



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108697907 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201780015429.X

(22)申请日 2017.01.05

(30)优先权数据

62/275378 2016.01.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2017/050019 2017.01.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/118985 EN 2017.07.13

(71)申请人 耶达研究及发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特邮箱95号

(72)发明人 I.沙沙尔 H.莱温斯基

L.拉多米尔 A.威纳

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 鲁炜

(51)Int.Cl.

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书3页 说明书55页 附图113页

(54)发明名称

用于治疗恶性疾病、自身免疫疾病和炎性疾病的组合物和方法

(57)摘要

公开了一种在受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的方法,前提条件是,所述恶性疾病不是B细胞恶性肿瘤。所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此治疗所述涉及T细胞耗竭的恶性疾病。也公开了一种在受试者中治疗自身免疫或炎性疾病的方法,所述方法包括给受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂。也公开了一种方法,其包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂,前提条件是,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂。

1. 一种在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的方法,前提条件是,所述恶性疾病不是B细胞恶性肿瘤,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此治疗所述涉及T细胞耗竭的恶性疾病。

2. 治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂用于在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的用途,前提条件是,所述恶性疾病不是B细胞恶性肿瘤。

3. 一种在有此需要的受试者中阻止或逆转T细胞耗竭的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,前提条件是,所述受试者没有被诊断出具有B细胞恶性肿瘤,由此阻止或逆转所述受试者中的T细胞耗竭。

4. 一种在有此需要的受试者中治疗自身免疫或炎性疾病的方法,所述方法包括给受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此治疗所述受试者中的自身免疫或炎性疾病。

5. 治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂用于在有此需要的受试者中治疗自身免疫或炎性疾病的用途。

6. 一种在有此需要的受试者中升高B调节细胞的活性或水平的方法,所述方法包括给受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此升高所述受试者中的B调节细胞的活性或水平。

7. 根据权利要求3所述的方法,其中所述受试者被诊断出具有恶性疾病。

8. 根据权利要求1或7所述的方法、或根据权利要求2所述的用途,其中所述恶性疾病是实体瘤。

9. 根据权利要求8所述的方法或用途,其中所述实体瘤选自:黑素瘤、肺癌、肾细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、结肠腺癌、纤维肉瘤、宫颈癌、食管癌、直肠癌、口腔癌、肝癌和胰腺癌。

10. 根据权利要求1或7所述的方法、或根据权利要求2所述的用途,其中所述恶性疾病包含T细胞恶性肿瘤或骨髓恶性肿瘤。

11. 根据权利要求6所述的方法,其中所述受试者被诊断出具有自身免疫或炎性疾病。

12. 根据权利要求4或11所述的方法、或根据权利要求5所述的用途,其中所述自身免疫或炎性疾病选自多发性硬化、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、关节炎和狼疮。

13. 根据权利要求4、11或12所述的方法、或根据权利要求5或12所述的用途,其中所述自身免疫或炎性疾病是慢性病症。

14. 根据权利要求4、11或12所述的方法、或根据权利要求5或12所述的用途,其中所述自身免疫或炎性疾病是急性病症。

15. 根据权利要求1、3、4或6中的任一项所述的方法、或根据权利要求2或5所述的用途,其中所述能够减少所述CD84的活性或表达的药剂是多核苷酸药剂。

16. 根据权利要求15所述的方法或用途,其中所述多核苷酸药剂选自反义物、siRNA、微RNA、核酶和DNA酶。

17. 根据权利要求1、3、4或6中的任一项所述的方法、或根据权利要求2或5所述的用途,其中所述能够减少所述CD84的活性或表达的药剂是抗体。

18. 根据权利要求17所述的方法或用途,其中所述抗体结合所述CD84的细胞外部分的至少一个表位。

19. 根据权利要求17或18所述的方法或用途,其中所述抗体是CD84中和抗体。

20. 根据权利要求1或3所述的方法、或根据权利要求2所述的用途,其中所述能够减少所述CD84的活性或表达的药剂下调所述T细胞上的程序性细胞死亡配体1 (PD-L1)、程序性细胞死亡1 (PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、淋巴细胞活化基因3 (Lag-3)、杀伤细胞凝集素样受体G1 (KLRG1)和/或2B4中的任一种的活性或表达。

21. 根据权利要求1或3所述的方法、或根据权利要求2所述的用途,其中所述治疗有效量的所述能够降低所述CD84的活性或表达的药剂造成所述T细胞耗竭的逆转,所述T细胞耗竭与所述T细胞的IL-2、IL-4、IFN γ 产生和/或CD107表达的增加有关。

22. 根据权利要求6所述的方法,其中所述升高B调节细胞的活性或水平表现为所述脾中增加的B调节细胞水平。

23. 根据权利要求6所述的方法,其中所述升高B调节细胞的活性或水平表现为所述B调节细胞的抗炎细胞因子产生的增加。

24. 根据权利要求23所述的方法或用途,其中所述抗炎细胞因子选自IL-10、TGF β -1和IL-35。

25. 根据权利要求6所述的方法,其中所述升高B调节细胞的活性或水平与所述B调节细胞对选自CD19、IL-10和CD1d的Breg标志物的表达的增加有关。

26. 根据权利要求6所述的方法,其中所述升高B调节细胞的活性或水平与B10 B调节细胞的增加有关。

27. 一种在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂,前提条件是,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此治疗所述涉及T细胞耗竭的恶性疾病。

28. 治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂用于在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的用途,前提条件是,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂。

29. 一种在有此需要的受试者中阻止或逆转T细胞耗竭的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂,前提条件是,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此阻止或逆转所述受试者中的T细胞耗竭。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述受试者被诊断出具有恶性疾病。

31. 根据权利要求27或30所述的方法、或根据权利要求28所述的用途,其中所述恶性疾病是B细胞恶性肿瘤。

32. 根据权利要求31所述的方法或用途,其中所述B细胞恶性肿瘤选自霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞性淋巴瘤、B-细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)/慢性淋巴样白血病(CLL)、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤、慢性粒细胞性白血病(CML)、结节外边缘区B细胞淋巴瘤-粘膜相关淋巴样组织淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、结节边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、毛细胞白血病、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞(Lymphoplasmocytic)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性成淋巴细胞性前B细胞白血病、浆细胞白血病、前B细胞白血病、早期前B细胞白血病和前-B急性成淋巴细胞样白血病。

33. 根据权利要求27或29所述的方法、或根据权利要求28所述的用途,其中所述能够降

低所述SLAMF1的所述活性或表达的药剂是多核苷酸药剂。

34. 根据权利要求33所述的方法或用途,其中所述多核苷酸药剂选自反义物、siRNA、微RNA、核酶和DNA酶。

35. 根据权利要求27或29所述的方法、或根据权利要求28所述的用途,其中所述能够降低所述SLAMF1的所述活性或表达的药剂是SLAMF1抗体。

36. 根据权利要求27或29所述的方法、或根据权利要求28所述的用途,其中所述能够降低所述SLAMF1的所述活性或表达的药剂下调所述T细胞上的程序性细胞死亡配体1 (PD-L1)、程序性细胞死亡1 (PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、淋巴细胞活化基因3 (Lag-3)、杀伤细胞凝集素样受体G1 (KLRG1) 和/或2B4的活性或表达。

37. 根据权利要求27或29所述的方法、或根据权利要求28所述的用途,其中所述治疗有效量的所述能够降低所述SLAMF1的活性或表达的药剂造成所述T细胞耗竭的逆转,所述T细胞耗竭与所述T细胞的IL-2、IL-4、IFN γ 产生和/或CD107表达的增加有关。

38. 根据权利要求1、3、4、6、27或29中的任一项所述的方法,所述方法进一步包括给所述受试者施用化学治疗剂、抗体免疫疗法和/或辐射疗法。

39. 根据权利要求2、5或28中的任一项所述的用途,其进一步包括化学治疗剂、抗体免疫疗法和/或辐射疗法的应用。

40. 根据权利要求1、3、4、6、27或29中的任一项所述的方法、或根据权利要求2、5或28中的任一项所述的用途,其中所述受试者是人受试者。

用于治疗恶性疾病、自身免疫疾病和炎性疾病的组合物和方法

[0001] 发明的领域和背景

本发明在其某些实施方案中涉及用于阻止或逆转T细胞耗竭、和用于增强B调节细胞的活性或水平、用于治疗恶性疾病、自身免疫疾病和炎性疾病的组合物和方法。

[0002] 存在不同类型的涉及B细胞分化的不同阶段的B细胞恶性肿瘤。例如，多发性骨髓瘤是由恶性浆细胞造成的疾病，而急性成淋巴细胞性白血病(ALL)是从淋巴前体细胞产生的恶性肿瘤，且伯基特淋巴瘤起源于生发中心B细胞。

[0003] 慢性淋巴细胞白血病(CLL)是西方世界最常见的白血病。该疾病的特征在于B淋巴细胞在外周血、淋巴样器官和骨髓中的进行性积累。该疾病的一个重要表现是免疫调节异常。CLL细胞是小的成熟的淋巴细胞，它们的进一步成熟为免疫球蛋白分泌细胞的能力显著受损。尽管具有B细胞受体和表达MHC II分子，但是它们是非常差的抗原呈递细胞。该疾病的标志是减少的细胞凋亡，从而导致恶性细胞的积累。在体内，CLL细胞的增殖和存活依赖于它们的微环境。

[0004] 骨髓(BM)基质在B-淋巴细胞生成中起重要作用，且可以为正常的B细胞和成熟的白血病B细胞提供存活环境。CLL细胞向BM基质细胞或向BM脉管系统的附着会挽救这些淋巴细胞免于细胞凋亡并延长它们的寿命。对于CLL，在组织中建立的复杂的细胞和分子背景(被统称为CLL微环境)为CLL克隆的繁殖提供信号，且实现原发性药物耐受性。另外，体外和体内研究表明，CLL细胞会在它们的环境中诱导变化，例如炎症性细胞因子环境、T细胞的耗竭表型、或具有免疫抑制活性的髓系细胞的分化。这些相互作用中的一些依赖于细胞-细胞接触，而其它通过趋化因子、生长因子和可能通过细胞外基质组分来介导。

[0005] SLAM家族受体由SLAMF1 (CD150)、SLAMF2 (CD48)、SLAMF3 (LY9)、SLAMF4 (2B4)、SLAMF5 (CD84)、SLAMF6 (Ly108/NTBA)、SLAMF7 (CRACC)、SLAMF8 (BLAME)和SLAMF9 (CD84H)组成，如图1所示。所述受体含有具有共有序列TxYxxI/V的基于免疫受体酪氨酸的转换基序(ITSM)。所述序列对SLAM相关蛋白(SAP)和/或尤因肉瘤相关的转录物2 (EAT-2)(在B细胞和巨噬细胞中)具有高亲和力。该家族中的两个成员SLAMF8和SLAMF9具有短的细胞内尾巴，该尾巴不具有酪氨酸基序。所述受体不具有配体，且在大多数情况下嗜同种相互作用调节它们的细胞的诱导的级联。SLAM家族受体在B细胞发育过程中差别地表达。

[0006] CD84(SLAM家族的受体的一个成员)在多种细胞上表达，所述细胞包括NK细胞、NKT细胞、B细胞、T细胞、单核细胞、血小板、树突细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞。发现CD84的水平在CLL患者中上调，且证实CD84的活化会导致存活级联，从而升高抗细胞凋亡的基因Bcl-2和Mcl-1 [Binsky-Ehrenreich I. et al., Oncogene (2014) 33: 1006-1016]。以前的结果表明，在CLL和它们的微环境上表达的CD84会介导导致抗细胞凋亡效应的相互作用，从而支持它们的存活[Marom等人(2016)提出]。CD84介导的细胞与细胞接触会导致来自CLL细胞的升高的CCL3表达和分泌。高表达CCL3、CCR1和CCR5的受体的基质细胞会结合分泌的趋化因子。CCL3会诱导基质细胞中的Bcl-2表达的上调，从而导致它们的存活。此外，CLL3诱导的级联导致细胞因子IL-6和IL-8 (在小鼠中的KC)的分泌，已知其支持CLL存活

[Binsky-Ehrenreich, I. 等人, *Oncogene* (2014) 33 (8): 1006-1016]。另外,在微环境中的CD84表达会调节体内CLL发病机制。在微环境中的细胞上表达的CD84的缺乏会延迟疾病发生和CLL细胞在BM隔室中的积累[Marom等人, 出处同上]。

[0007] SLAMF1(也称为CD150)在造血干细胞、B细胞、活化的T细胞、血小板和巨噬细胞上表达。它具有在它的细胞外区域中的202个氨基酸、22个氨基酸长度的疏水跨膜区域和77氨基酸细胞质区域。SLAMF1存在至少两种同种型,一种在细胞表面上表达,另一种是分泌型且缺少跨膜区域。以前已经发现,给人B细胞添加分泌的或转染的SLAMF1会上调这些细胞的生长和分化。以前已经证实,SLAMF1在自身免疫中具有作用。与健康对照相比,SLAMF1的表达在来自多发性硬化患者的T细胞上增加,从而提示在自身免疫中的作用。

[0008] 以前还证实SLAMF1在肿瘤中具有作用。在霍奇金淋巴瘤细胞系上的SLAMF1受体的连接导致AKT从细胞质向细胞核的运输,已知在此处AKT途径会促进细胞存活[Yurchenko M. 等人, *Exp Oncol* (2011) 33 (1): 9-18]。在CLL中,SLAMF1的过表达提示与正常B细胞相比通过CLL细胞中的SLAMF1实现的失调的信号传递[Schweighofer C. D. 等人, *PLoS One* (2011) 6 (12): e28277]。在多发性骨髓瘤患者中,发现SLAMF1就RNA表达与健康对照相比而言是多发性骨髓瘤细胞中的高表达基因。SLAMF1的另一个有趣特征是它在中枢神经系统的肿瘤上和在宫颈癌、食管癌、直肠癌和口腔癌中以及在皮肤基底细胞癌中的表达,其中这些肿瘤的正常组织相应物不表达所述受体。

[0009] 程序性细胞死亡1 (PD-1) 和程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 是被证实参与免疫应答的调节的细胞表面分子。PD-L1是PD1受体的配体。PD-L1在T细胞、B细胞、单核细胞、树突细胞(DC)、上皮细胞、内皮细胞和巨噬细胞上表达。PD-L1由290个氨基酸组成,具有一个跨膜结构域和一个短的细胞内结构域。在功能上,当结合T细胞上的PD-1时,已经将PD-L1描述为T细胞的免疫共抑制剂(参见图2)。膜结合的PD-1是由288个氨基酸组成的蛋白。它的结构由具有免疫球蛋白结构域的跨膜部分与具有ITIM和ITSM的细胞内部分组成。PD-L1/PD-1诱导的途径在T细胞耗竭的调节中具有重要作用。已经证实耗竭的T细胞过表达PD-1、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、淋巴细胞活化基因3 (Lag-3)、Tim-3、2B4、CD160和其它。

[0010] 以前已经证实,PD-1在CLL细胞上上调[Grzywnowicz, M. 等人, *PLoS One* (2012) 7 (4): e35178]。在Ep-TCL1 CLL模型小鼠中描述了PD-1在CD8⁺ T细胞上的过表达。这些细胞的效应子功能受影响,因为IFN γ 和CD107在这些T细胞上减少。已经在以下免疫学癌症中试验了使用抗-PD-L1或PD-1抗体的临床试验:晚期CLL、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、复发性霍奇金淋巴瘤、滤泡淋巴瘤和急性髓性白血病[Xia, Y. 等人, *Biochim Biophys Acta*, 印刷前的电子出版, 2015年10月16日]。还已经针对抗-PD-L1或PD-1抗体用实体瘤进行了临床试验,例如在黑素瘤、非小细胞肺癌和晚期肾细胞癌中[Xia, Y. 等人, (2015) 出处同上]。还已经在CLL的动物模型(Ep-TCL1小鼠模型)中试验了抗-PD-L1抗体治疗。这些结果表明脾中的T细胞的功能增加,其表现为PD-1、Lag-3、KLRG-1和2B4(都被描述为耗竭标志物)的表达减少,以及这些T细胞的功能性的增加,其表现为IL-2、IL-4和IFN γ 的增加以及CD8⁺ T细胞上的CD107(效应细胞细胞毒性的标志物)的增加[McClanahan, F. 等人, *Blood* (2015) 126 (2): 203-211]。

[0011] Lag-3存在于活化的T细胞和NK细胞上。Lag-3结合MHC-II(参见图2),且已经被证实会抑制CD4⁺ T细胞增殖和减少T细胞中的IL-4、IL-2、IFN γ 和TNF α 产生。目前,抗体对Lag3

的作用正在关于黑素瘤、肾细胞癌、乳腺癌和胰腺癌的临床试验中,其中在乳腺癌和肾癌中存在某种应答,而其它仍然在进行中(Sierro, Romero等人, 2011)。已经在癌症的小鼠模型中证实了一起阻断PD-1和Lag-3的组合效应,其中给小鼠注射黑素瘤、结肠腺癌和纤维肉瘤细胞系。与单独抗-PD-1或抗-Lag-3的治疗相比,在注射腺癌和纤维肉瘤的小鼠中的组合治疗是更有效的[Woo S.R. 等人, Cancer Res (2012) 72 (4): 917-927]。

[0012] CTLA-4是一种跨膜蛋白。它在活化的T细胞中强烈地诱导。它的配体是B7蛋白。PD-1、Lag-3和CTLA-4都已经被描述为T细胞的共抑制分子(参见图2)。已经将抗-CTLA4用在黑素瘤、前列腺癌、肾细胞癌和非霍奇金淋巴瘤的临床试验中[Ito A. 等人, Biomed Res Int (2015): 605478]。还已经试验了联合治疗。在黑素瘤中,抗-CTLA-4和PD-1的组合产生与用单独一种治疗患者相比更快速的且更深的临床肿瘤应答。

[0013] PCT公开号W02010/035259教导了CD84作为CLL细胞的存活所必需的调节剂蛋白。基于该发现,W02010/035259的发明人已经提示CD84作为B-CLL治疗的靶标和作为该疾病的标志物的应用。

[0014] PCT公开号W02015/118538提供了一种分离的包含抗原识别结构域的抗体,其特异性地结合CD84和(i)下调基质细胞在慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 细胞上的抗细胞凋亡活性;和/或(ii)诱导来自骨髓的CLL细胞的动员。

[0015] 另外的背景技术:

美国专利申请号20050027114公开了通过激动或拮抗CD84-样多肽的活性来治疗疾病(诸如慢性白血病)的方法。

[0016] 美国专利申请号20050025789公开了患者中的肿瘤的治疗或预防,其中使用表达共刺激性多肽(例如,CD84)的肿瘤细胞生产疫苗用于增加NK细胞的裂解活性。

[0017] 发明概述

根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了一种在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的方法,前提条件是,所述恶性疾病不是B细胞恶性肿瘤,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此治疗所述涉及T细胞耗竭的恶性疾病。

[0018] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂用于在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的用途,前提条件是,所述恶性疾病不是B细胞恶性肿瘤。

[0019] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了一种在有此需要的受试者中阻止或逆转T细胞耗竭的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,前提条件是,所述受试者没有被诊断出具有B细胞恶性肿瘤,由此阻止或逆转所述受试者中的T细胞耗竭。

[0020] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了一种在有此需要的受试者中治疗自身免疫或炎性疾病的方法,所述方法包括给受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此治疗所述受试者中的自身免疫或炎性疾病。

[0021] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂用于在有此需要的受试者中治疗自身免疫或炎性疾病的用途。

[0022] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了一种在有此需要的受试者中升高

B调节细胞的活性或水平的方法,所述方法包括给受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此升高所述受试者中的B调节细胞的活性或水平。

[0023] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了一种在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂,前提条件是,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此治疗所述涉及T细胞耗竭的恶性疾病。

[0024] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂用于在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的用途,前提条件是,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂。

[0025] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了一种在有此需要的受试者中阻止或逆转T细胞耗竭的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂,前提条件是,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此阻止或逆转所述受试者中的T细胞耗竭。

[0026] 根据本发明的一些实施方案,所述受试者被诊断出具有恶性疾病。

[0027] 根据本发明的一些实施方案,所述恶性疾病是实体瘤。

[0028] 根据本发明的一些实施方案,所述实体瘤选自黑素瘤、肺癌、肾细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、结肠腺癌、纤维肉瘤、宫颈癌、食管癌、直肠癌、口腔癌、肝癌和胰腺癌。

[0029] 根据本发明的一些实施方案,所述恶性疾病包含T细胞恶性肿瘤或骨髓恶性肿瘤。

[0030] 根据本发明的一些实施方案,所述恶性疾病是B细胞恶性肿瘤。

[0031] 根据本发明的一些实施方案,所述B细胞恶性肿瘤选自霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞性淋巴瘤、B-细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)/慢性淋巴样白血病(CLL)、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤、慢性粒细胞性白血病(CML)、结节外边缘区B细胞淋巴瘤- 粘膜相关淋巴样组织淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、结节边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、毛细胞白血病、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞(Lymphoplasmocytic)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性成淋巴细胞性前B细胞白血病、浆细胞白血病、前B细胞白血病、早期前B细胞白血病和前-B急性成淋巴细胞样白血病。

[0032] 根据本发明的一些实施方案,升高B调节细胞的活性或水平表现为所述脾中增加的B调节细胞水平。

[0033] 根据本发明的一些实施方案,升高B调节细胞的活性或水平表现为所述B调节细胞对抗炎细胞因子的生产的增加。

[0034] 根据本发明的一些实施方案,所述抗炎细胞因子选自IL-10、TGF β -1和IL-35。

[0035] 根据本发明的一些实施方案,升高B调节细胞的活性或水平与所述B调节细胞对选自CD19、IL-10和CD1d的Breg标志物的表达的增加有关。

[0036] 根据本发明的一些实施方案,升高B调节细胞的活性或水平与B10 B调节细胞的增加有关。

[0037] 根据本发明的一些实施方案,所述受试者被诊断出具有自身免疫或炎症性疾病。

根据本发明的一些实施方案,所述自身免疫或炎症性疾病选自多发性硬化、溃疡性结肠

炎、克罗恩氏病、关节炎和狼疮。

[0038] 根据本发明的一些实施方案,所述自身免疫或炎性疾病是慢性病症。

[0039] 根据本发明的一些实施方案,所述自身免疫或炎性疾病是急性病症。

[0040] 根据本发明的一些实施方案,所述能够降低CD84的活性或表达的药剂是多核苷酸药剂。

[0041] 根据本发明的一些实施方案,所述多核苷酸药剂选自反义物、siRNA、微RNA、核酶和DNA酶。

[0042] 根据本发明的一些实施方案,所述能够降低CD84的活性或表达的药剂是抗体。

[0043] 根据本发明的一些实施方案,所述抗体结合CD84的细胞外部分的至少一个表位。

[0044] 根据本发明的一些实施方案,所述抗体是CD84中和抗体。

[0045] 根据本发明的一些实施方案,所述能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂是多核苷酸药剂。

[0046] 根据本发明的一些实施方案,所述多核苷酸药剂选自反义物、siRNA、微RNA、核酶和DNA酶。

[0047] 根据本发明的一些实施方案,所述能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂是SLAMF1抗体。

[0048] 根据本发明的一些实施方案,所述能够降低CD84的活性或表达的药剂下调所述T细胞上的程序性细胞死亡配体1 (PD-L1)、程序性细胞死亡1 (PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、淋巴细胞活化基因3 (Lag-3)、杀伤细胞凝集素样受体G1 (KLRG1)和/或2B4的活性或表达。

[0049] 根据本发明的一些实施方案,治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂会造成T细胞耗竭的逆转,其与所述T细胞对IL-2、IL-4、IFN γ 的产生和/或CD107的表达的增加有关。

[0050] 根据本发明的一些实施方案,所述方法还包括给所述受试者施用化学治疗剂、抗体免疫疗法和/或辐射疗法。

[0051] 根据本发明的一些实施方案,所述受试者是人受试者。

[0052] 除非另有定义,在本文中使用的所有技术和/或科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的相同的含义。尽管与本文中描述的那些类似或等效的方法和材料可以用于实践或试验本发明的实施方案,下面描述了示例性的方法和/或材料。在冲突的情况下,以专利说明书(包括定义)为准。另外,所述材料、方法和实施例仅仅是示例性的,且无意成为必然地限制性的。

[0053] 附图简述

在本文中参考附图描述了本发明的一些实施方案,仅仅作为示例。现在详细地具体参考附图,应当强调,显示的细节是作为示例和用于示例性地讨论本发明的实施方案的目的。在这点上,结合附图做出的描述会使本领域技术人员明白可以如何实践本发明的实施方案。

[0054] 在附图中:

图1是SLAM家族受体和它们的配体的示意图。除了SLAMF8和SLAMF9以外,显示了在两种细胞上的所有SLAM家族受体。除了彼此结合的SLAMF2 (CD48)和SLAMF4 (2B4)以外,SLAM家

族受体都在不同的细胞上彼此结合。此外,它们的细胞内ITSM显示在该图中,SLAMF8和SLAMF9缺乏它(取自Cannons, Tangye等人, 2011)。

[0055] 图2是T细胞的共刺激/抑制的示意图。抗原呈递细胞通过表达许多配体而影响T细胞,所述配体在结合它们在T细胞上的受体后是共刺激性的(在箭头上的绿色点)或共抑制性的(在箭头上的红色点)。在这些中,PD-1、Lag-3和CTLA-4都是共抑制性的(在箭头上的红色点)。

[0056] 图3A-H的图解释了,在CD84活化以后,SLAMF1表达在微环境细胞和CLL细胞上升高。(图3A-C)将 1×10^5 个M210B4细胞与激动性的抗-CD84 (4 μ g/ml)或IgG1同种型对照(4 μ g/ml)抗体一起温育。(图3A) 24小时以后,收获细胞。纯化RNA,并通过qRT-PCR确定SLAMF1 mRNA (n=5,双尾比例配对T检验, *P<0.05)。(图3B-C) 48小时以后,通过流式细胞计量术确定SLAMF1的蛋白水平(图3B) (n=6,双尾比例配对T检验, *P<0.05)。代表性直方图显示在图3C中,其中CD84刺激的样品为黑色,且对照为浅灰色。(图3D-E)将NLC (图3D)或从BM抽吸物长成的BM基质细胞(图3E)与激动性的抗-CD84 (4 μ g/ml)或IgG1同种型对照(4 μ g/ml)抗体一起温育。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并通过qRT-PCR确定SLAMF1 mRNA (n=1)。(图3F-H)将 1×10^7 个CLL细胞与激动性的抗-CD84 (4 μ g/ml)或IgG1同种型对照(4 μ g/ml)抗体一起温育。(图3F) 24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并通过qRT-PCR确定mRNA水平(n=5,双尾比例配对T检验, *P<0.05) (图3G-H) 48小时以后,通过流式细胞计量术确定SLAMF1的蛋白水平(n=6,双尾比例配对T检验, *P<0.05)。代表性直方图显示在图3H中,其中CD84刺激的样品为黑色,且对照为浅灰色。

[0057] 图4A-E的图解释了,SLAMF1在从CLL患者衍生出的BM中和在来自E μ -TCL1转基因小鼠的TCL细胞上过表达。(图4A)从来自经证实的健康骨髓或CLL患者的骨髓的骨髓抽吸物接种骨髓基质细胞。收获以后,使它们生长3周并针对SLAMF1表达进行染色,获得健康患者(显示在图4B中)和CLL患者(在图4C中)的代表性直方图,其中患者染色显示为黑色,同种型对照显示为浅灰色(n=3-6,双尾T检验, **p<0.01)。(图4D)从患病的E μ -TCL1转基因小鼠的胫骨和股骨冲洗出TCL细胞和B细胞,并通过染色针对SLAMF1表达进行对比,其中使用流式细胞计量术,获得代表性直方图(显示在图4E中),其中TCL显示为黑色,B220群体显示为浅灰色(n=3,双尾T检验, *p<0.05)。

[0058] 图5的图解释了,基质细胞当与CLL细胞接触时增加它们的SLAMF1的表达。将 1×10^5 个M210B4细胞铺板在24孔板中,24小时以后,将 1.6×10^6 个CLL细胞接种在粘连层的上面。48小时以后,将CLL洗掉,并将基质细胞收获和在流式细胞计量术中针对SLAMF1表达进行染色(n=4, *p<0.05)。

[0059] 图6A-B的图解释了在过继转移模型中TCL群体的发育。给C57BL/6小鼠注射 4×10^7 个TCL-1脾细胞。(图6A)在不同天,取来自尾静脉的血液并针对CD5+B220+ 群体染色(n=6-10)。(图6B)在过继转移实验的第47天将动物处死,并确定脾、BM和PB中的CD5+B220+ 群体(n=6)。

[0060] 图7A-D的图解释了,CD84支持体内TCL-1细胞的维持。将TCL-1脾细胞(4×10^7)静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-}小鼠。(图7A-D) 14天以后,将小鼠处死,并通过(图7A)外周血(n=21, ****p<0.0001)、(图7B)脾(n=14, ****p=0.0001)、(图7C)腹膜(n=16, ****p<0.0001)和(图7D)骨髓(n=14, ****p<0.0001)中的流式细胞计量术测量每个隔室中

的恶性的CD5/B220细胞群体的数目。

[0061] 图8A-I的图解释了,SLAMF1表达在TCL1-E μ CLL模型小鼠中被体内CD84调节。(图8A-B)将TCL-1脾细胞(4×10^7)静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84 $^{-/-}$ 小鼠的尾静脉中。14天以后,将小鼠处死,并在BM中确定表达CD5/B220 SLAMF1的TCL细胞或表达B220 SLAMF1的B细胞的数目,并通过流式细胞计量术分析腹膜。(图8A)腹膜(n=4, **p<0.01)具有图8B中的代表性直方图,将CD84 $^{-/-}$ TCL显示为黑色曲线,并将野生型显示为浅灰色,(图8C)骨髓(n=4, **p=0.01)具有图8D中的代表性直方图,将CD84 $^{-/-}$ TCL显示为黑色曲线,并将野生型显示为浅灰色。(图8E)给动物注射 4×10^7 个TCL-1脾细胞,并从第2天开始用1 mg/kg体重的B4或同种型对照抗体静脉内治疗。14天以后,将小鼠处死,并在BM中确定表达CD5/B220 SLAMF1的TCL细胞或表达B220 SLAMF1的B细胞的数目,并通过流式细胞计量术分析腹膜(n=4, *p<0.05 **p<0.01),获得(图8F)腹膜和(图8G)骨髓的代表性直方图,将CD84 $^{-/-}$ TCL显示为黑色曲线,并将野生型显示为浅灰色。(图8H)将从野生型或CD84 $^{-/-}$ 动物(注射了 4×10^7 个TCL-1脾细胞)收获的骨髓基质细胞培养3周直到汇合,并用流式细胞计量术测量SLAMF1表达。代表性直方图显示在图8I中,将CD84 $^{-/-}$ TCL显示为黑色曲线,并将野生型显示为浅灰色(n=5-6)。

[0062] 图9A-J的图解释了,SLAMF1的下调会诱导CLL细胞死亡。(图9A-C)将 2×10^6 个CLL细胞与10 μ g/ml拮抗抗-SLAMF1一起温育24小时并用膜联蛋白V和7AAD染色,获得图9B-C中的代表性简图(n=3, **p<0.01)。(图9D-E)将 0.625×10^5 或 0.5×10^5 个M210B4接种至70%汇合,24小时以后,加入siCTRL或siSLAMF1,并将细胞电穿孔。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并通过qRT-PCR确定SLAMF1的mRNA水平(图9D) (n=3, *p<0.05)。48小时以后,收获细胞,并通过流式细胞计量术确定SLAMF1的蛋白水平(图9E) (n=7, **p<0.01)。(图9F-J)将 0.625×10^5 或 0.5×10^5 个M210B4铺板至70%汇合,24小时以后,加入siCTRL或siSLAMF1并将细胞电穿孔。另外24小时以后,将 1.6×10^6 个CLL细胞接种在电穿孔的层的上面。将细胞共培养48小时,此后通过流动池计量术通过膜联蛋白V和7AAD染色确定CLL细胞的细胞存活。显示了CLL细胞的细胞存活(图9F)和细胞死亡(图9G)。代表性图显示在图9H-J中(n=3-6, ***p<0.001, *p<0.05)。

[0063] 图10A-B的图解释了,用SLAMF1刺激M210B4会增加Bcl-2和PD-L1。将 1×10^5 个M210B4细胞与激动性的抗-SLAMF1抗体(10 μ g/ml)或同种型对照大鼠IgG1一起温育72小时。纯化RNA,并通过qRT-PCR测量Bcl-2(图10A)或PD-L1(图10B)的mRNA表达(n=1)。

[0064] 图11A-B的图解释了在多发性骨髓瘤中CD84对SLAMF1的调节。(图11A)将来自骨髓抽吸物的多发性骨髓瘤细胞与激动性的抗-CD84抗体(4 μ g/ml)或IgG1, k同种型对照(4 μ g/ml)一起温育。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并用qRT-PCR确定SLAMF1的mRNA水平(n=1)。(图11B)从来自经证实的健康骨髓或CLL患者的骨髓的骨髓抽吸物接种骨髓基质细胞。收获以后,使它们生长3周直到汇合,并针对SLAMF1表达进行染色(n=1)。

[0065] 图12A-D的图解释了,CD84可能在其它B细胞恶性肿瘤中调节SLAMF1。(图12A-B)将 1×10^7 个697或REH细胞(急性成淋巴细胞性白血病细胞系)与激动性的抗-CD84(4 μ g/ml)或IgG1同种型对照(4 μ g/ml)一起温育。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并用qRT-PCR确定SLAMF1的mRNA水平(n=2)。(图12C-D)将 1×10^7 个Ramos或Daudi细胞(伯基特淋巴瘤细胞系)与激动性的抗-CD84抗体(4 μ g/ml)或IgG1, k同种型对照(4 μ g/ml)一起温育。24小时以

后,收获细胞,纯化RNA,并用qRT-PCR确定SLAMF1的mRNA水平 (n=3)。

[0066] 图13A-H的图解释了,在CD84活化以后,PD-L1在微环境细胞和CLL细胞上升高。(图13A-C) 将 1×10^5 个M210B4细胞与激动性的抗-CD84 (4 μ g/ml) 或IgG1同种型对照 (4 μ g/ml) 抗体一起温育。(图13A) 24小时以后,收获细胞。纯化RNA,并通过qRT-PCR确定PD-L1 mRNA (n=5,双尾比例配对T检验,*P<0.05。(图13B-C) 48小时以后,通过流式细胞计量术确定PD-L1的蛋白水平 (图13B) (n=6,双尾比例配对T检验,*P<0.05)。代表性直方图显示在图13C中,其中CD84刺激的样品为黑色,且对照为浅灰色。(图13D-E) 将NLC (图13D) 或从BM抽吸物长成的BM基质细胞 (图13E) 与激动性的抗-CD84 (4 μ g/ml) 或IgG1同种型对照 (4 μ g/ml) 抗体一起温育。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并用qRT-PCR确定PD-L1 mRNA (n=1)。(图13F-H) 将 1×10^7 个CLL细胞与激动性的抗-CD84 (4 μ g/ml) 或IgG1同种型对照 (4 μ g/ml) 抗体一起温育。(图13F) 24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并通过qRT-PCR确定mRNA水平 (n=3,双尾比例配对T检验,*P<0.05 (图13G-H)。48小时以后,通过流式细胞计量术确定PD-L1的蛋白水平 (n=4,双尾比例配对T检验,*P<0.05)。代表性直方图显示在图13H中,其中CD84刺激的样品为黑色,且对照为浅灰色。

[0067] 图14A-E的图解释了,CD84负调节CLL中的PD-1,但是在骨髓基质细胞中不会。(图14A-B) 使骨髓基质细胞从经证实的健康患者的骨髓抽吸物生长大约3周直到汇合,并与激动性的抗-CD84抗体 (4 μ g/ml) 或IgG1同种型对照 (4 μ g/ml) 一起温育。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并用qRT-PCR确定PD-1的mRNA水平 (n=1)。48小时以后,通过流式细胞计量术确定PD-L1的蛋白水平 (图14A-B) (n=3)。(图14C-E) 将 1×10^7 个CLL细胞与激动性的抗-CD84抗体 (5 μ g/ml) 或IgG1, k同种型对照 (4 μ g/ml) 一起温育。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并用qRT-PCR确定PD-1的mRNA水平 (n=3,双尾比例配对T检验,**P<0.01.)。48小时以后,通过流式细胞计量术确定PD-L1的蛋白水平 (图14D-E) (n=2)。代表性直方图显示在图14E中,其中CD84刺激的样品为黑色,且对照为浅灰色。

[0068] 图15A-J的图解释了,PD-L1表达在TCL1-E μ CLL模型小鼠中受体内CD84调节。(图15A-G) 将TCL-1脾细胞 (4×10^7) 静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-} 小鼠的尾静脉中。14天以后,将小鼠处死,并在外周血、脾中确定表达CD5/B220 PD-L1的TCL细胞的数目,并通过流式细胞计量术分析腹膜。(图15A,B) 外周血 (n=6-7,双尾T检验,**p<0.01) (图15C-D) 脾 (n=6-7,双尾T检验,*p<0.05, **p=0.01) (图15E-G) 腹膜 (n=3-5,双尾T检验,**p<0.01),获得在图15G中的腹膜的代表性直方图,将CD84^{-/-} TCL显示为黑色曲线,并将野生型显示为浅灰色。(图15H) 给动物注射 4×10^7 个TCL-1脾细胞,并从第2天开始用1 mg/kg体重的B4或同种型对照抗体静脉内治疗。14天以后,将小鼠处死,并在腹膜中确定表达CD5/B220 PD-L1的TCL细胞的数目,并通过流式细胞计量术分析 (n=4, 双尾T检验**p<0.01)。(图15I-J) 使从野生型或CD84^{-/-} 动物 (注射了 4×10^7 个TCL-1脾细胞) 收获的骨髓基质细胞生长3周直到汇合,并用流式细胞计量术测量PD-L1表达 (n=6-8),获得在图15J中的BM基质细胞的代表性直方图,将从CD84^{-/-}收获的细胞显示为黑色曲线,并将野生型显示为浅灰色。

[0069] 图16A-B的图解释了,PD-1表达受体内CD84调节。(图16A-B) 将TCL-1脾细胞 (4×10^7) 静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-} 小鼠的尾静脉。28天以后,将小鼠处死,并通过流式细胞计量术在腹腔中确定表达CD5/B220 PD-L1的TCL细胞的数目 (n=4-5,双尾T检验,**p<0.01),获得图16B中的腹膜的代表性直方图,将CD84^{-/-} TCL显示为黑色曲线,并将

野生型显示为浅灰色。

[0070] 图17A-K的图解释了在TCL上的PD-L1的减少以后,在T细胞上的耗竭标志物的减少。(图17A-C)将TCL-1脾细胞(4×10^7)静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-}小鼠的尾静脉。14天以后,将小鼠处死,收获脾,并通过流式细胞计量术确定表达PD-1 (图17A)和Lag-3 (图17B)的CD3⁺CD8⁺ T细胞的数目(n=2)。在外周血中确定CTLA-4的数目(图17C),因为在2个独立实验中在脾中没有看到染色(n=6-7,单尾T检验* $p < 0.05$)。(图17D-F)将TCL-1脾细胞(4×10^7)静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-}小鼠的尾静脉。14天以后,将小鼠处死,收获来自腹腔的细胞,并通过流式细胞计量术确定表达PD-1 (图17D)、Lag-3 (图17F)和CTLA-4 (图17H)的CD3⁺CD8⁺ T细胞的数目(n=4-5,单尾T检验* $p < 0.05$),CD3⁺CD8⁺ T细胞PD-1 (在图17E中)、Lag-3 (在图17G中)和CTLA-4 (在图17I中)的代表性直方图将CD84^{-/-} T细胞显示为黑色曲线,并将野生型显示为浅灰色。(图17J-K)将TCL-1脾细胞(4×10^7)静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-}小鼠的尾静脉。14天以后,将小鼠处死,并通过流式细胞计量术在淋巴结中确定表达CD5/B220 PD-L1的TCL细胞的数目(图17J) (n=4-5)。相反,通过流式细胞计量术在相同器官中确定在CD3⁺CD4⁺和CD3⁺CD8⁺ T细胞上的CTLA-4、Lag-3和PD-1的表达(图17K) (n=4-5)。

[0071] 图18A-F的图解释了,6个月龄的嵌合TCL-CD84^{-/-}小鼠表现出在TCL上的降低的PD-L1水平,和相反,在T细胞上减少的PD-1。(图18A-D)将源自8周龄TCL-1小鼠或阴性对照同胞仔(野生型)的BM细胞(5×10^6)注射进致命地照射的C57BL/6(野生型)或CD84缺陷型(CD84^{-/-})小鼠中。(图18A, 18C) 6个月以后,处死小鼠,收获来自脾和腹腔的细胞,并在腹膜(图18A)和脾(图18C)中针对PD-L1表达来分析恶性的CD5+B220细胞(n=3-4,双尾T检验,* $p < 0.05$)。(图18B, 18D)将源自8周龄TCL-1小鼠或阴性对照同胞仔(野生型)的BM细胞(5×10^6)注射进致命地照射的C57BL/6(野生型)或CD84缺陷型(CD84^{-/-})小鼠中。6个月以后,处死小鼠,收获来自脾和腹腔的细胞,并在腹膜(图18A)和脾(图18C)中针对PD-1表达来分析CD3⁺CD4⁺或CD3⁺CD8⁺ T细胞(n=3-4,双尾T检验,* $p < 0.05$)。(图18E-F)收获未注射的小鼠用于腹腔(图18E)和脾(图18F)中的CD3⁺CD4⁺或CD3⁺CD8⁺ T细胞以及CTLA-4、Lag-3和PD-1的表达以观察表达的基本状态。

[0072] 图19A-B的图解释了来自注射了CD84^{-/-} TCL的小鼠的T细胞的功能性增加。(图19A-B)将TCL-1脾细胞(4×10^7)静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-}小鼠的尾静脉。14天以后,将小鼠处死,收获脾,并通过使用B220珠子滤出B细胞来回收T细胞。为了活化T细胞,将它们在CD3和CD28包被的平板上进一步温育24小时。纯化RNA,并用qRT-PCR确定IL-4 (图19A)和IFN γ (图19B)的mRNA水平(n=3-4, $p = 0.15$)。

[0073] 图20A-F的图解释了在CLL患者的骨髓基质细胞上增加的PD-L1、以及CD84表达。(图20A-F)从来自经证实的健康骨髓、CLL患者或多发性骨髓瘤患者的骨髓的骨髓抽吸物接种骨髓基质细胞。收获以后,使它们生长3周,并染色用于PD-L1表达(图20A)或CD84表达统计(图20D)。健康患者(显示在图20B中)和CLL患者(在图20C中)的PD-L1的代表性直方图,以及健康患者(显示在图20E中)和CLL患者(在图20F中)的CD84的代表性直方图,其中将患者染色显示为黑色,同种型对照显示为浅灰色(n=3-6,双尾T检验,** $p < 0.01$)。

[0074] 图21A-B的图解释了在多发性骨髓瘤中CD84对PD-L1的调节。(图21A-B)将来自骨髓抽吸物的多发性骨髓瘤细胞与激动性的抗-CD84抗体(4 μ g/ml)或IgG1同种型对照(4 μ g/

m1) 一起温育。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并用qRT-PCR确定PD-L1 (图21A) 或PD-1 (图21B) 的mRNA水平 (n=1)。

[0075] 图22A-F的图解释了,CD84可能调节在其它B细胞恶性肿瘤中的PD-L1/PD-1。(图22A-D) 将 1×10^7 个Ramos或Daudi细胞(伯基特淋巴瘤细胞系)与激动性的抗-CD84 (4 μ g/ml) 或IgG1同种型对照抗体(4 μ g/ml) 一起温育。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并用qRT-PCR确定Ramos (图22A) 和Daudi (图22C) 的PD-L1的mRNA水平,或Ramos (图22B) 和Daudi (图22D) 的PD-1的mRNA水平 (n=2-4)。(图22E-F) 将 1×10^7 个697或REH细胞(急性成淋巴细胞性白血病细胞系)与激动性的抗-CD84抗体(4 μ g/ml) 或IgG1, k同种型对照(4 μ g/ml) 一起温育。24小时以后,收获细胞,纯化RNA,并用qRT-PCR确定PD-L1的mRNA水平 (n=2)。

[0076] 图23 A-G的图解释了,CD84的活化导致升高的PD-L1表达。用5 μ g/ml CD84刺激源自患者或CLL模型小鼠E μ -TCL1的CLL细胞,并使用PD-L1和PSMB的引物通过RT-PCR纯化以后在mRNA上检查PD-L1水平 (n=3) (*p<0.05) (图23A),并通过流式细胞计量术检查蛋白水平 (n=4) (*p<0.05) (图23A-B)。将源自人CLL (n=4) 和健康患者 (n=4) (*p<0.05) (图23C) 或E μ -TCL1 (n=5) 和健康 (n=5) 小鼠 (*p<0.05) (图23D) 的骨髓基质细胞收获并培养至汇合,并检查它们的PD-L1的基础水平。用4 μ g/ml CD84刺激M210B4,并使用PD-L1和L32的引物通过RT-PCR在mRNA水平进行分析 (n=5) (*p<0.05) (图23E),或通过流式细胞计量术在蛋白水平进行分析 (n=6) (**p<0.01) (图23E)。将源自健康患者或CLL患者的骨髓基质细胞(图23F) 或源自CLL患者的单核细胞(图23G) 用4 μ g/ml CD84刺激,纯化,并使用PSMB作为持家基因通过RT-PCR在mRNA上进行分析 (n=3) (*p<0.05)。

[0077] 图24A-C的图解释了,细胞表面CD84的活化通过pAKT和mTOR升高PD-L1水平。(图24A) 将 1×10^5 个细胞在24孔板中用CD84 (4 μ g/ml, SCBT) 刺激30分钟,随后用抗-FAB交联5分钟。此后裂解,在12%wt/vol SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离,并用抗-phosphoS6、抗-phosphoAKTt、抗-phosphoERK和肌动蛋白作为持家基因进行印迹。显示了三个实验的代表印迹。(图24B-C) 将 1×10^5 个细胞在24孔板中用CD84 (4 μ g/ml, SCBT) 刺激20分钟,随后用抗-FAB交联5分钟。此后固定,并用BD生物科学药剂盒渗透化处理,针对抗-pAKT (细胞信号传递) 和抗-兔第二APC抗体染色。

[0078] 图25A-I的图解释了在源自CD84^{-/-}小鼠的TCL-1细胞上的减少的体内PD-L1表达。将TCL-1脾细胞(4×10^7) 静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-}小鼠的尾静脉中。14-21天以后,将小鼠处死,并通过流式细胞计量术在外周血 (n=8-10, ***p<0.001) (图25A, 25E)、脾 (n=12-14, ****p<0.001) (图25B)、腹膜 (n=6-10, ****p<0.001) (图25C)、BM (n=7-10, ****p<0.0001) (图25D) 和淋巴结 (n=7-8, ns p=0.9893) (图25F) 中确定在CD5/CD19 TCL细胞上的PD-L1表达。显示了来自外周血的代表性直方图。(图25G) 给动物注射 4×10^7 个TCL-1脾细胞,并从第2天开始用1 mg/kg体重的B4或同种型对照抗体静脉内治疗。14天以后,处死小鼠,并在来自腹膜的TCL1细胞上确定PD-L1表达 (n=4, **p<0.01)。(图25H-I) 将源自8-周龄TCL-1小鼠或阴性对照同胞仔(野生型)的BM细胞(5×10^6) 注射进致命地照射的C57BL/6(野生型)或CD84-缺陷型(CD84^{-/-}) 小鼠中。6个月以后,杀死小鼠,并在腹膜(图25H) 和脾(图25I) 中确定在TCL1细胞上的PD-L1表达 (n=3-4, *p<0.05)。

[0079] 图26A-G的图解释了在注射鼠CLL的CD84^{-/-}小鼠中在微环境上减少的体内PD-L1表达。将TCL-1脾细胞(4×10^7) 静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-}小鼠的尾静脉中。14-21

天以后,将小鼠处死,并在骨髓基质细胞 ($n=9-10$, $**p<0.01$) (图26A) (具有代表性直方图 (图26B))、巨噬细胞 ($n=9-10$, $n=5-6$, $**p<0.01$) (图26C, 26E) 和树突细胞 ($n=9-10$, $n=6$, $**p<0.01$) (图26D, 26F) (在骨髓和脾中) 和单核细胞 (在外周血中) ($n=7-9$, $****p<0.001$) (图26G) 上确定PD-L1的表达。

[0080] 图27A-H的图解释了,注射了鼠CLL的CD84^{-/-}小鼠表现出更少的耗竭的CD8 T细胞。将TCL-1脾细胞 (4×10^7) 静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-}小鼠的尾静脉中。14-21天以后,将小鼠处死,并在脾 ($n=6-11$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.001$) (图27A-B)、外周血 ($n=5-11$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$) (图27C)、腹腔 ($n=6-10$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$) (图27D) 和骨髓 ($n=4-7$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$) (图27E) 上确定耗竭标志物PD-1、Lag-3、CTLA-4、2B4和KLRG1在CD4 (s4) 和CD8上的表达。还从脾收集细胞并用抗-CD3 (Biolegend) 培养24小时,最后2小时用布雷菲德菌素-A培养。然后收获这些细胞,并针对IFN γ 和IL-2 (s4) 的表达检查CD4 T细胞,针对IFN γ 、IL-2颗粒蛋白酶B和LAMP-1的表达检查CD8 T细胞 ($n=7-8$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $ns\ p=0.3172$) (图27F-G)。将源自8-周龄TCL-1小鼠或阴性对照同胞仔(野生型)的BM细胞 (5×10^6) 注射进致命地照射的C57BL/6(野生型)或CD84-缺陷型(CD84^{-/-})小鼠中。6个月以后,杀死小鼠,并在腹膜和脾中确定在CD8 (图27H) 和CD4 (s4) T细胞上的PD-1表达 ($n=3-4$, $*p<0.05$)。

[0081] 图28A-C的图解释了,没有鼠CLL的CD84^{-/-}小鼠不具有CD8 T细胞功能性的差异。从脾收获细胞并用抗-CD3 (Biolegend) 培养24小时,最后2小时用布雷菲德菌素-A培养。针对耗竭标志物:PD-1、Lag-3、CTLA-4、2B4、KLRG-1 ($n=5-7$, $ns\ p=0.9508$, $ns\ p=0.7836$, $ns\ p=0.3026$, $ns\ p=0.8253$, $ns\ p=0.9909$) (图28A, 28C) 和细胞因子/细胞毒性标志物:IFN γ 、IL-2、颗粒蛋白酶B和LAMP-1 ($n=5-7$, $ns\ p=0.6461$, $ns\ p=0.7897$, $ns\ p=0.8740$, $ns\ p=0.8495$) (图28B) 将CD8 T细胞染色。

[0082] 图29A-F的图解释了,人CLL中CD84的破坏会减少CLL和基质上的PD-L1,以及诱导更少的耗竭的T细胞。将CLL细胞用siCD84 (Dharmacon) 处理24小时,并检查CD84 ($n=4$, $*p<0.05$) (图29A) 和PD-L1 ($n=4$, $***p<0.001$) (图29B) 的量。此后,将这些细胞与源自相同患者的M210B4或T细胞一起温育。将M210B4细胞针对它们的PD-L1的量染色 ($n=3$, $**p<0.01$) (图29C)。将T细胞针对CD4和CD8以及耗竭标志物PD-1、LAG-3和CTLA-4染色 ($n=2$) (图29D-F)。

[0083] 图30A-D的图解释了,CD84的活化会诱导多发性骨髓瘤(MM)中的PD-L1表达。(图30A-B) 将源自人MM ($n=3$) 和健康患者 ($n=4$) ($**p<0.01$, $*p<0.5$) 的骨髓基质细胞收获并培养至汇合,并针对它们的CD84和PD-L1的基础水平进行检查。(图30C) 将源自人MM的骨髓基质细胞收获并培养至汇合,此后用4 μ g/ml CD84刺激并使用PD-L1和PSMB的引物作为持家基因通过RT-PCR在mRNA水平上分析 ($n=3$) ($*p<0.05$),或通过流式细胞计量术在蛋白水平上分析 ($n=3$) ($*p<0.05$)。(图30D) 将骨髓抽吸物衍生的人MM (CD138+, CD38+) 用5 μ g/ml CD84刺激,并使用PD-L1和PSMB的引物作为持家基因通过RT-PCR在mRNA水平上分析 ($n=5$) ($**p<0.01$) (24小时),或通过流式细胞计量术在蛋白水平上分析 ($n=3$) ($*p<0.05$) (48小时)。

[0084] 图31A-E的图解释了,MM嵌合的CD84^{-/-}表明减少的PD-L1表达并表现出更少耗竭

的T细胞。将CD84^{-/-}或野生型小鼠致命地照射,并将它们的骨髓与C57BL/Kalwrij骨髓重构,此后注射5TGM1 MM细胞系。(图31A)在骨髓中的MM细胞表明在缺乏CD84的微环境中减少的PD-L1表达(n=4)。(图31B-C) CD8⁺ T细胞表现出显著减少的PD-1、Lag-3、CTLA-4、2B4和KLRG-1 (n=3-4, **p=0.01, *p<0.05) (图31B)以及增加的细胞因子和细胞毒性因子(图31C) (n=3-4)。(图31D-E) CD4⁺ T细胞表现出减少的PD-1、Lag-3、CTLA-4、2B4和KLRG-1 (n=3-4, **p=0.01, *p<0.05) (图31D)以及增加的细胞因子和细胞毒性因子(图31E) (n=3-4)。

[0085] 图32A-B的图解释了针对CD34和CD45染色的、从人骨髓抽吸物(图32A)和冲洗出的小鼠胫骨股骨(图32B)长成的原代基质细胞,表明它们属于非造血起源。

[0086] 图33的图解释了淋巴结中的CD8 T细胞耗竭标志物(n=3-8, ns p = 0.1738, ns p = 0.4895, ns p = 0.8798, ns p = 0.9190, ns p = 0.4381)。

[0087] 图34A-B的图解释了在膜联蛋白-V上阳性的TCL (CD19, CD5阳性的)细胞,和7AAD阴性细胞,和PD-L1的单独活细胞表达(n=2-4, **p<0.01, *p<0.05)。

[0088] 图35A-F的图解释了,注射了鼠CLL的CD84^{-/-}小鼠表现出更少耗竭的CD4 T细胞。将TCL-1脾细胞(4×10^7)静脉内注射进C57BL/6野生型或CD84^{-/-}小鼠的尾静脉中。14-21天以后,将小鼠处死,并在以下部位在CD4上确定耗竭标志物PD-1、Lag-3、CTLA-4、2B4和KLRG1的表达:脾(n=6-11, ns p = 0.1664, *p<0.05, *p<0.05, **p<0.01) (图35A);外周血(n=5-11, ns p = 0.3124, *p<0.05, ns p = 0.5285, *p<0.05, *p<0.05) (图35B);腹腔(n=6-10, **p<0.01, *p<0.05, *p<0.05, *p<0.05, **p<0.01) (图35C);和骨髓(n=4-7, ns p = 0.0900, *p<0.05, ns p = 0.6569, *p<0.05, **p<0.01) (图35D)。从脾收集细胞并用抗-CD3 (Biolegend)培养24小时,最后2小时用布雷菲德菌素-A培养。然后将这些细胞收获,并针对IFN γ 和IL-2的表达检查CD4 T细胞(n=7-8, *p<0.05, ns p = 0.3172) (图35E)。将源自8-周龄TCL-1小鼠或阴性对照同胞仔(野生型)的BM细胞(5×10^6)注射进致命地照射的C57BL/6(野生型)或CD84^{-/-}缺陷型(CD84^{-/-})小鼠中。6个月以后,杀死小鼠,并在CD4上确定PD-1的表达(图35F) (n=3-4, *p<0.05)。

[0089] 图36A-B的图解释了,与用siCD84处理过的CLL一起共培养的M210B4细胞表现出降低的CD84水平(n=3, *p<0.05) (图36A)。在共培养之前,将CLL细胞用珠子(抗-CD19珠子, Miltenyl)纯化并确定仅含有CLL细胞(图36B),此后用针对CD84的siRNA处理。

[0090] 图37A-B的图解释了MM嵌合的小鼠。将CD84^{-/-}或野生型小鼠致命地照射,并将它们的骨髓与C57BL/Kalwrij骨髓重构,此后注射5TGM1 MM细胞系。显示了注射的小鼠和野生型之间的对比,清楚地显示了MM细胞。

[0091] 图38的图解释了CD84在急性DSS诱导的结肠炎中的作用。将小鼠通过它们的饮用水用2%DSS处理5天,并然后接受正常水4-7天,或直到实验结束。每天将小鼠称重以监测疾病进展。该图显示了野生型小鼠相对于CD84敲除的小鼠的重量变化百分比。条显示了SEM。

[0092] 图39的图解释了CD84在慢性DSS诱导的结肠炎中的作用。将野生型和CD84^{-/-}小鼠用2个周期的2%DSS处理。第一个周期是从第0天至第5天,随后10天用水恢复。在第15天提供第二个DSS周期另外5天,随后是常规饮用水。每天监测重量以监测疾病进展。图显示了野生型小鼠相对于CD84敲除的小鼠的重量变化。条显示了SEM。

[0093] 图40A-D的图解释了,CD84影响结肠炎中的调节性B细胞群体。将野生型和CD84^{-/-}

小鼠通过它们的饮用水用2%DSS处理5天,随后用正常水直到实验结束。在第10天处死小鼠,并收获它们的脾和肠系膜淋巴结 (MLN)。将B细胞使用b220⁺ 珠子富集并用LPS⁺ PIM (PMA、离子霉素和莫能星)活化5或24小时。针对Breg子集进行FACS分析。总Breg:CD19⁺,IL-10⁺; B10:CD19⁺,IL-10⁺,CD1d^{hi},CD5⁺;Mz:CD19⁺,IL-10⁺,CD24⁺,CD21⁺,CD23⁻;T2-MzP:CD19⁺,IL-10⁺,CD24⁺,CD21⁺,CD23⁺。(图40A)脾群体,活化5小时。(图40B) MLN群体,活化5小时。(图40C)脾群体,活化24小时。(图40D) MLN群体,活化24小时。每个点代表生物学重复,条指示SEM。Ns p> 0.01,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001,*****p<0.00001。

[0094] 图41A-F的图解释了CD84在EAE中的作用。给小鼠在尾骨附近皮下注射在弗氏完全佐剂中的MOG肽,随后在第0和2天腹腔内注射百日咳毒素。将小鼠每天评分(图41A)和每2天称重(图41B)。在第27天,将来自每组的2只小鼠处死,并在5小时(图41C)或24小时(图41 D)活化后分析它们在脾中的Breg群体。(图41E)将脾细胞用CD3+ Ab活化24小时。通过FACS分析Th1 (INF γ 和T-Bet)和Th17 (IL-17和ROR γ T)标志物。(图41F)针对Treg (CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺)和Th17 (CD4⁺, RoR γ T+)群体分析脾细胞。每个点代表生物学重复,条指示SEM。Ns p> 0.01, *p<0.01, **p<0.001。

[0095] 发明详述

本发明在其某些实施方案中涉及用于阻止或逆转T细胞耗竭、和用于增强B调节细胞的活性或水平、用于治疗恶性疾病、自身免疫疾病和炎症疾病的组合物和方法。

[0096] 参考附图和伴随的说明,可以更好地理解本发明的原理和操作。

[0097] 在详细地解释本发明的至少一个实施方案之前,应当理解,本发明不一定在其应用方面限于在以下描述中阐述的或由实施例举例说明的细节。本发明能够实现其它的实施方案或能够以不同的方式实践或实现。另外,应当理解,本文所用的短语和术语仅用于描述目的,不应认为是限制性的。

[0098] 为了实现有效的应答(例如消除病原体和肿瘤),同时维持耐受性以防止组织损伤和自身免疫疾病的发生,免疫系统的平衡是至关重要的。T细胞对于保持该平衡是重要的,且通过共刺激性信号和抑制性信号(即免疫检验点)之间的平衡来调节,其中的许多由配体-受体相互作用开始。存在多种免疫检验点(参见例如图2),它们包括两种免疫检验点抑制性受体:细胞毒性的T-淋巴细胞相关抗原4 (CTLA4)和程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)。CTLA-4和PD-1在不同的水平和通过不同的机制调节免疫应答,且已经在临床癌症免疫疗法的背景下最活跃地研究[Pardoll, Nature Reviews Cancer (2012) 12: 252-264]。

[0099] 已知的是,肿瘤将某些免疫检验点途径增选为免疫抗性的主要机制,特别是针对对肿瘤抗原具有特异性的T细胞。另外,长期抗原暴露(诸如与慢性病毒感染和癌症一起发生)可以导致持久的免疫检验点表达,这会在相应抗原特异性T细胞中诱导耗竭状态[Pardoll, (2012) 出处同上]。

[0100] 当将本发明应用于实践时,本发明的发明人现在已经发现,CD84的刺激会上调另一个SLAM家族成员SLAMF1的表达(参见下面的实施例部分的实施例2-3)。SLAMF1的下调(诸如在微环境的基质细胞中)会诱导CLL细胞的细胞凋亡(参见下面的实施例部分的实施例4)。证实了CD84调节在不同的B细胞恶性肿瘤中的SLAMF1表达,所述B细胞恶性肿瘤包括多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤和急性淋巴细胞白血病(ALL)(参见下面的实施例部分的实施例6)。

[0101] 重要的是,本发明的发明人发现,CD84控制PD-L1的表达水平,可能通过SLAMF1 (参见下面的实施例部分的实施例5和7)。PD-L1水平在CD84活化后上调(参见下面的实施例部分的实施例7),且在CD84敲除的小鼠中显著下降(参见下面的实施例部分的实施例9)。PD-L1结合它的受体PD-1,它是体外和体内T细胞的已知共抑制剂。PD-1通常与Lag-3和CTLA-4一起在T细胞上共表达,它们都被视作耗竭性T细胞的标志物。本发明的发明人进一步阐明,PD-1、Lag-3和CTLA-4的水平在缺乏CD84的CLL模型小鼠中显著下降(参见下面的实施例部分的实施例9)。此外,从缺乏CD84的CLL模型小鼠收获的T细胞表现出与来自正常CLL小鼠的T细胞相比增加的功能性,如升高的IL-4和IFN- γ 水平所表明的(参见下面的实施例部分的实施例9)。证实了CD84调节在不同的B细胞恶性肿瘤中的PD-L1表达,所述B细胞恶性肿瘤包括CLL、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤和ALL (参见下面的实施例部分的实施例10-11)。

[0102] 因而,CD84在如下增强恶性细胞存活中具有重要作用:抑制T细胞的活性(例如通过增强在T细胞上的耗竭表型,例如PD-L1/PD-1的表达,由此使得T细胞不太能够攻击和杀死恶性细胞),和减少恶性细胞的细胞凋亡(例如通过SLAMF1的表达)。总之,CD84的活性或表达的下调可以用作治疗模态来中断CD84诱导的存活途径和增强恶性细胞凋亡和杀死。

[0103] 本发明的发明人进一步在体内阐明,CD84在Bregs活性中起作用。也就是说,CD84表达会造成Breg无反应性,由此介导自身免疫和炎症。具体地,本发明的发明人阐明,在CD84敲除的小鼠中,存在不太严重的结肠炎(参见下面的实施例部分的实施例12-14)。这些结果对于急性结肠炎和慢性结肠炎而言是可比较的(参见下面的实施例部分的实施例12-13)。类似地,在CD84敲除的小鼠中呈现更温和的EAE (参见下面的实施例部分的实施例15)。更温和的疾病症状伴有CD84敲除的动物的脾中的更高B调节细胞水平(参见下面的实施例部分的实施例14和15)。总之,这些结果提示CD84在调节性B细胞无反应性中的新作用。因此,CD84的活性或表达的下调可以进一步用作治疗模态以增加Bregs的调节活性和由此增强自身免疫和炎性病症的治疗。

[0104] 因而,根据本发明的一个方面提供了一种在有此需要的受试者中阻止或逆转T细胞耗竭的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,前提条件是,所述受试者没有被诊断出具有B细胞恶性肿瘤,由此阻止或逆转所述受试者中的T细胞耗竭。

[0105] 根据本发明的另一个方面提供了一种在有此需要的受试者中阻止或逆转T细胞耗竭的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂,前提条件是,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此阻止或逆转所述受试者中的T细胞耗竭。

[0106] 本文中使用的术语“受试者”或“有此需要的受试者”表示哺乳动物,例如,在任何年龄的男性或女性人受试者,其具有涉及T细胞耗竭的疾病或病症。

[0107] 本文中使用的短语“T细胞耗竭”或“耗竭的T细胞”表示由持久T细胞受体(TCR)信号传递引起的T细胞功能障碍的状态,其通常发生在慢性感染或癌症过程中。T细胞耗竭与无反应性的区别在于,它源自持久的信号传递且并非通过不完全的或有缺陷的信号传递。它通过T细胞的差效应子功能和抑制性受体的持久表达来定义(也被称作“耗竭的T细胞表型”)。耗竭可以源自外部负调节途径(例如,免疫调节性细胞因子,例如,IL-10和转化生长

因子- β (TGF- β)、IL-35) 以及细胞内部负调节 (共刺激) 途径 (例如PD-1、B7-H3、B7-H4、Lag-3、CTLA-4、Tim-3)。因此,T细胞耗竭会阻止T细胞对感染和肿瘤的最佳控制。

[0108] 当涉及T细胞时,术语功能失调通常表示对抗原识别的无应答性,具体地,表示受损的将抗原识别翻译成下游T-细胞效应子功能 (诸如增殖、细胞因子产生 (例如,IL-2、IL-4、IFN γ) 和/或靶细胞杀死) 的能力。

[0109] 本文中使用的术语“预防”表示延迟T细胞耗竭的发展和/或耗竭的T细胞的数目的减少,预期它们会响应于疾病或病症 (例如恶性疾病) 而发生。

[0110] 本文中使用的术语“逆转”表示更新、重新活化、恢复或增强耗竭的T-细胞的T细胞功能。

[0111] 增强T-细胞功能的例子包括、但不限于相对于干预之前的这种水平,增加的 (抗原依赖性的或独立于抗原的) 来自CD8⁺ T-细胞的IFN γ 和/或IL-4分泌,增加的增殖,增加的抗原应答性 (例如,病毒、病原体或肿瘤清除)。

[0112] 根据一个实施方案,使T细胞功能增强了至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%或200%。测量T细胞功能的增强是本领域普通技术人员已知的,且包括,例如,流式细胞计数测定 (FACS)、ELISA、混合淋巴细胞反应 (MLR)、ELISpot、细胞内细胞因子染色 (ICS)、病毒抑制测定 (VSA)、细胞毒性测定和增殖测定。

[0113] 根据一个实施方案,通过给所述受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,实现阻止或逆转T细胞耗竭。

[0114] 本文中使用的术语“CD84” (也被称作LY9B或SLAMF5) 表示CD84基因的表达的同种型。例子包括、但不限于Q9UIB8-1、Q9UIB8-2、Q9UIB8-3、Q9UIB8-4、Q9UIB8-5、Q9UIB8-6和Q9UIB8-7。根据一个实施方案,所述CD84是人CD84。根据一个实施方案,CD84阐述在登录号NP_001171808.1、NP_001171810.1、NP_001171811.1或NP_003865.1中。

[0115] 根据本发明的该方面的一个具体实施方案,降低CD84的活性或表达涉及所有CD84同种型。为此目的,使用识别CD84的所有同种型 (即,泛CD84) 的药剂。

[0116] 根据另一个实施方案,通过给所述受试者施用治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂,实现阻止或逆转T细胞耗竭。

[0117] 本文中使用的术语“SLAMF1” (也被称作SLAM、CD150或CDw150) 表示SLAMF1基因的表达的同种型。例子包括、但不限于Q13291。根据一个实施方案,SLAMF1阐述在登录号NP_003028.1中。

[0118] 在基因组 (例如,使用DNA编辑工具) 和/或转录物水平 (使用多种干扰转录和/或翻译的分子 [例如,RNA沉默剂 (例如,反义、siRNA、shRNA、微-RNA)、核酶和DNA酶]), 或在蛋白水平 (使用例如拮抗剂、切割多肽的酶等), 可以实现CD84或SLAMF1的下调。

[0119] 下面是能够下调CD84或SLAMF1的表达水平和/或活性的药剂的列表。

[0120] 能够下调CD84或SLAMF1的药剂的一个例子是含有CDR的多肽,诸如能够特异性地结合CD84或SLAMF1的抗体或抗体片段。根据一个具体实施方案,所述抗体特异性地结合CD84或SLAMF1的细胞外部分的至少一个表位并中和/阻断它的活性,诸如通过干扰它的嗜同种相互作用。

[0121] 本文中使用的术语“表位”表示抗原上被抗体的互补位结合的任何抗原决定簇。

[0122] 表位决定簇经常由分子的化学活性表面基团 (诸如氨基酸或碳水化合物侧链) 组

成,并且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。

[0123] 在本发明中使用的术语“抗体”包括完整分子以及它们的功能片段,诸如能够结合巨噬细胞的Fab、F(ab')₂和Fv。这些功能性抗体片段如下定义:(1) Fab,即含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段,可以通过用酶木瓜蛋白酶消化完整抗体以产生一个完整轻链和一个重链的一部分而产生;(2) Fab',即可以如下得到的抗体分子的片段:用胃蛋白酶处理完整抗体,随后还原,以产生一个完整轻链和重链的一部分;每个抗体分子得到两个Fab'片段;(3) (Fab')₂,即通过用酶胃蛋白酶处理完整抗体、没有后续还原可以得到的抗体的片段;F(ab')₂是由两个二硫键保持在一起的两个Fab'片段的二聚体;(4) Fv,定义为遗传工程改造的片段,其含有表达为两个链的轻链可变区和重链可变区;和(5)单链抗体(“SCA”),即一种遗传工程改造的分子,其含有通过合适多肽接头连接为遗传上融合的单链分子的轻链可变区和重链可变区。

[0124] 生产多克隆和单克隆抗体以及它们的片段的方法是本领域众所周知的(参见例如,Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988,通过引用并入本文)。

[0125] 通过抗体的蛋白水解性水解或通过编码所述片段的DNA在大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞培养物或其它蛋白表达系统)中的表达,可以制备根据本发明的一些实施方案的抗体片段。通过常规方法对完整抗体的胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化,可以得到抗体片段。例如,通过用胃蛋白酶对抗体进行酶切割以提供称作F(ab')₂的5S片段,可以产生抗体片段。该片段可以使用硫醇还原剂和任选地由二硫键的切割产生的巯基的阻断基进一步切割,以产生3.5S Fab'单价片段。可替换地,使用胃蛋白酶的酶切割会直接产生两个单价Fab'片段和一个Fc片段。这些方法描述在,例如,Goldenberg, 美国专利号4,036,945和4,331,647,和其中所含的参考文献,所述专利特此通过引用整体并入。也参见Porter, R. R. [*Biochem. J.* 73: 119-126 (1959)]。也可以使用其它切割抗体的方法,诸如分离重链以形成单价轻-重链片段,进一步切割片段,或其它酶技术、化学技术或基因技术,只要所述片段结合被完整抗体识别的抗原。

[0126] Fv片段包含VH和VL链的结合。该结合可以是非共价的,如在Inbar等人[*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:2659-62 (1972)]中所述。可替换地,所述可变链可以通过分子间二硫键连接或通过化学物质(诸如戊二醛)交联。优选地,所述Fv片段包含通过肽接头连接的VH和VL链。通过构建结构基因来制备这些单链抗原结合蛋白(sFv),所述结构基因包含通过寡核苷酸连接的编码VH和VL结构域的DNA序列。将所述结构基因插入表达载体中,随后将其引入宿主细胞诸如大肠杆菌中。所述重组宿主细胞合成单个多肽链,其具有桥连两个V结构域的接头肽。用于生产sFv的方法描述在,例如,[Whitlow和Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird等人, *Science* 242:423-426 (1988); Pack等人, *Bio/Technology* 11:1271-77 (1993);和美国专利号4,946,778,其特此通过引用整体并入。

[0127] 抗体片段的另一种形式是编码单个互补性决定区(CDR)的肽。通过构建编码目标抗体的CDR的基因,可以得到CDR肽(“最小识别单位”)。例如,通过使用聚合酶链式反应从抗体生产细胞的RNA合成可变区,制备这样的基因。参见,例如,Larrick和Fry [*Methods*, 2: 106-10 (1991)]。

[0128] 非人(例如,鼠)抗体的人源化形式是免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如

Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它结合抗原的子序列)的嵌合分子,其含有从非人免疫球蛋白衍生出的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被具有期望的特异性、亲和力和能力的来自非人物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠或兔)的CDR的残基替换。在某些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基被对应的非人残基替换。人源化抗体也可以包含既没有在受体抗体中又没有在输入的CDR或框架序列中发现的残基。一般而言,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、并且通常两个可变结构域,其中所有的或基本上所有的CDR区域对应于非人免疫球蛋白的那些,且所有的或基本上所有的FR区域是人免疫球蛋白共有序列的那些。所述人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常人免疫球蛋白的至少一部分[Jones等人, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature*, 332:323-329 (1988); 和Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)]。

[0129] 用于人源化非人抗体的方法是本领域众所周知的。通常,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入它的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基经常被称作输入残基,其通常取自输入可变结构域。人源化可以基本上按照Winter和同事[Jones等人, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen等人, *Science*, 239:1534-1536 (1988)]的方法执行,用啮齿动物CDR或CDR序列置换人抗体的对应序列。因此,这样的人源化抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中基本上小于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的对应序列置换。在实践中,人源化抗体通常是这样的人抗体:其中一些CDR残基和可能一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基置换。

[0130] 还可以使用多种本领域已知的技术生产人抗体,包括噬菌体展示文库[Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]。Cole等人和Boerner等人的技术也可以用于制备人单克隆抗体(Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77页(1985)和Boerner等人, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]。类似地,通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物(例如,其中已经将内源性免疫球蛋白基因部分地或完全地灭活的小鼠),可以制备人抗体。攻击后,观察到人抗体产生,其在所有方面非常类似于在人类中所见,包括基因重排、组装和抗体组成。该方案描述在,例如,美国专利号5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016,和以下科学出版物: Marks等人, *Bio/Technology* 10,: 779-783 (1992); Lonberg等人, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild等人, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); 以及Lonberg和Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995)。

[0131] 根据一个实施方案,所述抗体特异性地结合CD84的细胞外部分的至少一个表位并中和/阻断它的活性,诸如通过干扰它的嗜同种相互作用。

[0132] 根据一个实施方案,可以从杂交瘤生产能够特异性地结合CD84的含有CDR的多肽(例如,抗体),所述杂交瘤已经在2009年9月23日在保藏编号CNCM I-4228 (F8)下保藏在CNCN Pasteur Institut。在PCT公开号W02010/035259和W02015/118538(它们二者通过引用并入本文)中教导了根据本教导可以使用的另外的抗-CD84抗体。

[0133] 额外地或可替换地,能够特异性地结合CD84的含有CDR的多肽(例如,抗体)可商购得自例如Santa Cruz Biotechnology、OriGene、Abcam等。

[0134] 根据一个实施方案,能够特异性地结合SLAMF1的含有CDR的多肽(例如,抗体)可商购得自例如Abcam、Biolegend、Santa Cruz Biotechnology等。

[0135] 可以用于下调CD84或SLAMF1活性的另一种分子是CD84或SLAMF1的无功能形式,其分别结合CD84或SLAMF1,但是抑制它的信号传递活性,诸如通过抑制它的嗜同种相互作用。

[0136] 因而,本教导进一步提供了一种分离的多肽,其包含可溶性的CD84或SLAMF1(即,非膜结合的)的氨基酸序列,其中所述可溶性的CD84或SLAMF1分别结合在细胞上表达的CD84或SLAMF1(例如,B细胞、T细胞、基质细胞,例如以至少 10^{-5} nM的结合亲和力),并抑制它的嗜同种相互作用(即在一个细胞的表面上的分子与在另一个细胞的表面上的相同分子的结合)。

[0137] 根据一个具体实施方案,所述可溶性的CD84或SLAMF1包含CD84或SLAMF1的细胞外结构域且不具有跨膜结构域。在PCT公开号W02010/035259(其通过引用并入本文)中教导了可以根据本教导使用的示例性的可溶性的CD84多肽。

[0138] 根据一个具体实施方案,将所述可溶性的CD84或SLAMF1与用于增加可溶性的CD84或SLAMF1的溶解度的部分融合。

[0139] 根据一个具体实施方案,所述用于增加可溶性的CD84或SLAMF1的溶解度的部分是异源氨基酸序列或化学部分诸如PEG等。

[0140] 本文中使用的短语“异源氨基酸序列”表示不会内源地形成CD84或SLAMF1氨基酸序列的部分的氨基酸序列。优选地,所述异源氨基酸序列不会下调可溶性的CD84或SLAMF1多肽的生物活性。

[0141] 通过RNA沉默也可以实现CD84或SLAMF1的下调。本文中使用的短语“RNA沉默”表示由RNA分子介导的一组调节机制[例如RNA干扰(RNAi)、转录基因沉默(TGS)、转录后基因沉默(PTGS)、压制、共抑制和翻译抑制],其导致对应的蛋白编码基因的表达的抑制或“沉默”。已经在许多类型的生物(包括植物、动物和真菌)中观察到RNA沉默。

[0142] 本文中使用的术语“RNA沉默剂”表示能够特异性地抑制或“沉默”靶基因的表达的RNA。在某些实施方案中,所述RNA沉默剂能够通过转录后沉默机制阻止mRNA分子的完全加工(例如,完整翻译和/或表达)。RNA沉默剂包括非编码RNA分子,例如包含成对链的RNA双链体,以及可以从其产生这样的小非编码RNA的前体RNA。示例性的RNA沉默剂包括dsRNA诸如siRNA、miRNA和shRNA。在一个实施方案中,所述RNA沉默剂能够诱导RNA干扰。在另一个实施方案中,所述RNA沉默剂能够介导翻译抑制。

[0143] 根据本发明的一个实施方案,所述RNA沉默剂是对靶RNA(例如,CD84或SLAMF1)特异性的,且不会交叉抑制或沉默表现出与靶基因的99%或更少总同源性(例如,与靶基因的小于98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%总同源性)的基因或剪接变体。

[0144] RNA干扰表示由短干扰RNA(siRNA)介导的动物中的序列特异性的转录后基因沉默的过程。在植物中的对应过程通常被称作转录后基因沉默或RNA沉默,并且也被称作真菌中的压制(quelling in fungi)。认为转录后基因沉默的过程是用于阻止外源基因表达的进化上保守的细胞防御机制,并且通常被不同的菌群和群类共享。这样的免于外来基因表

达的保护可能已经响应于双链RNA (dsRNA) 的产生而进化,所述双链RNA源自病毒感染或源自转座子元件经由细胞应答向宿主基因组中的随机整合,所述细胞应答特异性地破坏同源单链RNA或病毒基因组RNA。

[0145] 长dsRNA在细胞中的存在会刺激被称作dicer的核糖核酸酶III酶的活性。Dicer参与dsRNA向dsRNA的短碎片(被称作短干扰RNA (siRNA))的加工。从dicer活性衍生出的短干扰RNA通常具有约21至约23个核苷酸的长度,且包含约19碱基对双链体。所述RNAi应答也表征了内切核酸酶复合物,通常被称作RNA诱导的沉默复合物(RISC),其介导具有与siRNA双链体的反义链互补的序列的单链RNA的切割。靶RNA的切割发生在与siRNA双链体的反义链互补的区域的中间。

[0146] 因此,本发明的一些实施方案预见到dsRNA用于下调来自mRNA的蛋白表达的用途。

[0147] 根据一个实施方案,所述dsRNA是大于30碱基对。由于相信双链RNA的这些较长区域将导致干扰素的诱导和PKR应答,长dsRNA (即大于30碱基对的dsRNA)的应用已经是非常有限的。但是,长dsRNA的应用可以提供众多优点,因为所述细胞可以选择减轻对试验众多siRNA的需要的最佳沉默序列;长dsRNA将使得沉默文库具有比需要siRNA时更低的复杂性;并且,可能最重要的是,长dsRNA当用作治疗剂时可以阻止病毒逃逸突变。

[0148] 不同的研究证实,长dsRNA可以用于沉默基因表达,而不诱导应激应答或造成显著的脱靶效应- 参见例如[Strat等人, *Nucleic Acids Research*, 2006, 第34卷, 第13期 3803-3810; Bhargava A等人. *Brain Res. Protoc.* 2004;13:115-125; Diallo M., 等人, *Oligonucleotides*. 2003;13:381-392; Paddison P.J., 等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002;99:1443-1448; Tran N., 等人, *FEBS Lett.* 2004;573:127-134]。

[0149] 具体地,本发明根据其一些实施方案预见到为了其中未激活干扰素途径的细胞(例如胚胎细胞和卵母细胞)中的基因沉默而引入长dsRNA (超过30碱基转录物),参见例如Billy等人, *PNAS* 2001, 第98卷, 第14428-14433页. 和Diallo等人, *Oligonucleotides*, 2003年10月1日, 13(5): 381-392. doi:10.1089/154545703322617069。

[0150] 本发明根据其一些实施方案也预见到为了下调基因表达而引入长dsRNA,其特别设计成不会诱导干扰素和PKR途径。例如,Shinagwa和Ishii [*Genes & Dev.* 17 (11): 1340-1345, 2003]已经开发了一种载体(命名为pDECAP)来从RNA聚合酶II (Pol II) 启动子表达长双链RNA。因为来自pDECAP的转录物缺乏促进ds-RNA输出至细胞质的5'-帽结构和3'-聚腺苷酸尾巴,来自pDECAP的长ds-RNA不会诱导干扰素应答。

[0151] 另一种避免哺乳动物系统中的干扰素和PKR途径的方法是通过转染或内源性表达引入小抑制性RNA (siRNA)。

[0152] 术语“siRNA”表示诱导RNA干扰(RNAi)途径的小抑制性RNA双链体(通常在18-30个碱基对之间)。通常,将siRNA化学合成为具有中央19碱基对双链体区域和在末端上的对称2-碱基3'-突出端的21聚体,尽管最近已经描述,化学合成的25-30碱基长度的RNA双链体可以具有与在相同位置处的21聚体相比多达100倍的效能增加。理论上认为观察到的在触发RNAi中使用较长RNA得到的增加的效能源自给Dicer提供底物(27聚体)而不是产物(21聚体),并且这会提高siRNA双链体进入RISC的速率或效率。

[0153] 已经发现,3'-突出端的位置会影响siRNA的效能,且在反义链上具有3'-突出端的

不对称双链体通常比在有义链上具有3'-突出端的那些更有效(Rose等人, 2005)。这可以归因于向RISC中的不对称链加载, 因为当靶向反义转录物时观察到相反的效力模式。

[0154] 可以将双链干扰RNA (例如, siRNA) 的链连接以形成发夹或茎-环结构(例如, shRNA)。因而, 如提及的, 本发明的一些实施方案的RNA沉默剂也可以是短发夹RNA(shRNA)。

[0155] 本文中使用的术语“shRNA”表示具有茎-环结构的RNA药剂, 其包含互补序列的第一和第二区域, 所述区域的互补性程度和取向足以使得碱基配对发生在所述区域之间, 所述第一和第二区域通过环区域连接, 所述环源自所述环区域内的核苷酸(或核苷酸类似物)之间的碱基配对的缺乏。所述环中的核苷酸的数目是在3-23、或5-15、或7-13、或4-9、或9-11之间(且包括端点)的数目。所述环中的一些核苷酸可以参加与所述环中的其它核苷酸的碱基对相互作用。可以用于形成所述环的寡核苷酸序列的例子包括5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T. R. 等人(2002) *Science* 296: 550) 和5'-UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. 等人(2002) *RNA* 8:1454)。本领域技术人员将认识到, 得到的单链寡核苷酸形成茎-环或发夹结构, 其包含能够与RNAi机制相互作用的双链区域。

[0156] 适合用于与本发明的一些实施方案一起使用的RNA沉默剂的合成可以如下实现。首先, 针对AA二核苷酸序列在AUG起始密码子的下游扫描CD84或SLAMF1 mRNA序列。将每个AA和3' 邻近19核苷酸的发生记录为潜在siRNA靶位点。优选地, siRNA靶位点选自开放读码框, 因为在调节蛋白结合位点中更富含非翻译区(UTR)。UTR-结合蛋白和/或翻译起始复合物可能干扰siRNA内切核酸酶复合物的结合[Tuschl *ChemBiochem.* 2:239-245]。将理解, 尽管指向非翻译区的siRNA也可能是有效的, 如关于GAPDH证实的, 其中指向5' UTR的siRNA介导细胞GAPDH mRNA的约90%下降并完全地消除蛋白水平(www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)。

[0157] 其次, 使用任何序列比对软件, 诸如可从NCBI服务器得到的BLAST软件(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), 将潜在靶位点与适当的基因组数据库(例如, 人、小鼠、大鼠等)进行对比。将表现出与其它编码序列的显著同源性的假定靶位点过滤掉。

[0158] 将合格的靶序列选择为siRNA合成的模板。优选的序列是包括低G/C含量的那些, 因为这些已经被证实与具有高于55%的G/C含量的那些相比更有效地介导基因沉默。优选地沿着靶基因的长度选择几个靶位点进行评价。为了更好地评价选择的siRNA, 优选地结合使用阴性对照。阴性对照siRNA优选地包括与siRNA相同的核苷酸组成, 但是缺乏与基因组的显著同源性。因而, 优选地使用siRNA的杂乱核苷酸序列, 只要它没有表现出与任何其它基因的任何显著同源性。

[0159] 例如, 合适的CD84 siRNA可以商业上得自例如Santa Cruz Biotechnology、Qiagen或OriGene。合适的SLAMF1 siRNA可以商业上得自例如GE Lifescience、Qiagen或OriGene。

[0160] 应当理解, 本发明的一些实施方案的RNA沉默剂不需要限于仅含有RNA的那些分子, 而是进一步包括化学修饰的核苷酸和非核苷酸。

[0161] 在某些实施方案中, 本文提供的RNA沉默剂可以在功能上与细胞穿透肽关联。本文中使用的“细胞穿透肽”是包含短(约12-30个残基)氨基酸序列或功能基序的肽, 其提供独立于能量的(即, 非内吞的)易位性能, 该性能与膜可透过的复合物穿过细胞的质和/或核膜

的运输有关。在本发明的一些实施方案的膜可透过的复合物中使用的细胞穿透肽优选地包含至少一个无功能的半胱氨酸残基,其是游离的或衍生化以与双链核糖核酸形成二硫键,所述双链核糖核酸已经为这样的键进行了修饰。赋予这样的性能的代表性氨基酸基序列出在美国专利号6,348,185中,其内容明确地通过引用并入本文。本发明的一些实施方案的细胞穿透肽优选地包括、但不限于穿透素(penetratin)、转运素(transportan)、pIsl、TAT(48-60)、pVEC、MTS和MAP。

[0162] 要使用RNA沉默剂靶向的mRNA包括、但不限于其表达与不希望的表型特性关联的那些。可以靶向的示例性mRNA是编码截短蛋白(即包含缺失)的那些。因此,本发明的一些实施方案的RNA沉默剂可以靶向在所述缺失的任一侧上的桥连区域。这样的RNA沉默剂向细胞中的引入会造成突变蛋白的下调,而使非突变蛋白不受影响。

[0163] 根据另一个实施方案,所述RNA沉默剂可以是miRNA。

[0164] 术语“微RNA”、“miRNA”和“miR”是同义的,且表示约19-28个核苷酸长度的非编码单链RNA分子的集合,所述分子调节基因表达。miRNA存在于广范围的生物(病毒、fwdarw.人类)中,且已经被证实在发育、体内稳态和疾病病原学中起作用。

[0165] 下面是miRNA活性机制的简要描述。

[0166] 转录编码miRNA的基因,从而导致被称作初级-miRNA的miRNA前体的产生。所述初级-miRNA通常是包含多个初级-miRNA的多顺反子RNA的部分。所述初级-miRNA可以与茎和环形成发夹。所述茎可以包含错配的碱基。

[0167] 初级-miRNA的发夹结构被Drosha识别,所述Drosha是一种RNA酶III内切核酸酶。Drosha通常识别初级-miRNA中的末端环并将大约2个螺旋匝切割成茎以产生被称作前-miRNA的60-70核苷酸前体。Drosha切割具有RNA酶III内切核酸酶的典型交错切口的初级-miRNA,从而产生具有5'磷酸和约2个核苷酸3'突出端的前-miRNA茎环。据估测,延伸超出Drosha切割位点的茎的大约1个螺旋匝(约10个核苷酸)是有效加工所必需的。所述前-miRNA然后被Ran-GTP和输出受体Exportin-5从细胞核主动运输至细胞质。

[0168] 前-miRNA的双链茎然后被Dicer识别,所述Dicer也是RNA酶III内切核酸酶。Dicer也可以识别在茎环的根部处的5'磷酸和3'突出端。Dicer然后在离茎环根部2个螺旋匝处切掉末端环,留下另一个5'磷酸和约2核苷酸3'突出端。得到的可能包含错配的siRNA-样双链体包含成熟的miRNA和类似大小的片段(被称作miRNA*)。所述miRNA和miRNA*可以源自初级-miRNA和前-miRNA的相对臂。miRNA*序列可以存在于克隆的miRNA的文库中,但是通常以比miRNA更低的频率。

[0169] 尽管最初作为具有miRNA*的双链物质存在,miRNA最终作为单链RNA掺入被称作RNA诱导的沉默复合物(RISC)的核糖核蛋白复合物中。多种蛋白可以形成RISC,其可以导致对miRNA/miRNA*双链体的特异性、靶基因的结合位点、miRNA的活性(抑制或活化)和miRNA/miRNA*双链体的哪条链加载进RISC中的变异性。

[0170] 当miRNA:miRNA*双链体的miRNA链加载进RISC中时,所述miRNA*被除去和降解。加载进RISC中的miRNA:miRNA*双链体的链是这样的链:其5'末端不太紧密地配对。在miRNA:miRNA*的两个末端具有大致等同的5'配对的情况下,miRNA和miRNA*都可能具有基因沉默活性。

[0171] 所述RISC基于miRNA和mRNA之间的高互补性水平鉴别靶核酸,特别是通过miRNA的

核苷酸2-7。

[0172] 许多研究已经注意到为了实现有效的翻译抑制对miRNA和它的mRNA靶标之间的碱基配对要求(综述见Bartel 2004, Cell 116-281)。在哺乳动物细胞中,miRNA的前8个核苷酸可能是重要的(Doench和Sharp 2004 GenesDev 2004-504)。但是,微RNA的其它部分也可能参与mRNA结合。此外,在3'的足够碱基配对可以补偿在5'处的不足配对(Brennecke等人, 2005 PLoS 3-e85)。分析在全基因组上的miRNA结合的计算研究已经提示在miRNA的5'处的碱基2-7在靶标结合中的特异性作用,但是也认识到第一个核苷酸(经常发现是“A”)的作用(Lewis等人2005 Cell 120-15)。类似地,Krek等人(2005, Nat Genet 37-495)使用核苷酸1-7或2-8来鉴别和验证靶标。

[0173] 在mRNA中的靶位点可以是在5' UTR、3' UTR中或在编码区中。令人感兴趣的是,多个miRNA可能通过识别相同的或多个位点来调节相同的mRNA靶标。多个miRNA结合位点在大多数遗传上鉴别的靶标中的存在可能指示,多个RISC的协作作用会提供最有效的翻译抑制。

[0174] miRNA可能指导RISC通过两种机制中的任一种下调基因表达:mRNA切割或翻译抑制。如果mRNA与miRNA具有某种互补性程度,miRNA可以指定mRNA的切割。当miRNA引导切割时,切口通常是在与miRNA的残基10和11的核苷酸配对之间。可替换地,如果miRNA与miRNA不具有必要的互补性程度,miRNA可以抑制翻译。翻译抑制可以在动物中更流行,因为动物可能具有在miRNA和结合位点之间的更低互补性程度。

[0175] 应当指出,在miRNA和miRNA*的任何对的5'和3'末端中可能存在变异性。该变异性可能是由于Drosha和Dicer就切割位点而言的酶加工的变异性。在miRNA和miRNA*的5'和3'末端处的变异性也可能是由于初级-miRNA和前-miRNA的茎结构中的错配。茎链的错配可能导致不同发夹结构的群体。茎结构中的变异性也可能导致Drosha和Dicer的切割产物中的变异性。

[0176] 术语“微RNA模仿物”表示合成的非编码RNA,其能够进入RNAi途径和调节基因表达。miRNA模仿物会模仿内源性微RNA(miRNA)的功能且可以设计为成熟的双链分子或模仿物前体(例如,或前-miRNA)。miRNA模仿物可以包含修饰的或未修饰的RNA、DNA、RNA-DNA杂合物或替代性核酸化学物质(例如,LNA或2'-O,4'-C-亚乙基-桥连的核酸(ENA))。对于成熟的双链miRNA模仿物,双链体区域的长度可以在13-33、18-24或21-23个核苷酸之间变化。miRNA也可以包含共计至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个核苷酸。miRNA的序列可以是前-miRNA的前13-33个核苷酸。miRNA的序列也可以是前-miRNA的最后13-33个核苷酸。

[0177] 从上文提供的描述将会明白,使表达CD84或SLAMF1的细胞与miRNA接触可能以多种方式实现:

1. 用成熟的双链miRNA瞬时转染表达CD84或SLAMF1的细胞。
2. 用编码成熟miRNA的表达载体稳定地或瞬时地转染表达CD84或SLAMF1的细胞。
3. 用编码前-miRNA的表达载体稳定地或瞬时地转染表达CD84或SLAMF1的细胞。所述前-miRNA序列可以包含45-90、60-80或60-70个核苷酸。前-miRNA的序列可以包含如本文所述的miRNA和a miRNA*。前-miRNA的序列也可以是这样的初级-miRNA的序列:其排除了来自初级-miRNA的5'和3'末端的0-160个核苷酸。

4. 用编码初级-miRNA的表达载体稳定地或瞬时地转染表达CD84或SLAMF1的细胞。所述初级-miRNA序列可以包含45-30,000、50-25,000、100-20,000、1,000-1,500或80-100个核苷酸。所述初级-miRNA的序列可以包含如本文中所述的前-miRNA、miRNA和miRNA*及其变体。

[0178] miRNA模仿物的制备可以通过化学合成方法或通过重组方法实现。

[0179] 另一种能够下调CD84或SLAMF1的药剂是分别能够特异性地切割CD84或SLAMF1的mRNA转录物或DNA序列的DNA酶分子。DNA酶是能够切割单链和双链靶序列的单链多核苷酸(Breaker, R.R. 和Joyce, G. Chemistry and Biology 1995;2:655; Santoro, S.W. 和Joyce, G.F. Proc. Natl, Acad. Sci. USA 1997;943:4262)。已经提出了DNA酶的一般模型(“10-23”模型)。“10-23”DNA酶具有15个脱氧核糖核苷酸的催化结构域,其侧接两个各7-9个脱氧核糖核苷酸的底物识别结构域。这类DNA酶可以在嘌呤:嘧啶连接处有效地切割它的底物RNA (Santoro, S.W. 和Joyce, G.F. Proc. Natl, Acad. Sci. USA 199;关于DNA酶的综述,参见Khachigian, LM [CurrOpinMolTher 4:119-21 (2002)]。

[0180] 合成的、经工程改造的识别单链和双链靶切割位点的DNA酶的构建和扩增的例子已经公开在Joyce等人的美国专利号6,326,174。最近观察到针对人尿激酶受体的类似设计的DNA酶会抑制尿激酶受体表达,并成功地抑制体内结肠癌细胞转移(Itoh等人, 2002, Abstract 409, Ann Meeting Am. Soc. Gen. Ther. www.asgt.org)。在另一个应用中,与bcr-abl癌基因互补的DNA酶成功地抑制白血病细胞中的癌基因表达,并降低在CML和ALL的情况下自体骨髓移植的复发率。

[0181] 通过使用分别能够与编码CD84或SLAMF1的mRNA转录物特异性地杂交的反义多核苷酸,也可以实现CD84或SLAMF1的下调。

[0182] 当考虑对于反义方案而言重要的两个方面时,必须实现可以用于有效地下调CD84或SLAMF1的反义分子的设计。第一方面是寡核苷酸向适当细胞的细胞质中的递送,而第二方面是以抑制其翻译的方式特异性地结合细胞内的指定mRNA的寡核苷酸的设计。

[0183] 现有技术教导了许多可以用于将寡核苷酸有效地递送进多种细胞类型中的递送策略[参见,例如,Luft J Mol Med 76: 75-6 (1998); Kronenwett等人. Blood 91: 852-62 (1998); Rajur等人. BioconjugChem 8: 935-40 (1997); Lavigne等人. BiochemBiophys Res Commun 237: 566-71 (1997)和Aoki等人(1997) BiochemBiophys Res Commun 231: 540-5 (1997)]。

[0184] 另外,也可得到这样的算法:其用于鉴别对它们的靶mRNA具有最高预测结合亲和力的那些序列,这基于解释靶mRNA和寡核苷酸中的结构改变的能量学的热力学循环[参见,例如,Walton等人. BiotechnolBioeng 65: 1-9 (1999)]。

[0185] 这样的算法已经成功地用于在细胞中实现反义方案。例如,由Walton等人开发的算法使科学家能够成功地设计兔 β -珠蛋白(RBG)和小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF α)转录物的反义寡核苷酸。同一个研究组最近已经报道,通过动力学PCR技术评价的、理性地选择的针对三种模型靶mRNA(人乳酸脱氢酶A和B和大鼠gp130)的寡核苷酸在细胞培养物中的反义活性被证实在几乎所有情况下是有效的,所述动力学PCR技术包括用磷酸二酯和硫代磷酸酯寡核苷酸化学在两个细胞类型中针对三种不同靶标的试验。

[0186] 另外,也公开了几个使用体外系统设计和预测特定寡核苷酸的效率的方案

(Matveeva等人, Nature Biotechnology 16: 1374 - 1375 (1998))。

[0187] 几个临床试验已经证实反义寡核苷酸的安全性、可行性和活性。例如,已经成功地使用适合用于治疗癌症的反义寡核苷酸[Holmund等人, Curr Opin Mol Ther 1:372-85 (1999)],而通过靶向c-myc基因、p53和Bcl-2的反义寡核苷酸对血液学恶性肿瘤的治疗已经进入临床试验,且已经证实被患者耐受[Gerwitz Curr Opin Mol Ther 1:297-306 (1999)]。

[0188] 最近,已经报道反义介导的人类肝素酶基因表达的遏制会抑制小鼠模型中人癌细胞的胸膜传播[Uno等人, Cancer Res 61:7855-60 (2001)]。

[0189] 因而,当前一致认为,反义技术领域中的新进展(如上所述,其已经导致非常准确的反义设计算法和多种寡核苷酸递送系统的产生)使得普通技术人员能够设计和实现适合用于下调已知序列的表达的反义方案,不必求助于过度试错实验。

[0190] 另一种能够下调CD84或SLAMF1的药剂是分别能够特异性地切割编码CD84或SLAMF1的mRNA转录物的核酶分子。通过切割编码目标蛋白的mRNA,核酶正在越来越多地用于基因表达的序列特异性抑制[Welch等人, Curr Opin Biotechnol. 9:486-96 (1998)]。设计核酶以切割任何特定靶RNA的可能性已经使它们在基础研究和治疗用途中成为有价值的工具。在治疗领域中,已经利用核酶来靶向感染性疾病中的病毒RNA、癌症的显性癌基因和遗传障碍中的特定体细胞突变[Welch等人, Clin Diagn Virol. 10:163-71 (1998)]。最值得注意的是,几个针对HIV患者的核酶基因治疗方案已经处于1期试验中。最近,已经将核酶用于转基因动物研究、基因靶标验证和途径阐明。几种核酶处于临床试验的不同阶段。ANGIOZYME是要在人临床试验中研究的第一种化学合成的核酶。ANGIOZYME特异性地抑制VEGF-r (血管内皮生长因子受体,血管生成途径中的一种关键组分)的形成。Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.以及其它公司已经证实了抗-血管生成治疗剂在动物模型中的重要性。发现HEPTAZYME(一种被设计成选择性地破坏丙型肝炎病毒(HCV) RNA的核酶)在细胞培养测定中有效地减少丙型肝炎病毒RNA (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - WEB主页面)。

[0191] 另一种调节细胞中CD84或SLAMF1基因的表达的方法是通过形成三链体的寡核苷酸(TFO)。最近的研究已经证实,可以设计TFO,其可以以序列特异性的方式识别和结合双链螺旋DNA中的多嘌呤/多嘧啶区域。这些识别规则阐述在:Maher III, L. J., 等人, Science, 1989;245:725-730; Moser, H. E., 等人, Science, 1987;238:645-630; Beal, P. A., 等人, Science, 1992;251:1360-1363; Cooney, M., 等人, Science, 1988;241:456-459;和Hogan, M. E., 等人, 欧洲公开375408。寡核苷酸的修饰,诸如嵌入剂的引入和主链置换以及结合条件(pH和阳离子浓度)的优化,已经在帮助克服TFO活性的固有障碍,诸如电荷排斥和不稳定性,并且最近证实合成的寡核苷酸可以靶向特定序列(关于最近的综述,参见Seidman和Glazer, J Clin Invest 2003; 112:487-94)。

[0192] 一般而言,形成三链体的寡核苷酸具有以下序列对应:

寡物	3'--A G G T
双链体	5'--A G C T
双链体	3'--T C G A。

[0193] 但是,已经证实,A-AT和G-GC三联体具有最大三螺旋稳定性(Reither和Jeltsch, BMC Biochem, 2002年9月12日,电子出版)。相同作者已经证实,根据A-AT和G-GC规则设计

的TF0不会形成非特异性的三链体,从而指示三链体形成实际上是序列特异性的。

[0194] 因而,对于CD84或SLAMF1调节区中的任何给定序列,可以设计形成三链体的序列。形成三链体的寡核苷酸优选地是至少15个、更优选地25个、更优选地30个或更多个核苷酸长度,直到50或100个碱基对。

[0195] 用TF0转染细胞(例如,经由阳离子脂质体),和与靶DNA的三螺旋结构的形成,会诱导空间和功能变化,从而阻断转录起始和延伸,从而允许期望的序列变化在内源性DNA中的引入并导致基因表达的特异性下调。在用TF0处理过的细胞中的这样的基因表达抑制的例子包括哺乳动物细胞中附加型supFG1和内源性HPRT基因的敲除(Vasquez等人, Nucl Acids Res. 1999;27:1176-81,和Puri, 等人, J BiolChem, 2001;276:28991-98),和Ets2转录因子(在前列腺癌病原学中是重要的)(Carbone, 等人, Nucl Acid Res. 2003; 31:833-43)和促炎症性的ICAM-1基因(Besch等人, JBiolChem, 2002;277:32473-79)的表达的序列-和靶标-特异性下调。另外,Vuyisich和Beal最近已经证实,序列特异性的TF0可以结合dsRNA,从而抑制dsRNA依赖性的酶(诸如RNA依赖性的激酶)的活性(Vuyisich和Beal, Nuc. Acids Res 2000; 28:2369-74)。

[0196] 另外,根据上述原则设计的TF0可以诱导能够实现DNA修复的定向诱变,从而提供内源基因的表达的下调和上调(Seidman和Glazer, J Clin Invest 2003; 112:487-94)。有效TF0的设计、合成和施用的详细描述可以参见Froehler等人的美国专利申请号2003 017068和2003 0096980以及Emanuele等人的美国专利申请号2002 0128218和2002 0123476、和Lawn的美国专利号5,721,138。

[0197] 通过引入靶向突变来灭活基因(例如,分别CD84或SLAMF1基因)也可以实现CD84或SLAMF1的下调,所述靶向突变涉及基因结构中的功能缺失改变(例如点突变、缺失和插入)。

[0198] 本文中使用的短语“功能缺失改变”表示基因(例如,CD84或SLAMF1)的DNA序列中导致表达的产物(即,mRNA转录物和/或翻译的蛋白)的表达水平和/或活性的下调的任何突变。这样的功能缺失改变的非限制性例子包括:错义突变,即,用另一个氨基酸残基改变蛋白中的氨基酸残基并由此消除所述蛋白的酶活性的突变;无义突变,即,在蛋白中引入终止密码子(例如,产生不具有酶活性的更短蛋白的早期终止密码子)的突变;移码突变,即,改变蛋白的读码框的突变,经常是核酸的缺失或插入,且可能通过向读码框(例如,截短的蛋白,不具有酶活性)中或较长氨基酸序列(例如,连读蛋白)中引入终止密码子而导致早期终止,所述较长氨基酸序列影响蛋白的二级或三级结构并产生无功能蛋白,其不具有非突变多肽的酶活性;由移码突变或经修饰的终止密码子突变(即,当将终止密码子突变成氨基酸密码子时)引起的连读突变,具有消除的酶活性;启动子突变,即,在启动子序列中的突变,经常是5'至基因的转录起始位点,其导致特定基因产物的下调;调节突变,即,在基因的上游或下游或内部的区域中的突变,其影响基因产物的表达;缺失突变,即,删除基因序列中的编码核酸的突变,且其可能导致移码突变或框架内突变(在编码序列内,一个或多个氨基酸密码子的缺失);插入突变,即,向基因序列中插入编码或非编码核酸的突变,且其可能导致一个或多个氨基酸密码子的移码突变或框架内插入;反转,即,产生反转的编码或非编码序列的突变;剪接突变,即,导致异常剪接或差剪接的突变;和重复突变,即,产生重复的编码或非编码序列的突变,其可以是在框架内或可以造成移码。

[0199] 根据具体实施方案,基因的功能缺失改变可能包含所述基因的至少一个等位基

因。

[0200] 本文中使用的术语“等位基因”表示基因座的一种或多种替代形式中的任一种,所述等位基因都与形状或特征有关。在二倍体细胞或生物中,给定基因的两个等位基因占据一对同源染色体上的对应基因座。

[0201] 根据其它具体实施方案,基因的功能缺失改变包含该基因的两个等位基因。在这样的情况下,例如CD84或SLAMF1可以呈纯合形式或杂合形式。根据该实施方案,纯合体型是这样的情况:其中在例如CD84或SLAMF1基因座处的两个等位基因由相同核苷酸序列表征。杂合体型表示在例如CD84或SLAMF1基因座处的基因的不同情况。

[0202] 将核酸改变引入目标基因的方法是本领域众所周知的[参见例如Menke D. *Genesis* (2013) 51: - 618; Capecchi, *Science* (1989) 244:1288-1292; Santiago等人. *Proc Natl AcadSci USA* (2008) 105:5809-5814;国际专利申请号W0 2014085593、W0 2009071334和W0 2011146121;美国专利号8771945、8586526、6774279和UP专利申请公开号20030232410、20050026157、US20060014264,它们的内容通过引用整体并入],且包括靶向同源重组、位点特异性的重组酶、PB转座酶和由工程改造的核酸酶实现的基因组编辑。用于将核酸改变引入目标基因的药剂可以是设计的公开可得到的来源,或商业上得自Transposagen、Addgene和Sangamo Biosciences。

[0203] 下面是用于将核酸改变引入目标基因的不同示例性方法和用于实现所述方法的药剂的描述,它们可以根据本发明的具体实施方案使用。

[0204] 使用工程改造的内切核酸酶的基因组编辑- 该方案表示这样的反求遗传学方法:其使用人工工程改造的核酸酶在基因组中的期望位置处切割和建立特异性的双链断裂,然后将其通过细胞内源性过程修复,例如,同源性定向修复(HDS)和不同源末端连接(NFfEJ)。NFfEJ直接连接双链断裂中的DNA末端,而HDR利用同源序列作为在断裂点处再生缺失的DNA序列的模板。为了将特定核苷酸修饰引入基因组DNA,含有期望序列的DNA修复模板必须在HDR过程中存在。由于大多数限制性酶识别DNA上的几个碱基对作为它们的靶标并且识别的碱基对组合将存在于基因组上的许多位置的概率非常高(导致不限于期望位置的多个切口),使用传统的限制性内切核酸酶不可执行基因组编辑。为了克服该挑战和建立位点特异性的单链或双链断裂,迄今为止已经发现并生物工程改造了几个不同种类的核酸酶。这些包括大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化剂如效应物核酸酶(TALEN)和CRISPR/Cas系统。

[0205] 大范围核酸酶- 大范围核酸酶通常分成四个家族:LAGLIDADG家族、GIY-YIG家族、His-Cysbox家族和HNH家族。这些家族通过结构基序来表征,所述结构基序影响催化活性和识别序列。例如,LAGLIDADG家族的成员特征在于具有保守LAGLIDADG基序的一个或两个拷贝。大范围核酸酶的四个家族就保守结构元件而言且因此就DNA识别序列特异性和催化活性而言彼此宽分离。大范围核酸酶通常存在于微生物物种中,且具有以下独特性质:具有非常长的识别序列(>14碱基对),因而使它们对于在期望的位置处切割而言是天然地非常特异性的。这可以用于在基因组编辑中造成位点特异性的双链断裂。本领域技术人员可以使用这些天然存在的大范围核酸酶,但是,这样的天然存在的大范围核酸酶的数目是有限的。为了克服该挑战,已经使用诱变和高通量筛选方法来制备识别独特序列的大范围核酸酶变体。例如,已经将多种大范围核酸酶融合以制备识别新序列的杂合酶。可替换地,可以改变

大范围核酸酶的DNA相互作用氨基酸以设计序列特异性的大范围核酸酶(参见例如,美国专利8,021,867)。使用在例如以下文献中描述的方法,可以设计大范围核酸酶:Certo, MT等人. *Nature Methods* (2012) 9:073-975;美国专利号8,304,222; 8,021,867; 8, 119, 381; 8, 124,369; 8, 129,134; 8,133,697; 8,143,015; 8,143,016; 8, 148,098;或8, 163,514,每篇的内容通过引用整体并入本文。可替换地,使用商购可得的技术,例如, Precision Biosciences的Directed Nuclease Editor™ 基因组编辑技术,可以得到具有位点特异性的切割特征的大范围核酸酶。

[0206] ZFN和TALEN-两个不同种类的工程改造的核酸酶,锌指核酸酶(ZFN)和转录活化剂-样效应物核酸酶(TALEN),已经被证实可有效地产生靶向双链断裂(Christian等人, 2010; Kim等人, 1996; Li等人, 2011; Mahfouz等人, 2011; Miller等人, 2010)。

[0207] 基本上,ZFN和TALEN限制性内切核酸酶技术利用非特异性的DNA切割酶,其连接至特定DNA结合结构域(分别是一系列锌指结构域或TALE重复)。通常,选择这样的限制性酶:其DNA识别位点和切割位点彼此分离。将切割部分分离,并然后连接至DNA结合结构域,由此产生对期望的序列具有非常高特异性的内切核酸酶。具有这样的性质的一种示例性限制性酶是FokI。另外,FokI具有需要二聚化才能具有核酸酶活性的优点,这意味着特异性随着每个核酸酶配偶体识别独特DNA序列而急剧地增加。为了增强该效果,已经工程改造FokI核酸酶,其仅仅可以作为异源二聚体起作用且具有增加的催化活性。以异源二聚体起作用的核酸酶避免了不希望的同源二聚体活性的可能性,且因而增加了双链断裂的特异性。

[0208] 因而,例如为了靶向特定位置,将ZFN和TALEN构建为核酸酶对,将该对的每个成员设计成结合在被靶向的位点处的相邻序列。在细胞中瞬时表达后,所述核酸酶结合它们的靶位点,且FokI结构域异源二聚化以造成双链断裂。通过非同源的末端连接(NHEJ)途径对这些双链断裂的修复最经常导致小缺失或小序列插入。由于由NHEJ造成的每个修复是独特的,单个核酸酶对的应用可以产生在靶位点处具有多种不同缺失的等位基因系列。所述缺失通常是在几个碱基对至几百碱基对长度之间的任何地方的范围内,但是通过同时使用两对核酸酶已经在细胞培养物中成功地产生了较大的缺失(Carlson等人, 2012; Lee等人, 2010)。另外,当与核酸酶对结合地引入与被靶向的区域具有同源性的DNA片段时,通过同源性定向修复可以修复双链断裂以产生特定修饰(Li等人, 2011; Miller等人, 2010; Urnov等人, 2005)。

[0209] 尽管ZFN和TALEN的核酸酶部分具有类似的性质,这些工程改造的核酸酶之间的差异是在它们的DNA识别肽中。ZFN依赖于Cys2-His2锌指,且TALEN依赖于TALE。这两种DNA识别肽结构域具有这样的特征:它们天然地组合地存在于它们的蛋白中。Cys2-His2锌指通常存在于间隔3个碱基对的重复中,并且以不同组合存在于多种核酸相互作用蛋白中。另一方面,TALE存在于在氨基酸和识别的核苷酸对之间具有一对一识别比率的重复中。因为锌指和TALE以重复模式发生,可以尝试不同的组合来建立多种序列特异性。用于制备位点特异性的锌指内切核酸酶的方案包括,例如,模块组装(其中与三联体序列相关的锌指排成一行以覆盖要求的序列)、OPEN(肽结构域相对于三联体核苷酸的低严谨性选择,随后是肽组合相对于细菌系统中的最终靶标的高严谨性选择)和锌指文库的细菌单杂种筛选,以及其它。还可以例如从Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA)商业地设计和得到ZFN。

[0210] 用于设计和得到TALEN的方法描述在例如Reyon等人. *Nature Biotechnology*

2012年5月; 30 (5):460-5; Miller等人. Nat Biotechnol. (2011) 29: 143-148; Cermak等人. Nucleic Acids Research (2011) 39 (12): e82和Zhang等人. Nature Biotechnology (2011) 29 (2): 149-53. Mayo Clinic介绍了一种新近开发的基于网络的程序(命名为Mojo Hand),其用于设计TAL和TALEN构建体用于基因组编辑应用(可以通过www.talendesign.org访问)。还可以例如从Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA)商业地设计和得到TALEN。

[0211] CRISPR-Cas系统- 许多细菌和古细菌(archea)含有内源性的基于RNA的适应性免疫系统,其可以降解侵入噬菌体和质粒的核酸。这些系统由产生RNA组分的成簇的规则地隔开的短回文重复(CRISPR)基因和编码蛋白组分的CRISPR有关(Cas)基因组成。CRISPR RNA(crRNA)含有与特定病毒和质粒具有同源性的短段,且充当导引物以指导Cas核酸酶以降解对应病原体的互补核酸。酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的II型CRISPR/Cas系统的研究已经证实,来自RNA/蛋白复合物的三种组分和一起足以实现序列特异性的核酸酶活性:Cas9核酸酶,含有与靶序列具有同源性的20个碱基对的crRNA,和反式-活化crRNA(tracrRNA)(Jinek等人. *Science* (2012) 337: 816-821.)。进一步证实,由crRNA和tracrRNA之间的融合组成的合成嵌合导引RNA(gRNA)可以指导Cas9在体外切割与crRNA互补的DNA靶标。也证实,与合成的gRNA结合的Cas9的瞬时表达可以用于在多种不同物种中产生靶向双链断裂(Cho等人, 2013; Cong等人, 2013; DiCarlo等人, 2013; Hwang等人, 2013a,b; Jinek等人, 2013; Mali等人, 2013)。

[0212] 用于基因组编辑的CRISPR/Cas系统含有两种独特组分:gRNA和内切核酸酶例如Cas9。

[0213] gRNA通常是20核苷酸序列,其编码靶同源序列(crRNA)和内源性细菌RNA的组合,在单个嵌合转录物中所述内源性细菌RNA将所述crRNA连接至Cas9核酸酶(tracrRNA)。gRNA/Cas9复合物通过gRNA序列和互补基因组DNA之间的碱基配对募集至靶序列。为了Cas9的成功结合,基因组靶序列还必须含有紧跟在靶序列后面的正确的原间隔物相邻基序(Protospacer Adjacent Motif,PAM)序列。gRNA/Cas9复合物的结合将Cas9定位至基因组靶序列,使得Cas9可以切割DNA的两条链,从而造成双链断裂。正如ZFN和TALEN一样,由CRISPR/Cas产生的双链断裂可以经历同源重组或NHEJ。

[0214] Cas9核酸酶具有两种功能结构域:RuvC和HNH,各自切割不同的DNA链。当这两种结构域都有活性时,Cas9会造成基因组DNA中的双链断裂。

[0215] CRISPR/Cas的一个显著优点是,与容易地产生合成的gRNA的能力偶联的该系统的高效率使得能够同时靶向多个基因。另外,大多数携带突变的细胞呈现在被靶向的基因中的双等位基因突变。

[0216] 但是,在gRNA序列和基因组DNA靶序列之间的碱基配对相互作用中的明显灵活性允许与要被Cas9切割的靶序列的不完美匹配。

[0217] 含有单个无活性催化结构域(RuvC-或HNH-)的Cas9酶的修饰形式被称作‘切口酶’。由于仅一个活性核酸酶结构域,Cas9切口酶仅切割靶DNA的一条链,从而产生单链断裂或‘切口’。单链断裂或切口通常通过HDR途径快速地修复,其中使用完整的互补DNA链作为模板。但是,由Cas9切口酶引入的两个近侧相对链切口被处理为双链断裂,因此经常被称作‘双切口’CRISPR系统。双切口可以通过NHEJ或HDR修复,取决于在基因靶标上期望的作

用。因而,如果特异性和减少的脱靶效应是至关重要的,使用Cas9切口酶来产生双切口(通过设计两种gRNA,其靶序列紧密靠近且在基因组DNA的相反链上)将会减少脱靶效应,因为单独的任一种gRNA将产生不会改变基因组DNA的切口。

[0218] 含有两个无活性催化结构域的Cas9酶的修饰形式(死的Cas9,或dCas9)不具有核酸酶活性,尽管基于gRNA特异性仍然能够结合DNA。dCas9可以用作DNA转录调节剂的平台以通过将无活性酶与已知的调节结构域融合来活化或抑制基因表达。例如,单独的dCas9与基因组DNA中的靶序列的结合可以干扰基因转录。

[0219] 存在许多可公开得到的工具,其可用于帮助选择和/或设计靶序列以及生物信息学上确定的不同物种中的不同基因的独特gRNA的列表,诸如Feng Zhang实验室的Target Finder、Michael Boutros实验室的Target Finder (E-CRISP)、RGEN Tools: Cas-OFFinder、CasFinder: 用于鉴别基因组中的特定Cas9靶标的柔性算法和CRISPR Optimal Target Finder。

[0220] 为了使用CRISPR系统,应当在靶细胞中表达gRNA和Cas9。插入载体可以含有在单个质粒上的两个盒,或从两个单独质粒表达所述盒。CRISPR质粒是商购可得的,诸如来自Addgene的px330质粒。

[0221] “击和跑”或“进-出”-涉及两步重组程序。在第一步中,将含有双重阳性/阴性选择标记盒的插入-型载体用于引入期望的序列改变。所述插入载体含有与被靶向的基因座具有同源性的单个连续区域,且被修饰成携带目标突变。将该靶向构建体在同源性区域内的一个位点处用限制性酶线性化,电穿孔进细胞中,并执行阳性选择以分离同源的重组体。这些同源的重组体含有被插入载体序列隔开的局部重复,包括选择盒。在第二步中,对靶向的克隆进行阴性选择以鉴别这样的细胞:其通过复制的序列之间的染色体重组已经丢失选择盒。局部重组事件会除去重复,且取决于重组的位点,所述等位基因保留引入的突变或恢复至野生型。最终结果是期望的修饰的引入,没有保留任何外源序列。

[0222] “双替换”或“标记并交换”策略-涉及与击和跑方案类似的两步选择程序,但是需要两种不同靶向构建体的应用。在第一步中,使用具有3'和5'同源性臂的标准靶向载体在要引入突变的位置附近插入双重阳性/阴性选择盒。电穿孔和阳性选择以后,鉴别同源地靶向的克隆。接着,将含有具有期望突变的同源性区域的第二靶向载体电穿孔进靶向的克隆中,并应用阴性选择来除去选择盒和引入突变。最终的等位基因含有期望的突变,同时消除不希望的外源序列。

[0223] 位点特异性的重组酶-从P1细菌噬菌体衍生出的Cre重组酶和从酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)衍生出的Flp重组酶是各自识别独特的34碱基对DNA序列(分别称作“Lox”和“FRT”)的位点特异性的DNA重组酶,并且侧接Lox位点或FRT位点的序列可以分别在Cre或Flp重组酶的表达后通过位点特异性的重组容易地除去。例如,Lox序列由侧接13碱基对反向重复的不对称8碱基对间隔区域组成。Cre如下重组34碱基对lox DNA序列:结合13碱基对反向重复并催化间隔区域内的链切割和重新连接。由Cre在间隔区域中产生的交错的DNA切口被6个碱基对隔开以产生重叠区域,其充当同源性传感器来确保仅具有相同重叠区域的重重组位点重组。

[0224] 基本上,位点特异性的重组酶系统会提供在同源重组以后除去选择盒的方式。该系统也允许产生条件的改变的等位基因,其可以以时间或组织特异性的方式灭活或活化。

值得注意的是,Cre和Flp重组酶留下34碱基对的Lox或FRT“疤痕”。留下的Lox或FRT位点通常留在经修饰的基因座的内含子或3'UTR中,并且当前的证据提示,这些位点经常不会显著地干扰基因功能。

[0225] 因而,Cre/Lox和Flp/FRT重组涉及具有3'和5'同源性臂的靶向载体的引入,所述3'和5'同源性臂含有目标突变、两个Lox或FRT序列和典型的置于两个Lox或FRT序列之间的选择盒。应用阳性选择,并鉴别含有靶向突变的同源重组体。与阴性选择结合的Cre或Flp的瞬时表达导致选择盒的切除,并选择其中所述盒已经丢失的细胞。最终的靶向的等位基因含有外源序列的Lox或FRT疤痕。

[0226] 转座酶- 本文中使用的术语“转座酶”表示这样的酶:其结合转座子的末端并催化所述转座子向基因组的另一个部分的移动。

[0227] 本文中使用的术语“转座子”表示包含核苷酸序列的可移动的遗传元件,其可以来回移动至单个细胞的基因组内的不同位置。在该过程中,转座子可以造成突变和/或改变细胞的基因组中的DNA的量。

[0228] 已经分离或设计了许多也能够在细胞(例如脊椎动物)中换位的转座子系统,诸如Sleeping Beauty [Izsvák and Ivics Molecular Therapy (2004) 9, 147-156], piggyBac [Wilson等人. Molecular Therapy (2007) 15, 139-145], Tol2 [Kawakami等人. PNAS (2000) 97 (21): 11403-11408]或Frog Prince [Miskey等人. Nucleic Acids Res. Dec 1, (2003) 31 (23): 6873-6881]。通常,DNA转座子以简单的剪切并粘贴的方式从一个DNA位点转移至另一个DNA位点。这些元件中的每一个具有它们自身的优点,例如,Sleeping Beauty在区域特异性的诱变中是特别有用的,而Tol2具有整合进表达的基因中的最高趋势。可为Sleeping Beauty和piggyBac得到极度活跃的系统。最重要的是,这些转座子具有独特的靶位点偏好,且因此可以在重叠的、但是独特的基因集合中引入序列改变。因此,为了实现最好的可能基因覆盖,超过一个元件的应用是特别优选的。所述基本机制在不同的转座酶之间共享,因此描述piggyBac (PB)作为一个例子。

[0229] PB是最初从甘蓝尺蠖蛾(cabbage looper moth)粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)分离的2.5 kb昆虫转座子。所述PB转座子由侧接转座酶PBase的不对称末端重复序列组成。PBase会识别末端重复并通过基于“剪切并粘贴”的机制诱导转座,且优先地在四核苷酸序列TTAA处转置进宿主基因组中。插入后,将TTAA靶位点复制,使得PB转座子侧接该四核苷酸序列。当动员时,PB通常精确地切离它自身以重新建立单个TTAA位点,由此将宿主序列恢复至它的前转座子状态。切除以后,PB可以转置进新位置或从基因组永久地丢失。

[0230] 通常,类似于使用Cre/Lox或Flp/FRT,转座酶系统提供在同源重组停止以后除去选择盒的替代方式。因而,例如,PB转座酶系统涉及具有3'和5'同源性臂的靶向载体的引入,所述3'和5'同源性臂含有目标突变、在内源性TTAA序列的位点处的两个PB末端重复序列和置于PB末端重复序列之间的选择盒。应用阳性选择,并鉴别含有靶向突变的同源重组体。与阴性选择结合的PBase除去的瞬时表达导致选择盒的切除,并选择其中所述盒已经丢失的细胞。最终的靶向的等位基因含有引入的突变,不具有外源序列。

[0231] 对于要用于引入序列改变的PB,在相对紧密靠近要插入特定突变的位置处必须存在天然TTAA位点。

[0232] 使用重组腺伴随病毒(rAAV)平台的基因组编辑- 该基因组编辑平台是基于rAAV

载体,其能够在活哺乳动物细胞的基因组中插入、删除或置换DNA序列。rAAV基因组是正义或负义单链脱氧核糖核酸(ssDNA)分子,其是约4.7 kb长。这些单链DNA病毒载体具有高转导速率且具有在没有基因组中的双链DNA断裂存在下刺激内源性同源重组的独特性质。本领域技术人员可以设计rAAV载体来靶向期望的基因组基因座和在细胞中执行总的和/或精细的内源基因改变。rAAV基因组编辑具有优点,因为它靶向单个等位基因且不会导致任何脱靶基因组改变。rAAV基因组编辑技术是商购可得的,例如,来自Horizon™ (Cambridge, UK)的rAAV GENESIS™ 系统。

[0233] 应当理解,所述药剂可以是造成随机突变的诱变剂,且可以选择表现出CD84或SLAMF1的表达水平和/或活性的下调的细胞。

[0234] 所述诱变剂可以是,但不限于遗传剂、化学剂或辐射剂。例如,所述诱变剂可以是电离辐射,例如,但不限于,紫外线、 γ 射线或 α 粒子。其它诱变剂可以包括,但不限于:碱基类似物,其可以造成复制错误;脱氨剂,诸如亚硝酸;嵌入剂,诸如溴化乙锭;烷化剂,诸如溴尿嘧啶;转座子;天然的和合成的生物碱;溴及其衍生物;叠氮化钠;补骨脂素(例如,与紫外辐射组合)。所述诱变剂可以是化学诱变剂,例如,但不限于,ICR191, 1,2,7,8-二环氧-辛烷(DEO), 5-氮杂C, N-甲基-N-亚硝基胍(MNNG)或甲磺酸乙酯(EMS)。

[0235] 用于量化效力和检测序列改变的方法是本领域众所周知的,并且包括、但不限于,DNA测序、电泳、基于酶的错配检测测定和杂交测定,诸如PCR、RT-PCR、RNA酶保护、原位杂交、引物延伸、DNA印迹、RNA印迹和斑点印迹分析。

[0236] 使用例如色谱法、电泳方法、免疫检测测定诸如ELISA和蛋白质印迹分析和免疫组织化学,也可以在蛋白水平确定在特定基因中的序列改变。

[0237] 另外,本领域普通技术人员可以容易地设计敲入/敲除构建体,包括用于有效地选择转化的细胞(其经历与所述构建体的同源重组事件)的阳性和/或阴性选择标志物。阳性选择提供了富集已经摄入外源DNA的克隆的群体的方式。这样的阳性标志物的非限制性例子包括谷氨酰胺合成酶、二氢叶酸还原酶(DHFR)、赋予抗生素抗性的标志物诸如新霉素、潮霉素、嘌呤霉素和杀稻瘟素S抗性盒。阴性选择标志物是针对随机整合和/或标志物序列(例如阳性标志物)的消除的选择所必需的。这样的阴性标志物的非限制性例子包括单纯疱疹-胸苷激酶(HSV-TK)(其将更昔洛韦(GCV)转化成细胞毒性的核苷类似物)、次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(ARPT)。

[0238] 可以与本发明的一些实施方案一起使用以下调CD84或SLAMF1的另一种药剂是阻止CD84或SLAMF1活化或底物结合的分子。

[0239] 根据一个实施方案,当使用的药剂是能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂时,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂。

[0240] 根据一个实施方案,所述受试者被诊断出具有恶性疾病。

[0241] 根据一个实施方案,所述受试者被诊断出具有自身免疫病、炎性疾病或传染性疾病(例如病毒性疾病)。

[0242] 本文中使用的术语“诊断”表示分类病理学(例如,恶性肿瘤)。

[0243] 根据一个实施方案,可以治疗所述受试者。

[0244] 因而,根据另一个方面,提供了一种在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或

表达的药剂。

[0245] 根据另一个方面,提供了治疗有效量的能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂用于在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的用途,前提条件是,所述药剂不是能够降低CD84的活性或表达的药剂。

[0246] 根据另一个方面,提供了在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的方法,前提条件是,所述恶性疾病不是B细胞恶性肿瘤,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂。

[0247] 根据另一个方面,提供了治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂用于在有此需要的受试者中治疗涉及T细胞耗竭的恶性疾病的用途,前提条件是,所述恶性疾病不是B细胞恶性肿瘤。

[0248] 本文中使用的术语“治疗”包括终止、实质上抑制、减慢或逆转病症的进展,实质上改善病症的临床或美学症状,或者实质上预防病症的临床或美学症状的出现。

[0249] 根据一个实施方案,如果与所述疾病有关的一种或多种症状被缓解或消除,包括、但不限于,减少(或破坏)癌细胞的增殖,减轻由所述疾病引起的症状,增加遭受所述疾病的对象的生活质量,减小治疗所述疾病所需的其它药物的剂量,延迟疾病的进展,和/或延长个体的存活,则成功地“治疗”个体。

[0250] 使用本领域已知的用于评价具体疾病或病症的任意方法(例如利用血液试验、超声、CT扫描、MRI等),可以评价治疗。这样的方法可以由本领域技术人员确定。

[0251] 本文中使用的术语“恶性疾病”或“癌症”表示任何癌性疾病。癌细胞可以与诸如以下表型有关:失控的增殖,专门功能的丧失,不死性,显著的转移潜力,抗细胞凋亡活性的显著增加,快速的生长和增殖速率,和某些特征性形态和细胞标志物。根据一个具体实施方案,所述癌症涉及T细胞的耗竭。

[0252] 在某些情况下,癌症细胞将呈肿瘤的形式,这样的细胞可以局部地存在于动物内(例如实体瘤),可替换地,癌细胞可以作为独立细胞在血流中循环,例如,白血病细胞(非实体瘤),或可以分散在体内(例如转移)。应当理解,本文中使用的术语癌症包括处于任何阶段和呈任何形式的所有类型的癌症。

[0253] 适合通过本发明的一些实施方案的方法进行诊断或治疗的恶性疾病的类型包括良性肿瘤、疣、息肉、初癌和恶性肿瘤/癌症。

[0254] 使用本发明的方法可以治疗的癌性疾病的具体例子包括、但不限于:胃肠道肿瘤(结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、结直肠癌、结肠直肠癌、遗传性非息肉病类型1、遗传性非息肉病类型2、遗传性非息肉病类型3、遗传性非息肉病类型6;结直肠癌、遗传性非息肉病类型7、小肠和/或大肠癌、食管癌、食管癌伴甲状腺肿(tylosis with esophageal cancer)、胃癌、胰腺癌、胰腺内分泌肿瘤)、子宫内膜癌、隆凸性皮肤纤维肉瘤、胆囊癌、胆道肿瘤、前列腺癌、前列腺腺癌、肾癌(例如,威尔曼瘤类型2或类型1)、肝癌(例如,肝胚细胞瘤、肝细胞癌、肝细胞癌)、膀胱癌、胚胎型横纹肌肉瘤、生殖细胞肿瘤、滋养层肿瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、卵巢、子宫、上皮卵巢的未成熟畸胎瘤、骶尾骨肿瘤、绒毛膜癌、胎盘部位滋养层肿瘤、上皮成体肿瘤、卵巢癌、浆液性卵巢癌、卵巢性索肿瘤、宫颈癌、子宫颈癌、小细胞和非小细胞肺癌、鼻咽癌、乳腺癌(例如,导管型乳腺癌、散发的侵袭性导管内乳腺癌;乳腺癌、对乳腺癌易感、类型4乳腺癌、乳腺癌-1、乳腺癌-3;乳腺-卵巢癌)、鳞状细胞癌(例如,在

头和颈中)、神经源性肿瘤、星形细胞瘤、恶性神经节瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、腺癌、肾上腺肿瘤、遗传性肾上腺皮质癌、脑恶性肿瘤(肿瘤)、各种其它癌(例如,支气管原大细胞、导管、Ehrlich-Lettre腹水、表皮样、大细胞、Lewis肺、骨髓、粘液表皮样、燕麦细胞、小细胞、梭形细胞、脊细胞、移行细胞、未分化的、癌肉瘤、绒毛膜癌、囊腺癌)、室管膜母细胞瘤、上皮瘤、红白血病(例如,弗兰德红白血病、淋巴母细胞性红白血病)、纤维肉瘤、巨细胞瘤、神经胶质肿瘤、胶质母细胞瘤(例如,多形性、星形细胞瘤)、神经胶质瘤、肝细胞瘤、异种杂交瘤、异源骨髓瘤、组织细胞瘤、杂交瘤(例如,B细胞杂交瘤)、肾上腺样瘤、胰岛素瘤、胰岛肿瘤、角化病、成平滑肌细胞瘤、平滑肌肉瘤、白血病(例如,急性淋巴性白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性成淋巴细胞性前B细胞白血病、急性成淋巴细胞性T细胞白血病、急性巨核母细胞白血病、单核细胞性白血病、急性髓性白血病、急性髓样白血病、急性髓样白血病伴发嗜酸性粒细胞增多症、B细胞白血病、嗜碱细胞性白血病、慢性髓样白血病、慢性白血病、B细胞白血病、嗜酸性白血病、弗兰德白血病、粒细胞或髓细胞白血病、多毛细胞白血病、淋巴细胞白血病、巨核母细胞性白血病、单核细胞性白血病、单核细胞-巨噬细胞白血病、成髓细胞白血病、髓样白血病、粒单核细胞白血病、浆细胞白血病、前B细胞白血病、前髓细胞白血病、亚急性白血病、T细胞白血病、淋巴样肿瘤、骨髓恶性肿瘤倾向、急性非淋巴细胞性白血病)、淋巴肉瘤、淋巴瘤(例如,霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、组织细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、胸腺淋巴瘤)、黑色素瘤、乳腺肿瘤、肥大细胞瘤、髓母细胞瘤、间皮瘤、转移性肿瘤、单核细胞肿瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、骨髓瘤、肾母细胞瘤、神经组织神经胶质肿瘤、神经组织神经元肿瘤、神经鞘瘤、神经母细胞瘤、少突神经胶质瘤、骨软骨瘤、骨骨髓瘤(osteomyeloma)、骨肉瘤(例如,尤因氏骨肉瘤)、乳头状瘤、移行细胞瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤(侵袭性垂体瘤)、浆细胞瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤(例如,尤因氏肉瘤、组织细胞的细胞肉瘤、Jensen肉瘤、成骨性肉瘤、网状细胞肉瘤)、许旺细胞瘤、皮下肿瘤、畸胎瘤(例如,多能畸胎瘤)、畸胎瘤、睾丸肿瘤、胸腺瘤和毛发上皮瘤、胃癌、纤维肉瘤、多形性胶质母细胞瘤;多发性血管球瘤、李弗劳明综合征、脂肪肉瘤、lynch癌症家族综合征II、男性生殖细胞肿瘤、肥大细胞白血病、甲状腺髓样癌(medullary thyroid)、多发性脑膜瘤、内分泌瘤形成粘液肉瘤、副神经节瘤、家族性非嗜铬细胞瘤(familial nonchromaffin)、毛母质瘤、家族性的和散发的乳头状瘤(papillary, familial and sporadic)、家族性杆状瘤倾向综合征(rhabdoid predisposition syndrome, familial)、杆状瘤、软组织肉瘤和伴发胶质母细胞瘤的特科特综合征。

[0255] 初癌被充分表征且是本领域已知的(例如,参见Berman JJ. 和Henson DE., 2003. Classifying the precancers: a metadata approach. BMC Med Inform Decis Mak. 3:8)。适合通过本发明的方法治疗的初癌的种类包括:获得的小的或极微小的初癌,获得的具有核异型的大病变,与促进癌症的遗传性增生综合征一起发生的前体病变,和获得的弥散性增生和弥散性组织转化。小的或极微小的初癌的例子包括HGSIL(子宫颈的高度鳞状上皮内病变)、AIN(肛门上皮内瘤形成)、声带发育异常、(结肠的)异常隐窝、PIN(前列腺上皮内瘤形成)。获得的具有核异型的大病变的例子包括管状腺瘤、AILD(血管免疫母细胞性淋巴结病伴异常蛋白血症)、非典型脑膜瘤、胃息肉、大斑块副银屑病、脊髓发育不良、乳头状移行细胞原位癌、具有过量胚细胞的难治性贫血和Schneiderian乳头状

瘤。与促进癌症的遗传性增生综合征一起发生的前体病变的例子包括非典型黑痣综合征、C细胞腺瘤病和MEA。获得的弥散性增生和弥散性组织转化的例子包括AIDS、非典型淋巴样增生、骨的佩吉特病、移植后淋巴组织增生和溃疡性结肠炎。

[0256] 根据一个实施方案,所述癌症是诱导T细胞耗竭的癌症。

[0257] 根据一个实施方案,所述癌症包含实体瘤。

[0258] 例如,所述实体瘤(癌症)可以是肾上腺皮质癌、肛门癌、膀胱癌、脑肿瘤、神经胶质瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、肝外胆管癌、尤文肿瘤、颅外胚细胞瘤、眼癌、胆囊癌、胃癌、生殖细胞肿瘤、妊娠滋养细胞肿瘤、头颈癌、下咽癌、胰岛细胞癌、肾癌、喉癌、唇和口腔癌、肝癌、肺癌、黑素瘤、间皮瘤、梅克尔细胞癌、转移性鳞状头颈癌、骨髓瘤、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、窦和鼻癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、垂体癌、前列腺癌、横纹肌肉瘤、直肠癌、肾细胞癌、唾液腺癌、皮肤癌、软组织肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌或威尔曼瘤。

[0259] 根据其它实施方案,所述癌症是选自肝癌(例如肝细胞癌)、肺癌(例如肺癌诸如非小细胞肺癌和肺腺癌)、乳腺癌(例如乳腺癌诸如乳腺癌)、结肠癌(例如结肠直肠癌、结肠腺癌)、肾癌(例如肾细胞癌)、前列腺癌、卵巢癌、头颈癌、纤维肉瘤、宫颈癌、食管癌、直肠癌、口腔癌和胰腺癌的实体瘤。

[0260] 根据一个具体实施方案,所述肿瘤是转移中的实体瘤(例如,由转移性癌细胞形成)。

[0261] 根据一个实施方案,所述恶性疾病是造血癌症。

[0262] 根据一个实施方案,所述恶性疾病是T细胞恶性肿瘤或骨髓恶性肿瘤。

[0263] 示例性的T细胞恶性肿瘤包括、但不限于:前体T-成淋巴细胞性淋巴瘤/白血病、皮肤T-细胞淋巴瘤、成年人T-细胞白血病/淋巴瘤、血管免疫母细胞性T-细胞淋巴瘤、结节外天然杀伤/T-细胞淋巴瘤(鼻型)、肠病变相关的肠T-细胞淋巴瘤(EATL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)和未指定的周围T-细胞淋巴瘤。

[0264] 示例性的骨髓恶性肿瘤包括、但不限于:急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病、急性髓性白血病、成年人急性髓样白血病、儿童急性髓样白血病、骨髓增生异常综合征(MDS)、与嗜酸性粒细胞增多症有关的骨髓增生性肿瘤(MPN)和骨髓肿瘤、和PDGFR-A或-B或FGFR1的异常。

[0265] 根据一个实施方案,所述恶性疾病不是B细胞恶性肿瘤(例如当给所述受试者施用能够降低CD84的活性或表达的药剂时)。

[0266] 根据一个实施方案,所述恶性疾病是B细胞恶性肿瘤(例如当给所述受试者施用能够降低SLAMF1的活性或表达的药剂时)。

[0267] 本文中使用的术语“B细胞恶性肿瘤”表示造血或淋巴组织的恶性肿瘤,其涉及分化的任何亚型或阶段的B淋巴细胞(例如早期前B细胞、前B细胞、成熟的B细胞、浆细胞)。

[0268] 根据一个实施方案,所述B细胞恶性肿瘤包含淋巴瘤、白血病或骨髓瘤。

[0269] 这样的疾病包括、但不限于:霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞性淋巴瘤(DLBCL)、B-细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)/慢性淋巴样白血病(CLL)、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤、慢性粒细胞性白血病(CML)、结节外边缘区B细胞淋巴瘤-粘膜相关淋巴样组织淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、结节边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特

淋巴瘤、毛细胞白血病、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞(Lymphoplasmocytic)淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病(也被称作急性成淋巴细胞性白血病或ALL)、急性成淋巴细胞性前B细胞白血病、浆细胞白血病、前B细胞白血病(例如前-B ALL)、早期前B细胞ALL(例如早期前-B ALL)或前-B急性成淋巴细胞样白血病。

[0270] 根据一个实施方案,所述B细胞恶性肿瘤是CLL。

[0271] 本文中使用的术语“B-CLL”或“CLL”表示B-细胞的异常肿瘤增殖。认为CLL与被称作小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)的疾病(主要存在于淋巴结中的一种非霍奇金淋巴瘤类型)相等。世界卫生组织认为CLL和SLL代表相同疾病的不同阶段[Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M (2005). “Chronic lymphocytic leukemia”*N. Engl. J. Med.* 352 (8): 804-15]。

[0272] 可以实现本发明的方法用于治疗涉及T细胞耗竭的其它疾病。这样的疾病包括,例如,免疫相关的疾病,包括自身免疫疾病、炎症性疾病和感染性疾病(例如未分辨的急性感染和慢性感染)。

[0273] 如上所述,本发明的发明人已经进一步揭示,CD84在Bregs活性中起作用。具体地,本发明的发明人发现,在没有CD84表达存在下,存在B调节细胞(其已知为免疫应答的负调节剂)的活性和水平的显著增加。因此,在有B调节细胞存在下,存在自身免疫和炎症的显著下降。因此,可以进一步实现本发明的方法用于治疗其中涉及B调节细胞的疾病,包括自身免疫疾病、炎症性疾病和感染性疾病。

[0274] 根据本发明的另一个方面,提供了一种在有此需要的受试者中治疗自身免疫或炎症性疾病的方法,所述方法包括给受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此治疗所述受试者中的自身免疫或炎症性疾病。

[0275] 根据本发明的另一个方面,提供了治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂用于在有此需要的受试者中治疗自身免疫或炎症性疾病的用途。

[0276] 根据本发明的另一个方面,提供了在有此需要的受试者中升高B调节细胞的活性或水平的方法,所述方法包括给受试者施用治疗有效量的能够降低CD84的活性或表达的药剂,由此升高所述受试者中的B调节细胞的活性或水平。

[0277] 术语“B调节细胞”或“Bregs”表示抑制免疫应答的B细胞。Bregs可以抑制T细胞活化(直接地或间接地),且也可以抑制抗原呈递细胞(APC)、其它先天性免疫细胞或其它B细胞。Bregs可以表达任何B细胞标志物,包括、但不限于,CD19、CD1d、CD5、CD24、CD27、CD38、CD40或T细胞免疫球蛋白粘蛋白-1 (TIM-1)。Bregs还可以分泌IL-10、TGF β -1和/或IL-35。

[0278] 根据一个实施方案,使所述B调节细胞的活性或水平增强至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%或200%。测量B细胞水平的增强是本领域技术人员已知的,且包括例如流式细胞计数测定(FACS)。同样地,测量B细胞功能的增强是本领域普通技术人员已知的,且包括例如流式细胞计数测定(FACS)、ELISA、ELISpot、细胞内细胞因子染色(ICS)和增殖测定。

[0279] 根据本发明的一些实施方案,升高B调节细胞的活性或水平表现为所述脾中增加的B调节细胞水平。

[0280] 根据本发明的具体实施方案,升高B调节细胞的活性或水平与B10 B调节细胞的增

加有关。

[0281] 根据本发明的一些实施方案,升高B调节细胞的活性或水平表现为所述B调节细胞对抗炎细胞因子的生产的增加。示例性的抗炎细胞因子包括、但不限于IL-10、TGF β -1和IL-35。

[0282] 根据本发明的一些实施方案,升高B调节细胞的活性或水平与Breg标志物的表达的增加有关。示例性的Breg标志物包括、但不限于CD19、CD1d、CD5、CD24、CD27、CD38、CD40和/或TIM-1。

[0283] 感染性疾病的例子包括、但不限于慢性感染性疾病、亚急性感染性疾病、急性感染性疾病、病毒性疾病、细菌性疾病、原生动物疾病、寄生虫疾病、真菌疾病、支原体疾病和朊病毒疾病。

[0284] 根据一个实施方案,所述涉及T细胞耗竭的疾病包含病毒感染。

[0285] 根据一个实施方案,所述涉及T细胞耗竭的疾病包含慢性病毒感染。

[0286] 示例性的病毒感染包括、但不限于:由淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、多瘤病毒、腺病毒、弗兰德白血病病毒、小鼠肝炎病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、埃博拉病毒和登革热病毒引起的感染。

[0287] 通过本发明的方法可以治疗的示例性自身免疫疾病包括、但不限于:心血管疾病、类风湿性疾病、腺疾病、胃肠道疾病、皮肤疾病、肝疾病、神经系统疾病、肌疾病、肾疾病、与生殖有关的疾病、结缔组织疾病和系统疾病。

[0288] 自身免疫性心血管疾病的例子包括、但不限于:动脉粥样硬化、心肌梗塞、血栓形成、韦格纳氏肉芽肿病、高安动脉炎、川崎综合征、抗-因子VIII自身免疫病、坏死性小血管血管炎、显微镜下多血管炎、Churg和Strauss综合征、微量免疫病灶的坏死性和新月形成性肾小球肾炎、抗磷脂综合征、抗体诱导的心力衰竭、血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、在美洲锥虫病中的心脏自身免疫和抗-辅助性T淋巴细胞自身免疫。

[0289] 自身免疫性类风湿性疾病的例子包括、但不限于类风湿性关节炎和强直性脊柱炎。

[0290] 自身免疫性腺疾病的例子包括、但不限于:胰腺疾病、I型糖尿病、甲状腺疾病、格雷夫斯病、甲状腺炎、自发的自身免疫性甲状腺炎、桥本甲状腺炎、特发性粘液性水肿、卵巢自身免疫疾病(ovarian autoimmunity)、自身免疫性抗精子不育、自身免疫性前列腺炎和I型自身免疫性多腺性综合征。疾病包括、但不限于:胰腺的自身免疫疾病、I型糖尿病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、自发的自身免疫性甲状腺炎、桥本甲状腺炎、特发性粘液性水肿、卵巢自身免疫疾病、自身免疫性抗精子不育、自身免疫性前列腺炎和I型自身免疫性多腺性综合征。

[0291] 自身免疫性胃肠道疾病的例子包括、但不限于:慢性炎症性肠疾病、乳糜泻、结肠炎、回肠炎和克罗恩氏病。

[0292] 自身免疫性皮肤疾病的例子包括、但不限于自身免疫性大疱性皮肤病,例如,但不限于,寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮和落叶型天疱疮。

[0293] 自身免疫性肝疾病的例子包括、但不限于:肝炎、自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和自身免疫性肝炎。

[0294] 自身免疫性神经系统疾病的例子包括、但不限于:多发性硬化、阿尔茨海默氏病、

重症肌无力、神经病、运动神经病、格-巴二氏综合征和自身免疫性神经病、肌无力、Lambert-Eaton肌无力综合征、副肿瘤性神经系统疾病、小脑萎缩、副肿瘤性小脑萎缩和僵人综合征、非-副肿瘤性僵人综合征、进行性小脑萎缩、脑炎、Rasmussen氏脑炎、肌萎缩性侧索硬化、Sydeham舞蹈病、抽动秽语综合征和自身免疫性多内分泌腺病、免疫失调性神经病、获得性神经性肌强直、先天性多关节弯曲、神经炎、视神经炎和神经变性疾病。

[0295] 自身免疫性肌疾病的例子包括、但不限于：肌炎、自身免疫性肌炎和原发性舍格伦综合征和平滑肌自身免疫病。

[0296] 自身免疫性肾疾病的例子包括、但不限于：肾炎和自身免疫性基质性肾炎。

[0297] 与生殖有关的自身免疫性疾病的例子包括、但不限于反复流产。

[0298] 自身免疫性结缔组织的例子疾病包括、但不限于：耳疾病、自身免疫性耳疾病和内耳的自身免疫疾病。

[0299] 自身免疫性系统疾病的例子包括、但不限于：系统性红斑狼疮和系统性硬化症。

[0300] 通过本发明的方法可以治疗的示例性炎性疾病包括、但不限于：慢性炎性疾病和急性炎性疾病。

[0301] 与超敏反应有关的炎性疾病

超敏反应的例子包括、但不限于：I型超敏反应、II型超敏反应、III型超敏反应、IV型超敏反应、速发型超敏反应、抗体介导的超敏反应、免疫复合物介导的超敏反应、T淋巴细胞介导的超敏反应和DTH。

[0302] I型或速发型超敏反应，诸如哮喘。

[0303] II型超敏反应包括、但不限于：类风湿性疾病、风湿样自身免疫疾病、类风湿性关节炎(Krenn V. 等人, Histol Histopathol 2000年7月; 15 (3):791)、脊柱炎、强直性脊柱炎(Jan Voswinkel等人, Arthritis Res 2001; 3 (3): 189)、系统疾病、系统性自身免疫疾病、系统性红斑狼疮(Erikson J. 等人, Immunol Res 1998;17 (1-2):49)、硬化、系统性硬化症(Renaudineau Y. 等人, Clin Diagn Lab Immunol. 1999年3月;6 (2):156); Chan OT.等人, Immunol Rev 1999年6月; 169:107)、腺疾病、腺自身免疫疾病、胰腺自身免疫疾病、糖尿病、I型糖尿病(Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996年10月;34增刊:S125)、甲状腺疾病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病(Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000年6月; 29 (2):339)、甲状腺炎、自发的自身免疫性甲状腺炎(Braley-Mullen H.和Yu S, J Immunol 2000年12月15日;165 (12):7262)、桥本甲状腺炎(Toyoda N. 等人, Nippon Rinsho 1999年8月;57 (8):1810)、粘液性水肿、特发性粘液性水肿(Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999年8月;57 (8):1759);自身免疫性生殖疾病、卵巢疾病、卵巢自身免疫疾病(Garza KM. 等人, J Reprod Immunol 1998年2月;37 (2):87), 自身免疫性抗精子不育(Diekman AB. 等人, Am J Reprod Immunol. 2000年3月;43 (3): 134)、反复流产(Tincani A. 等人, Lupus 1998;7增刊2:S107-9)、神经变性疾病、神经系统疾病、神经系统自身免疫疾病、多发性硬化(Cross AH. 等人, J Neuroimmunol 2001年1月1日;112 (1-2):1)、阿尔茨海默氏病(Oron L. 等人, J Neural Transm Suppl. 1997; 49:77)、重症肌无力(Infante AJ.和Kraig E, Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83)、运动神经病(Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000年5月;7 (3):191)、格-巴二氏综合征、神经病和自身免疫性神经病(Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000年4月;319 (4):234)、肌

无力疾病、Lambert-Eaton肌无力综合征(Takamori M. Am J Med Sci. 2000年4月;319 (4):204)、副肿瘤性神经系统疾病、小脑萎缩、副肿瘤性小脑萎缩、非-副肿瘤性僵人综合征、小脑萎缩、进行性小脑萎缩、脑炎、Rasmussen氏脑炎、肌萎缩性侧索硬化、Sydeham舞蹈病、抽动秽语综合征、多内分泌腺病、自身免疫性多内分泌腺病(Antoine JC.和Honnorat J. Rev Neurol (巴黎) 2000年1月;156 (1):23);神经病、免疫失调性神经病(Nobile-Orazio E. 等人, Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999;50:419);神经性肌强直、获得性神经性肌强直、先天性多关节弯曲(Vincent A. 等人, Ann N Y Acad Sci. 1998年5月13日; 841:482)、心血管疾病、心血管自身免疫疾病、动脉粥样硬化(Matsuura E. 等人, Lupus. 1998;7增刊2:S135)、心肌梗塞(Vaarala O. Lupus. 1998;7增刊2:S132)、血栓形成(Tincani A. 等人, Lupus 1998; 7增刊2:S107-9)、肉芽肿病、韦格纳氏肉芽肿病、动脉炎、高安动脉炎和川崎综合征(Praprotnik S. 等人, Wien Klin Wochenschr 2000年8月25日;112 (15-16):660);抗-因子VIII自身免疫病(Lacroix-Desmazes S. 等人, Semin Thromb Hemost.2000;26 (2):157);血管炎、坏死性小血管血管炎、显微镜下多血管炎、Churg和Strauss综合征、肾小球肾炎、微量免疫病灶的坏死性肾小球肾炎、新月形肾小球肾炎(Noel LH. Ann Med Interne (巴黎). 2000年5月;151 (3):178);抗磷脂综合征(Flamholz R. 等人, J Clin Apheresis 1999;14 (4):171);心力衰竭、在心力衰竭中的激动剂-样 β -肾上腺素受体抗体(Wallukat G. 等人, Am J Cardiol. 1999 Jun 17;83 (12A):75H)、血小板减少性紫癜(Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 4-6月; 14 (2):114);溶血性贫血、自身免疫性溶血性贫血(Efremov DG. 等人, Leuk Lymphoma 1998年1月;28 (3-4):285)、胃肠道疾病、胃肠道的自身免疫疾病、肠疾病、慢性炎症性肠疾病(Garcia Herola A. 等人, Gastroenterol Hepatol. 2000年1月;23 (1):16)、乳糜泻(Landau YE.和Shoenfeld Y. Harefuah 2000年1月16日;138 (2):122)、肌肉组织的自身免疫疾病、肌炎、自身免疫性肌炎、舍格伦综合征(Feist E. 等人, Int Arch Allergy Immunol 2000年9月;123 (1):92);平滑肌自身免疫病(Zauli D. 等人, Biomed Pharmacother 1999年6月;53 (5-6):234)、肝疾病、肝自身免疫疾病、自身免疫性肝炎(Manns MP. J Hepatol 2000年8月;33 (2):326)和原发性胆汁性肝硬化(Strassburg CP. 等人, Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999年6月;11 (6):595)。

[0304] IV型或T细胞介导的超敏反应包括、但不限于:类风湿性疾病、类风湿性关节炎(Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci U S A 1994年1月18日; 91 (2):437)、系统疾病、系统性自身免疫疾病、系统性红斑狼疮(Datta SK., Lupus 1998;7 (9):591)、腺疾病、腺自身免疫疾病、胰腺疾病、胰腺自身免疫疾病、I型糖尿病(Castano L.和Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647);甲状腺疾病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病(Sakata S. 等人, Mol Cell Endocrinol 1993年3月;92 (1):77);卵巢疾病(Garza KM. 等人, J Reprod Immunol 1998年2月;37 (2):87)、前列腺炎、自身免疫性前列腺炎(Alexander RB. 等人, Urology 1997年12月;50 (6):893)、多腺性综合征、自身免疫性多腺性综合征、I型自身免疫性多腺性综合征(Hara T. 等人, Blood. 1991年3月1;77 (5):1127)、神经系统疾病、自身免疫性神经系统疾病、多发性硬化、神经炎、视神经炎(Soderstrom M. 等人, J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994年5月;57 (5):544)、重症肌无力(Oshima M. 等人, Eur J Immunol 1990年12月;20 (12):2563)、僵人综合征

(Hiemstra HS. 等人, Proc Natl Acad Sci U S A 2001年3月27日; 98 (7):3988)、心血管疾病、在美洲锥虫病中的心脏自身免疫(Cunha-Neto E. 等人, J Clin Invest 1996年10月15日; 98 (8):1709)、自身免疫性血小板减少性紫癜(Semple JW. 等人, Blood 1996年5月15日; 87 (10):4245)、抗-辅助性T淋巴细胞自身免疫(Caporossi AP. 等人, Viral Immunol 1998;11 (1):9)、溶血性贫血(Sallah S. 等人, Ann Hematol 1997年3月;74 (3):139)、肝疾病、肝自身免疫疾病、肝炎、慢性活动性肝炎(Franco A. 等人, Clin Immunol Immunopathol 1990年3月;54 (3):382)、胆汁性肝硬化、原发性胆汁性肝硬化(Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996年11月;91 (5):551)、肾疾病、肾自身免疫疾病、肾炎、基质性肾炎(Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990年8月;1 (2):140)、结缔组织疾病、耳疾病、自身免疫性结缔组织疾病、自身免疫性耳疾病(Yoo TJ. 等人, Cell Immunol 1994年8月;157 (1):249)、内耳的疾病(Gloddek B. 等人, Ann N Y Acad Sci 1997年12月29日;830:266)、皮肤病、皮肤疾病、真皮疾病、大疱性皮肤病、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮和落叶型天疱疮。

[0305] 迟发型超敏反应的例子包括、但不限于:接触性皮炎和药疹。

[0306] T淋巴细胞介导的超敏反应的类型的例子包括、但不限于:辅助性T淋巴细胞和细胞毒性T淋巴细胞。

[0307] 辅助性T淋巴细胞介导的超敏反应的例子包括、但不限于:Th1淋巴细胞介导的超敏反应和Th2淋巴细胞介导的超敏反应。

[0308] 根据一个实施方案,所述炎性疾病不是B细胞恶性肿瘤。

[0309] 根据一个具体实施方案,所述炎性疾病不是B-CLL。

[0310] 根据一个实施方案,所述自身免疫或炎性疾病是慢性病症。

[0311] 根据一个实施方案,所述自身免疫或炎性疾病是急性病症。

[0312] 根据一个实施方案,所述受试者被诊断出具有自身免疫或炎性疾病(例如在治疗之前)。

[0313] 根据一个具体实施方案,所述自身免疫或炎性疾病是多发性硬化、溃疡性结肠炎(UC)、克罗恩氏病、炎性肠病(IBD)、关节炎或狼疮。

[0314] 可以将本发明的一些实施方案的药剂(能够降低CD84或SLAMF1的活性或表达)单独地或在药物组合物中(其中将它与合适的载体或赋形剂混合)施用给生物。

[0315] 本文中使用的“药物组合物”表示本文描述的一种或多种活性成分与其它化学组分(诸如生理学上合适的载体和赋形剂)的制剂。药物组合物的目的是便于将化合物施用给生物体。

[0316] 本文中的术语“活性成分”表示可引起生物学效应(即,CD84或SLAMF1活性或表达的下调)的药剂。

[0317] 在下文中,可以可互换地使用的短语“生理上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”表示对生物体不引起显著刺激且不终止所施用的化合物的生物活性和性能的载体或稀释剂。佐剂被包含在这些短语下。

[0318] 本文中的术语“赋形剂”表示加入药物组合物中以进一步促进活性成分施用的惰性物质。赋形剂的例子包括、但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0319] 用于配制和施用药物的技术可以参见“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版,其通过引用并入本文。

[0320] 合适的施用途径可以包括,例如,口服、直肠、透粘膜,特别是经鼻、肠或胃肠外递送,包括肌肉内、皮下和骨髓内注射以及鞘内、直接心室内、心内(例如,注射进右或左心室腔,注射进共同冠状动脉)、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0321] 可替代地,可以以局部而不是系统方式施用药物组合物,例如,通过将药物组合物直接注射进患者的组织区域中。

[0322] 术语“组织”表示由细胞组成的生物体的部分,其用于执行一种或多种功能。例子包括、但不限于脑组织、视网膜、皮肤组织、肝组织、胰腺组织、骨、软骨、结缔组织、血液组织、肌肉组织、心脏组织、脑组织、血管组织、肾组织、肺组织、性腺组织、造血组织。

[0323] 本发明的一些实施方案的药物组合物可以通过本领域众所周知的方法制备,例如,借助于常规混合、溶解、粒化、做糖衣丸、磨细、乳化、包封、截留或冻干过程。

[0324] 因此,可以以常规方式,使用促进将所述活性成分加工成可在药学上使用的制品的一种或多种生理上可接受的载体(包括赋形剂和助剂),配制用于根据本发明的一些实施方案的用途的药物组合物。适当的制剂取决于选择的施用途径。

[0325] 对于注射,可以将所述药物组合物的活性成分配制在水溶液中,优选地在生理上相容的缓冲液(诸如汉克氏溶液、林格氏溶液或生理盐水缓冲液)中。对于透粘膜施用,在所述制剂中使用适合要透过的屏障的穿透剂。这样的穿透剂在本领域内是公知的。

[0326] 对于口服施用,通过将所述活性化合物与本领域众所周知的药学上可接受的载体组合,可以容易地配制药组合物。这样的载体使得所述药物组合物能够配制为用于被患者口服摄入的片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊剂、液体、凝胶、糖浆剂、浆、混悬液等。可以如下制备用于口服使用的药理学制剂:使用固体赋形剂,任选地碾磨得到的混合物,并加工颗粒的混合物(如果需要的话在加入合适的辅料以后),以得到片剂或糖衣丸芯。合适的赋形剂具体地是,填充剂诸如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制品例如,玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羟丙基甲基-纤维素、羧甲基纤维素钠;和/或生理上可接受的聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要的话,可以加入崩解剂,诸如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐诸如海藻酸钠。

[0327] 可以给糖衣丸芯提供合适的包衣。为此目的,可以使用浓缩的糖溶液,其可以任选地含有阿拉伯树胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以向片剂或糖衣丸包衣中加入染料或色素,用于鉴别或者表征活性化合物剂量的不同组合。

[0328] 可以口服使用的药物组合物包括由明胶制成的推入配合胶囊剂以及由明胶和塑化剂(诸如甘油或山梨醇)制成的软密封胶囊剂。所述推入配合胶囊剂可以含有与以下物质混合的活性成分:填充剂诸如乳糖,粘合剂诸如淀粉,润滑剂诸如滑石或硬脂酸镁,和任选的稳定剂。在软胶囊剂中,可以将所述活性成分溶解或悬浮在合适的液体(诸如脂肪油、液状石蜡或液体聚乙二醇)中。另外,可以加入稳定剂。用于口服施用的所有制剂应当是在适合用于选择的施用途径的剂量。

[0329] 对于含服施用,所述组合物可以采取按常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0330] 对于通过鼻吸入施用,用于根据本发明的一些实施方案的用途的活性成分方便地

以气溶胶喷雾递送形式从加压包装或喷雾器借助于合适的推进剂(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳)递送。在加压气溶胶的情况下,通过提供阀来递送计量的量,可以确定剂量单元。可以配制在分配器中使用的胶囊和药盒(例如由明胶制成),其含有所述化合物和合适的粉末基质(诸如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0331] 本文描述的药物组合物可以配制用于胃肠外施用,例如,通过快速推注或连续输注。用于注射的制剂可以以单位剂型呈现,例如,存在于安瓿中或在多剂量容器内,任选地具有添加的防腐剂。所述组合物可以是在油性或水性媒介物中的混悬液、溶液或乳液,并且可以含有配制药剂诸如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0332] 用于胃肠外施用的药物组合物包括水溶性形式的活性制品的水溶液。另外,可以将活性成分的混悬液制备成适当的油性或基于水的注射混悬液。合适的亲脂溶剂或媒介物包括脂肪油如芝麻油,或合成的脂肪酸酯如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。水性注射混悬液可以含有增加该混悬液的粘性的物质,诸如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,所述混悬液还可以含有适当的稳定剂或增加活性成分的溶解度的药剂,以允许制备高度浓缩的溶液。

[0333] 可替换地,所述活性成分可以呈粉末形式,以用于在使用前用适当的媒介物(例如,无菌的、无热原的基于水的溶液)构建。

[0334] 使用例如常规栓剂基质诸如可可脂或其它甘油酯,也可以将本发明的一些实施方案的药物组合物配制在直肠组合物诸如栓剂或保留灌肠剂中。

[0335] 适合用在本发明的一些实施方案的背景下的药物组合物包括这样的组合物:其中含有有效地实现预期目的的量的活性成分。更具体地,治疗有效量是指有效地阻止、减轻或改善障碍(例如,恶性疾病)的症状或延长正在治疗的受试者的存活的活性成分(例如能够降低CD84或SLAMF1的活性或表达的药剂)的量。

[0336] 根据一个实施方案,所述治疗有效量下调在耗竭的T细胞上的程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、程序性细胞死亡1(PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、淋巴细胞活化基因3(Lag-3)、杀伤细胞凝集素样受体G1(KLRG1)和/或2B4(即T细胞耗竭的标志物)中的至少一种的活性或表达。

[0337] 使用本领域已知的任意方法,例如使用FACS分析,可以评估T细胞耗竭标志物(例如PD-L1、PD-1、CTLA-4、Lag-3、KLRG1和/或2B4)的下调。根据一个实施方案,与没有用本发明的一些实施方案的药剂处理的耗竭的T细胞相比,T细胞耗竭标志物下调了至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0338] 根据一个实施方案,所述治疗有效量导致T细胞耗竭的逆转,其与T细胞对细胞因子(例如IL-2、IL-4、IFN γ)的产生和/或CD107的表达的增加有关。

[0339] 使用本领域已知的任意方法,例如使用ELISA,可以评估细胞因子产生的增加。根据一个实施方案,与没有用本发明的一些实施方案的药剂处理的耗竭的T细胞相比,细胞因子产生增加了至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0340] 同样地,使用本领域已知的任意方法,例如使用FACS分析,可以评估与T细胞的重新活化有关的细胞标志物(例如CD107)的表达的增加。根据一个实施方案,与没有用本发明的一些实施方案的药剂处理的耗竭的T细胞相比,T细胞标志物增加了至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

[0341] 根据一个实施方案,所述治疗有效量导致T细胞耗竭的逆转,所述逆转导致恶性细胞的杀死(例如通过效应T细胞)。

[0342] 根据一个实施方案,所述治疗有效量导致恶性细胞的细胞凋亡(即由于CD84诱导的存活途径的中断)。

[0343] 使用本领域已知的任意方法,例如细胞增殖测定、FACS分析等,可以评估细胞杀死或细胞凋亡。

[0344] 治疗有效量的确定充分在本领域技术人员的能力之内,特别是根据本文中提供的详细公开内容。

[0345] 对于在本发明的方法中使用的任何制剂,最初可以从体外和细胞培养测定估计治疗有效量或剂量。例如,可以在动物模型中配制剂量以达到期望的浓度或滴度。这样的信息可以用来更准确地确定在人类中有用的剂量。

[0346] T细胞耗竭的模型可以是具有慢性病毒性疾病或恶性肿瘤的任何动物模型(例如小鼠)。这样的模型描述在McGary等人,“Animal models for viral infection and cell exhaustion”, Curr Opin HIV AIDS (2014) 9(5): 492-499,通过引用并入本文。另外,在以前[Bichi R. 等人, Proc Natl Acad Sci U S A (2002) 99(10): 6955-6960]和在下面的实施例部分中描述了发生鼠CLL的Ep-TCL1 (TCL-1)转基因小鼠,所述鼠CLL进展成充分显现的克隆和致命白血病。额外地或可替换地,B-CLL动物模型诸如以前描述的NOD-SCID小鼠嵌合体[Shimoni A, Marcus H, Canaan A, 等人. A model for human B-chronic lymphocytic leukemia in human/mouse radiation chimera: evidence for tumor-mediated suppression of antibody production in low-stage disease. Blood. 1997; 89:2210-2218]可以用于确定本发明的药剂在体内的治疗效果。

[0347] 通过标准制药规程在体外、在细胞培养物或实验动物中可以确定本文描述的活性成分的毒性和治疗效果。可以将得自这些体外和细胞培养测定和动物研究的数据用于配置人用的剂量范围。所述剂量可以随采用的剂型和利用的施用途径而变化。精确的制剂、施用途径和剂量可以由个别医师考虑到患者的状况来选择。(参见例如,Fingl, 等人, 1975, “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 第1章第1段)。

[0348] 可以个别地调节给药量和间隔以提供足以诱导或抑制生物学效应的活性成分的(组织)水平(最低有效浓度,MEC)。所述MEC将随每种制剂而变化,但是可以从体外数据估测。达到MEC所需要的剂量取决于个体特性和给药途径。可以使用检测测定来确定血浆浓度。

[0349] 取决于要治疗的病症的严重程度和应答性,给药可以是单次或多次给药,疗程持续几天至几周,或直到实现治愈或达到疾病状态的减轻。

[0350] 组合物的施用量当然取决于治疗的受试者、疾病严重程度、施用方式、处方医师的判断等。

[0351] 如果需要的话,本发明的一些实施方案的组合物可以存在于包装或分配器装置(诸如FDA批准的药剂盒)中,其可以含有一个或多个包含活性成分的单位剂型。所述包装可以包含例如金属或塑料箔,诸如泡罩包。所述包装或分配器装置可以伴有施用说明书。所述包装或分配器还可以包纳与容器结合的公告,所述公告采用管理药物的制备、使用或销售的政府机构指定的形式,所述公告反映了所述机构对所述组合物的形式或人或兽施用的批

准。例如,这样的公告可以是由美国食品和药品管理局关于处方药物批准的标记,或是批准的产品插页。也可以制备包含在相容药用载体中配制的本发明制剂的组合物,将其放置在适当的容器中,并且标记用于指定病症的治疗,如上文更详细地描述的。

[0352] 为了增强恶性疾病的治疗,本发明进一步预见到给所述受试者施用另一种疗法诸如放射疗法、化学疗法、生物疗法例如免疫疗法(例如抗体免疫疗法)或移植(例如骨髓移植)、光疗和光动力学疗法、外科手术、营养疗法、烧蚀疗法、组合的放射疗法和化学疗法、近距离放射疗法(brachiotherapy)、质子束疗法、细胞疗法和光子束放射外科疗法或它们的组合。也预见到镇痛剂和其它治疗方案。在下面详细描述了化学治疗剂的例子。

[0353] 本文中使用的术语“化学疗法”或“化疗”表示这样的药剂:其减少、阻止、减轻、限制和/或延迟肿瘤或转移灶的生长,或通过肿瘤的坏死或细胞凋亡或任意其它机制直接杀死赘生性细胞,或者其可以以其它方式以药有效量使用,以在具有肿瘤疾病(例如癌症)的受试者中减少、阻止、减轻、限制和/或延迟肿瘤或转移灶的生长。

[0354] 化学治疗剂包括、但不限于:氟嘧啶;嘧啶核苷;嘌呤核苷;抗-叶酸盐,铂药剂;蒽环类抗生素/蒽二酮;表鬼臼毒素;喜树碱(例如,Karenitecin);激素;激素复合物;抗激素;酶、蛋白、肽和多克隆和/或单克隆抗体;免疫学药剂;长春花生物碱;紫杉烷;埃博霉素;抗微管剂;烷化剂;抗代谢药;拓扑异构酶抑制剂;抗病毒剂;和多种其它细胞毒性剂和细胞抑制剂。

[0355] 根据一个具体实施方案,所述化学治疗剂包括、但不限于:阿巴瑞克、阿地白介素、阿地白介素、阿仑珠单抗、阿利维A酸、别嘌呤醇、六甲蜜胺、氨磷汀、阿那曲唑、三氧化二砷、天门冬酰胺酶、阿扎胞苷、贝伐珠单抗、贝沙罗汀、博来霉素、硼替佐米、白消安、卡普唑酮、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、塞来考昔、西妥昔单抗、顺铂、克拉屈滨、氯法拉滨、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、放线菌素D、达促红素 α 、达促红素 α 、柔红霉素脂质体、柔红霉素、地西他滨、地尼白介素2、右丙亚胺、右丙亚胺、多西他赛、多柔比星、丙酸屈他雄酮、Elliott氏B溶液、表柔比星、促红素 α 、厄洛替尼、雌莫司汀、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶5-FU、氟维司群、吉非替尼、吉西他滨、吉妥珠单抗奥加米星、醋酸戈舍瑞林、醋酸组氨瑞林、羟基脲、替伊莫单抗、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼甲磺酸酯、干扰素 α 2a、干扰素 α -2b、伊立替康、来那度胺、来曲唑、亚叶酸、醋酸亮丙瑞林、左旋咪唑、洛莫司汀、CCNU、meclorothamine、氮芥、乙酸甲地孕酮、美法仑、L-PAM、巯基嘌呤6-MP、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托坦、米托蒽醌、苯丙酸诺龙、奈拉滨、若莫单抗、奥普瑞白介素、奥普瑞白介素、奥沙利铂、紫杉醇、帕利夫明、帕米膦酸盐、培加酶、培门冬酶、培非司亭、培美曲塞二钠、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、光辉霉素、吡吩姆钠、丙卡巴肼、米帕林、拉布立酶、利妥昔单抗、沙格司亭、索拉非尼、链佐星、马来酸舒尼替尼、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷VM-26、鞣内酯、硫鸟嘌呤6-TG、塞替派、塞替派、托泊替康、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥珠单抗、维A酸ATRA、尿嘧啶氮芥、戊柔比星、长春碱、长春瑞滨、唑来膦酸盐和唑来膦酸。

[0356] 根据另一个实施方案,为了增强自身免疫病或炎性疾病的治疗,本发明进一步预见到给所述受试者施用另一种可能有益于治疗的疗法。本领域技术人员能够做出这样的决定。

[0357] 因而,例如,抗炎疗法可以包括、不受限于NSAID(非甾体类抗炎药)、皮质类固醇

(诸如泼尼松)和抗组胺剂。

[0358] 本文中使用的术语“约”表示 $\pm 10\%$ 。

[0359] 术语“包含”、“包括”、“具有”和它们的变化形式是指“包括、但不限于”。

[0360] 术语“由……组成”是指“包括且限于”。

[0361] 术语“基本上由……组成”是指,所述组合物、方法或结构可以包含额外成分、步骤和/或部分,但是前提是所述额外的成分、步骤和/或部分不会实质上改变要求保护的组合物、方法或结构的基础的和新颖的特征。

[0362] 本文中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式,除非上下文另外清楚地指明。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括其混合物。

[0363] 贯穿本申请,本发明的多个实施方案可以以范围格式呈现。应理解,以范围格式的描述仅是为了方便和简洁,并不应被解释为对本发明的范围的不可改变的限制。因此,范围的描述应当视作已经具体地公开了所有可能的子范围以及在该范围内的各个数值。例如,范围的描述诸如从1至6应当视作已经具体地公开了子范围诸如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等,以及该范围内的各个数值,例如,1、2、3、4、5和6。不管范围的宽度,这均适用。

[0364] 每当在本文中指示数值范围时,意在包括所指示的范围之内的任何引用的数值(分数或整数)。短语在第一指示数值和第二指示数值“之间的范围”以及从第一指示数值“至”第二指示数值的“范围”在本文中可互换地使用,并意图包括第一指示数值和第二指示数值以及在二者之间的所有分数和整数。

[0365] 本文中使用的术语“方法”表示完成给定任务的方式、手段、技术和程序,包括、但不限于:化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业人员已知的那些方式、手段、技术和程序,或者易于从已知的方式、手段、技术和程序开发出来的那些方式、手段、技术和程序。

[0366] 本文中使用的术语“治疗”包括终止、实质上抑制、减慢或逆转病症的进展,实质上改善病症的临床或美学症状,或者实质上预防病症的临床或美学症状的出现。

[0367] 应当理解,为了清楚而在单独的实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征还可被组合提供在单个实施方案中。相反,为了简洁而在单个实施方案的上下文中描述的本发明的多种特征也可以单独提供,或以任意合适的子组合提供,或在合适时在本发明的任意其它描述的实施方案中提供。在多个实施方案的上下文中描述的某些特征不被认为是那些实施方案的必需特征,除非该实施方案在没有这些要素时是不起作用的。

[0368] 如上文所描绘的以及如以下权利要求部分所要求保护的本发明的多个实施方案和方面在以下实施例中得到实验支持。

实施例

[0369] 现在参考下述实施例,其与以上描述一起以非限制性的方式例证本发明。

[0370] 通常,本文中使用的命名法和在本发明中使用的实验室规程包括分子技术、生物化学技术、微生物技术和重组DNA技术。在文献中充分解释了这样的技术。参见,例如,“Molecular Cloning: A laboratory Manual”Sambrook等人,(1989);“Current

Protocols in Molecular Biology”第I-III卷Ausubel, R. M., 编(1994); Ausubel等人, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson等人, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren等人(编) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998);在美国专利号4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659和5,272,057中阐述的方法;“Cell Biology: A Laboratory Handbook”, 第I-III卷Cellis, J. E., 编(1994);“Current Protocols in Immunology”第I-III卷Coligan J. E., 编(1994); Stites等人(编), “Basic and Clinical Immunology” (第8版), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell和Shiigi (编), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., New York (1980);可利用的免疫测定被广泛地描述在专利和科学文献中,参见,例如,美国专利号3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771和5,281,521;“Oligonucleotide Synthesis”Gait, M. J., 编(1984);“Nucleic Acid Hybridization”Hames, B. D., 和Higgins S. J., 编(1985);“Transcription and Translation”Hames, B. D., 和Higgins S. J., 编(1984);“Animal Cell Culture”Freshney, R. I., 编(1986);“Immobilized Cells and Enzymes”IRL Press, (1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal, B., (1984)和“Methods in Enzymology”第1-317卷, Academic Press;“PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak等人, “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual”CSHL Press (1996);它们都通过引用并入,如同在本文中完整地阐述。在本文件中提供了其它一般参考文献。认为其中的程序是本领域众所周知的,并为了读者的方便而提供。在其中所含的所有信息通过引用并入本文。

[0371] 一般材料和实验程序

基质细胞系

鼠BM细胞系M210B4 (CRL-1972) 购自ATCC (Manassas, VA, USA) 并维持在含有10%(v/v) 胎牛血清的RPMI 1640中。每个第三天将细胞传代,以 14.5×10^3 细胞/cm²接种新代。

[0372] 原代人CLL细胞

在疾病的不同阶段从CLL患者的外周血获得B-CLL细胞(Hematology Institute of the Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel; Tel-Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israel;和Asaf Harofeh Medical Center, Tzrifin, Israel)。

[0373] 原代人BM细胞

从得自经证实的CLL患者和具有健康骨髓特征的患者BM抽吸物建立原代人骨髓(BM)基质细胞(BMSC)培养物(Asaf Harofeh Medical Center, Tzrifin, Israel)。通过在蔗糖-泛影葡胺密度梯度上铺层,分离单核细胞。此后将 1×10^6 个细胞在24-孔平板中铺板在胎牛血清上并温育1小时以使细胞附着,然后向其中加入Chang培养基(含有庆大霉素、L-谷氨酰胺的Chang, Irvine Scientific)。使培养物生长至汇合,大约3周,每周更换培养基。

[0374] 使用的另外的细胞系:

使用m210B4 (骨髓小鼠基质细胞系)、REH (急性成淋巴细胞性白血病(ALL)细胞系)、697 (ALL细胞系)、Daudi (伯基特氏淋巴瘤细胞系)和Ramos (伯基特氏淋巴瘤细胞系)。用含有10%(v/v)胎牛血清的RPMI 1640培养m210B4细胞。每个第三天将细胞传代,以 14.5×10^3 细胞/ cm^2 接种新代。用含有10%(v/v)胎牛血清的RPMI 1640培养REH、697、Daudi和Ramos细胞。每第四个第1-3天将细胞传代。

[0375] 共培养物

在共培养物中,使用1:16的M210B4: CLL比率,因为在该比率,M210B4细胞给如前面描述的CLL细胞提供存活优点[Kurtova, A. V. 等人, Blood (2009) 114(20): 4441-4450]。

[0376] 从不同解剖部位分离细胞

通过将脾在显微镜载玻片之间粉碎或穿过40-微米网,分离鼠脾细胞。使用注射器清洗来自胫骨和股骨的骨髓细胞。通过注射PBS/BSA和收集流体,收集来自腹腔的细胞。从眶窦/尾静脉收集来自外周血的细胞。使用RBC裂解缓冲液(5分钟)除去红细胞,继之以洗涤步骤以收集细胞。最后,将细胞穿过40-微米网过滤,并准备用于注射或流式细胞计量术染色。

[0377] RNA分离和反转录

如以前所述分离来自CLL细胞或M210B4细胞的总RNA[Binsky, I. 等人, Proc Natl Acad Sci U S A (2007) 104(33): 13408-13413; Binsky, I. 等人, J Immunol (2010) 184(9): 4761-4769]。根据生产商的手册使用Perfect Pure RNA Cultured Cell Kit (5 Prime, 汉堡, 德国)分离来自原代人BM和T细胞样品的mRNA。

[0378] 用于流式细胞计量术的染色

使用在染色缓冲液(0.5%的BSA在PBS中的溶液)中的特异性抗体(参见下面表1)将分离的细胞或培养的M210B4细胞在暗处在冰上染色30分钟。洗涤细胞以除去未结合的抗体,并通过流式细胞计量术(FACS Canto, BD Bioscience)测量。根据数据单使用同种型对照。使用FlowJo软件(10版, Ashland, OR, USA)分析结果。

[0379] 表1: 用于FACS染色的抗体

靶	物种	荧光团	克隆	公司
SLAMF1	人	APC	REA151	Miltenyl
SLAMF1	小鼠	PE	<u>TC15-12F12.2</u>	Biolegend
CD5	小鼠	BV421	53-7.3	Biolegend
PDL-1	人	PE/CY7	<u>29E.2A3</u>	Biolegend
PDL-1	小鼠	BV711	<u>10F.9G2</u>	Biolegend
B220/CD45R	人/小鼠	FITC或APC	RA3-6B2	Biolegend
CD19	小鼠	FITC/PE	<u>6D5</u>	Biolegend
CD3	小鼠	APC-CY7	<u>17A2</u>	Biolegend
CD4	小鼠	FITC/PERCP	<u>RM4-5</u>	Biolegend
CD8	小鼠	BV711	<u>53-6.7</u>	Biolegend
PD1	小鼠	PE/CY7	<u>RMP1-30</u>	Biolegend
PD1	人	BV711	<u>EH12.2H7</u>	Biolegend

Lag-3	小鼠	PE	C9B7W	Biolegend
CTLA-4	小鼠	APC	L3D10	Biolegend

[0380] T细胞的RNA表达

将鼠脾如上面所写进行处理,此后与B220抗-小鼠珠子[25 μ l珠子/ 10^7 细胞CD45R (B220) MicroBeads, 小鼠, Miltenyl]一起温育30 min。然后与磁体一起温育20分钟以除去B细胞,然后将上清液(大部分T细胞)在CD3和CD28包被的平板上温育24小时。24小时以后,收获细胞,并纯化RNA。

[0381] T细胞的蛋白表达

收获鼠脾,并将T细胞用含有抗-CD3的培养基刺激,此后针对耗竭标志物染色或可替换地固定并渗透化处理(BD生物科学药剂盒),此后针对细胞因子和细胞毒性因子染色。

[0382] CD84刺激

在刺激前一天,将M210B4基质细胞接种在24-孔平板中(1×10^5 /孔)。在实验前一天,在含有20%FCS的RPMI中融化人CLL细胞。为了刺激,将培养基更换成含有活化CD84抗体(克隆152-1D5, Pierce/Thermo或SCBT) (M210B4 4 μ g/ml, CLL 1×10^7 细胞, 5或10 μ g/ml)或同种型对照(IgG1, 克隆MOPC-21, Biolegend)的培养基1小时。将细胞洗涤,并将CD84与1 μ g F(ab')₂抗体(Jackson Immuno Research)交联,随后如以前所述[Binsky-Ehrenreich, I. 等人, Oncogene (2014) 33 (8): 1006-1016]温育指定的时间段。

[0383] SLAMF1刺激

在刺激前一天,将M210B4基质细胞接种在24-孔平板中(1×10^5 /孔)。为了刺激,将培养基更换成含有活化抗-SLAMF1抗体(10 μ g/ml, 克隆: 9D1, Ebioscience)或同种型对照大鼠IgG1 (克隆: eBRG1, Ebioscience)的培养基72小时。将细胞洗涤,并使SLAMF1与1 μ g F(ab')₂抗体(Jackson Immuno Research)交联,随后温育24小时。

[0384] CD84阻断

将M210B4基质细胞接种在24-孔平板中(1×10^5 个细胞/孔),并在实验前一天融化CLL细胞。在所有实验中,使用5 μ g/ml CD84-B4抗体阻断培养物中的CD84嗜同种相互作用。将相同量的IgG2a (MOPC-173, Biolegend或eBM2a, eBioscience)用作同种型对照。为了特异性地阻断基质上的CD84,将B4抗体在基质上温育1小时,通过用培养基洗涤3次除去未结合的抗体,然后加入CLL (1.6×10^6)细胞。

[0385] SLAMF1阻断

在实验前一天,融化 2×10^6 个CLL细胞,并接种在24-孔平板中。在所有实验中,使用10 μ g/ml抗-SLAMF1抗体(克隆: A12, Biolegend)阻断培养物中的CD84嗜同种相互作用。将相同量的IgG1, κ (MOPC-21, Biolegend)用作同种型对照并温育24小时。

[0386] siRNA下调SLAMF1

使用Nepagene Super Electroporator NEPA21 Type II,由通过电穿孔引入的siRNA实现SLAMF1的下调。使用Adherent Cell Electrode(125V,3毫秒),给附着M201B4细胞(0.625×10^5)电穿孔进120 nM siRNA。SiRNA购自GE Lifescience: 小鼠SLAMF1: Dharmacon ON-TARGET plus SMART pool mouse SLAMF1 (目录号L-056021-01-0005),非特异性的对照siRNA: Dharmacon ON-TARGET plus Non-targeting Pool (D-001810-10)。

[0387] 细胞生存力

根据生产商 (BD Bioscience) 方案使用膜联蛋白-V-FITC/7-AAD染色确定CLL细胞生存力,并通过流式细胞计量术评价。

[0388] TCL-1过继转移

E μ -TCL1 (TCL-1) 转基因小鼠发生鼠CLL,其先于充分显现的克隆的和致命的白血病 [Bichi R. 等人, Proc Natl Acad Sci U S A (2002) 99 (10): 6955-6960]。迄今为止,它是最广泛地验证的和广泛使用的鼠CLL模型。E μ -TCL1小鼠在腹腔、外周血、骨髓和淋巴样器官中积累B220^{int}IgM⁺CD5⁺ B淋巴细胞。已经证实TCL1转基因小鼠表现出未突变的CLL疾病的特征,具有类似于人疾病的B-细胞受体特征,并且也表现出类似于人CLL的表现遗传变化。

[0389] 因此,在9个月龄开始在外周血中针对它们的恶性群体 (CD5+B220+ 细胞) 分析TCL-1转基因小鼠。将其外周血 (PB) 中的恶性群体超过30%的小鼠处死,并制备它们的脾细胞用于注射。将TCL-1脾细胞 (4×10^7) 注射进6-8周龄雌性受体野生型 (wt) 小鼠的尾静脉中。使用流式细胞计量术针对B220/CD5群体在外周血中监测移植物植入的进展。

[0390] 体内CD84阻断

使用B4抗体和IgG2a同种型对照 (eBioscience) 执行体内CD84阻断。在4小时实验中,在CLL注射以后1小时,将20 μ g抗体静脉内注射进尾静脉中。在过继转移实验中,在TCL-1脾细胞注射以后第2天开始B4或IgG2a同种型对照抗体的治疗,并每2天继续以1 mg/kg体重注射进尾静脉中。

[0391] 小鼠

如以前所述[参见Cannons J. L. 等人. *Immunity* (2010) 32: 253-65]使用SLAMF5 (CD84) 缺陷型小鼠。在6-10周龄使用所有动物。所有动物程序经过魏茨曼科学研究所 (Weizmann Institute of Science) 的动物研究委员会 (Animal Research Committee) 批准。

[0392] EAE模型

给10周龄野生型 (wt) 或CD84敲除的 (CD84^{-/-}敲除或CD84敲除) 小鼠皮下地 (S.C.) 注射200 μ g MOG 35-55肽/100 μ l/小鼠。MOG 35-55肽制品进一步包含含有4 mg/ml热杀死的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的完全弗氏佐剂 (CFA)。将所述剂量分成在小鼠尾巴附近的两个部位处的两次施用 (50 μ l乳剂/部位)。然后给小鼠腹膜内地 (I.P.) 注射200 ng百日咳毒素 (PT) (在200 μ l PBS中)。在48小时以后重复PT注射 (即在第0和2天施用PT)。

[0393] 将小鼠评分,并针对EAE的临床症状每天或每2天称重 (如指示的)。评分如下:0 = 无疾病,1 = 尾巴无力和/或步态不稳,2 = 后肢轻瘫,2.5 = 部分后肢麻痹,3 = 后肢麻痹,4 = 后肢和前肢麻痹,5 = 垂死/死亡。

[0394] 结肠炎模型

急性疾病:在6-8周的小鼠 (野生型或CD84敲除) 通过它们的饮用水接受2%DSS 5天。在第5天,用正常水替换饮用水4-7天,或直到实验结束。将小鼠每天称重以监测疾病进展。

[0395] 慢性疾病:在6-8周的小鼠 (野生型或CD84敲除) 接受2个5天周期的2%DSS,在2个周期之间恢复10天。具体地,第一个周期是从第0天至第5天,随后是10天的水恢复。在第15天提供第二个DSS周期另外5天,随后是常规饮用水。将小鼠每天称重以监测疾病进展。

[0396] B调节细胞的分离和活化

在处理结束时从野生型或CD84敲除小鼠得到脾或肠系膜淋巴结。将B细胞使用B220⁺珠子富集并用LPS活化5或24小时。在活化的最后5小时加入PIM (PMA、离子霉素和莫能星)。然后将细胞针对细胞外和细胞内标志物染色,以便通过流式细胞计量术评价调节性B细胞群体。

[0397] 统计学

使用Graphpad Prism (6.0f版本, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) 执行数据分析。通常,提供平均值和SEM。为了确定差异的显著性,使用Student氏t-检验,单变量或双变量取决于实验。对于归一化的数据,执行比率t-检验以校正非正态分布的数据点。对于p值 ≤ 0.05 ,认为结果是显著的。

[0398] 实施例1

CD84的靶基因

为了跟踪CD84在CLL存活的微环境控制的调节中的作用,发明人检索了微环境细胞中的CD84的靶基因。将在人患者衍生的Nurse样细胞或M210B4基质细胞上表达的CD84用抗-CD84 (4 μ g/ml)或用对照IgG抗体刺激24小时。另外,使用抗-CD84 B4抗体(发明人的实验室开发的阻断抗体),在与CLL的共培养场合中将在来自CLL患者和健康BM的抽吸物的原代患者骨髓(BM)样品上表达的CD84阻断24小时[Binsky-Ehrenreich I. 等人, Oncogene (2014) 33: 1006-1016]。纯化RNA,并通过AffymetrixGeneChip[®]表达分析系统分析其表达受CD84调节的基因。在CD84活化后上调且当它被阻断时下调的基因之一是SLAMF1 (数据未显示)。

[0399] 实施例2

SLAMF1表达是基质细胞中的CD84靶基因

SLAMF1是SLAM受体家族的另一个成员,已知其介导细胞-细胞相互作用[Cannons J. L. 等人, Annu Rev Immunol (2011) 29: 665-705]。首先,证实了DNA芯片结果。因此,将M210B4基质细胞用抗-CD84刺激抗体(4 μ g/ml)刺激,并分析SLAMF1 mRNA (图3A)和蛋白(图3B-C)水平。CD84刺激显著地升高M210B4基质细胞中的SLAMF1表达水平。此外,SLAMF1 mRNA在单核细胞-衍生的nurse样细胞(NLC)的活化以后(图3D)和在来自健康患者的原代人骨髓基质细胞(图3E)上被上调。令人感兴趣的是,在CLL上表达的CD84的刺激导致SLAMF1 mRNA (图3F)和蛋白水平(图3G-H)的升高。这些结果提示,CD84诱导在它们的微环境中的CLL和细胞的SLAMF1的表达。

[0400] 接着,分析了在源自骨抽吸物的细胞上的SLAMF1表达,所述细胞在体外生长以变成基质细胞。令人感兴趣的是,与源自经证实的健康骨髓的细胞相比,来自这些患者的骨髓基质细胞表现出SLAMF1表达的约5倍增加,从而表明所述受体可以在所述疾病的发病机制中起作用(图4A-C)。

[0401] 接着,确定在BM衍生的Ep-TCL1转基因小鼠细胞(其为CLL的鼠模型)上的SLAMF1表达。与来自相同小鼠的非恶性B细胞上的表达相比,在鼠TCL-1衍生的BM细胞上检测到SLAMF1表达的显著增加(图4D-E)。

[0402] 实施例3

在CLL和它们的微环境接触以后以CD84依赖性方式上调SLAMF1表达

以前的结果表明,CD84是体外和体内CLL-微环境相互作用中的重要参与者(Marom等人, 2016 submitted)。为了确定该相互作用是否诱导SLAMF1表达,将来自患者外周血样品的人CLL细胞与M210B4基质细胞系共培养,并对比M210B4基质细胞上的SLAMF1表达。如在图5中所示,当将所述细胞与CLL细胞一起培养时,显著地增加SLAMF1水平。这提示,SLAMF1参与这两种细胞之间的相互作用。

[0403] 本发明的发明人假定,由于CD84刺激上调体外SLAMF1表达,它将对它的体内表达有作用。因此,在过继转移模型[即Hofbauer J. P. 等人, Leukemia (2011) 25 (9): 1452-1458以前描述的模型]中分析了CD84对SLAMF1表达的体内作用,其中所述小鼠发生类似于进行性CLL疾病的疾病。将来自荷瘤TCL-1小鼠的脾细胞注射进近交系野生型或CD84缺陷型小鼠中,并监测CLL样疾病的发展。在细胞转移以后12天在野生型微环境中在外周血中检测到TCL-1细胞,且它们的数目随时间增加(图6A)。7周以后,TCL-1细胞包含约40%的脾淋巴细胞、25%的BM和58%的外周血(图6B)。

[0404] 重要的是,14天以后,在所有隔室、BM、脾、腹膜和外周血中在CD84缺陷型微环境中检测到恶性群体的显著下降(图7A-D)。尽管所述差异对于BM而言是较小的(约40%下降),在脾和腹膜(各约55%下降)和外周血(约65%下降)中的差异是更显著的。将结果归一化至野生型组,因为TCL群体的百分比在不同实验之间变化(图7A-D)。

[0405] 接着,在TCL-1细胞上分析SLAMF1表达。如在图8A和8C中所示,在CD84^{-/-}环境中在TCL-1细胞上的SLAMF1水平在过继转移后14天与它们的野生型对照相比显著下降。在腹膜中(图8A-B)和在BM中(图8C-D)检测到该下降,在以前已经发现所述两种器官在Eμ-TCL1小鼠模型中是重要的[Bichi R. 等人, (2002), 出处同上]。但是,在脾和外周血中没有观察到SLAMF1表达的变化(数据未显示)。所述调节不限于恶性群体,因为也在正常B细胞上检测到SLAMF1的下降(图8A, 8C),但是,重要的是,注意到这些细胞的微环境仍然是恶性的。此外,用抗-CD84 B4杂交瘤处理TCL-1转移的野生型小鼠会减少在腹膜和骨髓中在TCL1细胞上表达的SLAMF1的量(图8E-G)。

[0406] 为了确定肿瘤环境对在BM基质细胞上的SLAMF1表达的影响,将骨髓基质细胞收获并针对SLAMF1表达进行分析。在培养3周以后,这些细胞仍然表现出SLAMF1表达量的减少(图8H-I)。

[0407] 实施例4

SLAMF1的下调诱导CLL细胞死亡

为了确定SLAMF1是否参与CLL存活的调节,将原代CLL细胞与或不与拮抗性SLAMF1抗体(克隆: A12, Biolegend)一起温育48小时,并确定存活的差异。如在图9A-C中所示,对于CLL细胞发现存活CLL细胞的25%减少。

[0408] 接着,检查了在基质上表达的SLAMF1对CLL细胞的存活的作用。因此,在M210B4基质细胞中的SLAMF1表达被siRNA下调,并监测对CLL存活的影响。在用SLAMF1 siRNA处理的M210B4基质细胞中检测到SLAMF1 mRNA的70%下降(图9D)和蛋白水平的60%下降(图9E)。接着,将CLL细胞加给siSLAMF1处理过的M210B4基质细胞进行48小时共培养。在微环境中SLAMF1表达的击倒导致活CLL细胞的43%下降(图9F, 9H),并达到在单独培养中生长的CLL细胞的存活和细胞凋亡水平(图9F-J)。该结果提示,在基质上表达的SLAMF1会调节CLL存活。

[0409] 实施例5*SLAMF1的刺激增加Bcl-2和PD-L1*

为了进一步阐明在微环境中表达的SLAMF1的作用,跟踪它的下游诱导的级联。因此,在M210B4基质细胞上表达的SLAMF1被抗-SLAMF1抗体(10 μ g/ml, 克隆: 9D1, Ebioscience)活化,并跟踪其表达在该刺激后上调的基因。如在图10A-B中所示,检测到Bcl2 (图10A)和程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) (图10B) mRNA水平的增加。

[0410] 实施例6*CD84调节多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病和伯基特淋巴瘤细胞上的SLAMF1表达*

本发明的发明人感兴趣的是,确定SLAMF1表达的调节是否是对CLL特异性的,或是否它也存在其它恶性肿瘤中。因此,在源自患者的原代多发性骨髓瘤(MM)细胞上活化CD84(图11A)。CD84的刺激使SLAMF1表达升高了约2倍(图11A)。此外,在原代多发性骨髓瘤患者细胞上的SLAMF1表达比它在健康对照细胞上的水平高了超过10倍(图11B)。

[0411] 接着,在CD84刺激以后在急性成淋巴细胞性白血病(ALL)和伯基特淋巴瘤细胞系中分析了SLAMF1表达。再次,24小时刺激升高了在ALL细胞系697和REH上(图12A-B)和在伯基特淋巴瘤细胞系Ramos和Daudi上(图12C-D)的SLAMF1表达水平,从而表明该调节作用对于B细胞恶性肿瘤而言是更一般的,且不单独与CLL有关。

[0412] 实施例7A*在CD84刺激以后上调PD-L1*

选择进行跟踪的另一个CD84靶基因是PD-L1。为了验证CD84的调节它的表达的能力,将在M210B4小鼠基质细胞系(图13A-C和23E)、人患者衍生的nurse样细胞(图13D和23G)、人和鼠CLL细胞(图13F-H和23A-B)和人原代骨髓健康和CLL基质细胞(图13E和23F)上表达的CD84用抗-CD84或对照IgG抗体刺激24小时。如在图13A、13D、13E、13F、23A-B、23E和23F中所示,PD-L1 mRNA水平在所有刺激的细胞中升高。此外,与它在健康BM(与CLL共培养)中的水平相比,在原代CLL患者骨髓样品中在拮抗剂抗-CD84处理上执行的AffymetrixGeneChip[®]分析中观察到降低的PD-L1 mRNA水平(数据未显示)。进一步,在源自CLL患者/CLL小鼠模型的鼠和人基质细胞上的PD-L1表达水平与健康对照相比显著升高(图23C-D)。确定这些细胞是基质细胞,且因此通过CD34和CD45染色确定为非造血来源(图32A-B)。

[0413] 接着,在抗-CD84抗体刺激之前和之后分析了PD-L1受体、程序性细胞死亡1 (PD-1)的表达。在健康患者的BM细胞(图14A)或M210B4基质细胞(图14B)上的CD84的刺激对PD-1蛋白表达水平没有影响。令人感兴趣的是,在CLL细胞上表达的CD84的刺激导致PD-1 mRNA(图14C)和蛋白(图14D-E)表达水平的显著下降。

[0414] 实施例7B*CD84活化通过AKT-mTOR途径上调PD-L1*

本发明的发明人接下来跟踪CD84诱导的级联,其导致PD-L1表达。以前已经证实PD-L1的表达是在AKT-mTOR和MAPK途径的控制下。因此,在CD84刺激的M210B4细胞中分析了这些途径。尽管在MAPK途径中几乎没有检测到变化(图24A),与非活化的M210B4细胞相比,CD84刺激升高了活化的M210B4细胞中的pAKT水平(图24A-B)。另外,CD84刺激诱导了S6(肺癌中的PD-L1的一种已知调节剂)的磷酸化。这通过流式细胞计量术进一步证实(图24B-C)。因而,CD84通过AKT/mTOR和磷酸-S6的活化而升高PD-L1蛋白表达。

[0415] 实施例8*PD-1/PD-L1水平受体体内CD84调节*

以前的研究已经将PD-L1描述为免疫共抑制剂,其被白血病祖先用于逃脱免疫系统[Norde, W. J. 等人, *Cancer Res* (2011) 71 (15): 5111-5122]。此外,其他人已经证实,阻断Eμ-TCL1 CLL模型小鼠中的PD-L1/PD-1途径会消退CLL诱导的慢性炎症[McClanahan, F. 等人, *Blood* (2015) 126 (2): 203-211]。结果,在体内跟踪在CLL疾病进展中CD84对PD-L1/PD-1途径的调节作用。将来自TCL-1小鼠的脾收获,并注射进近交系野生型或CD84^{-/-}小鼠中,并收获BM、淋巴结(LN)、脾、外周血和腹膜。如在图15A-G和25A-E中所示,除了淋巴结以外,在源自所有器官(其收获自缺乏CD84的微环境)的TCL-1细胞上检测到PD-L1水平的显著下降(图25F)。因而,在微环境上表达的CD84调节PD-L1表达。在它的缺失下,在TCL细胞上检测到更低的PD-L1水平。此外,用拮抗性抗-CD84 B4杂交瘤处理的小鼠(显示在图15H中)在腹腔中具有显著降低的PD-L1表达水平(图15I和25G)。这再次表明CD84对体内PD-L1的调节作用。此外,源自这些小鼠的骨髓基质细胞生长大约3周,并分析它们的PD-L1水平(图15J和26A),这些结果表明在缺乏CD84的微环境BM细胞上的PD-L1表达的显著下降。另外,与对照衍生的细胞相比,在CD84缺陷型环境中的BM巨噬细胞(图26C)、BM DC (图26D)、脾巨噬细胞(图26E)、脾DC (图26F)和PB单核细胞(图26G)表现出减少的PD-L1表达。这些结果提示由CD84介导的肿瘤微环境中的PD-L1表达的总体调节。

[0416] 由于PD-L1的表达在CD84^{-/-}小鼠中减少,也分析了TCL细胞上的受体PD-1的量。在注射后28天,与对照小鼠相比在CD84^{-/-}小鼠中观察到平均荧光(MFI)的约2倍显著增加(图16A-B),这与CLL细胞的以前体外结果一致,其中CD84刺激导致PD-1的减少(图14C-E)。

[0417] 实施例9

PD-1、Lag3、2b4、KLRG-1和CTLA-4的表达在CD84^{-/-}CLL过继转移小鼠中减少,仅在其中PD-L1减少的器官中

证实了PD-1与Lag-3和CTLA-4一起在耗竭性和功能失调性肿瘤浸润T细胞上共表达[Baitsch, L. 等人, *PLoS One* (2012) 7 (2): e30852; Duraiswamy, J. 等人, *Cancer Res* (2013) 73 (12): 3591-3603]。因此,本发明的发明人提示,在CD84^{-/-}小鼠中减少的PD-L1表达会诱导更多的功能性T细胞,且因此诱导更少的耗竭性表型。因此,分析了CD84^{-/-}过继转移的小鼠中的T细胞耗竭性表型。

[0418] 如在图17A-I和27A-E中所示,当在TCL细胞上的PD-L1水平在脾、腹膜和外周血中较低时,在CD8 T细胞上的PD-1、Lag-3、2B4、KLRG-1和CTLA4细胞表面表达水平下降。在其中没有观察到PD-L1的减少的淋巴结中,没有检测到Lag-3、CTLA-4和PD-1的显著减少(图17J-K和33)。

[0419] 为了进一步证实对PD-1、LAG3和CTLA-4的影响是由于在恶性细胞上的PD-L1表达的减少且不是由于T细胞中的CD84的固有缺乏,通过照射CD84^{-/-}小鼠和给它们注射野生型TCL BM来制备嵌合小鼠。这产生了具有表达CD84的免疫细胞的小鼠,而微环境没有表达该蛋白。如在图18A-D、25H-I和27H中所示,在源自CD84^{-/-}环境的TCL细胞上检测到PD-L1染色的显著减少,且相反在T细胞上检测到PD-1的减少,从而提示,减少的表达不是T细胞固有效应。

[0420] 此外,未注射的CD3活化的源自野生型和CD84^{-/-}小鼠的腹膜和脾的细胞的对比没

有表明在注射的小鼠中对耗竭性表型的显著影响,从而强化了以下观念:所述调节是TCL-1依赖性的(图18E-F和28A-C)。

[0421] 本发明的发明人然后希望确定对TCL-1衍生的T细胞的CD84依赖性作用。为此目的,将来自CD84^{-/-}或野生型CLL过继转移模型小鼠的脾收获,并将B220阴性群体收获。然后将所述细胞在CD3-CD28包被的平板上培养24小时。从T细胞纯化mRNA,并然后通过qRT-PCR分析细胞因子水平。如在图19A-B中所示,与野生型环境中的水平相比,从CD84^{-/-}小鼠收获的T细胞表现出IL-4 (图19A)和IFN γ (图19B)的mRNA的增加。这提示,在微环境上表达的CD84上调降低T细胞活性的PD-L1水平。在它的缺失下,PD-L1水平下降,从而产生更多功能性T细胞,其表现出减少的耗竭标志物并且产生更高的IL-4和IFN γ 水平。

[0422] 实施例10

CLL和多发性骨髓瘤患者在它们的骨髓基质上具有增加的PD-L1表达

为了证实这些结果,在基质细胞上分析PD-L1和CD84的表达,所述基质细胞源自从经证实的健康患者和CLL患者、以及多发性骨髓瘤患者衍生出的骨髓抽吸物。与健康对照上的水平相比,在源自CLL和MM患者的细胞上检测到PD-L1 (图20A-C和30B)和CD84 (图20D-F和30A)表达水平的显著增加。

[0423] 实施例11A

在另外的B细胞恶性肿瘤中由CD84调节PD-L1

本发明的发明人接下来希望探究另外的B细胞恶性肿瘤中CD84对PD-L1表达的调节。

[0424] 如在图21A和30D中所示,在CD84的活化以后检测到PD-L1的增加,其中将细胞针对mRNA水平进行分选并针对CD38和CD138进行染色(关于蛋白水平)。此外,在该样品中,受体PD-1的表达减少(图21B),类似于在CLL细胞中观察到的结果(图14C-D)。为了进一步确定CD84是否调节MM的微环境中的PD-L1,用CD84刺激源自患者骨髓抽吸物的骨髓基质细胞。在RNA和蛋白水平观察到PD-L1的显著增加(图30C)。

[0425] 此外,用抗-CD84抗体(4 μ g/ml)刺激在伯基特淋巴瘤细胞系Ramos和Daudi上表达的CD84分别使PD-L1 mRNA的量升高4和2.5倍(分别图22A和22C)。如关于CLL和MM所见,该刺激使PD-1受体的量减少约0.9倍(对于Daudi细胞系)和约0.7倍(对于Ramos细胞系)(分别图22B和22D)。还在急性成淋巴细胞性白血病(ALL)细胞系REH和697上分析了刺激,其中PD-L1 mRNA的增加分别是约2和4倍(分别图22E-D)。

[0426] 总之,这表明,CD84在不同的B细胞恶性肿瘤中调节PD-L1/PD-1表达。

[0427] 实施例11B

CD84活化也可能在体内多发性骨髓瘤细胞中上调PD-L1

为了说明CD84缺乏是否可以影响T细胞(如在CLL中)的问题,本发明的发明人使用了5TGM1和C57BL/KaLwRj Hsd模型。该模型不可在C57BL/6小鼠中移植和建立骨髓瘤,因此将C57BL/6 CD84^{-/-}和野生型小鼠照射并与C57BL/KaLwRj Hsd小鼠的骨髓重构。然后给所述小鼠静脉内注射5TGM1细胞,其导致多发性骨髓瘤疾病的发生(图37A-B)。

[0428] 如在图31A中所示,在BM中在5TGM1细胞上的PD-L1表达减少。其它CD8和CD4 T细胞表现出减少的耗竭标志物(图31B, 31D)以及增加的细胞因子和细胞毒性因子(图31 C, 31E)。

[0429] 总之,这些结果提示CD84在MM中的类似调节机制。

[0430] 实施例11C

CLL衍生的人T细胞的活性的调节

本文描述了鼠模型表现出CD84对PD-L1表达的调节,其可以用作T细胞的功能性的调节。本发明的发明人接下来希望确定CD84是否在源自CLL患者的细胞中调节PD-L1表达和T细胞功能。为此目的,将外周血(PB) CLL细胞纯化(在CD19珠子以后的纯度显示在图36B中)并用siCD84或siCTRL (100 nm, Dharmacon) 处理。24小时以后,将周围血细胞的其它部分加回至48小时共培养物。

[0431] 在CLL细胞中减少的CD84表达导致这些细胞上的PD-L1表达的下调(图29A-B)。惊人的是,与CD84缺陷型CLL细胞一起温育的T细胞表现出降低的耗竭标志物PD-1、Lag-3和CTLA-4的表达水平(图29D-E)。令人感兴趣的是,以与鼠TCL-1模型中的表型非常类似的方式,对CD8⁺ T细胞的作用比对CD4⁺ 群体的作用更显著(图29F)。

[0432] 最后,本发明的发明人希望确定CD84的破坏是否可以消除在微环境中观察到的增加的PD-L1。为此目的,用siCD84下调CLL细胞中的CD84表达水平。24小时以后,将这些细胞与M210B4细胞一起共培养另外48小时。当降低在CLL上的CD84水平时,检测到PD-L1显著下降至在单独培养的M210B4中检测到的表达水平(图29C),另外,M210B4也表现出减少的CD84(图36A)。

[0433] 总之,这些结果提示,在CLL中减少的CD84表达下调在本身上和在微环境中的PD-L1表达水平,从而导致诱导的T细胞活性。

[0434] 实施例12

CD84在急性DSS诱导的结肠炎中的作用

在小鼠中研究Bregs的模型之一是硫酸葡聚糖钠(DSS)诱导的结肠炎模型。为了理解CD84是否在结肠炎中起作用,首先评估了CD84是否在结肠炎的发生和严重程度中起作用。在急性DSS模型中,小鼠在它们的饮用水中接受2%DSS共5天,然后接受正常水4-7天,直到实验结束。每天确定经处理的小鼠的重量,以便跟踪所述疾病的临床迹象。如在图38中所示,CD84^{-/-} (CD84敲除)小鼠与野生型(wt)小鼠相比减少更少的重量。这些结果提示,CD84在结肠炎诱导中起作用,且在它缺失下减少炎症应答。

[0435] 实施例13

CD84在慢性DSS诱导的结肠炎中的作用

炎性肠病(IBD)通常被称作慢性病状。与急性疾病相比,在小鼠中的结肠炎的慢性模型表现出不同的免疫应答和不同的细胞因子。因此,本发明的发明人接下来分析了结肠炎的慢性模型,其中在重复循环中施用DSS,从而导致慢性肠炎。小鼠接受2个5天周期的2%DSS,在2个周期之间恢复10天。如在图39中所示,CD84^{-/-} (ko)小鼠完全耐受第二个周期的DSS,且继续它们的愈合过程。这些结果暗示CD84在炎症过程中调节免疫应答的作用。

[0436] 实施例14

CD84影响结肠炎中的调节性B细胞群体

由于证实了CD84缺陷型小鼠更耐受DSS诱导的结肠炎,本发明的发明人接下来检查了CD84是否在调节Breg子集中起作用。为此目的,在脾和肠系膜淋巴结(MLN)中分析了调节性B细胞的不同子集(即B10:CD19⁺、IL-10⁺、CD1d^{hi}、CD5⁺;Mz:CD19⁺、IL-10⁺、CD24⁺、CD21⁺、CD23⁻;T2-MzP:CD19⁺、IL-10⁺、CD24⁺、CD21⁺、CD23⁺)。

[0437] 在DSS诱导的结肠炎开始后第10天,从野生型和CD84^{-/-}小鼠收获脾和MLN。将B细胞用B220⁺珠子富集,并用LPS活化5或24小时。对于活化的最后5小时,加入PIM (PMA、离子霉素和莫能星)。如在图40A和40C中所见,在活化的5和24小时中,CD84缺乏导致脾中几乎所有的调节性B细胞群体的显著增加。但是,在肠系膜淋巴结中,观察到在CD84缺乏时调节性B细胞群体的减少(图40B和40D)。这些结果可能指示,CD84对脾和MLN中的调节性B细胞产生具有作用。脾中Bregs的显著增加与在CD84^{-/-}小鼠中看到的更轻疾病相关。

[0438] 实施例15

CD84在EAE中的作用

为了评价CD84在Bregs分化和功能的调节中的参与,使用了另一种动物模型,即关于多发性硬化(MS)的鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型。通过用MOG 35-55肽和百日咳毒素(PT)处理这些小鼠,在野生型和CD84^{-/-}敲除小鼠中诱导EAE。跟踪小鼠27天以观察临床EAE表型。结果表明,CD84^{-/-}敲除小鼠表现出与野生型小鼠相比显著更温和的疾病,如通过更低的临床评分(图41A)和更低的重量减轻(图41B)所看到的。在疾病的第27天,在活化后5小时(图41C)或24小时(图41D)分析脾中的调节性B细胞群体。如在图41C-D中所示,在2个时间点检测到Breg群体(即B10、Mz和T2-MzP)的显著增加。另外,分析了在该模型中的T细胞应答。在CD4⁺ T细胞群体中没有检测到显著差异(图41E-F)。这些结果提示,CD84缺乏保护小鼠免于诱导的EAE,其可能通过调节性B细胞群体的升高而产生。

[0439] 尽管已结合其具体实施方案描述了本发明,但是显而易见,本领域技术人员会明白许多替代方案、修改和变化。因此,意图包括落入所附权利要求的精神和宽范围之内的所有这样的替代方案、修改和变化。

[0440] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请在此以它们的整体并入说明书中,达到与明确地且单独地指出每篇单独的出版物、专利或专利申请通过引用并入本文相同的程度。另外,在本申请中对任何参考文献的引述或鉴定不应解释为承认这样的参考文献可作为本发明的现有技术。就使用的段落标题而言,它们不应解释为必然限制性的。

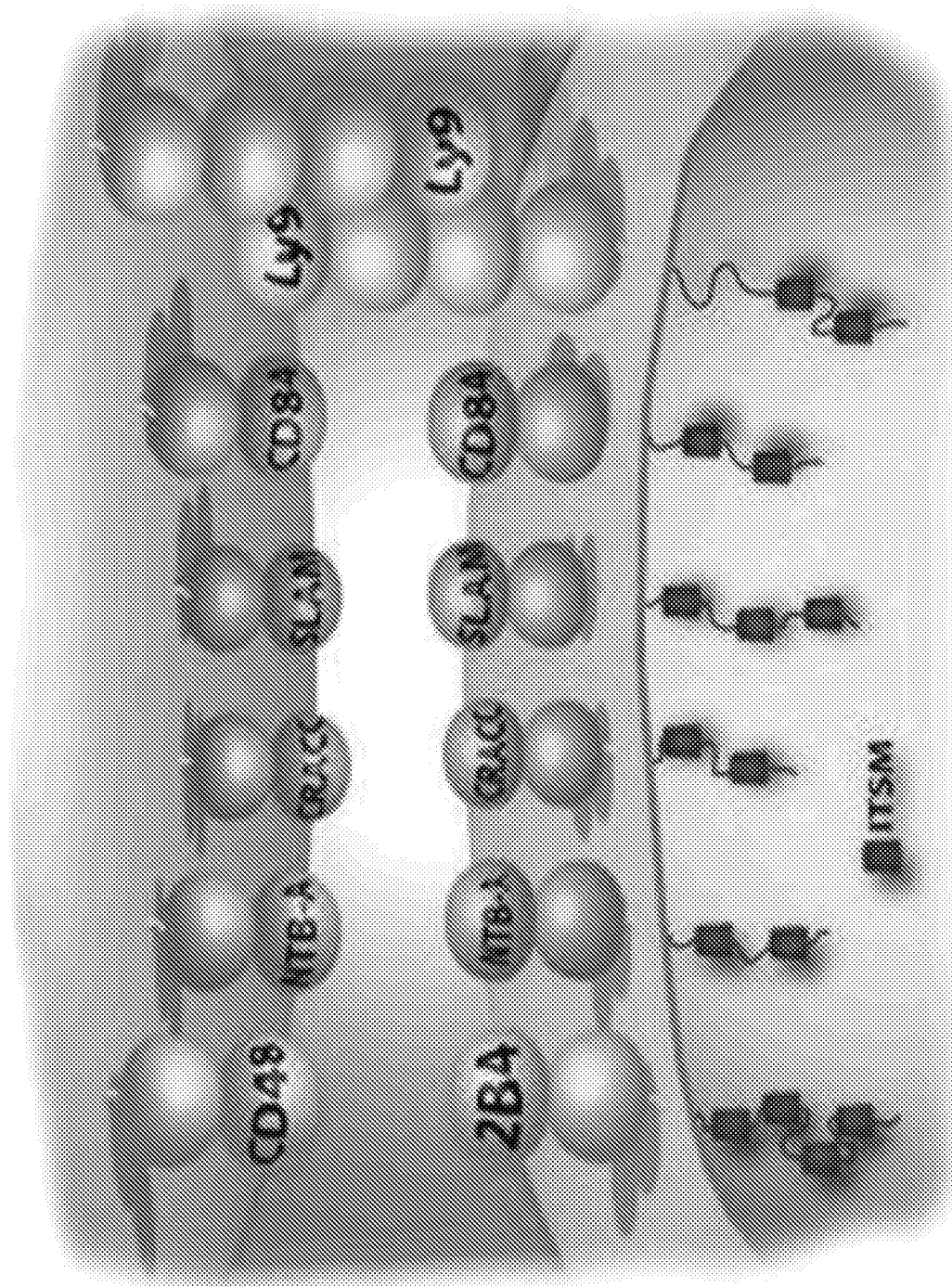
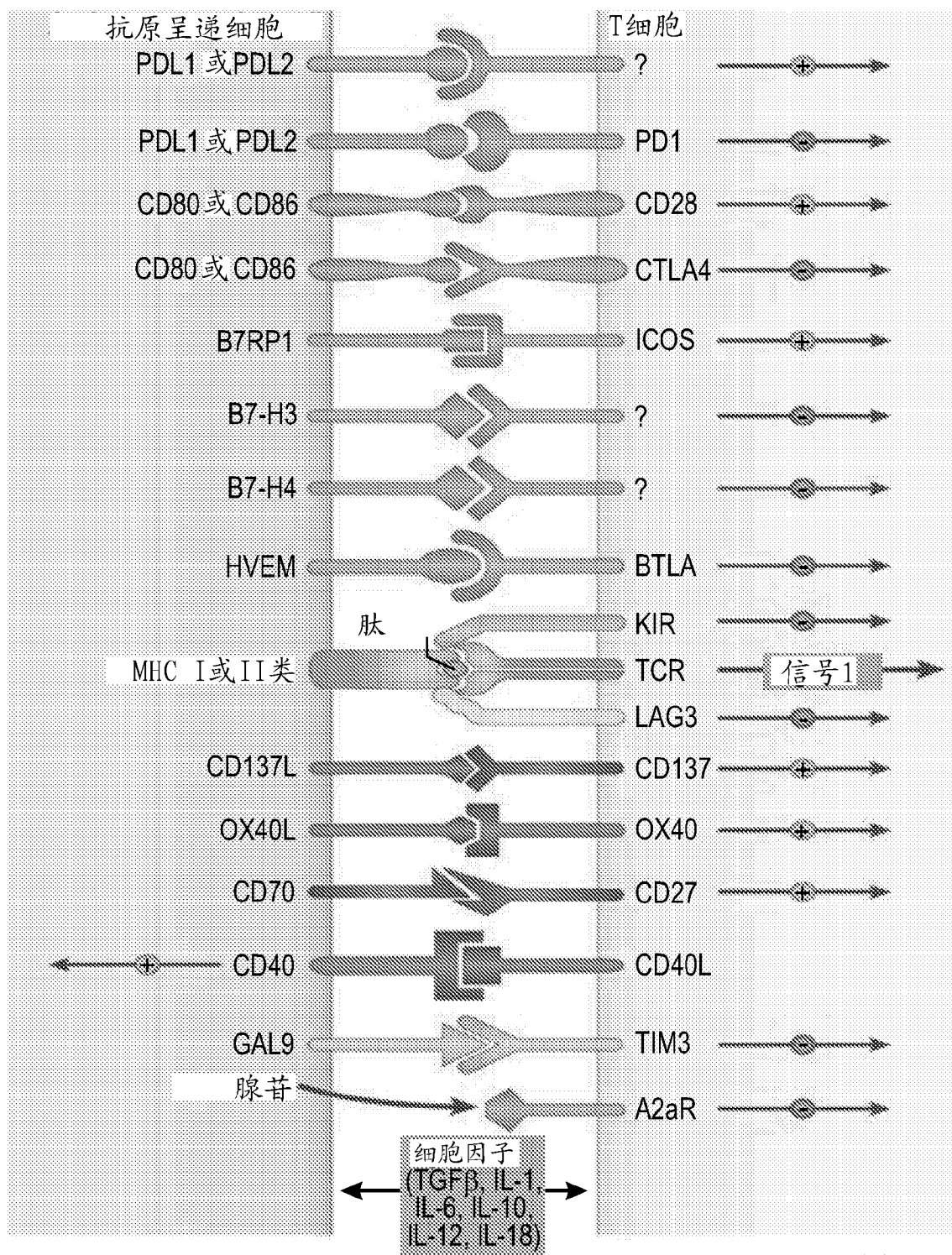


图 1



Nature Reviews | Cancer

图 2

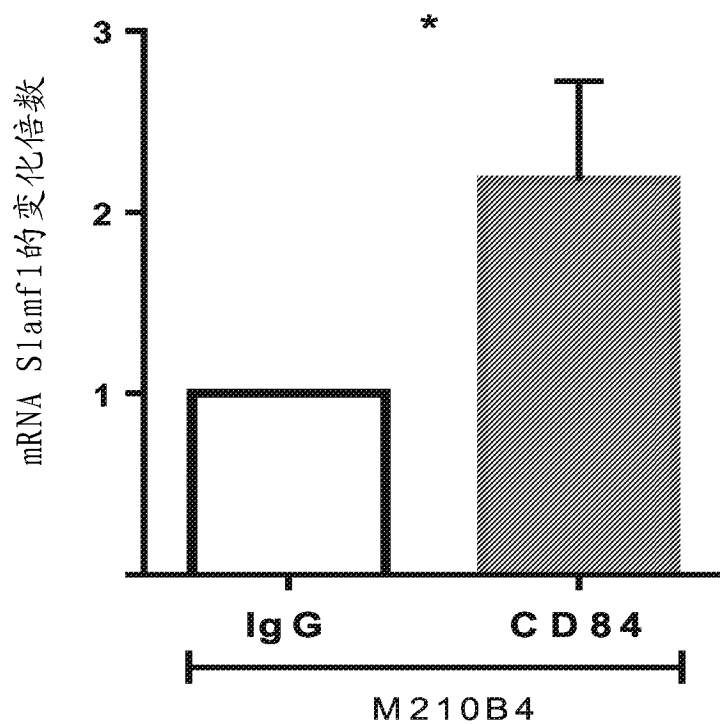


图 3A

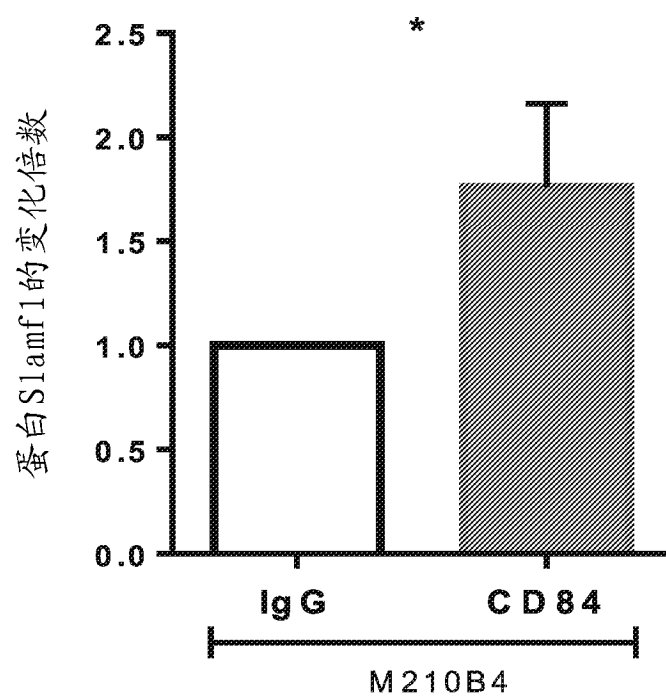


图 3B

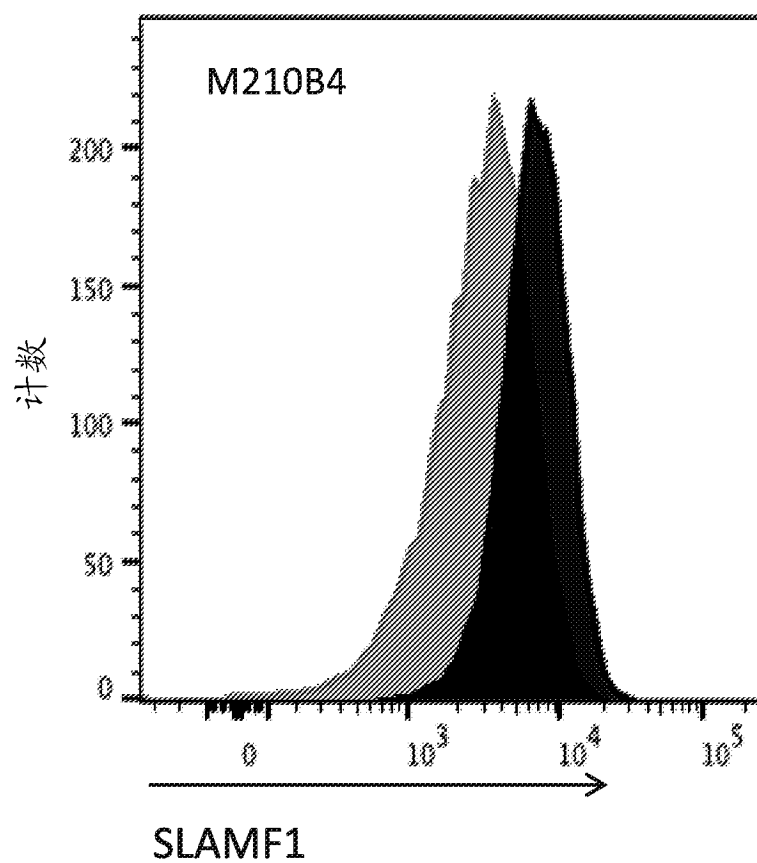


图 3C

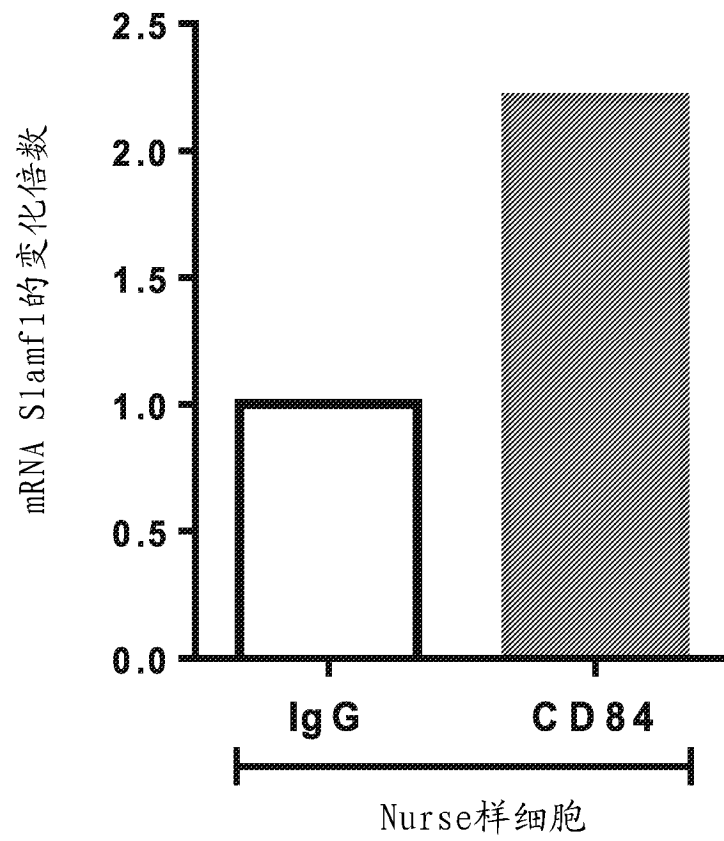


图 3D

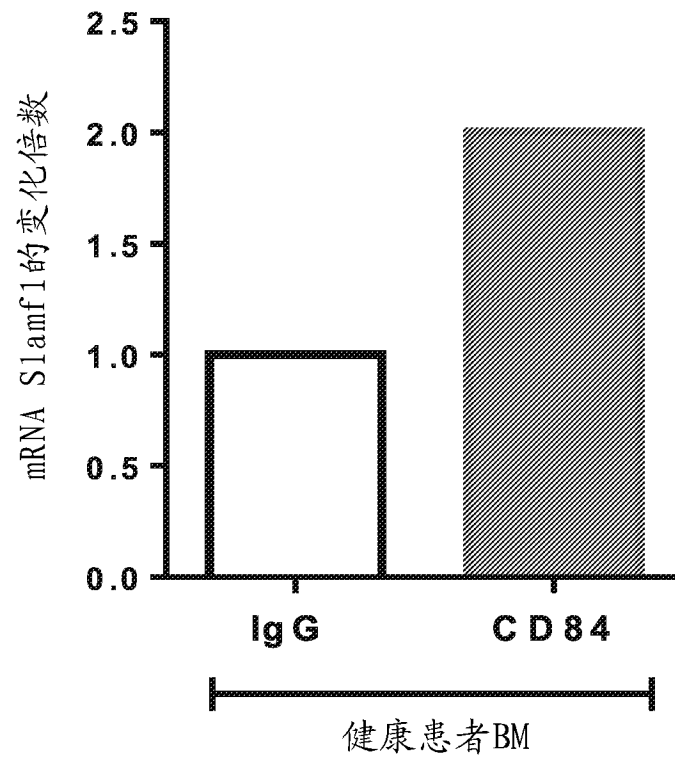


图 3E

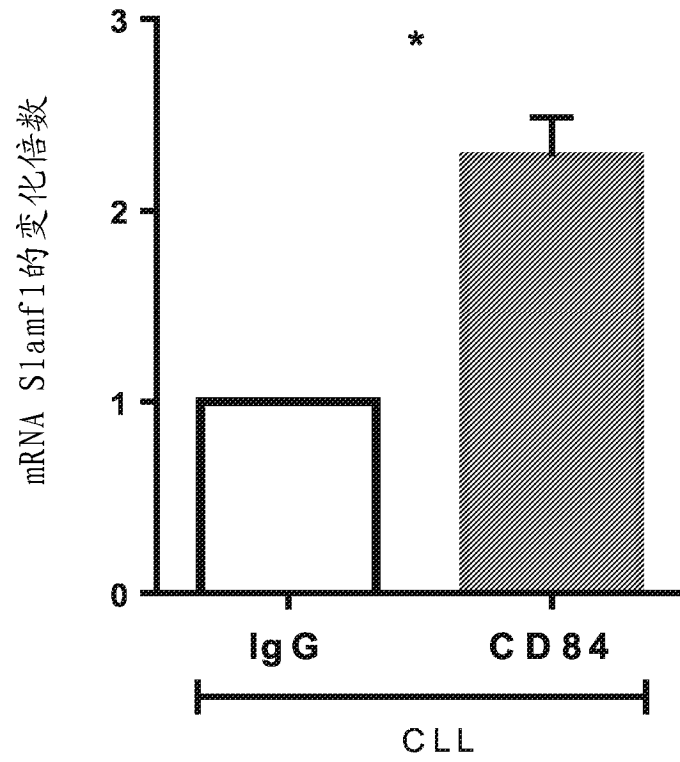


图 3F

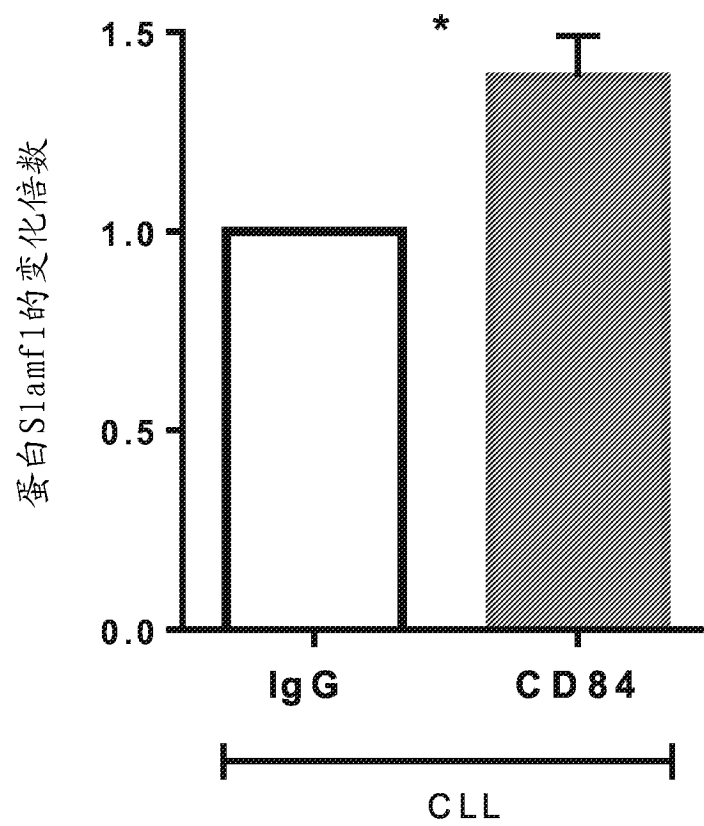


图 3G

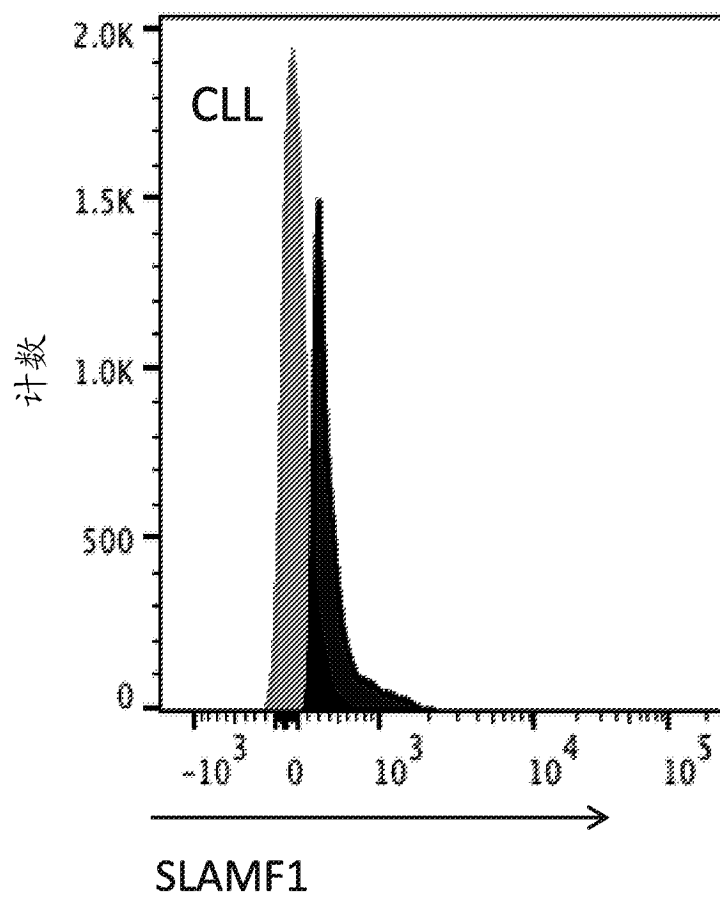


图 3H

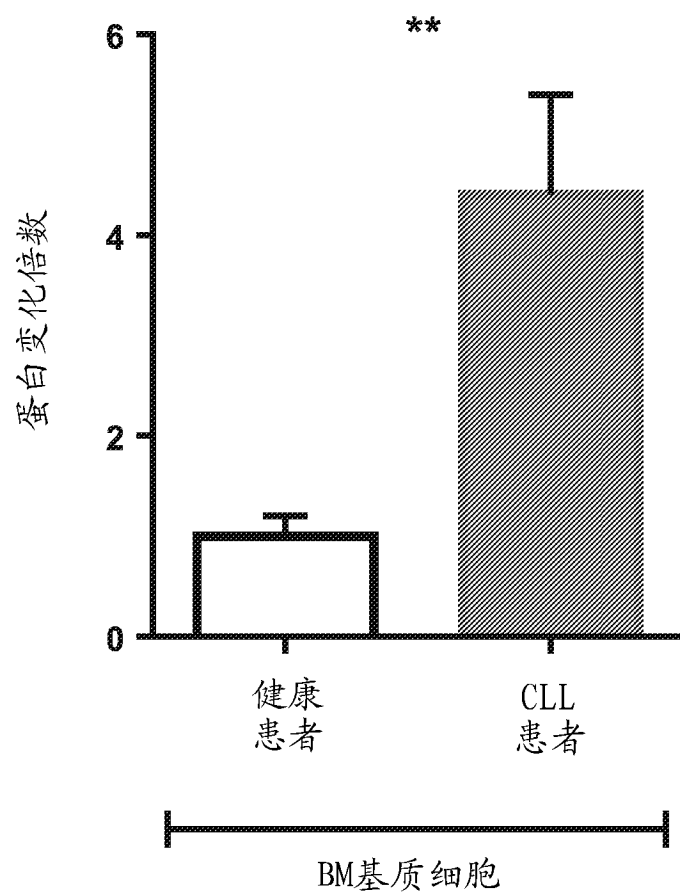


图 4A

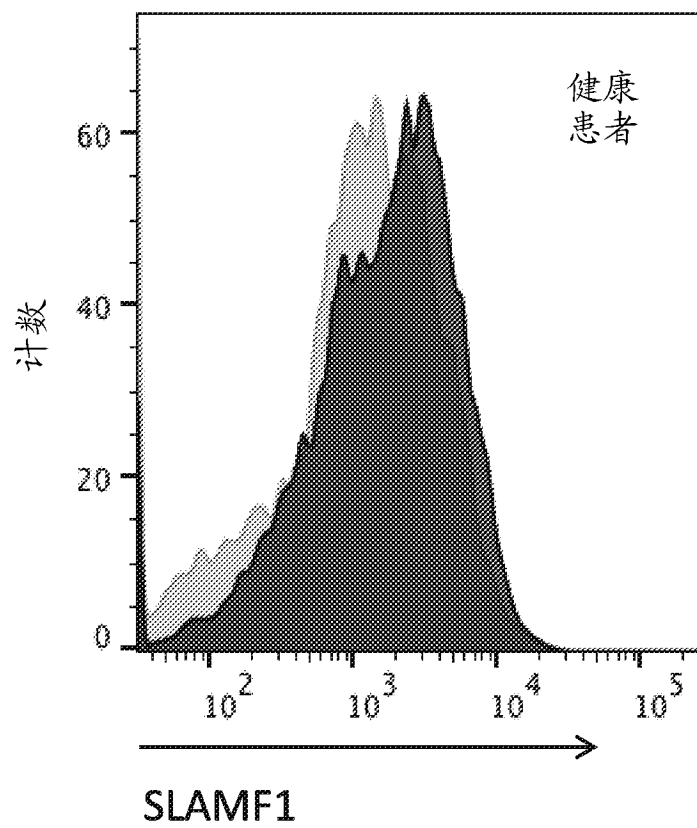


图 4B

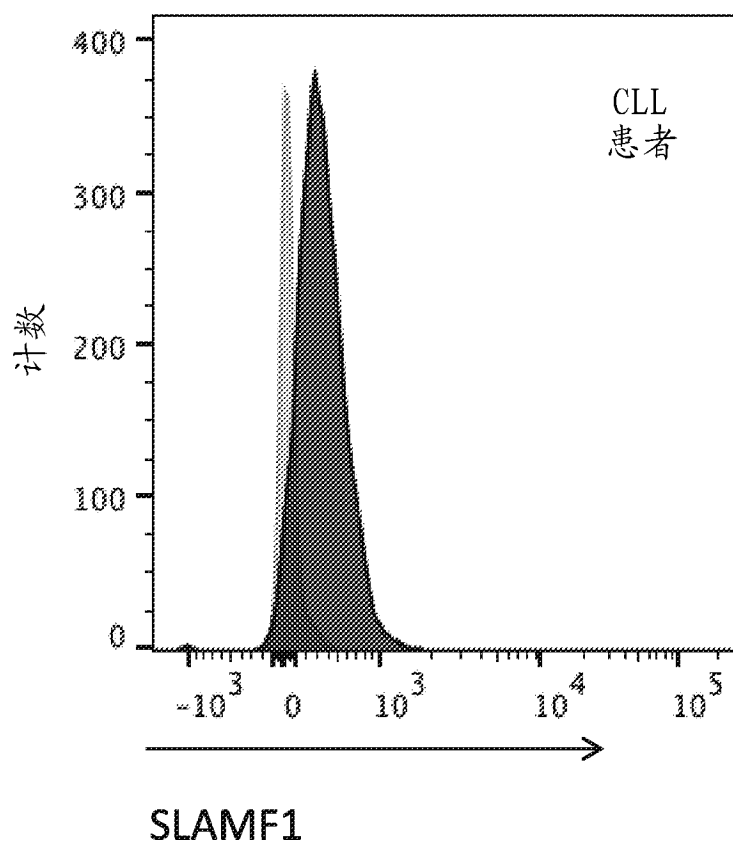


图 4C

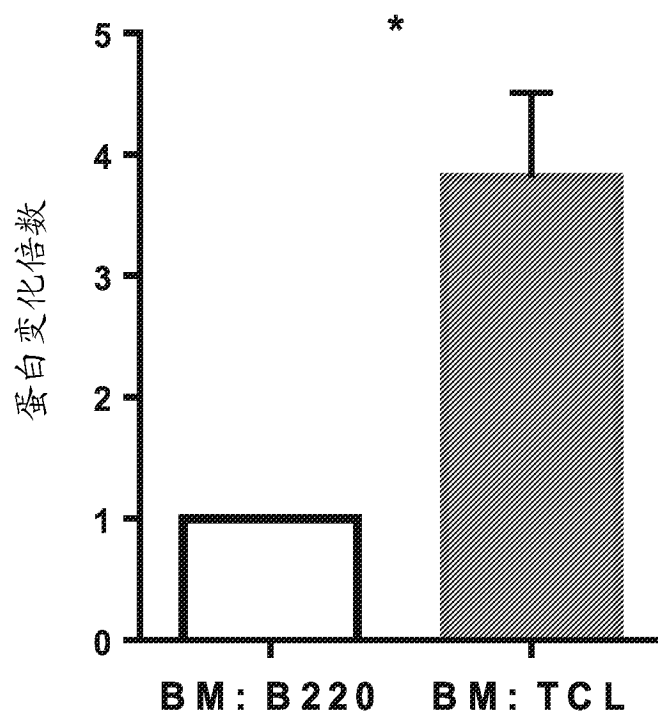


图 4D

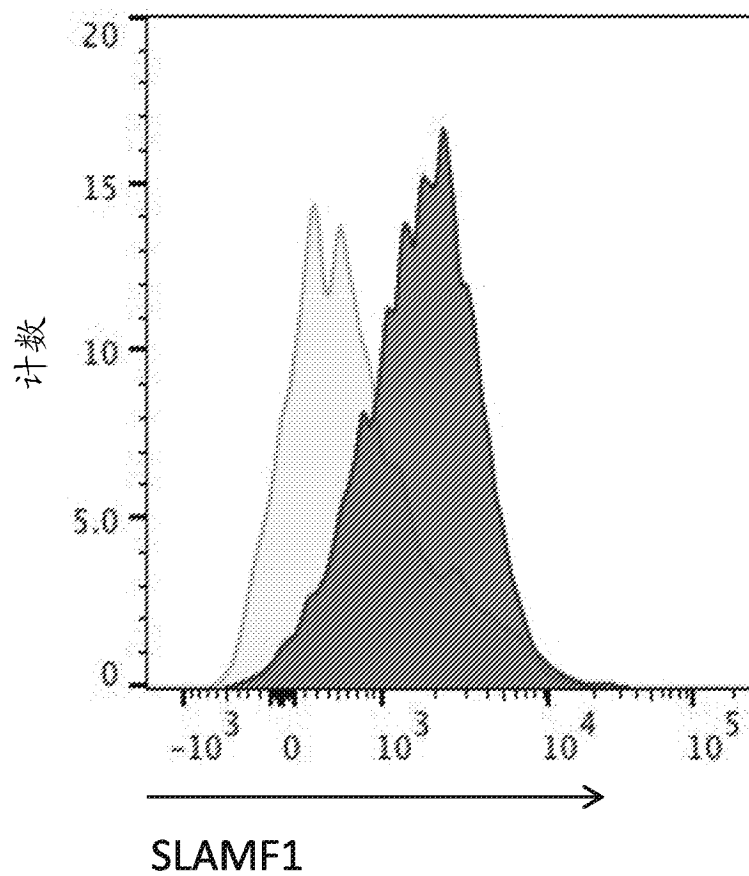


图 4E

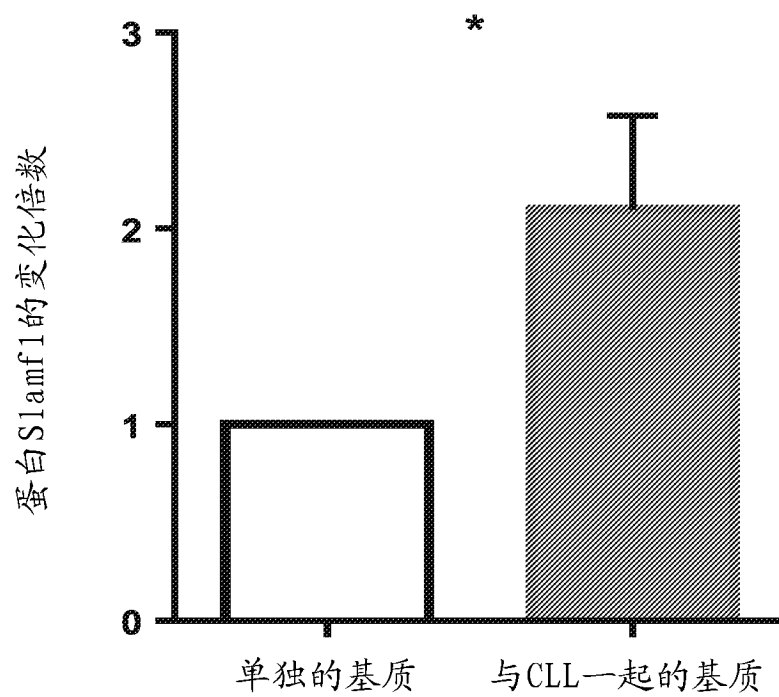


图 5

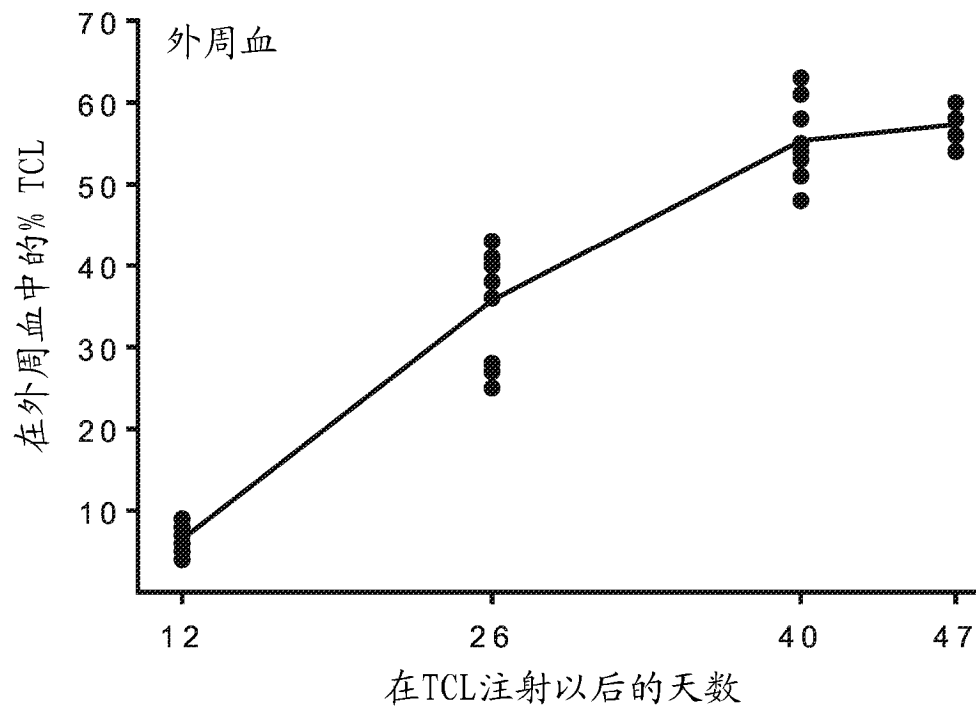


图 6A

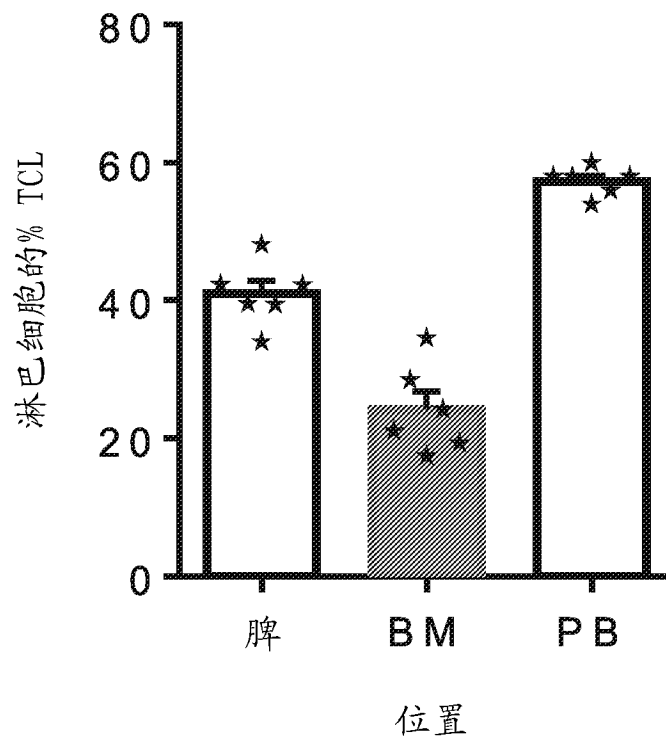


图 6B

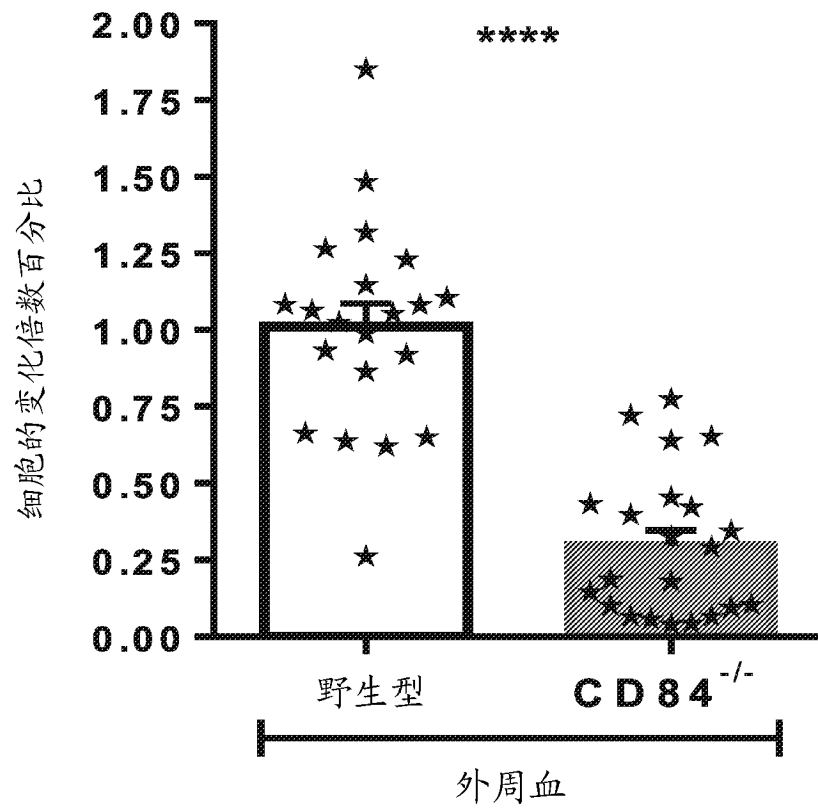


图 7A

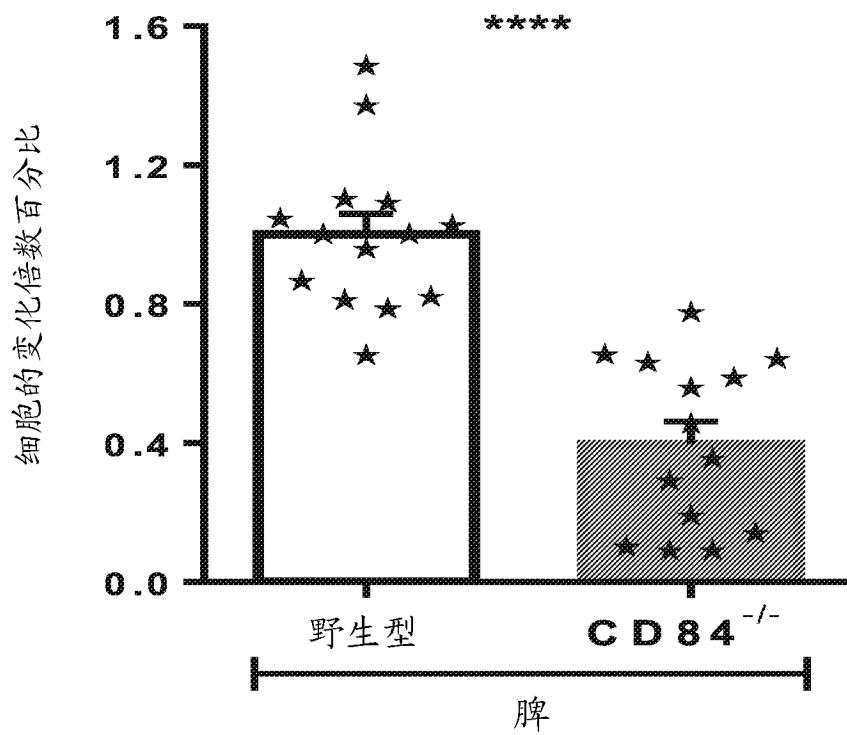


图 7B

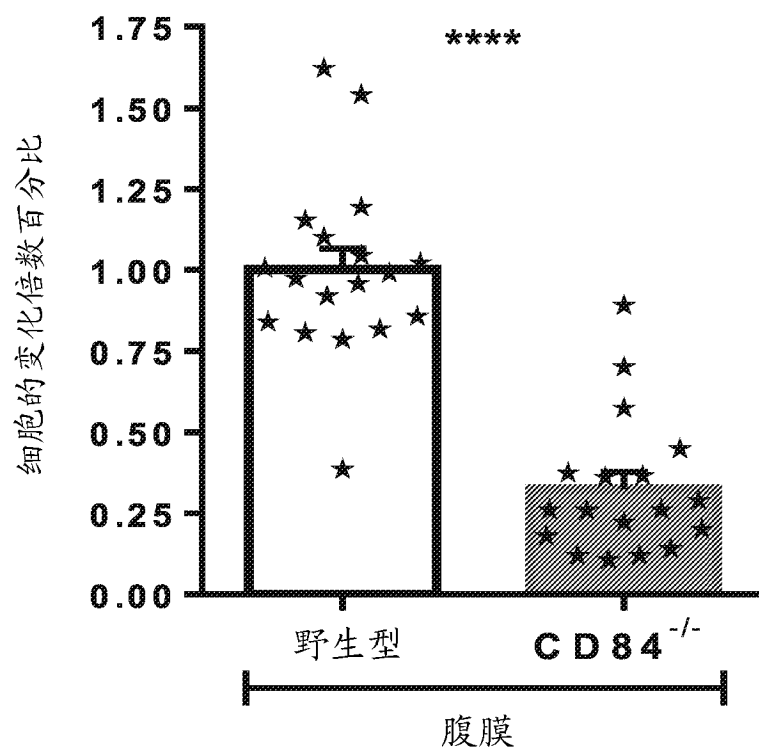


图 7C

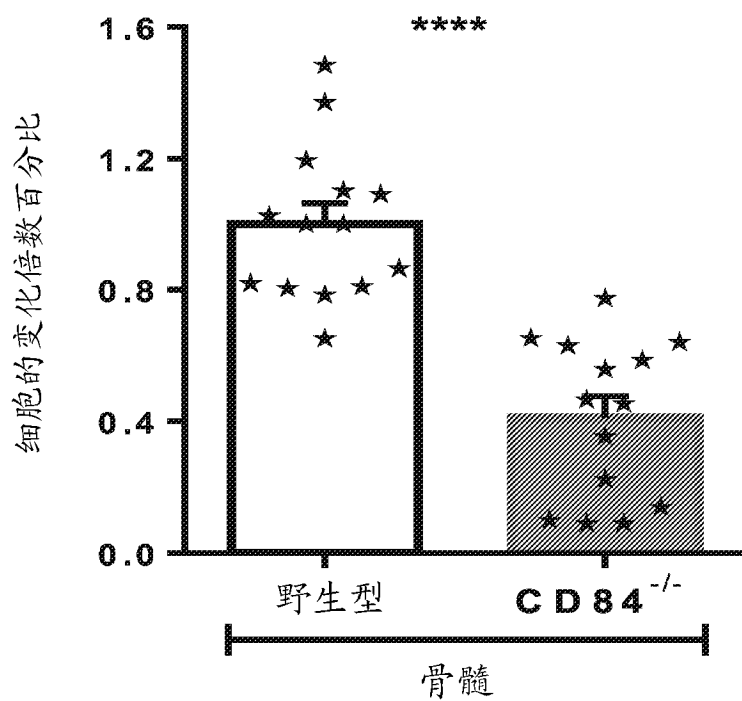


图 7D

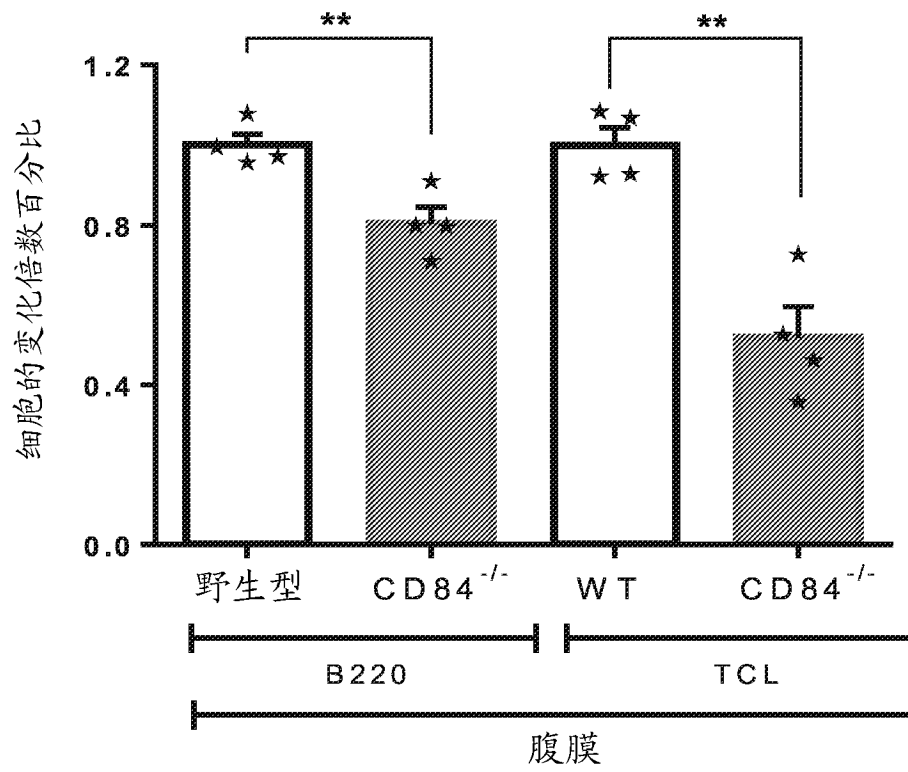


图 8A

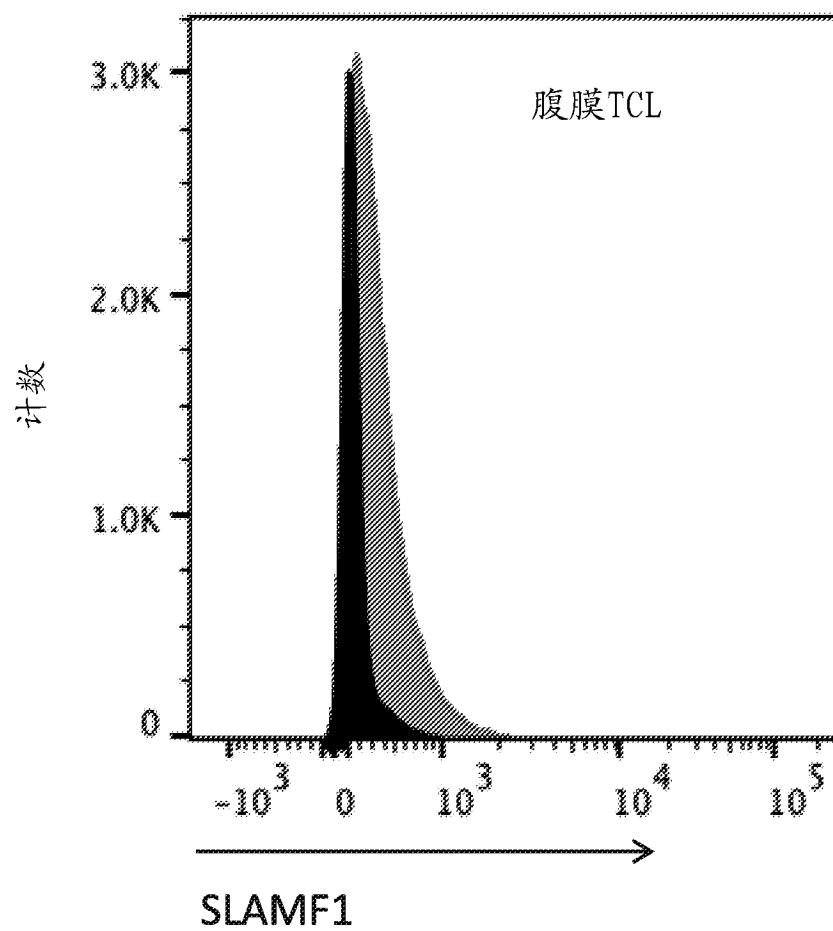


图 8B

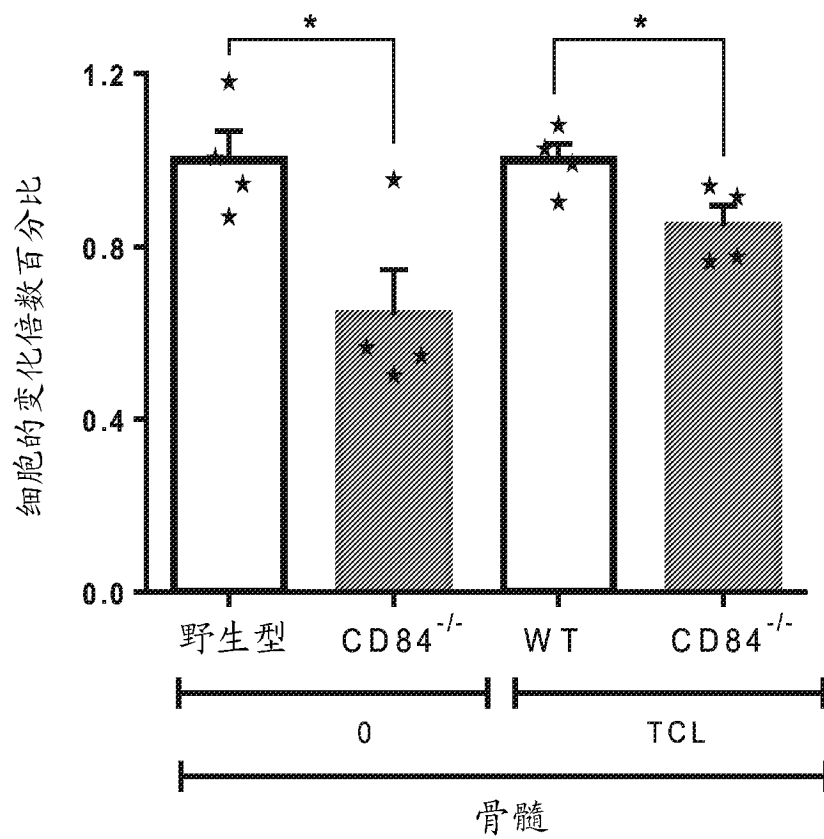


图 8C

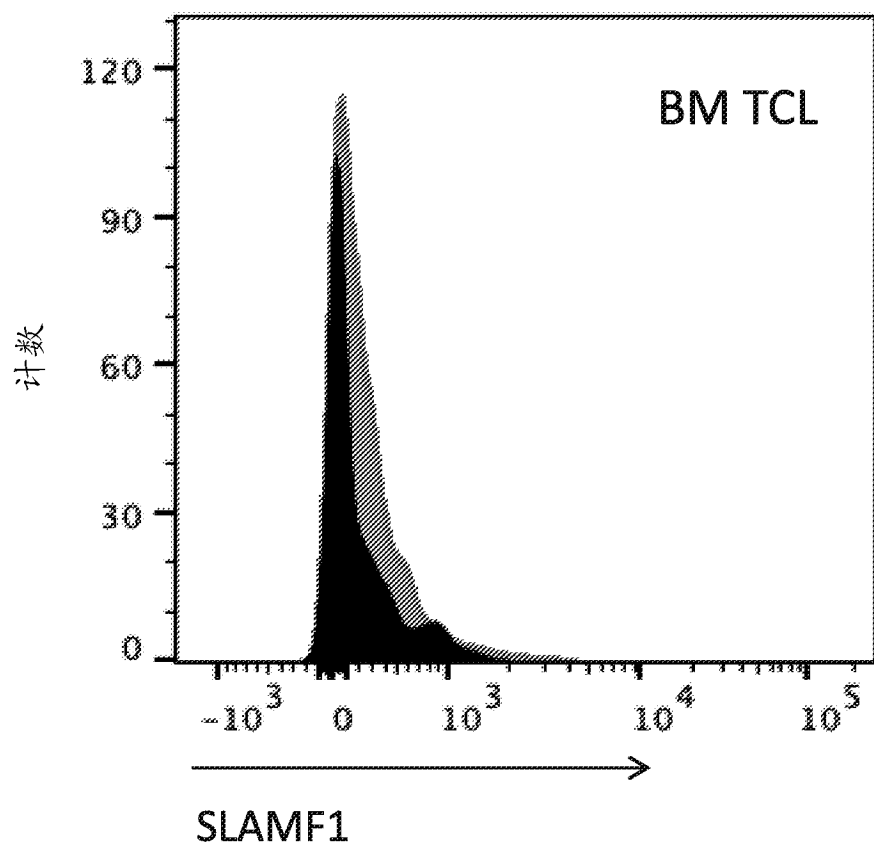


图 8D

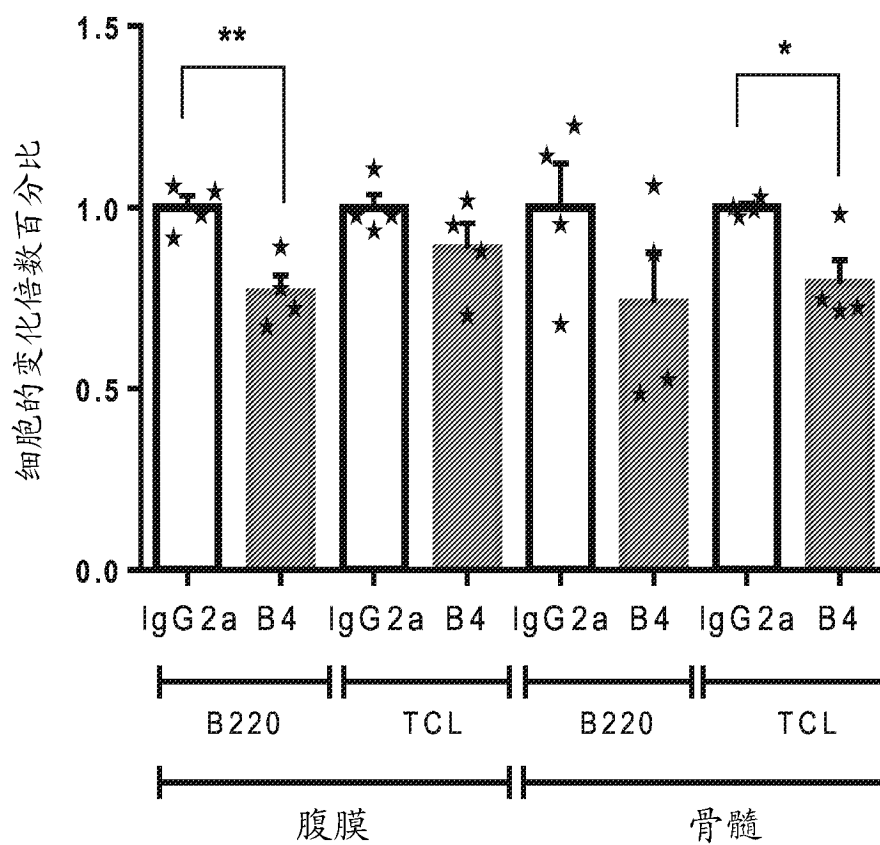


图 8E

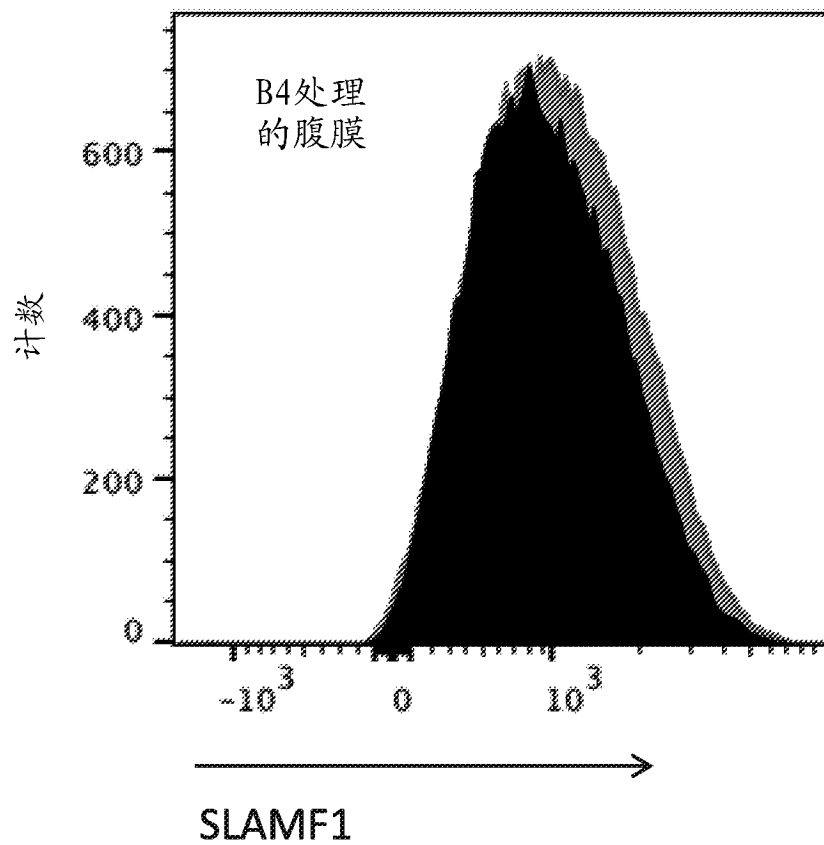


图 8F

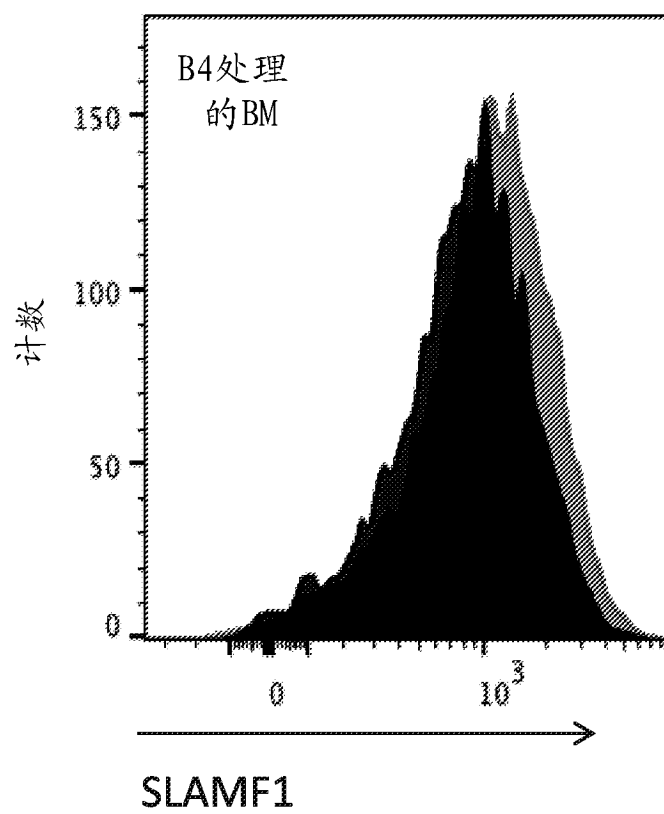


图 8G

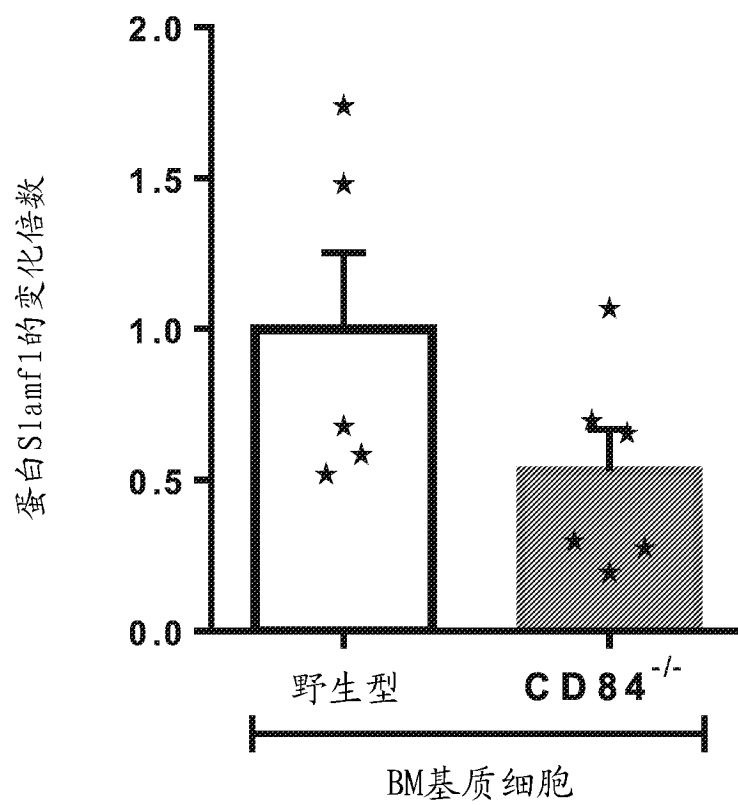


图 8H

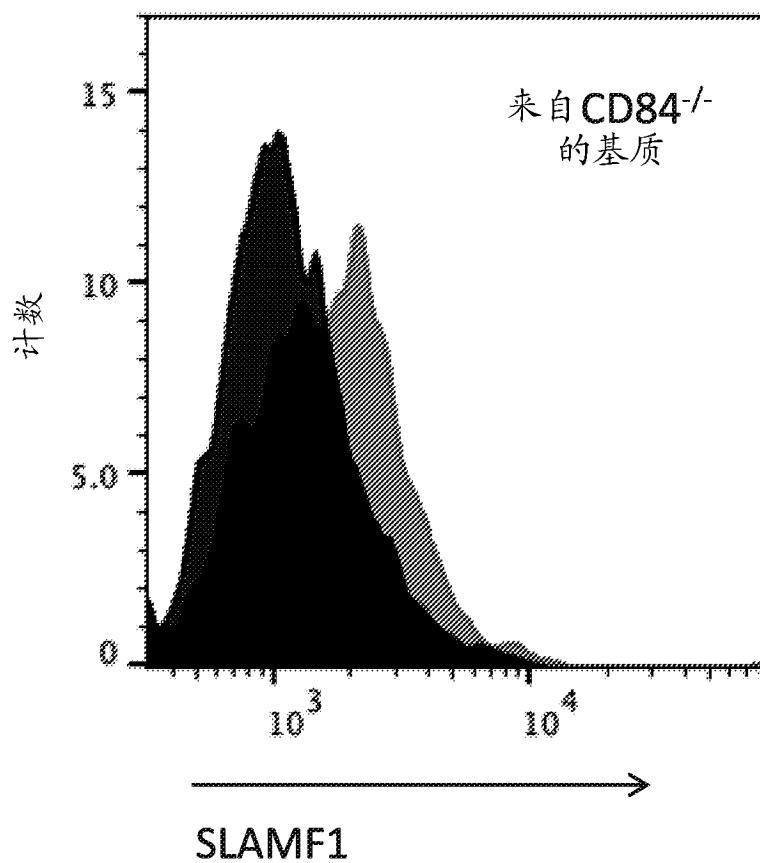


图 8I

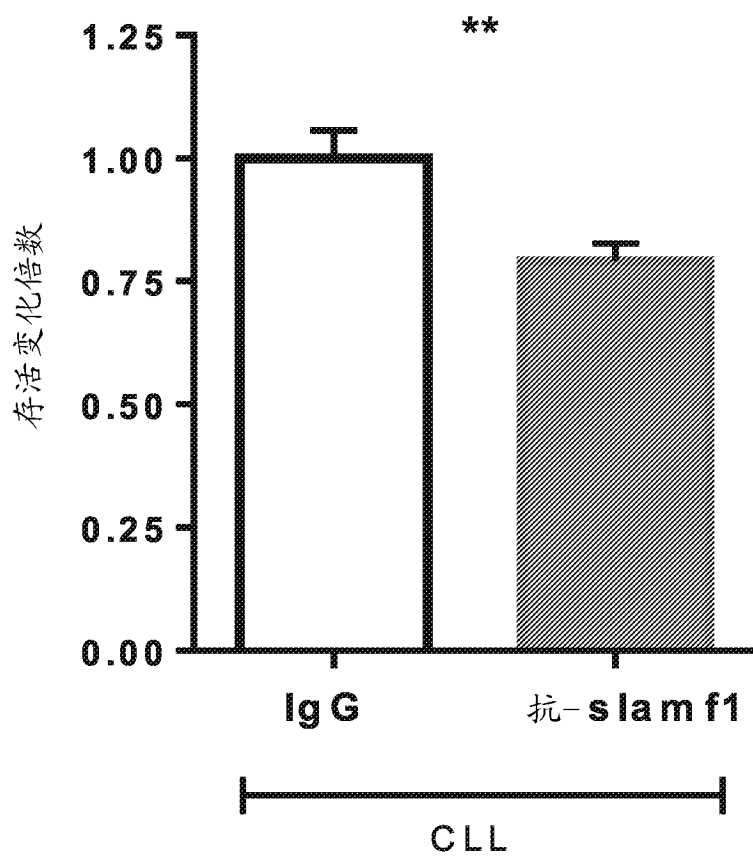
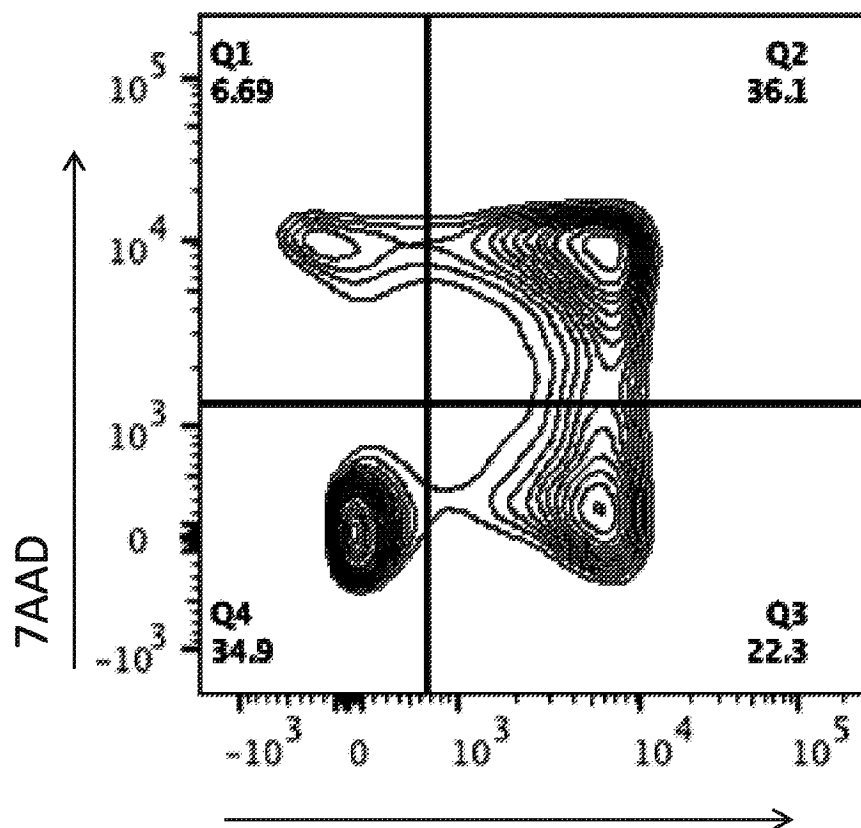


图 9A



膜联蛋白V
抗-SLAMF1

图 9B

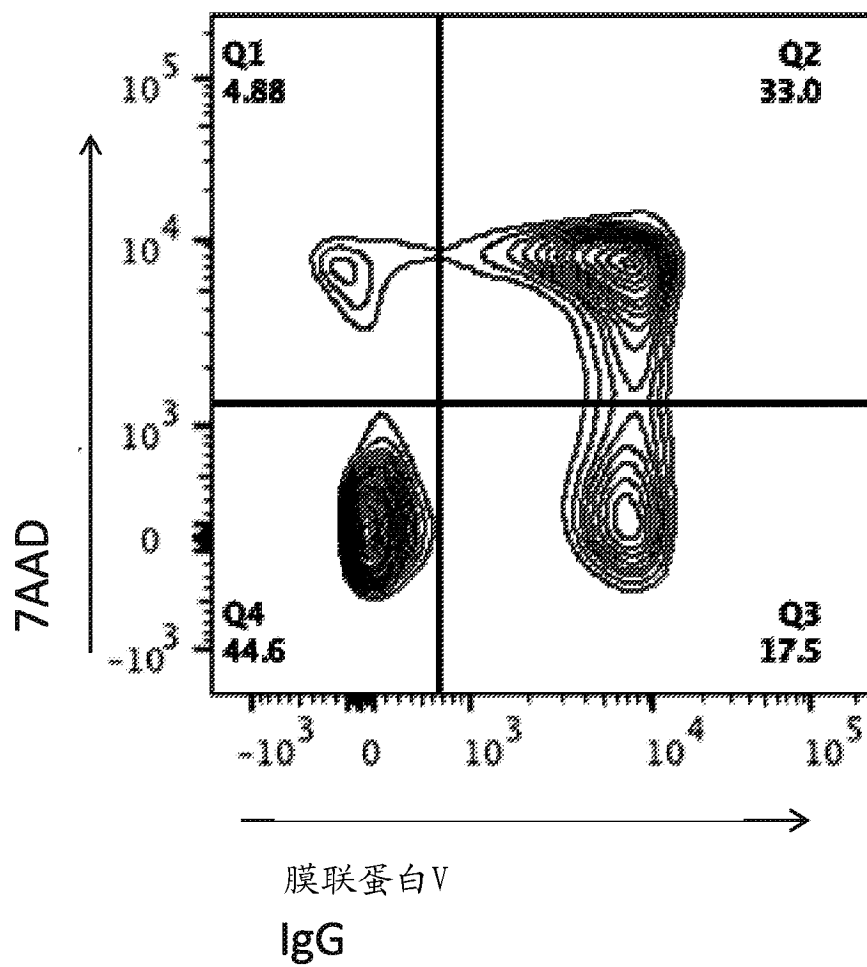


图 9C

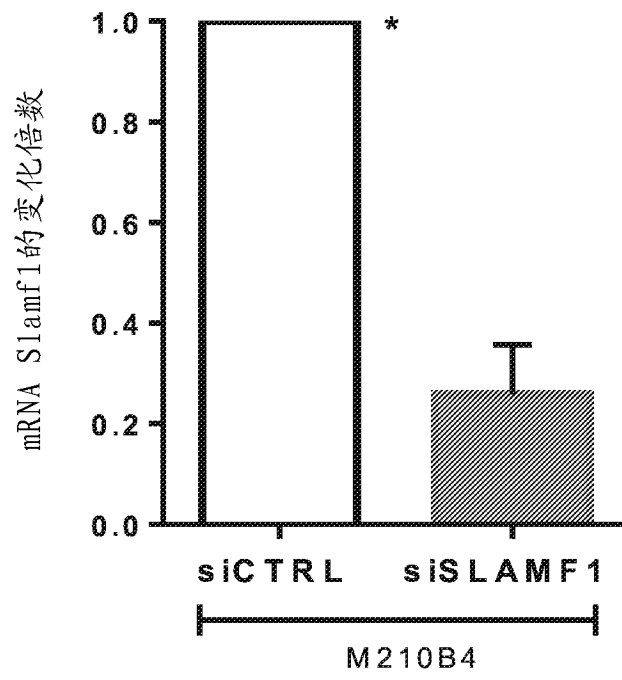


图 9D

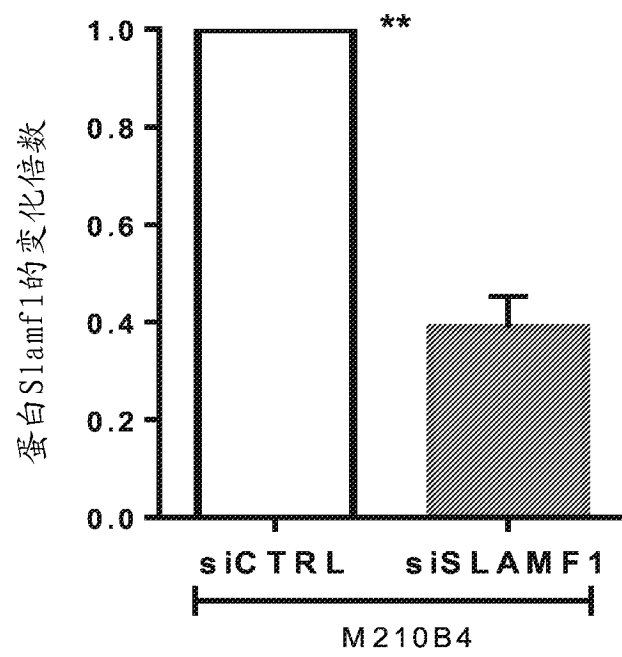


图 9E

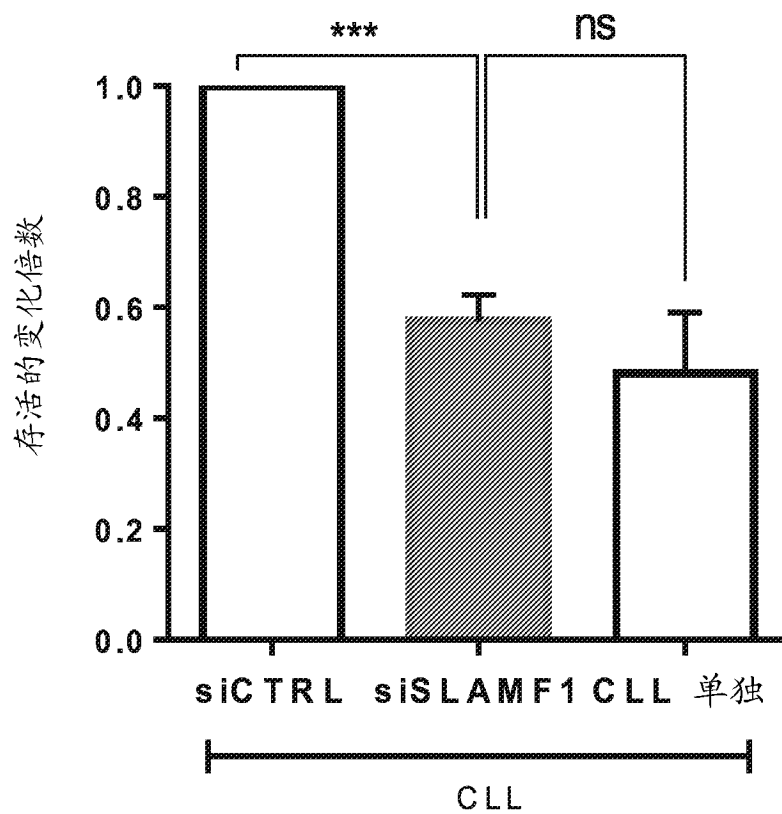


图 9F

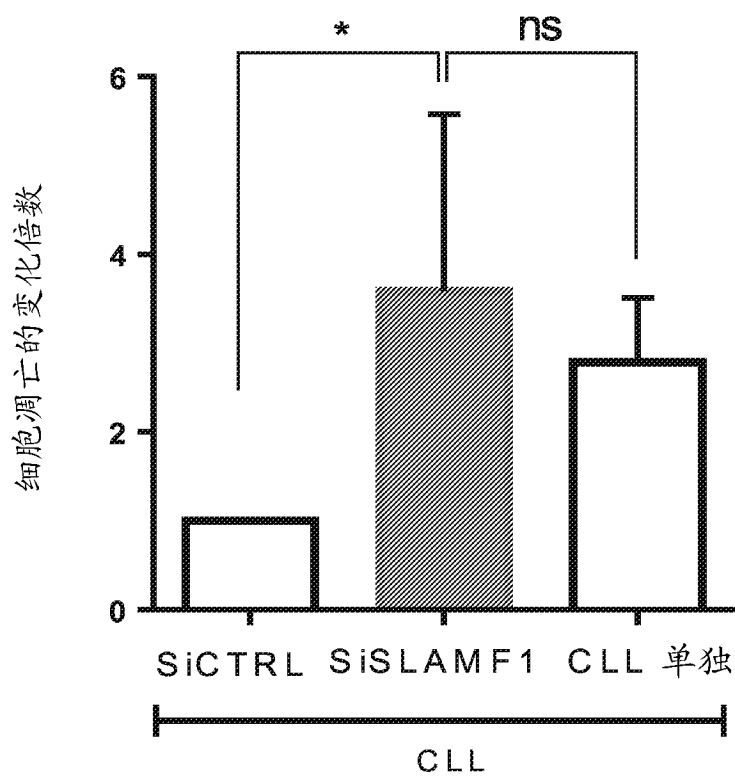


图 9G

图 9J

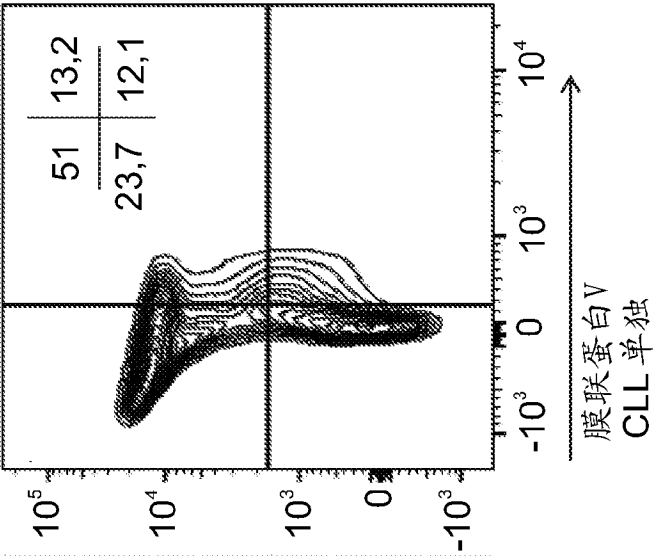


图 9I

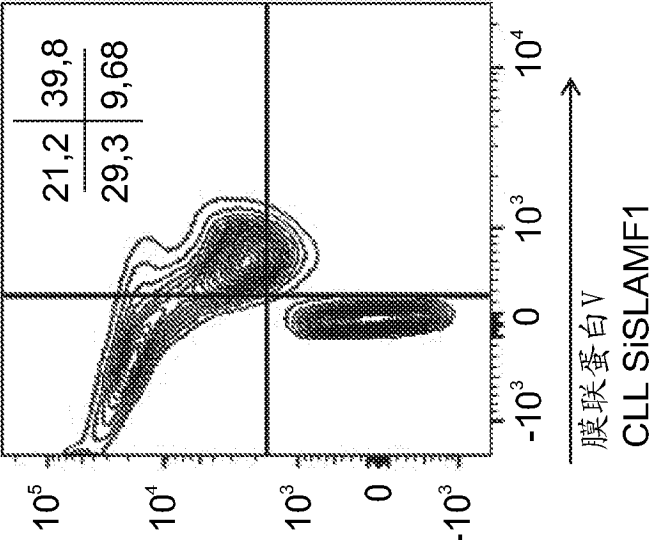


图 9H

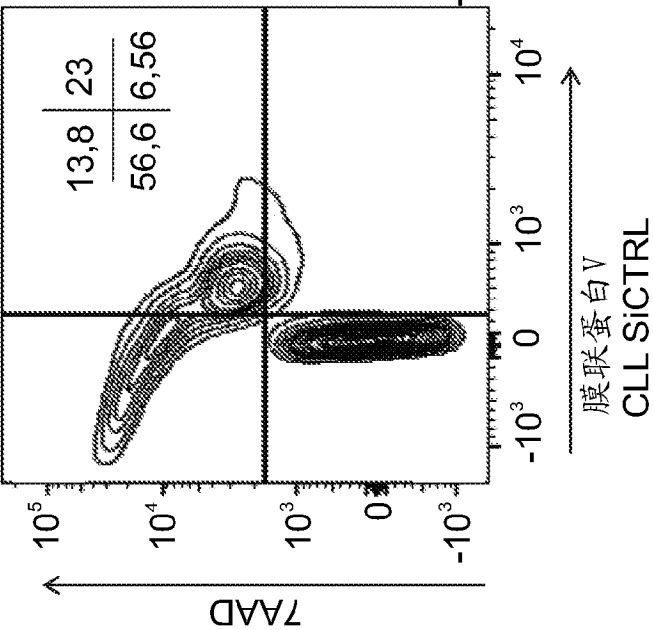


图 9H,图 9I,图 9J

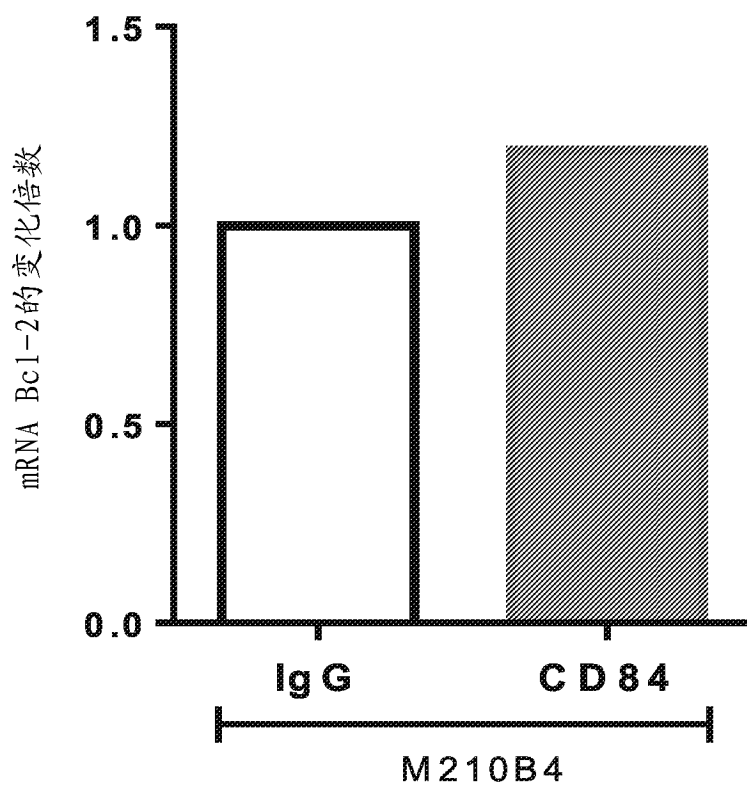


图 10A

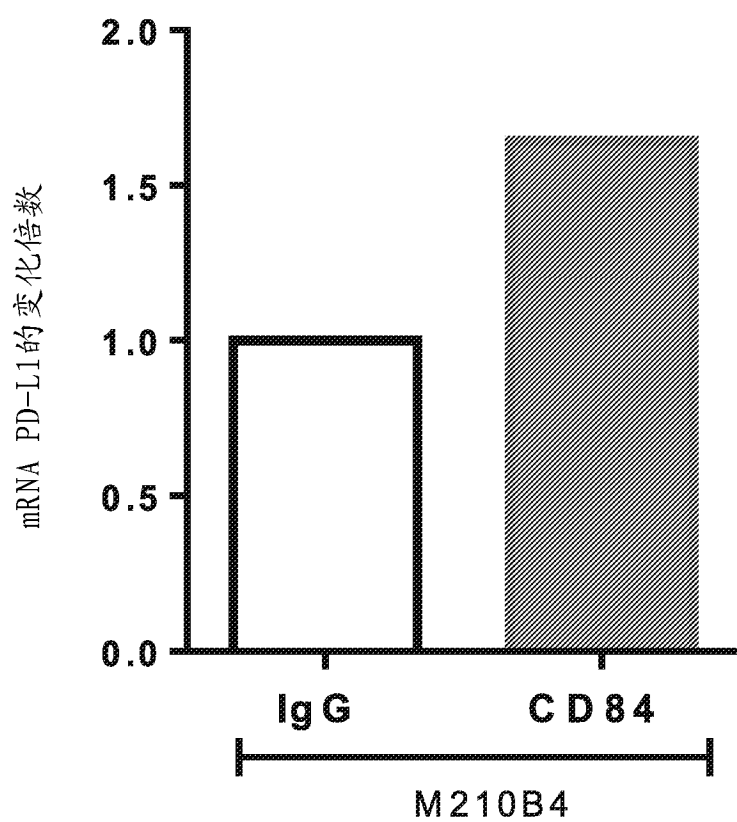


图 10B

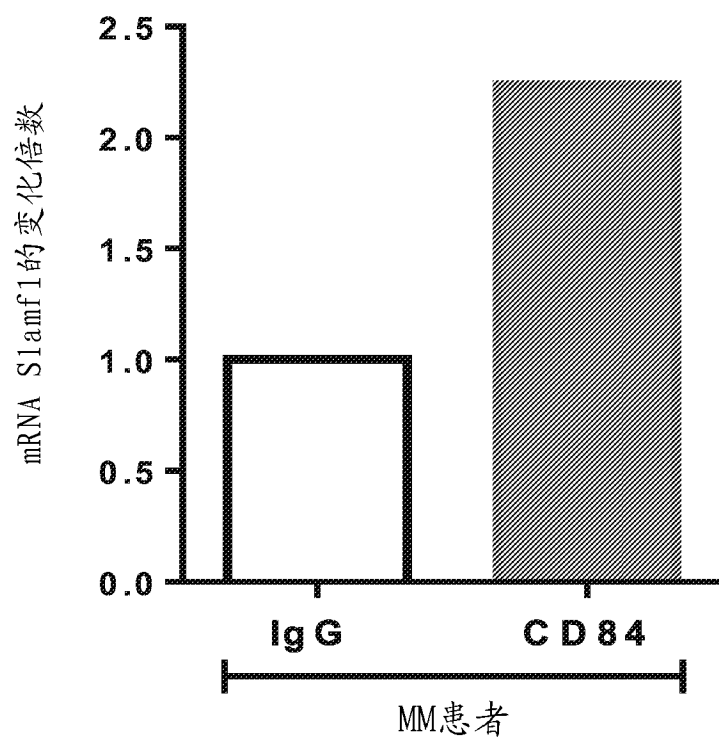


图 11A

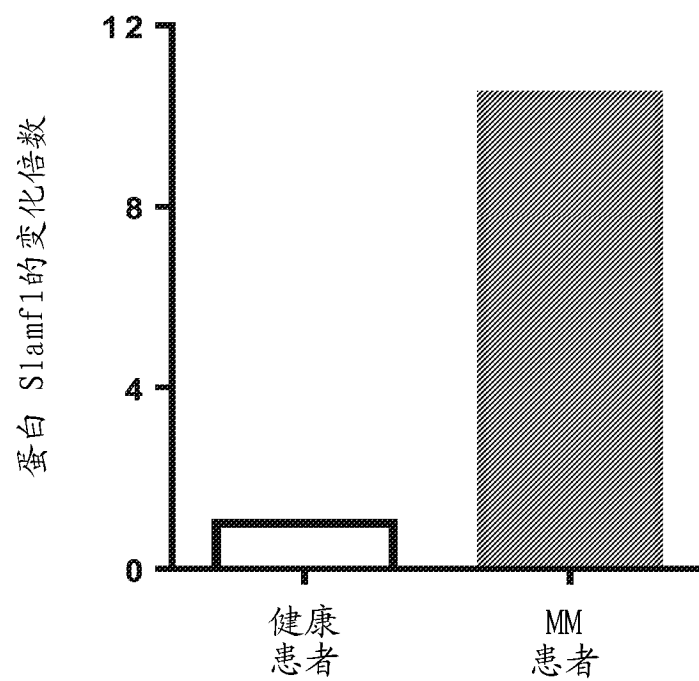


图 11B

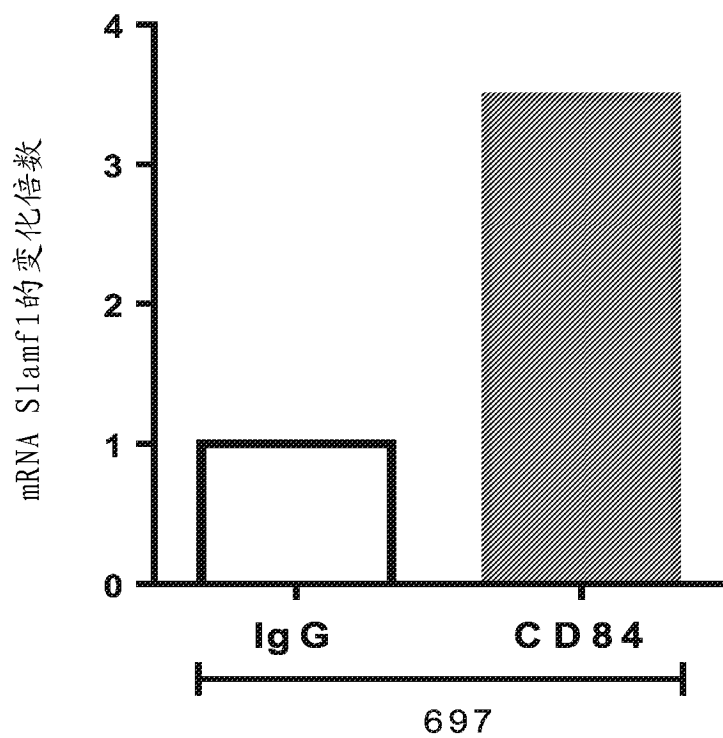


图 12A

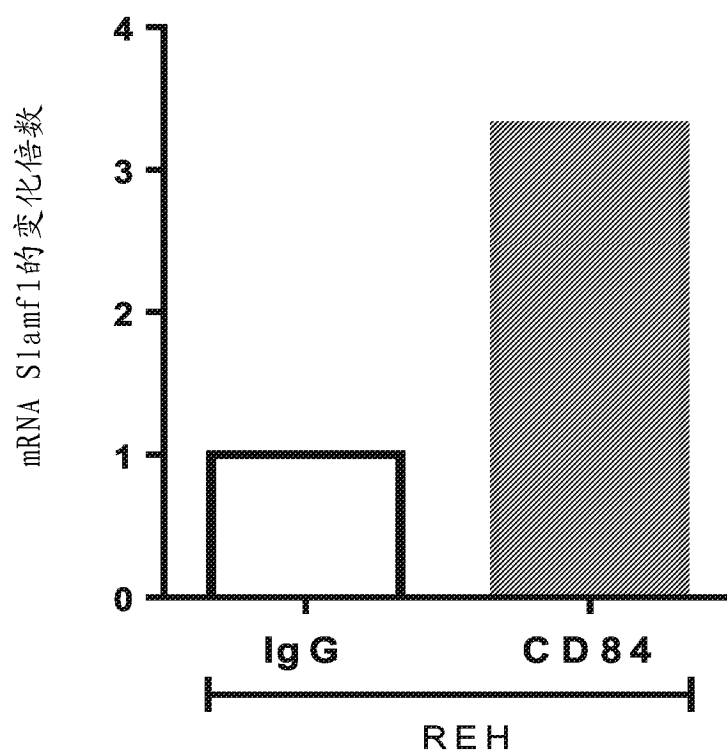


图 12B

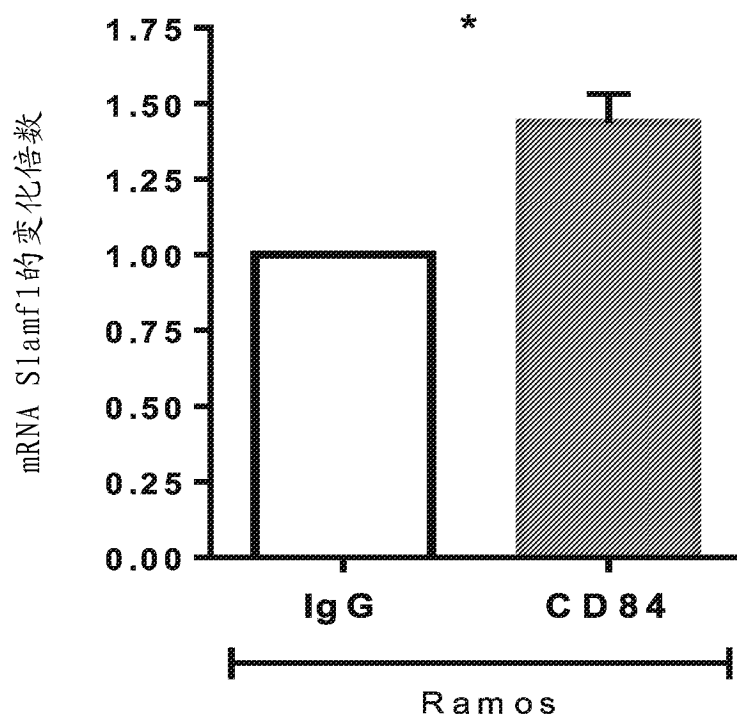


图 12C

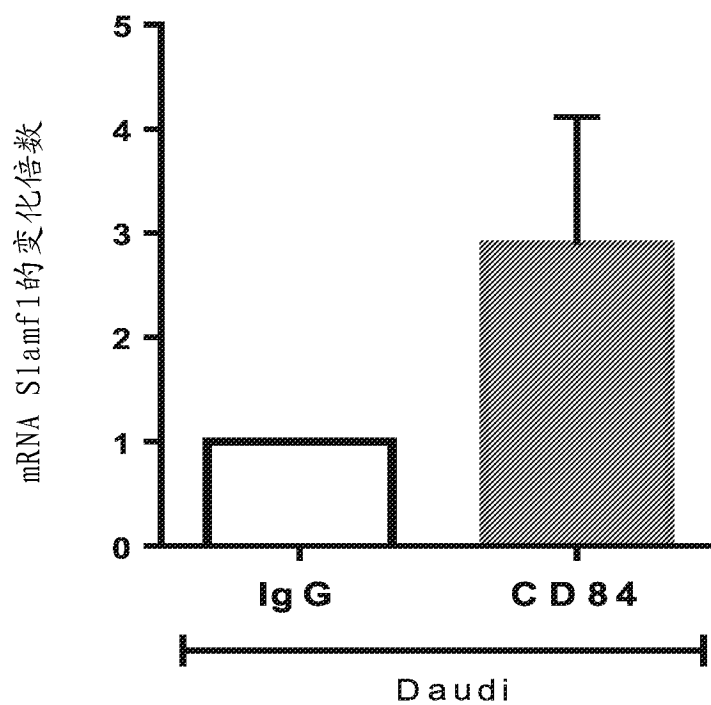


图 12D

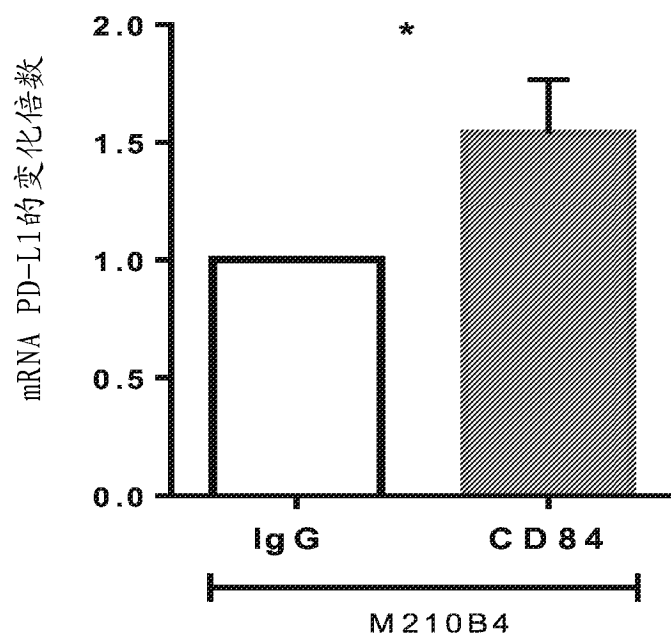


图 13A

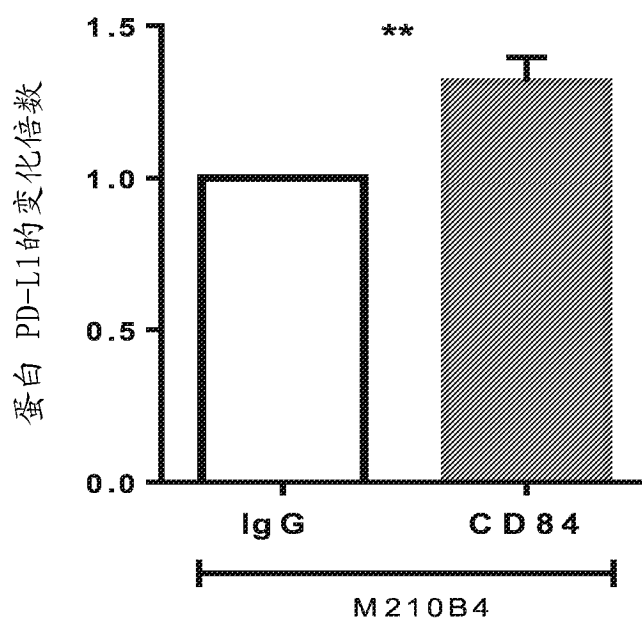


图 13B

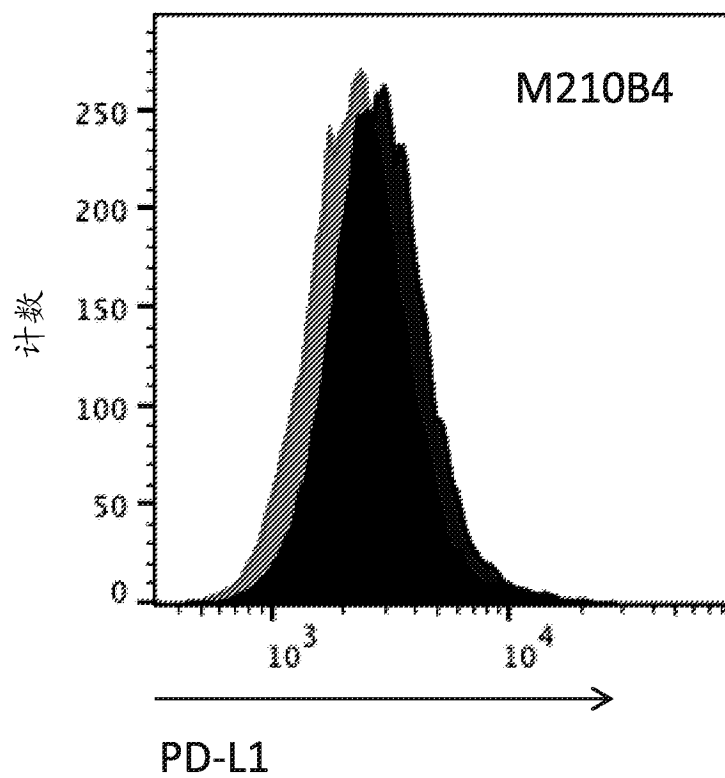


图 13C

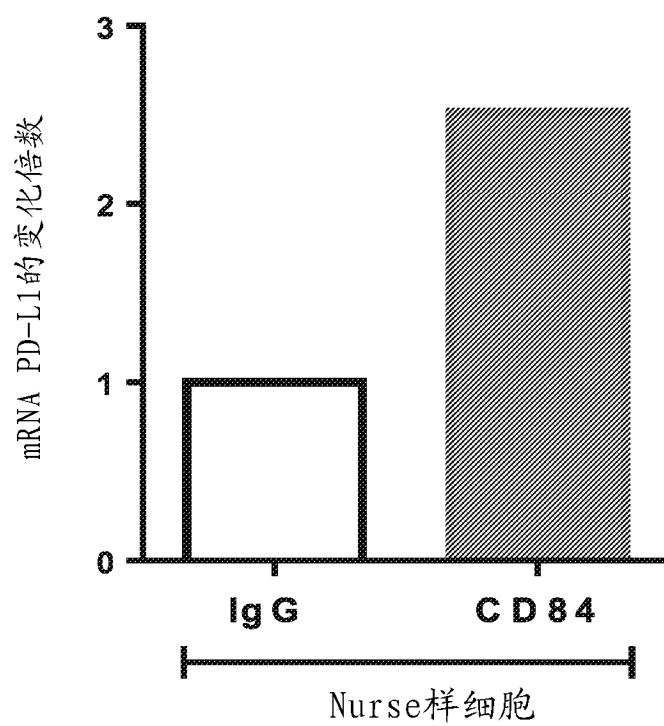


图 13D

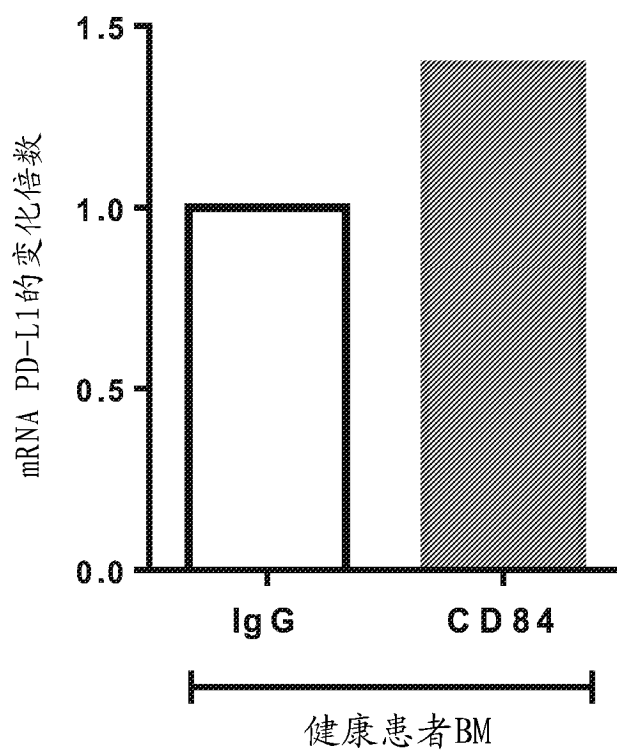


图 13E

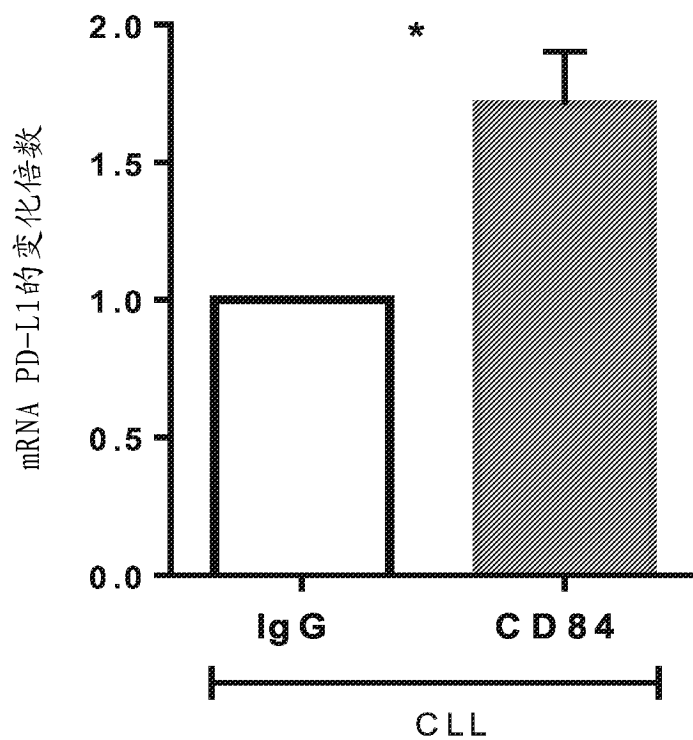


图 13F

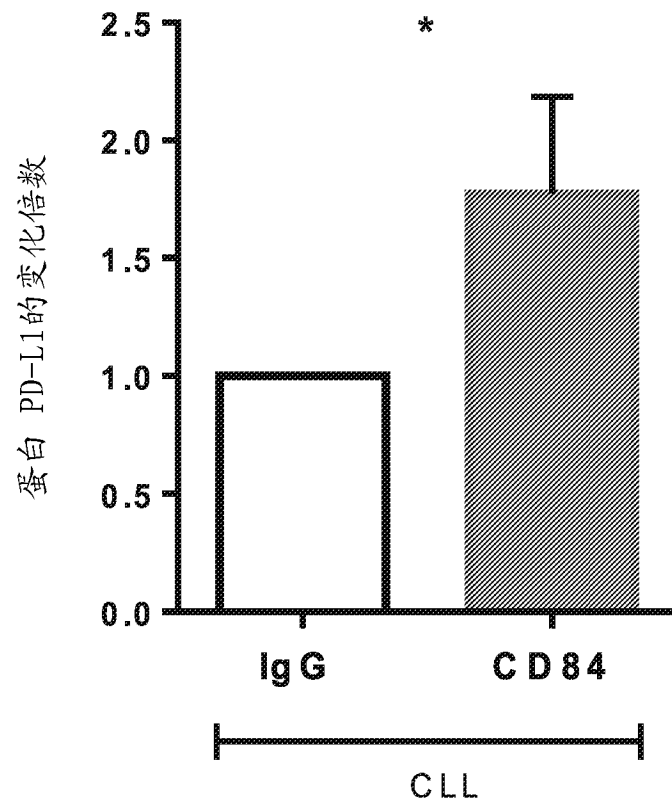


图 13G

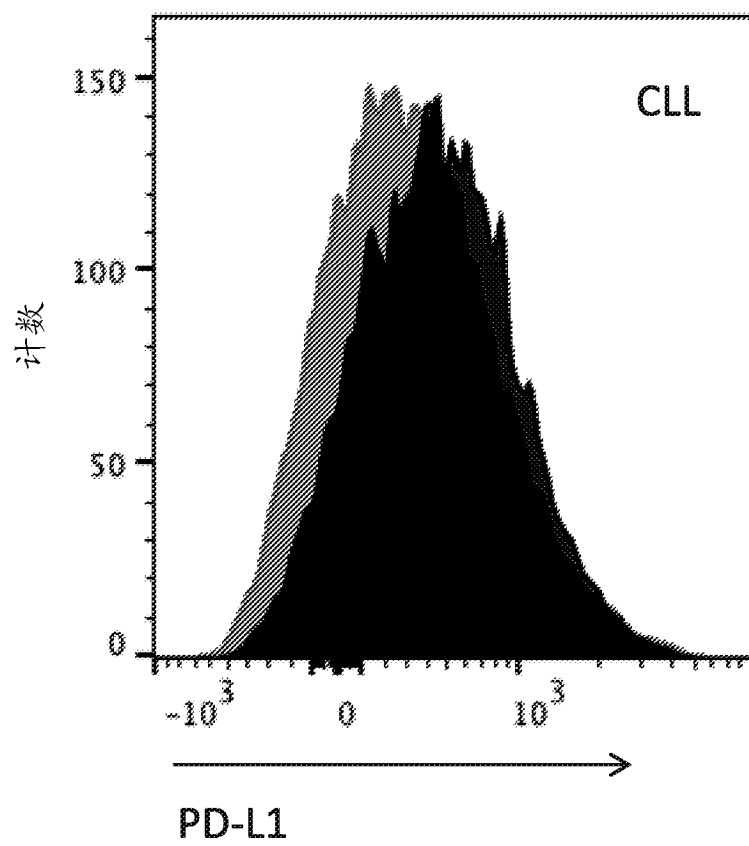


图 13H

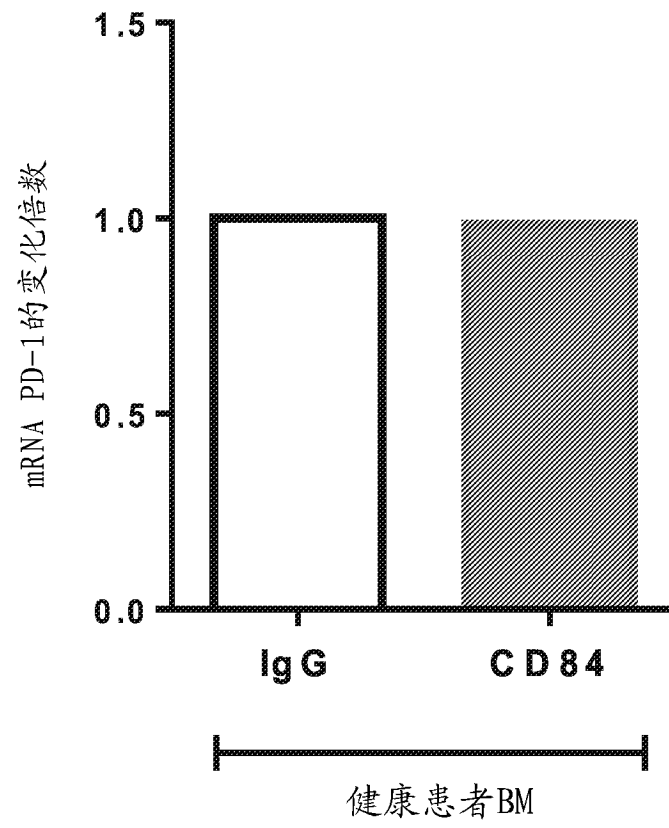


图 14A

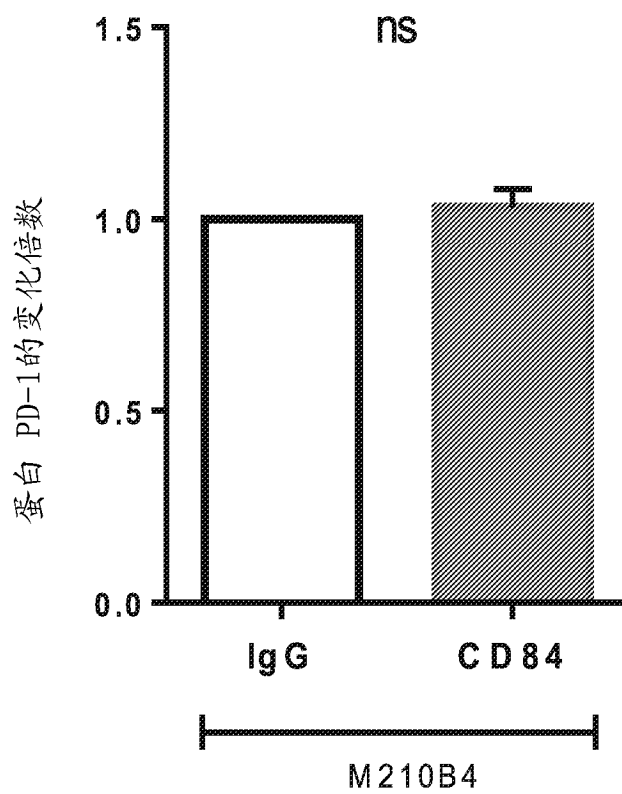


图 14B

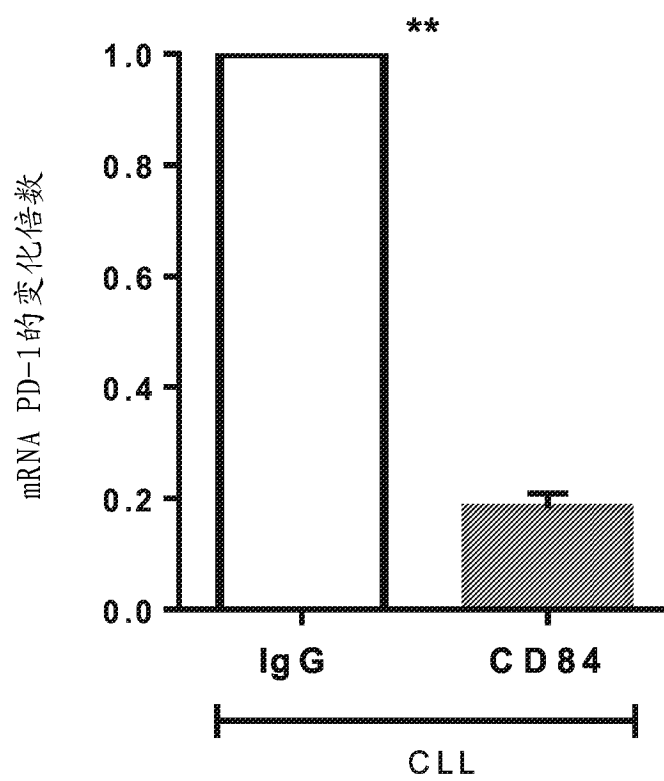


图 14C

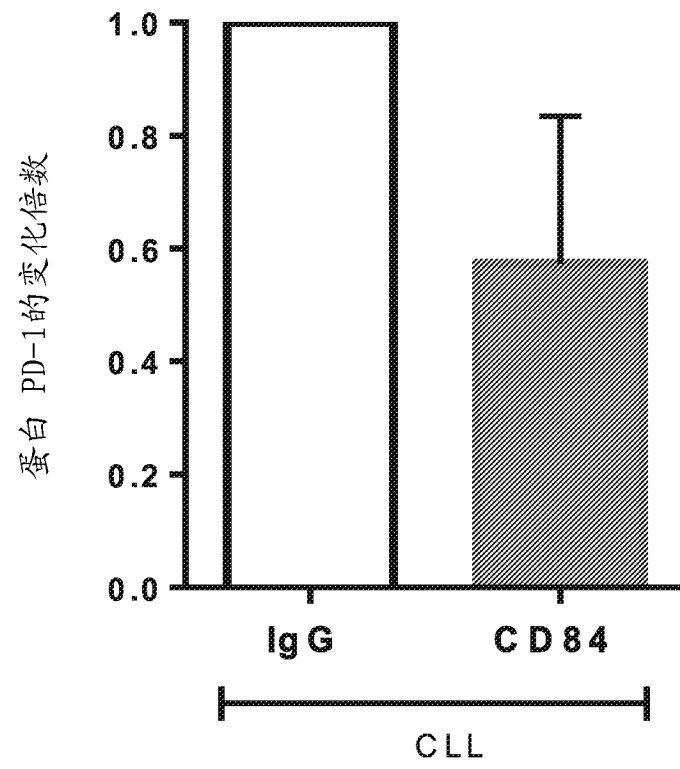


图 14D

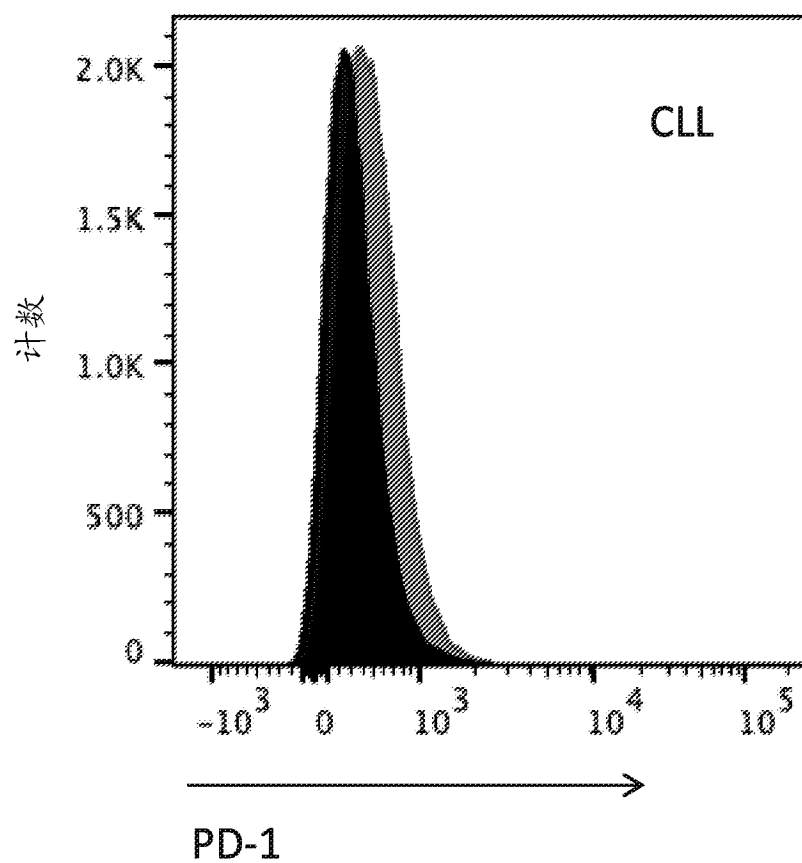


图 14E

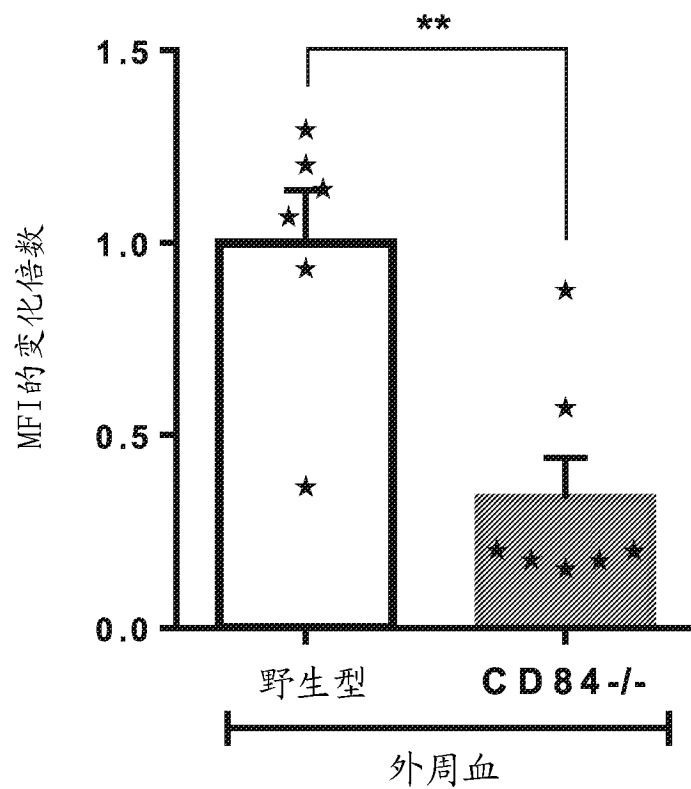


图 15A

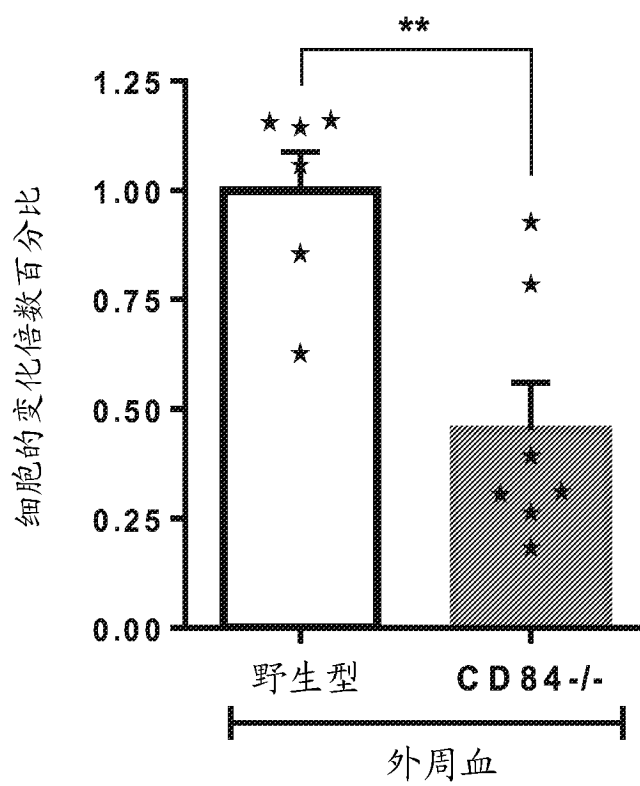


图 15B

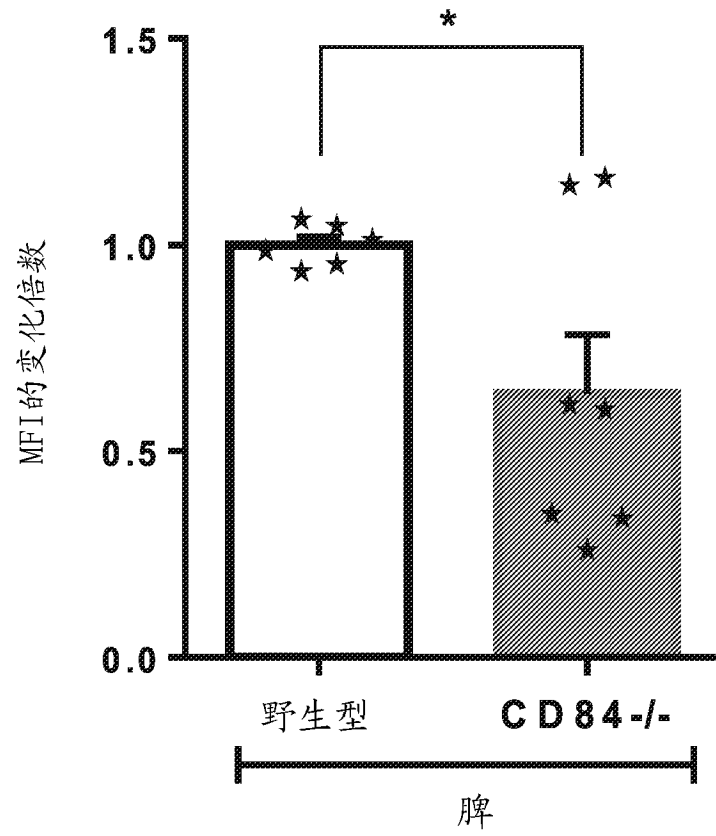


图 15C

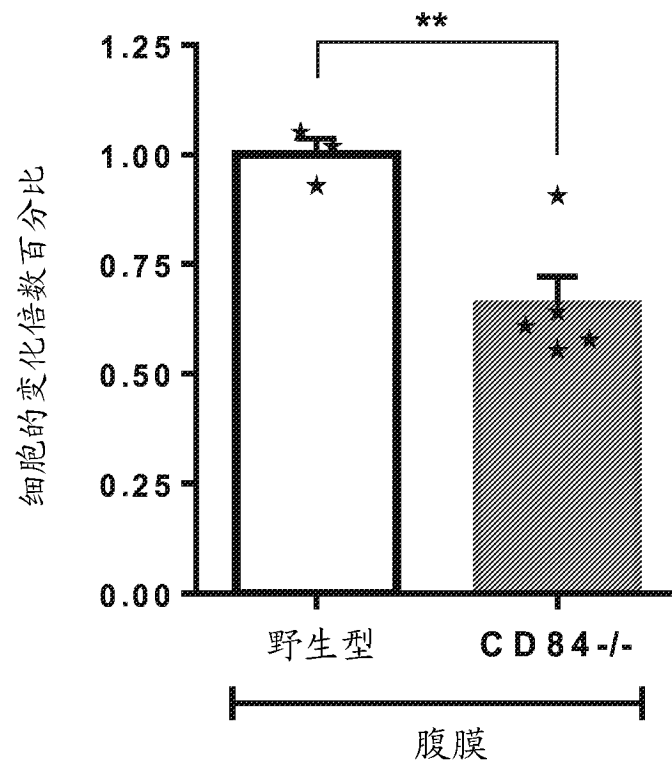


图 15F

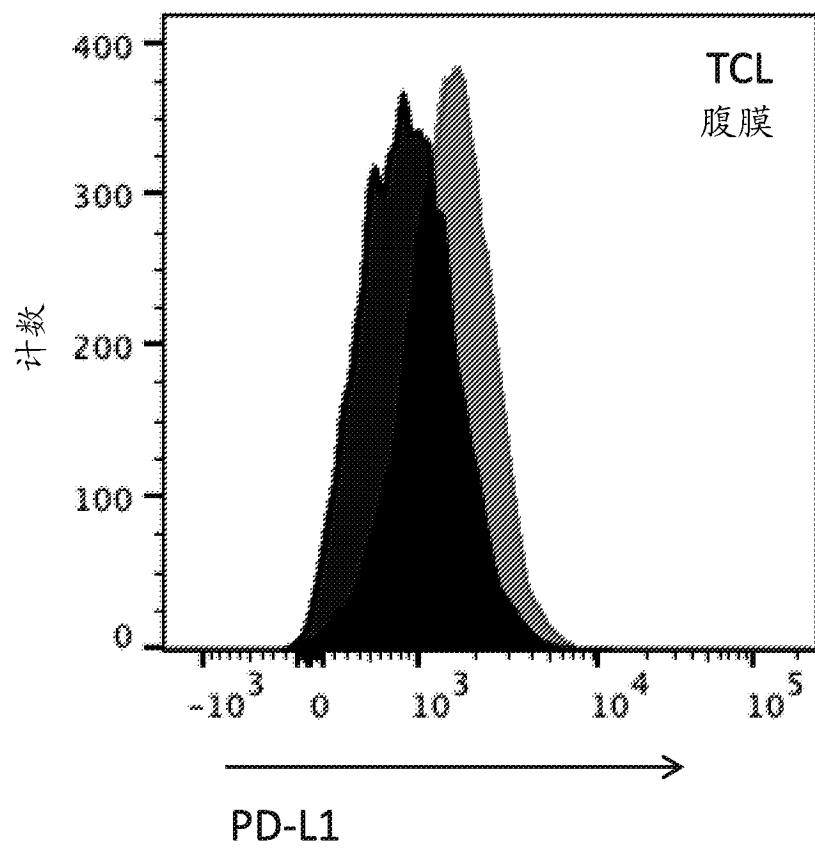


图 15G

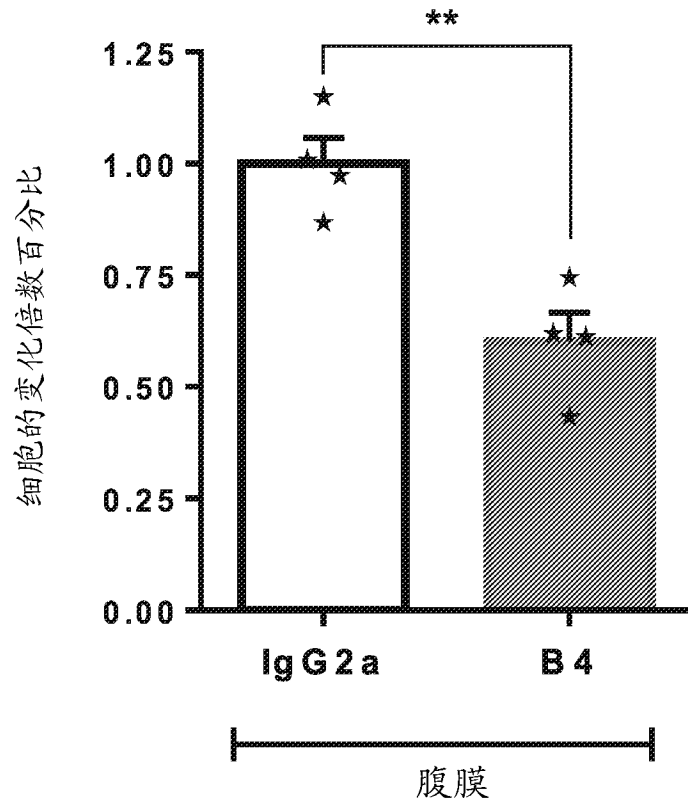


图 15H

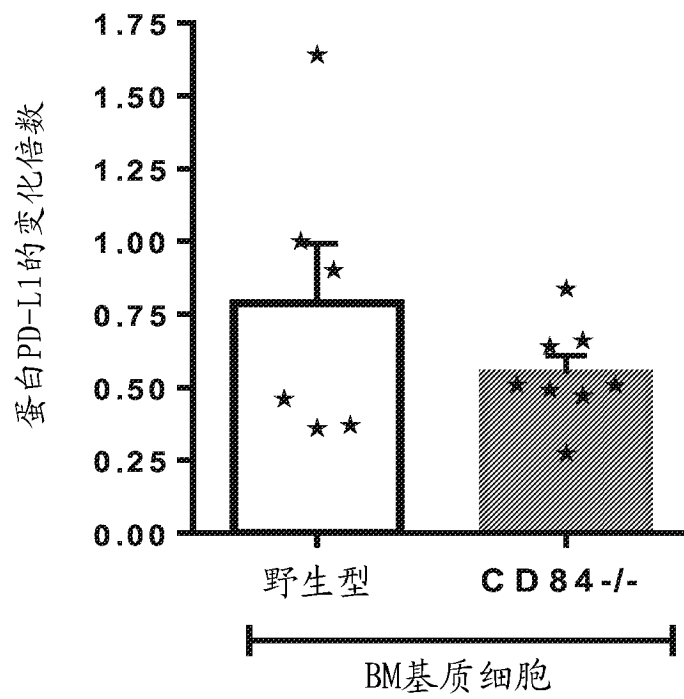


图 15I

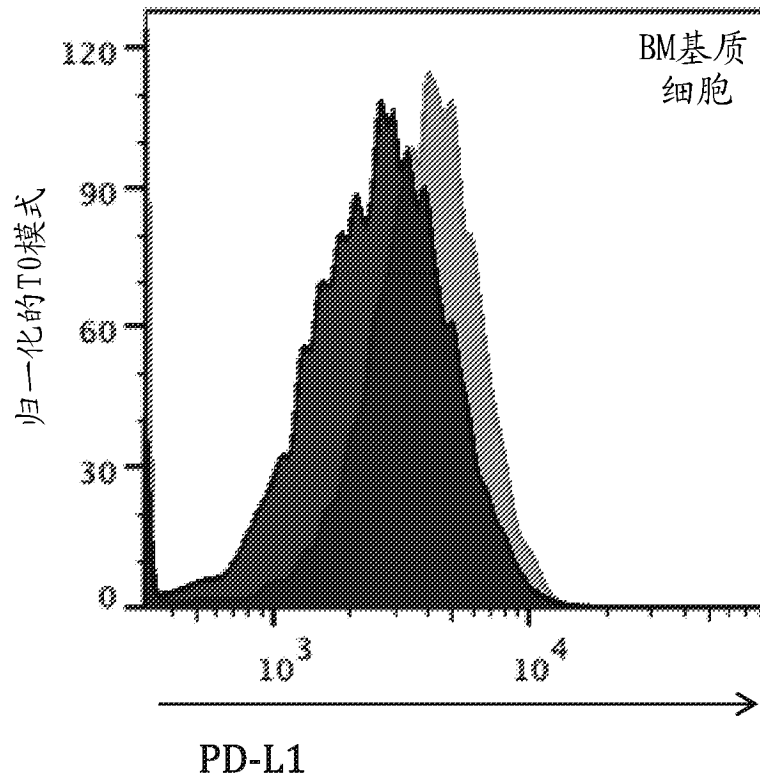


图 15J

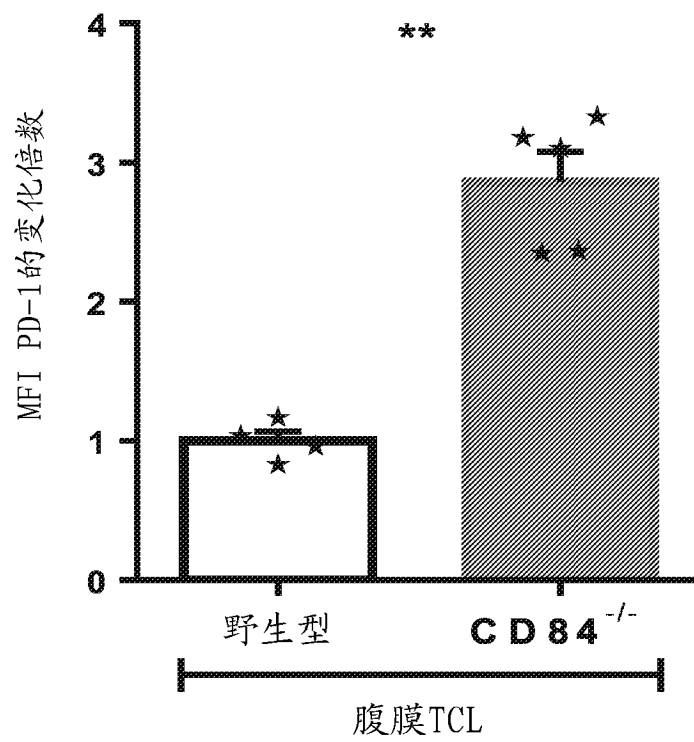


图 16A

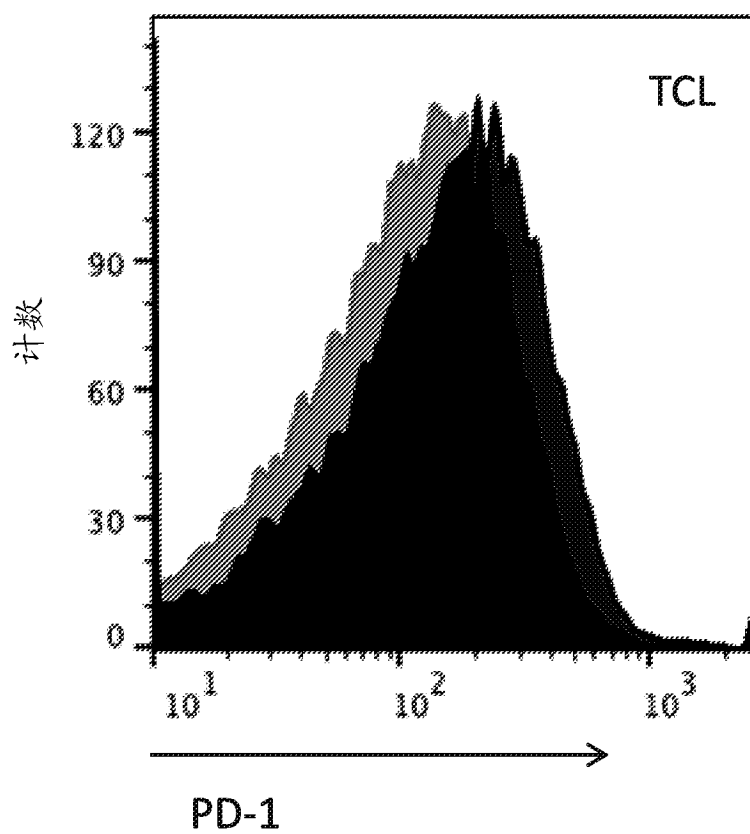


图 16B

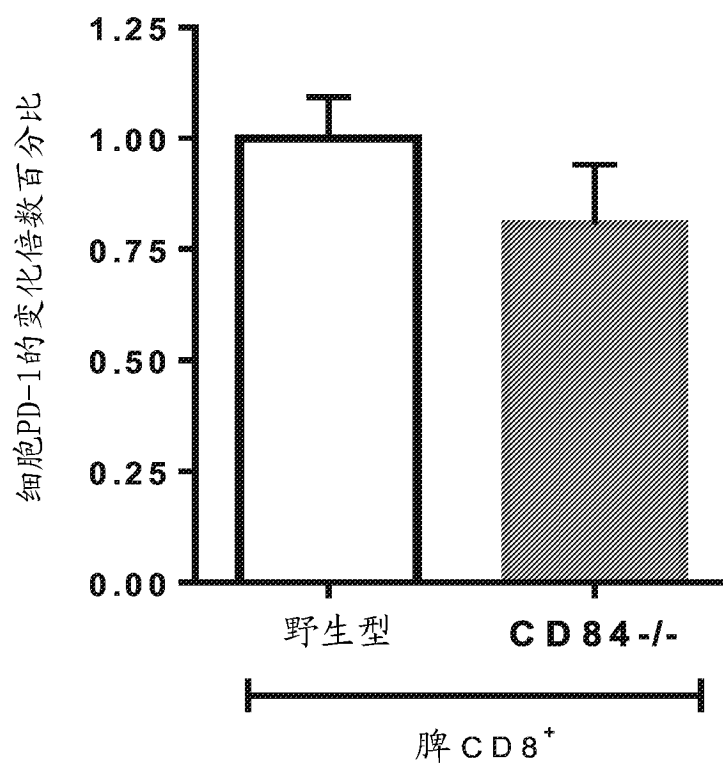


图 17A

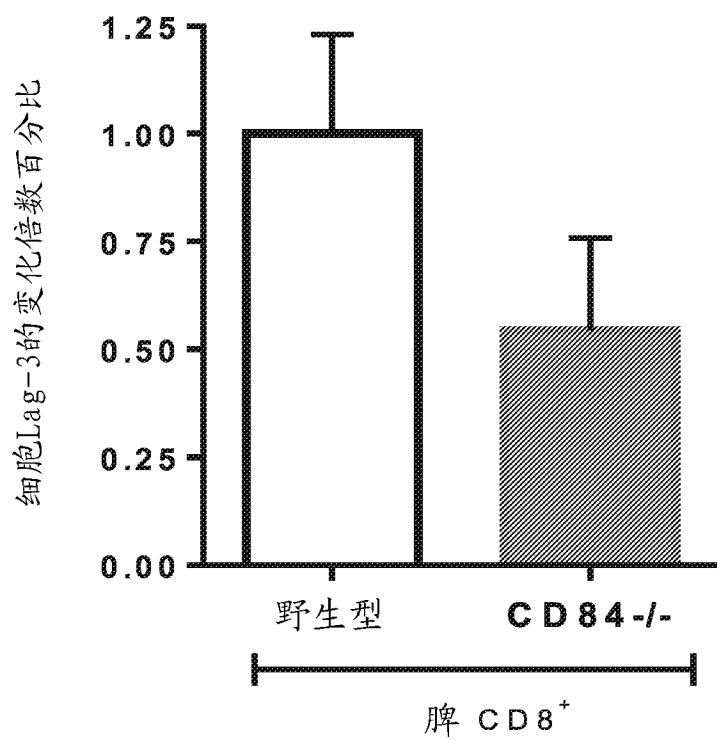


图 17B

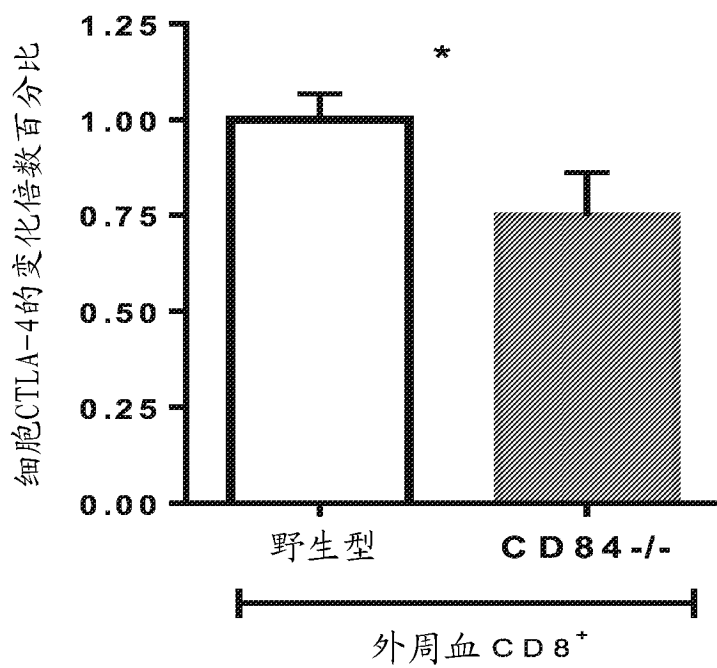


图 17C

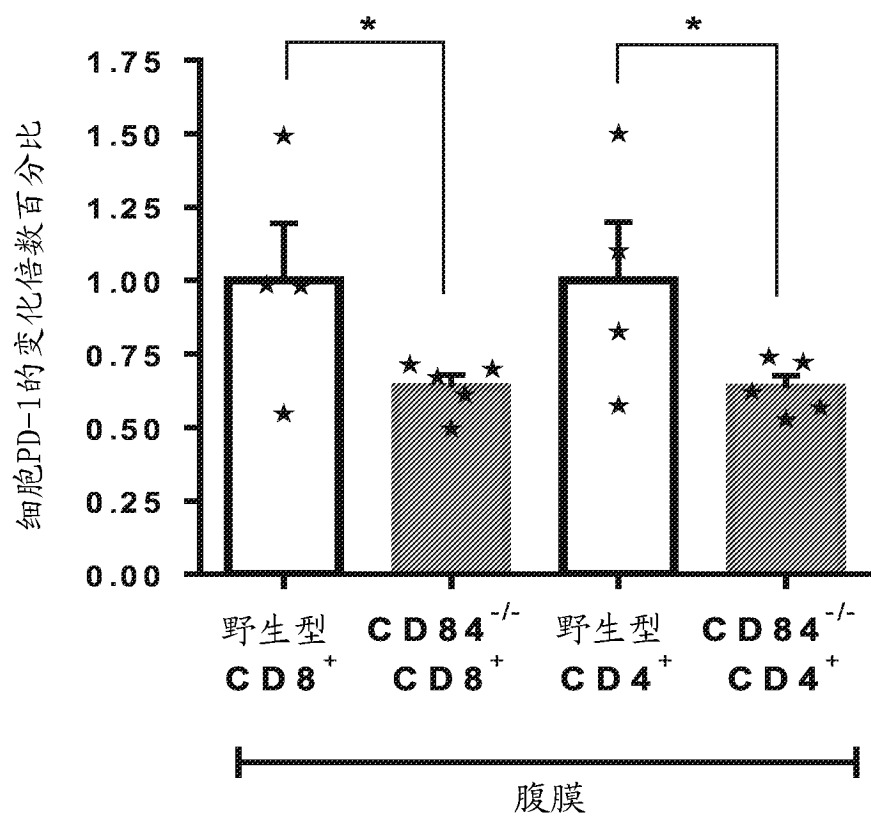


图 17D

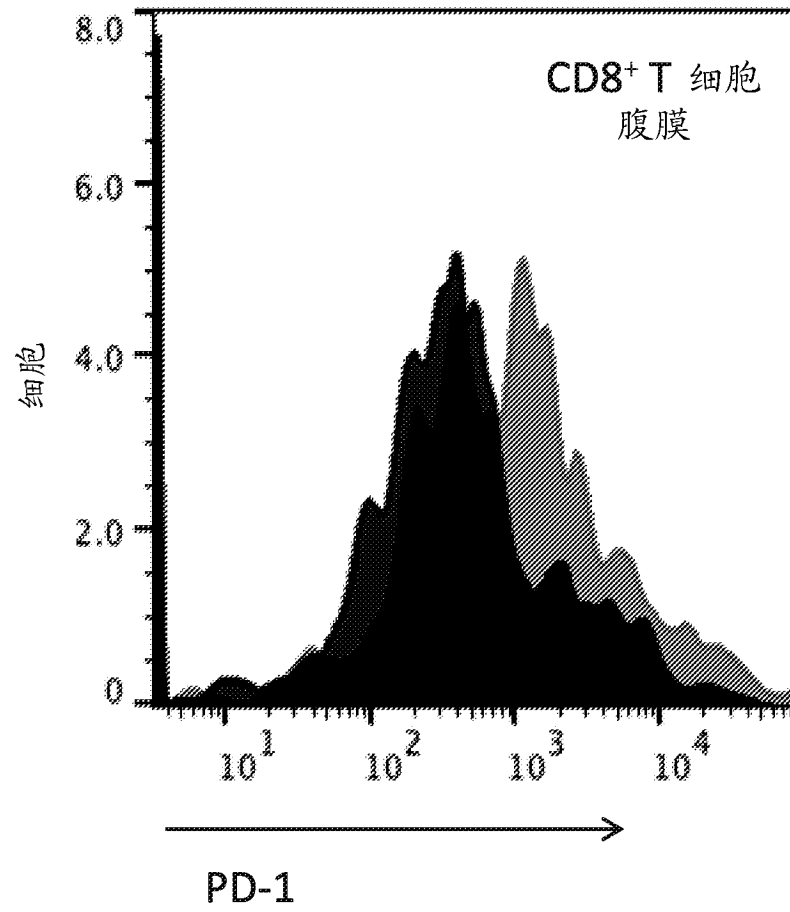


图 17E

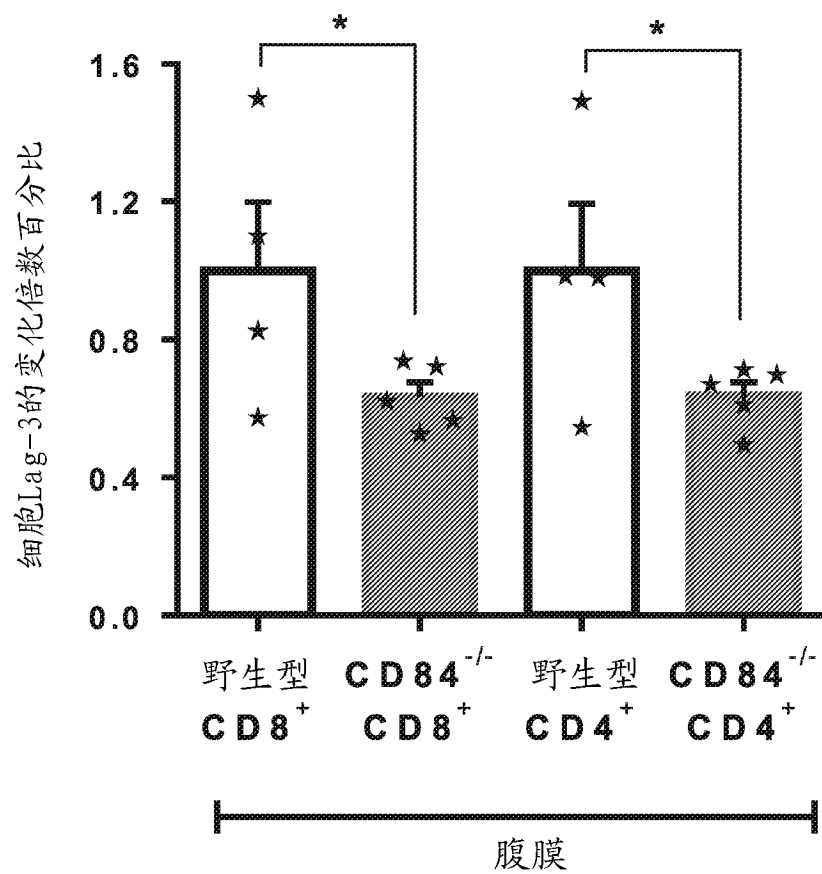


图 17F

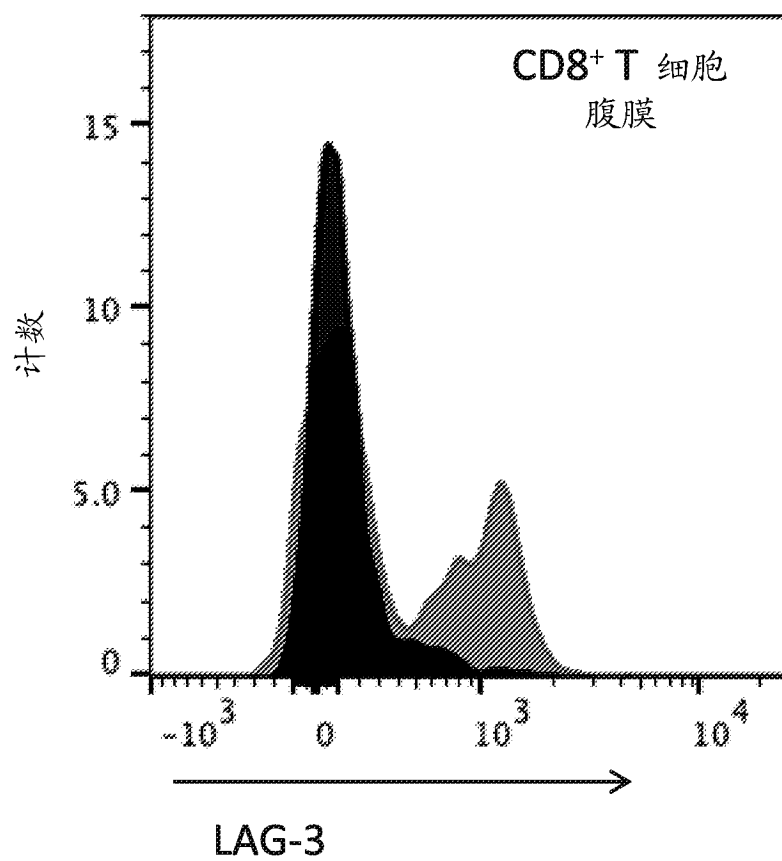


图 17G

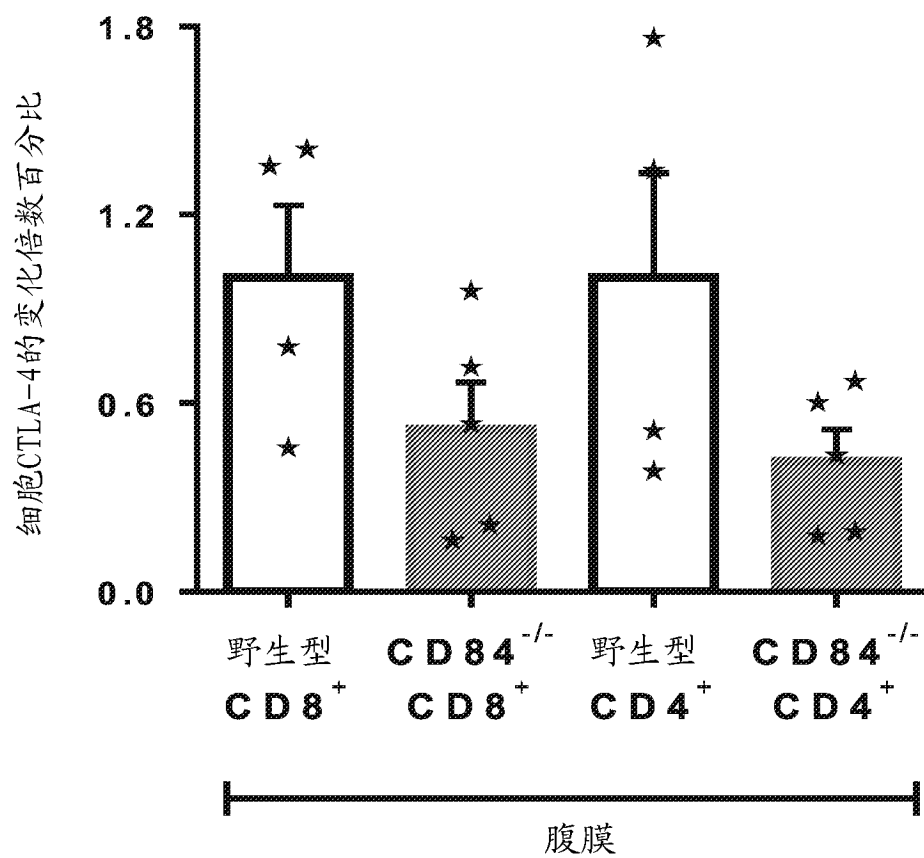


图 17H

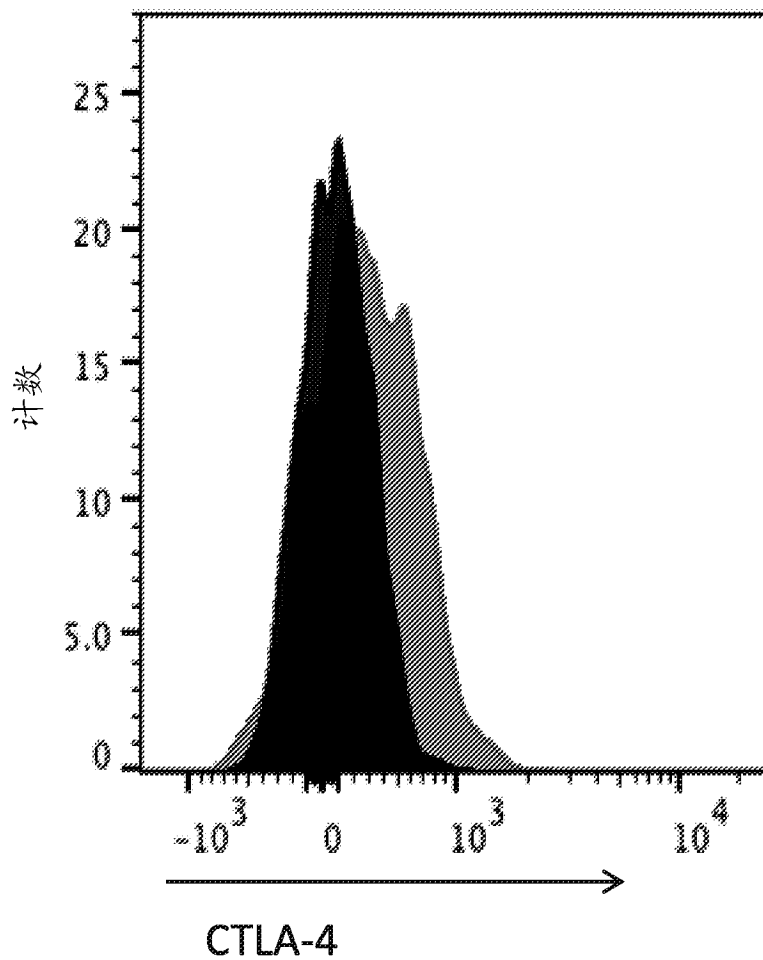


图 17I

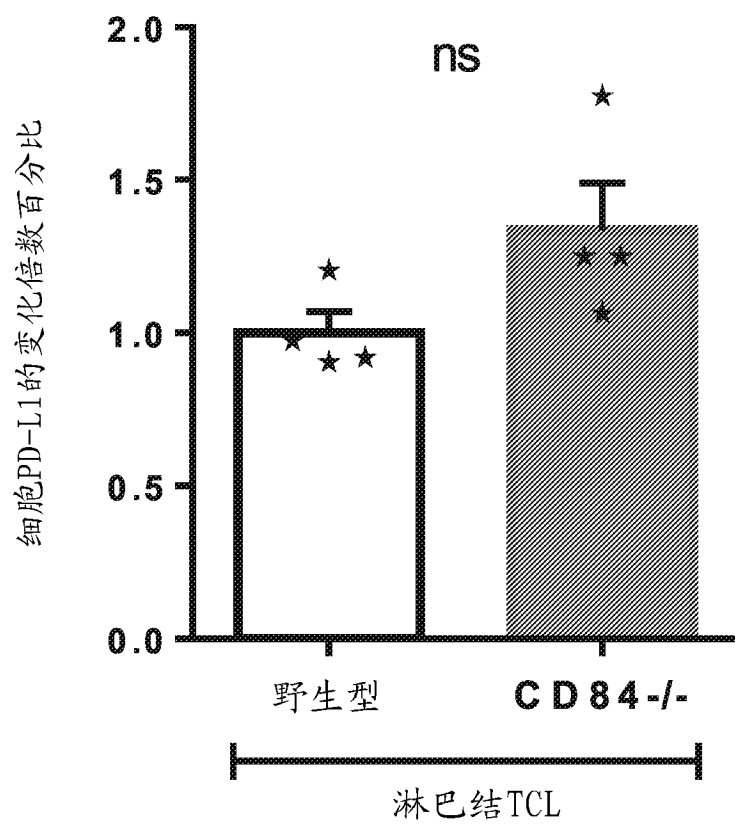


图 17J

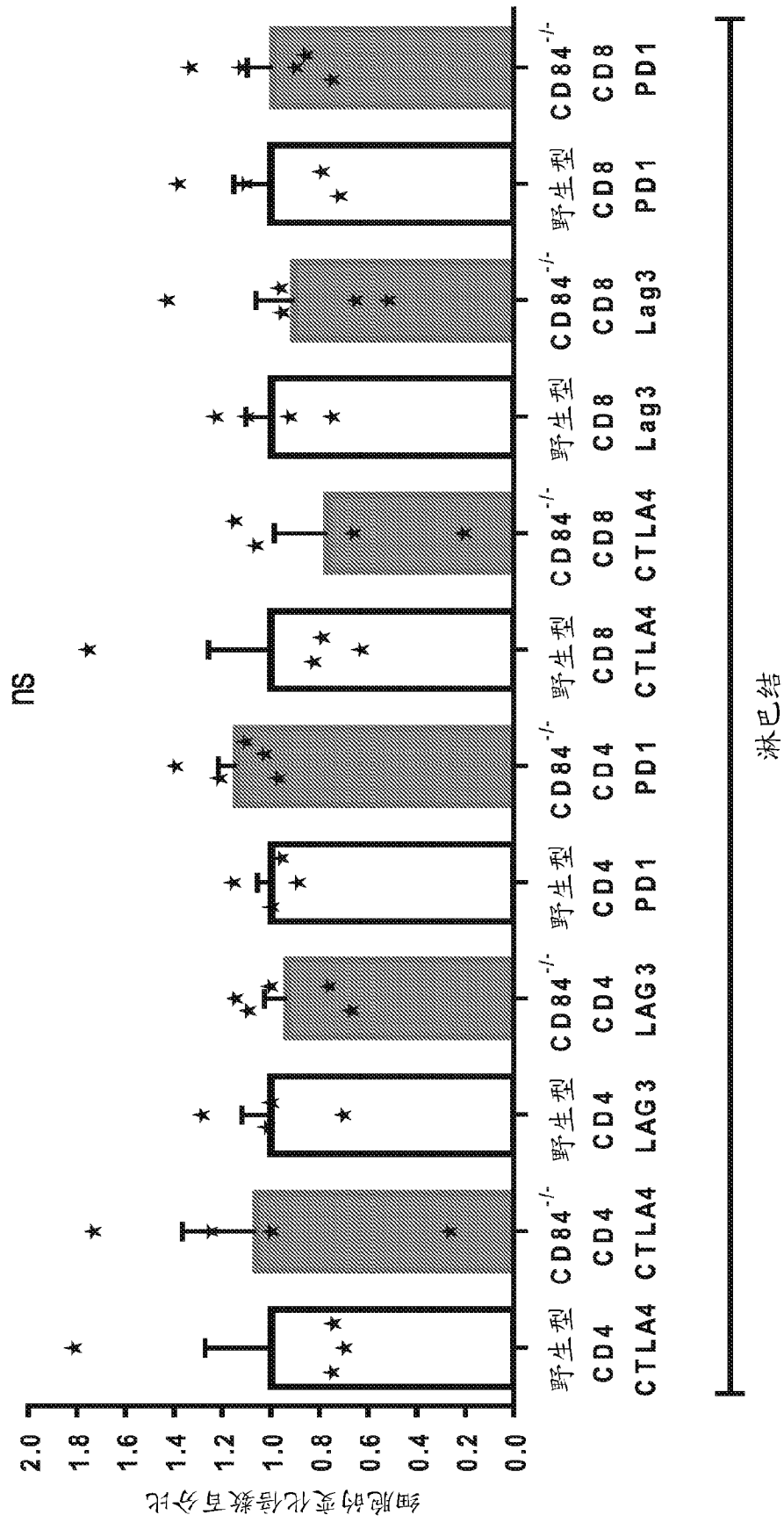


图 17K

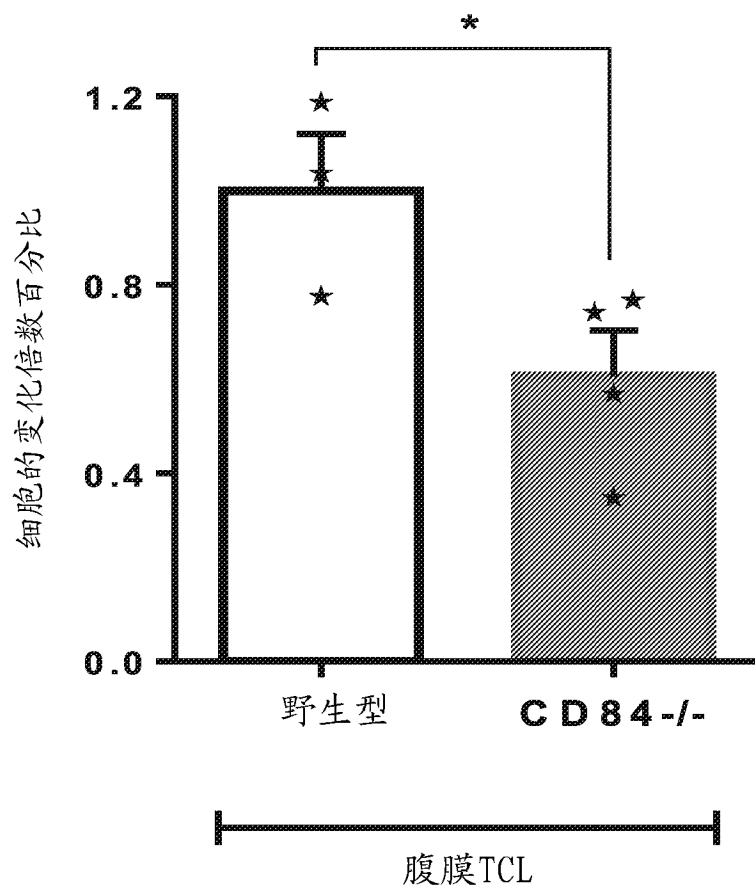


图 18A

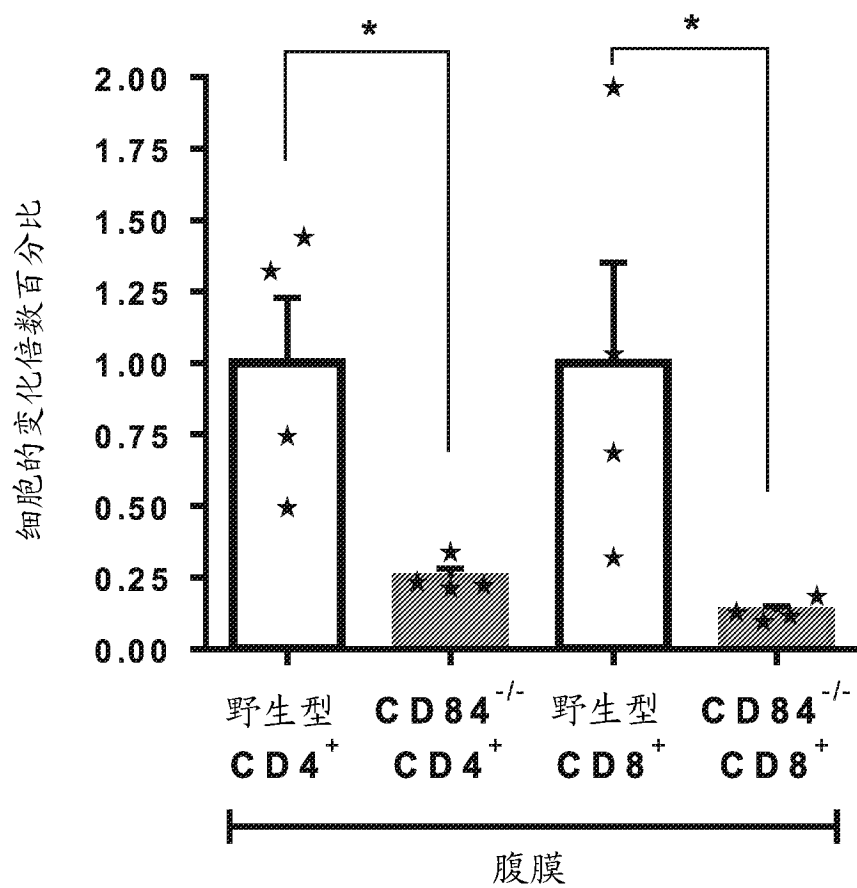


图 18B

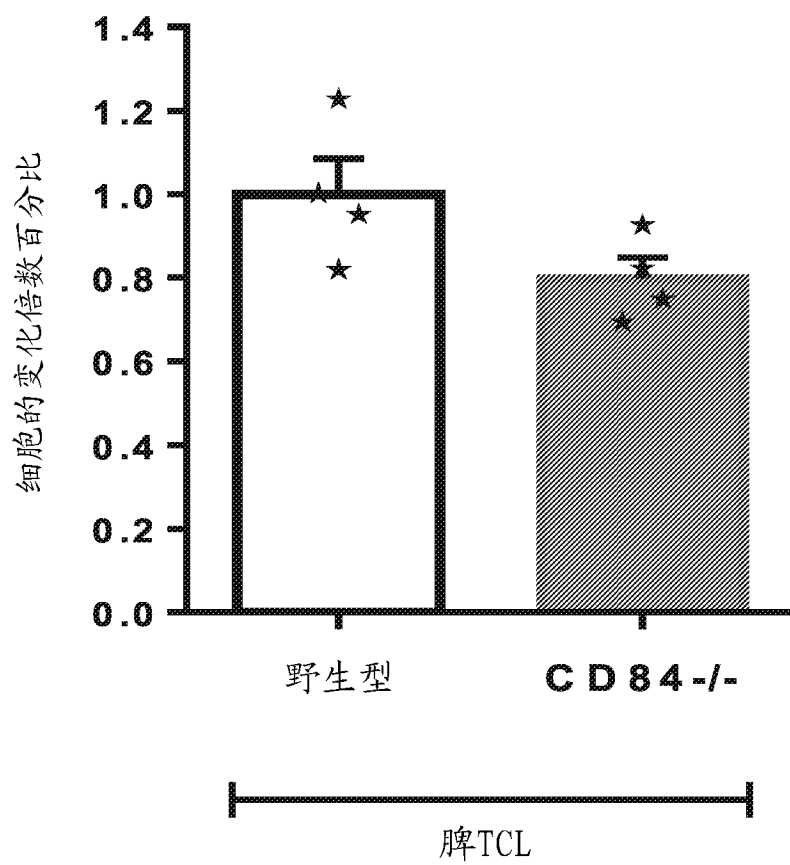


图 18C

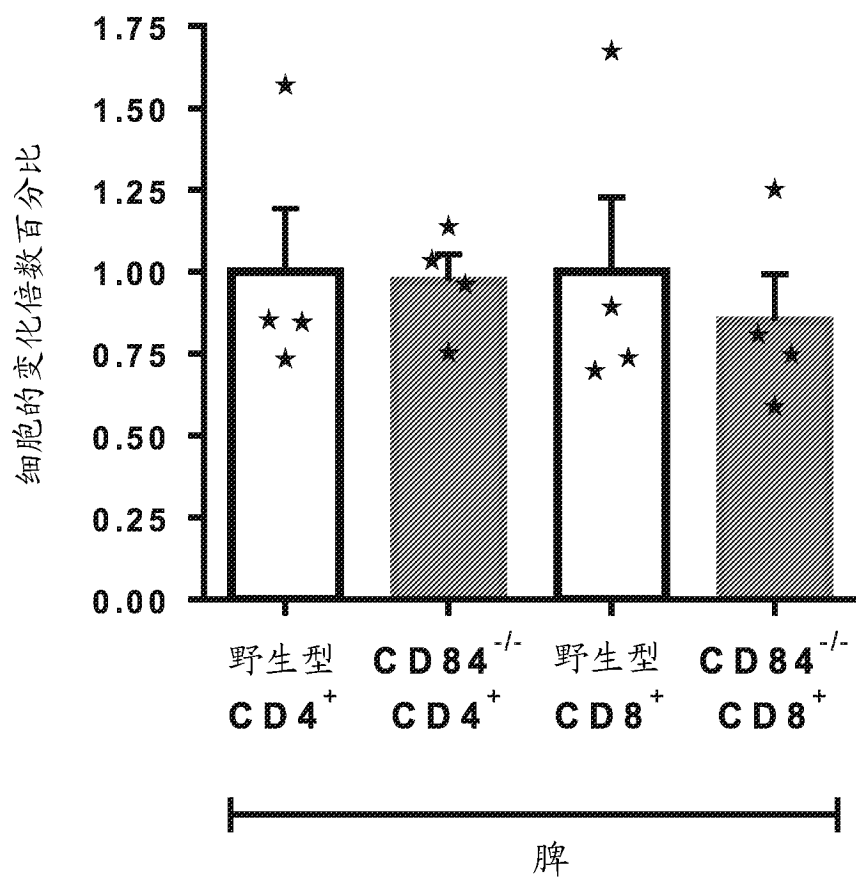


图 18D

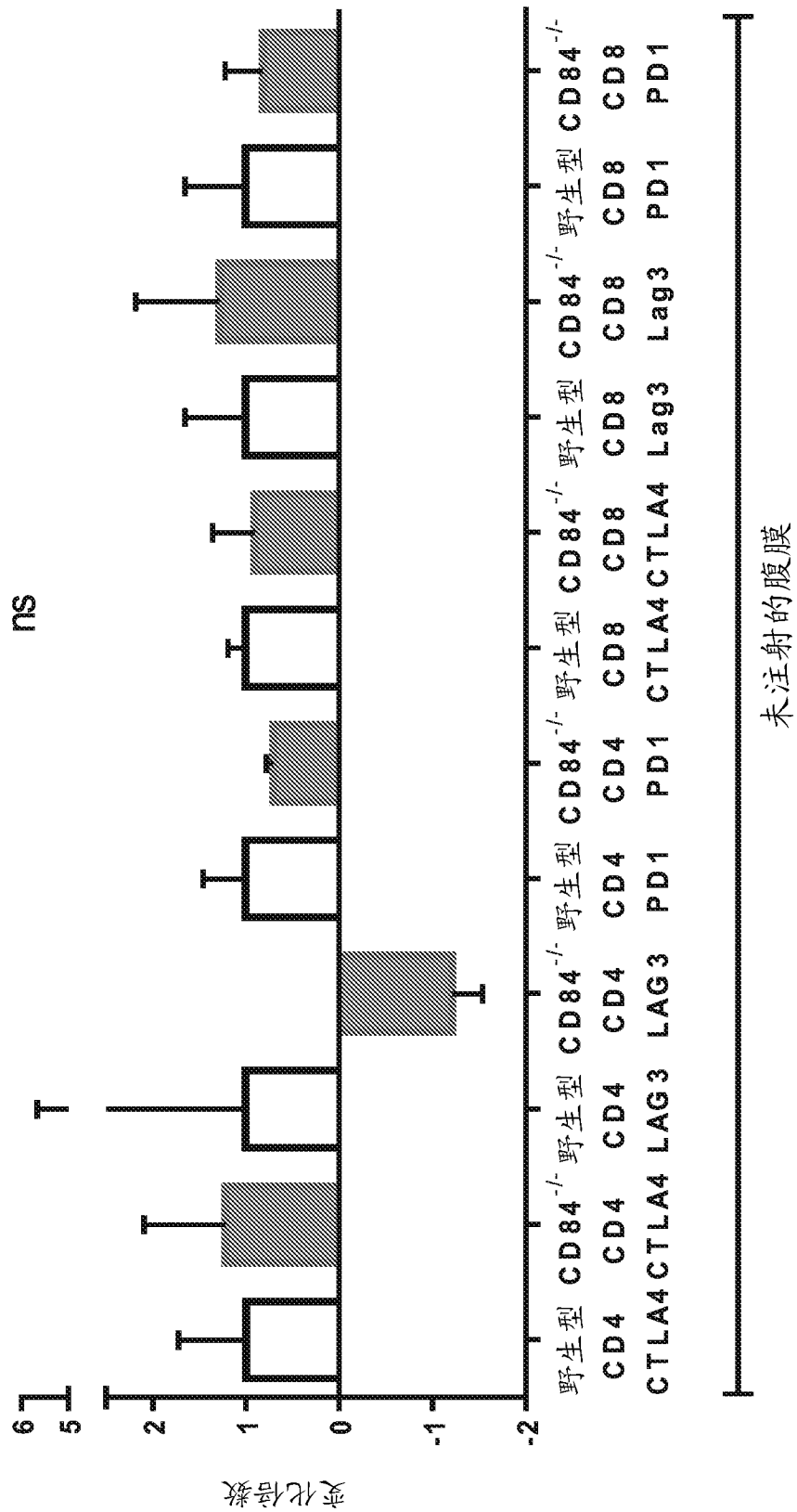


图 18E

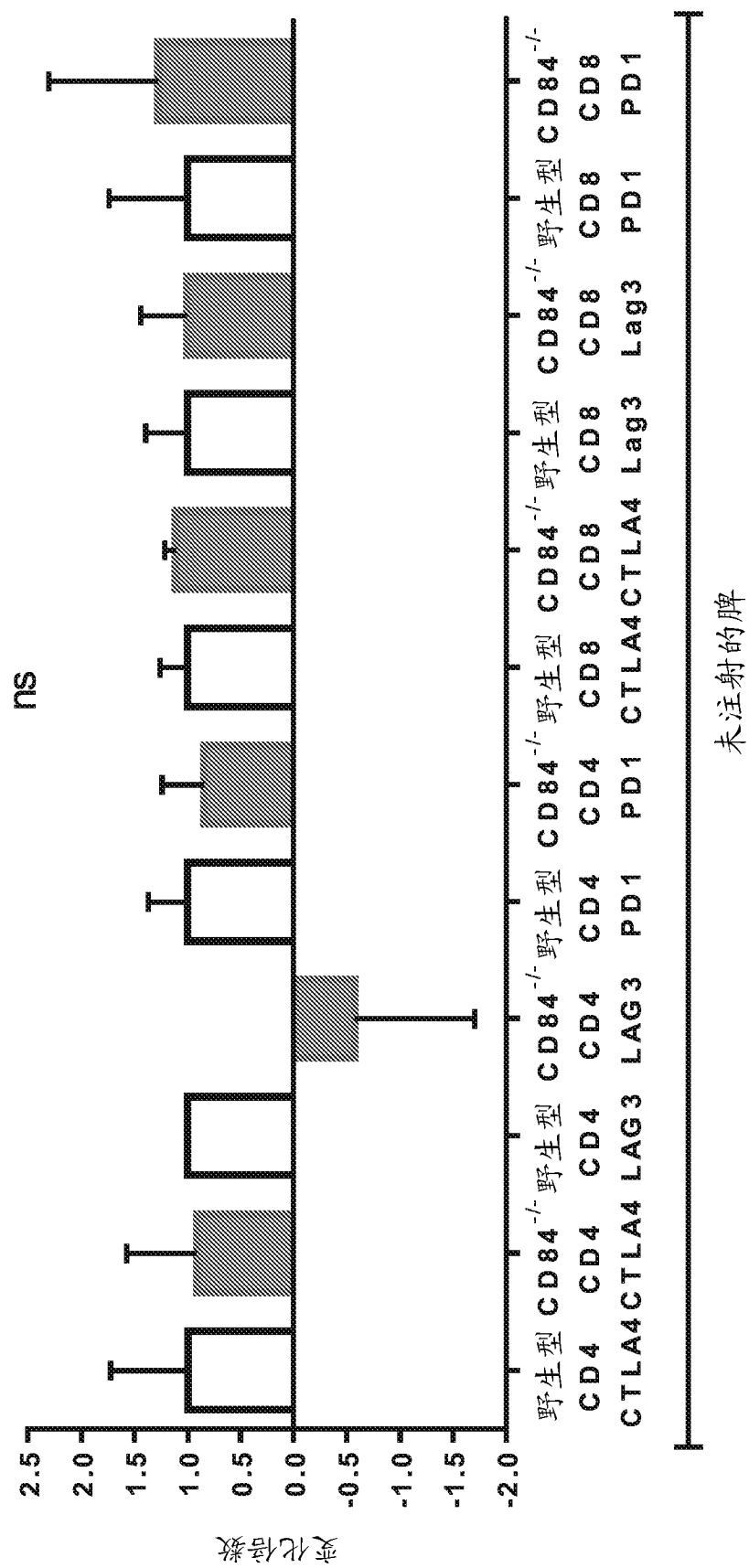


图 18F

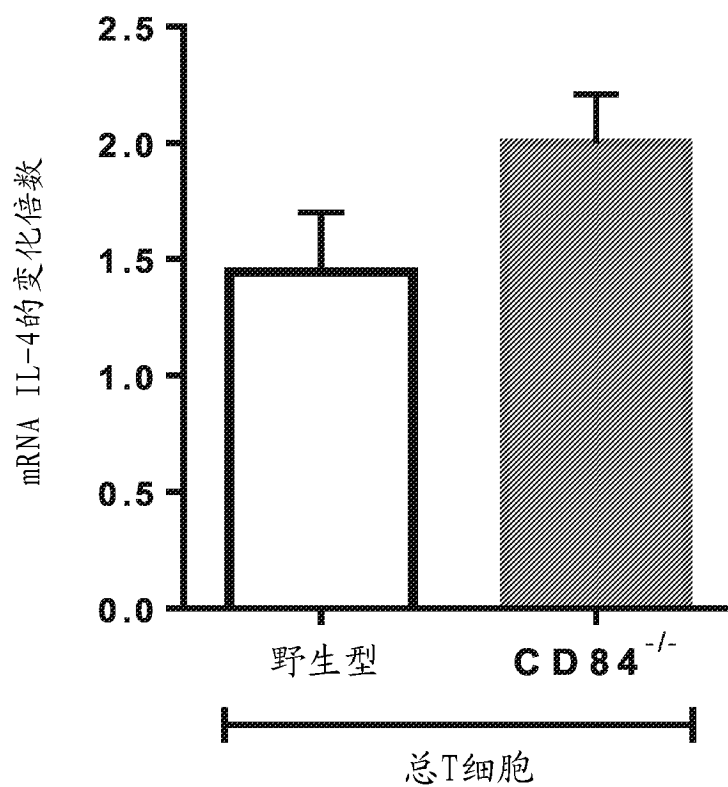


图 19A

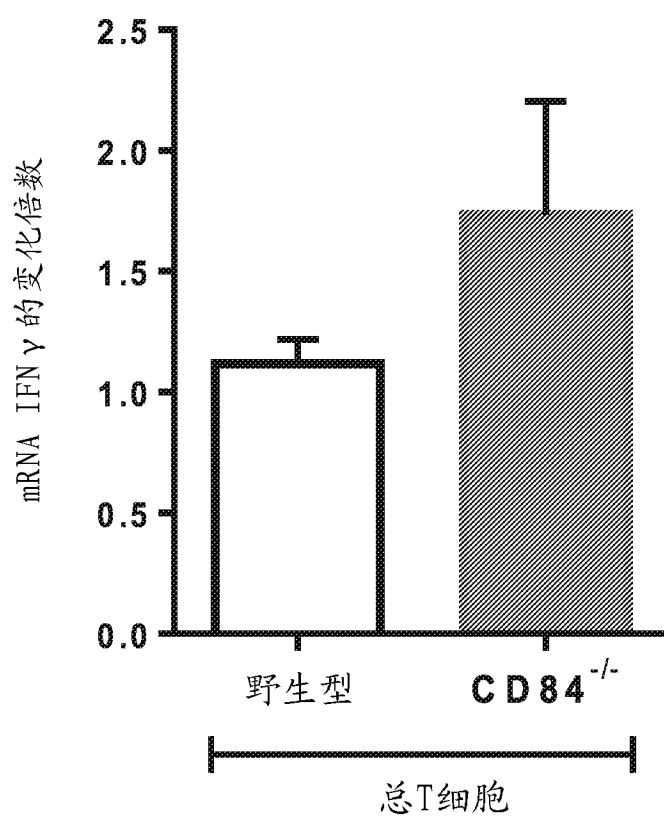


图 19B

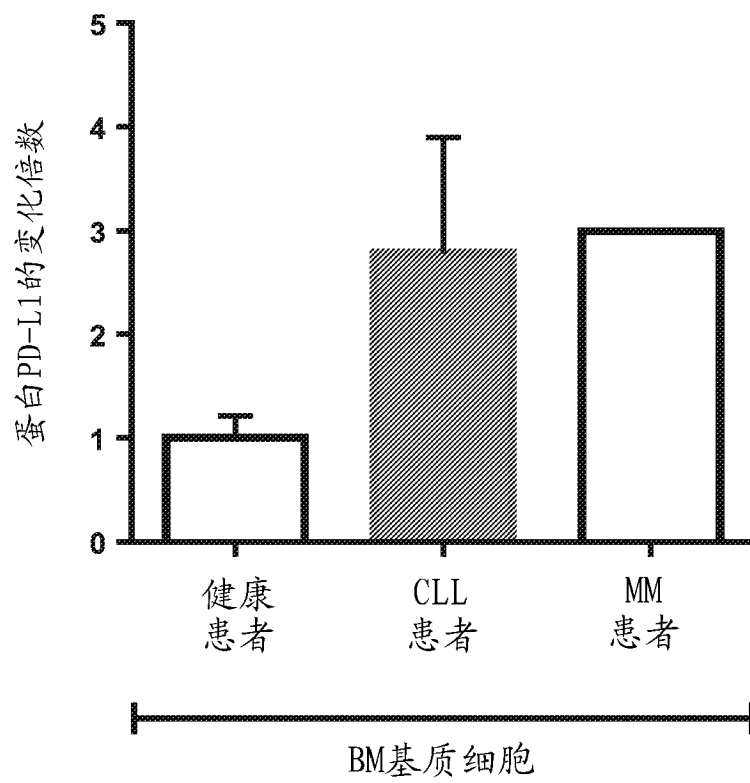


图 20A

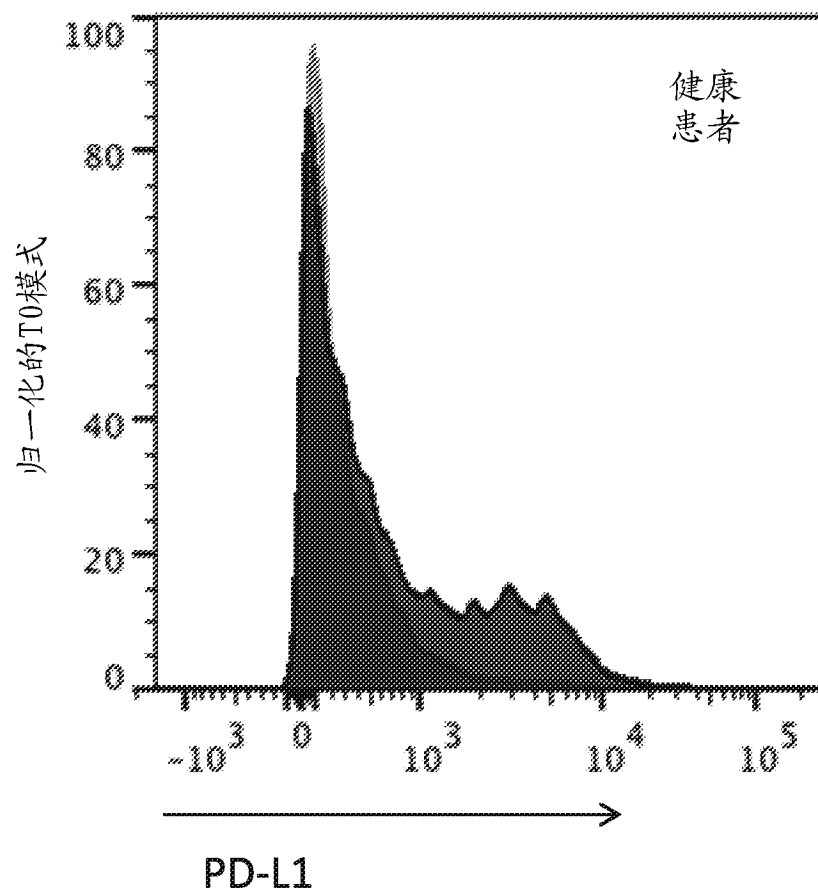


图 20B

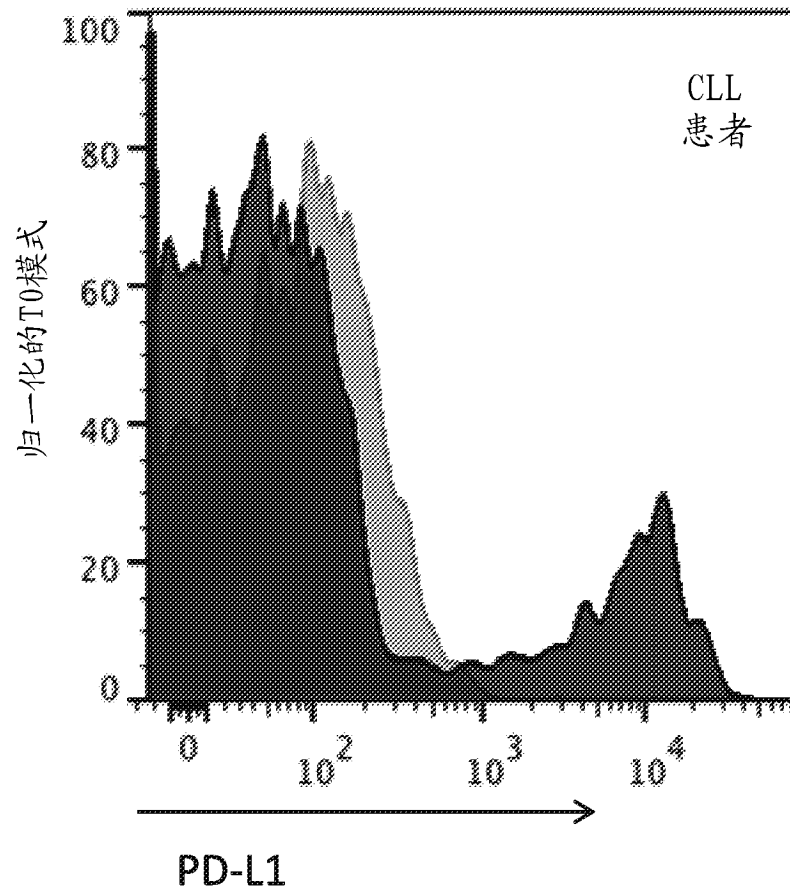


图 20C

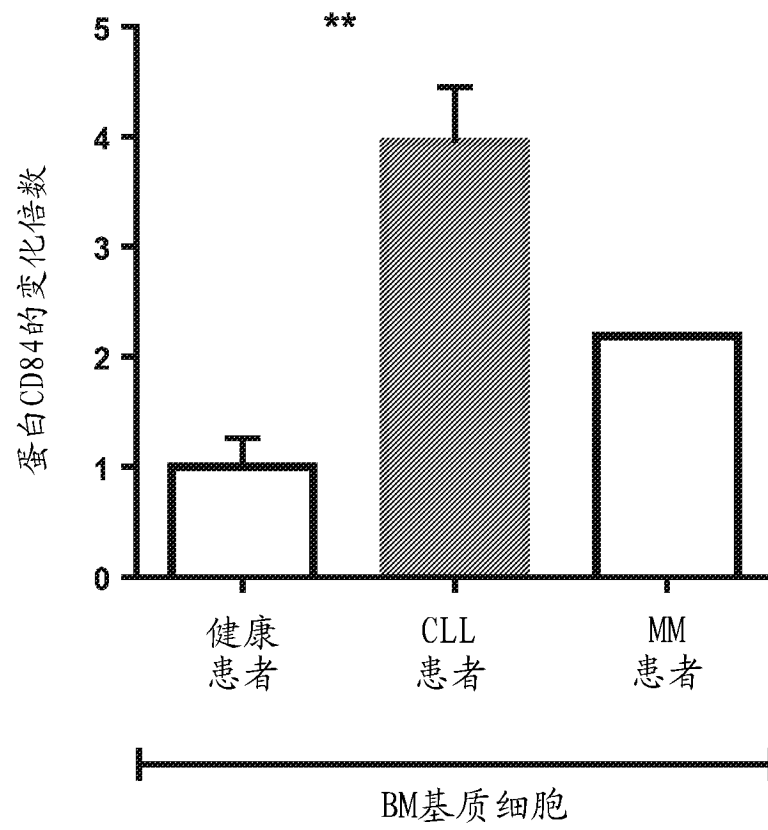


图 20D

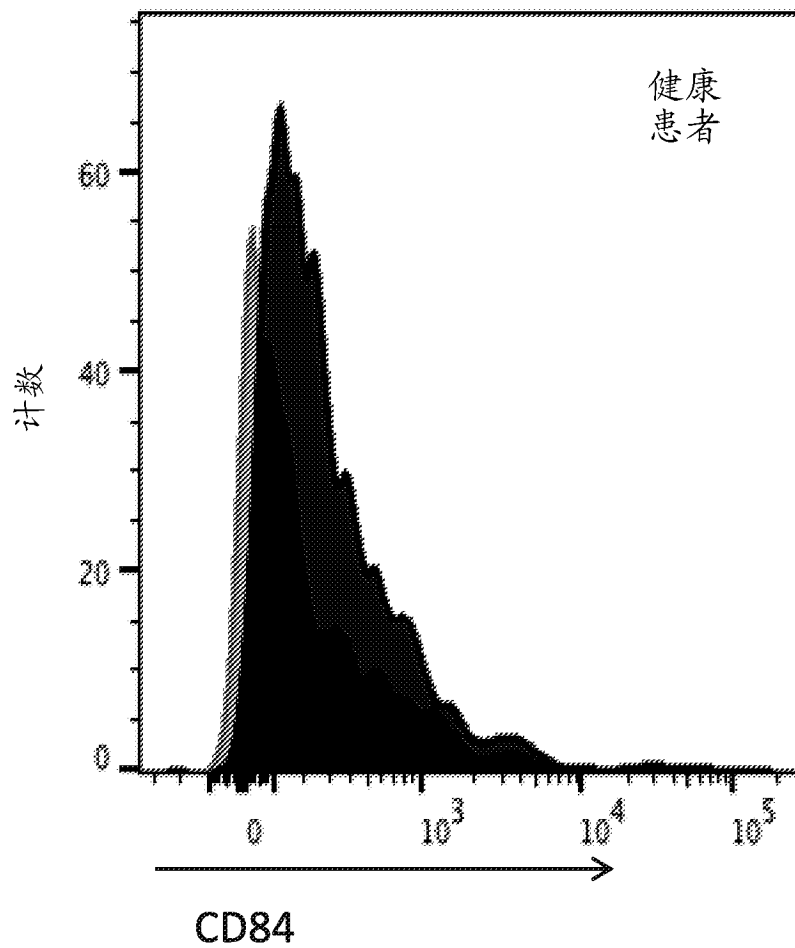


图 20E

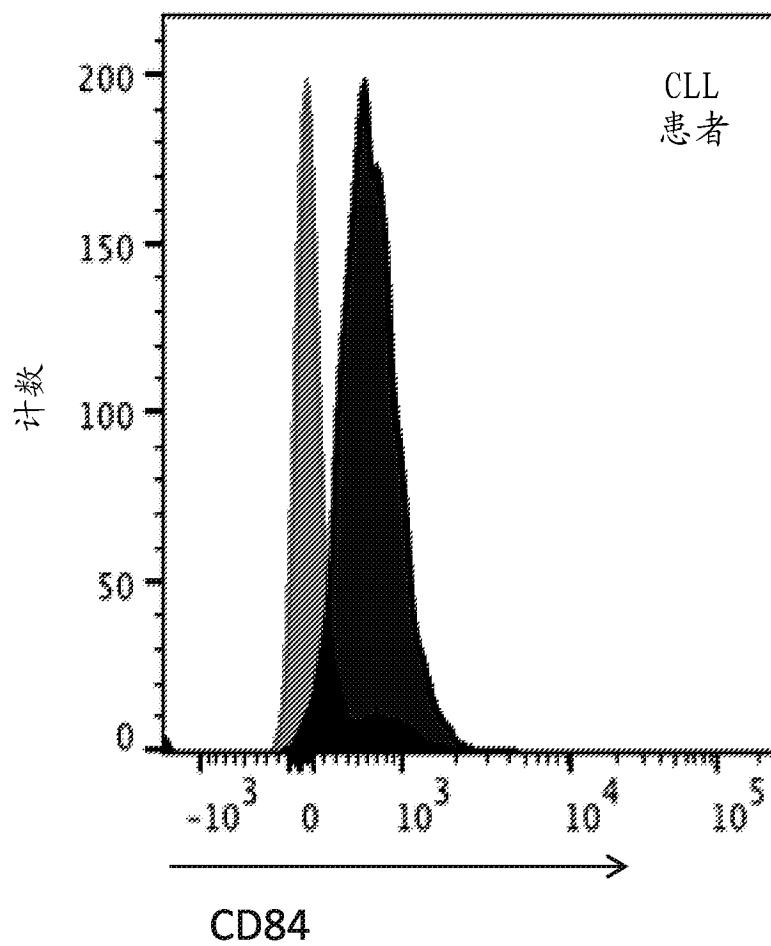


图 20F

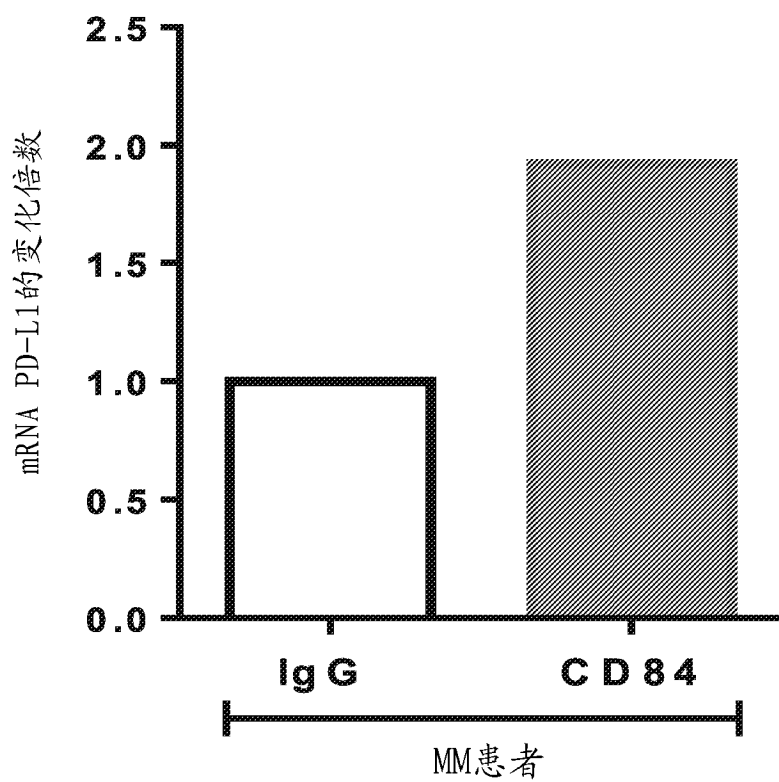


图 21A

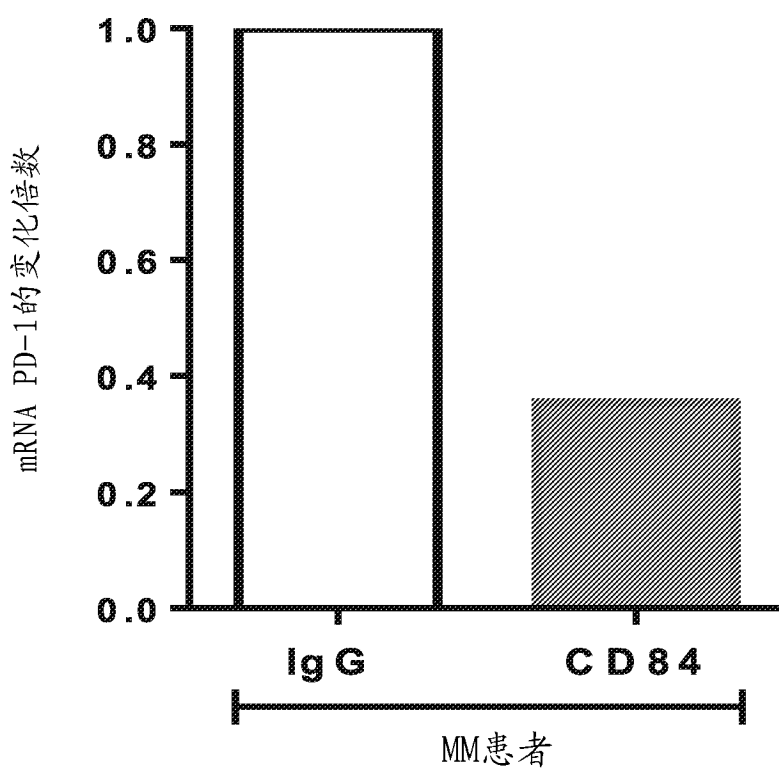


图 21B

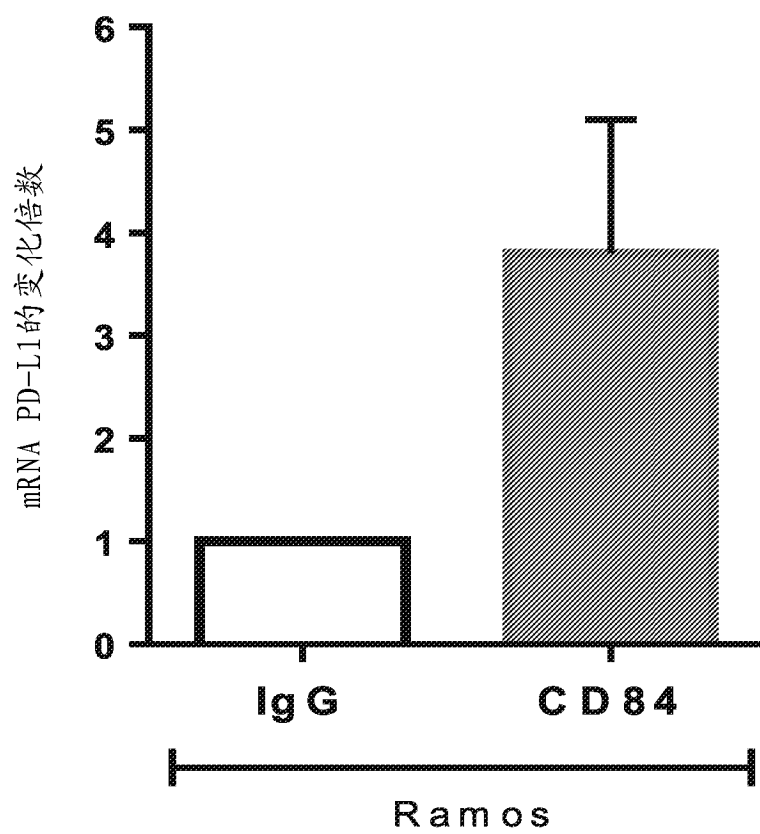


图 22A

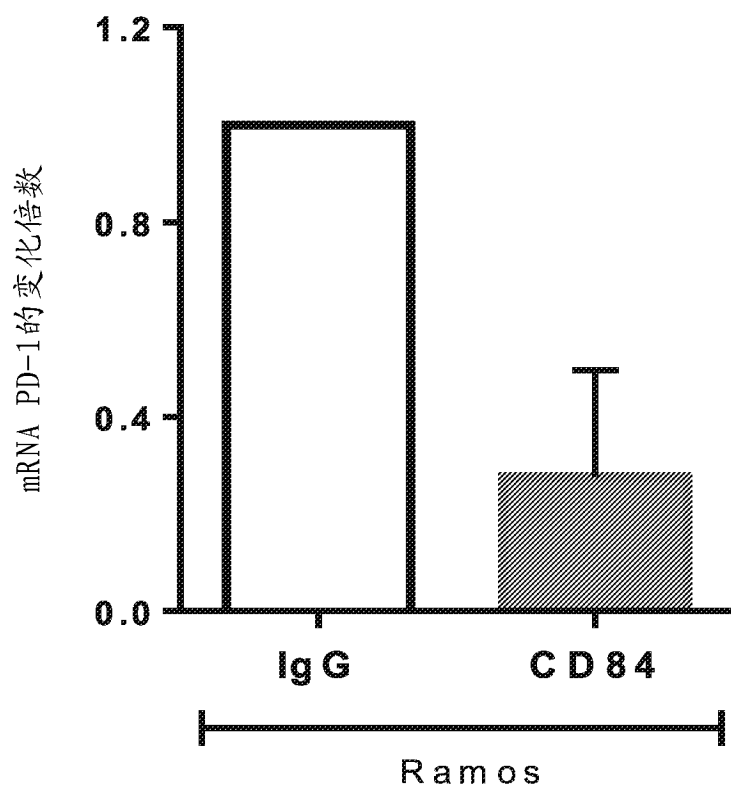


图 22B

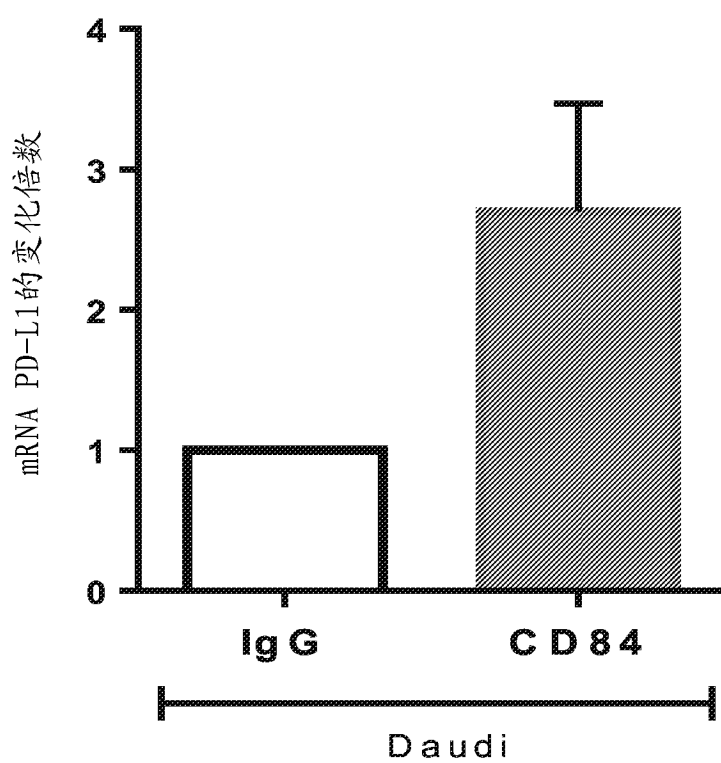


图 22C

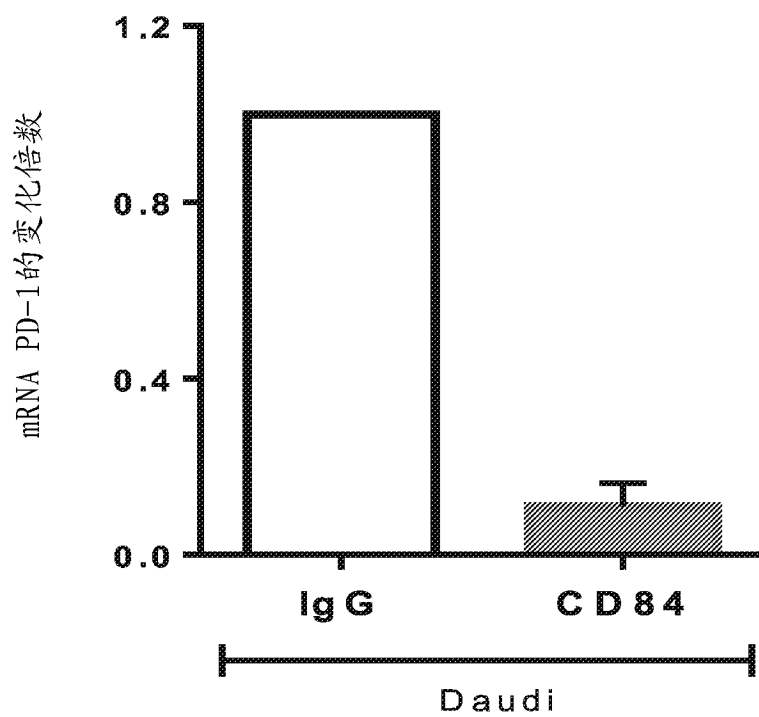


图 22D

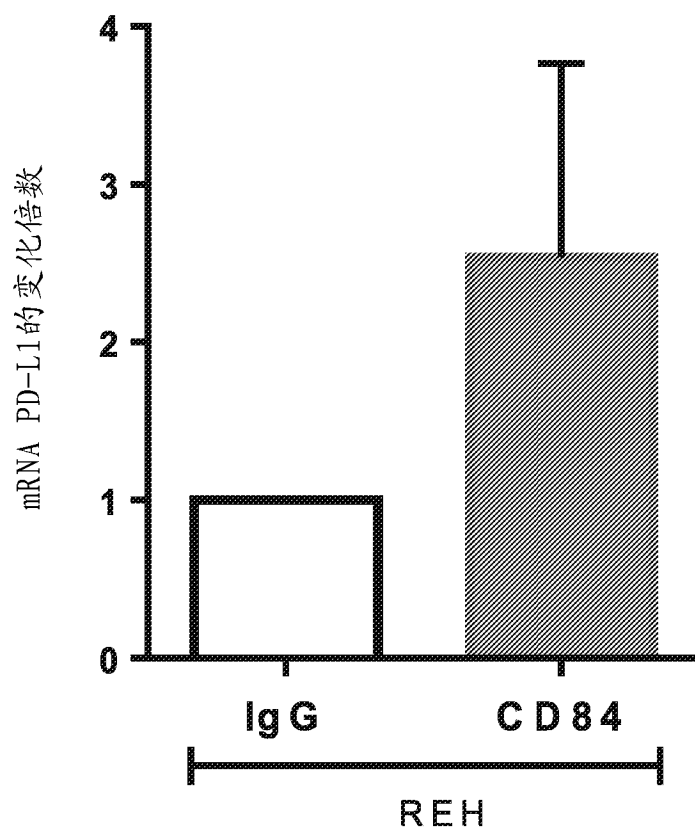


图 22E

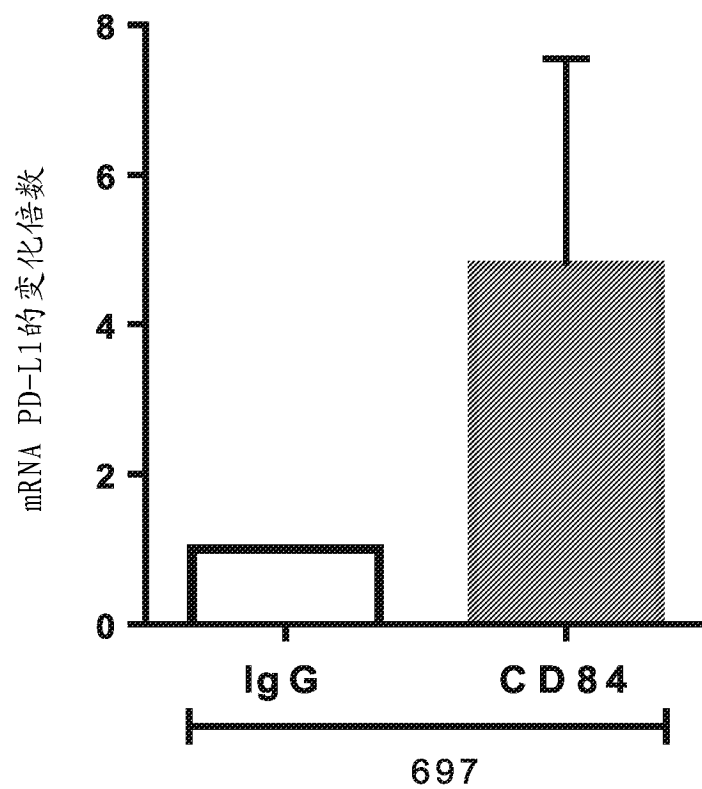


图 22F

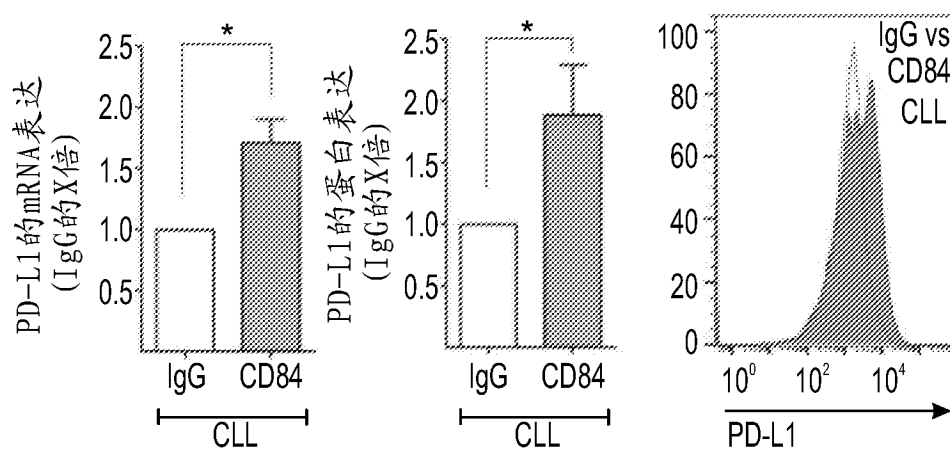


图 23A

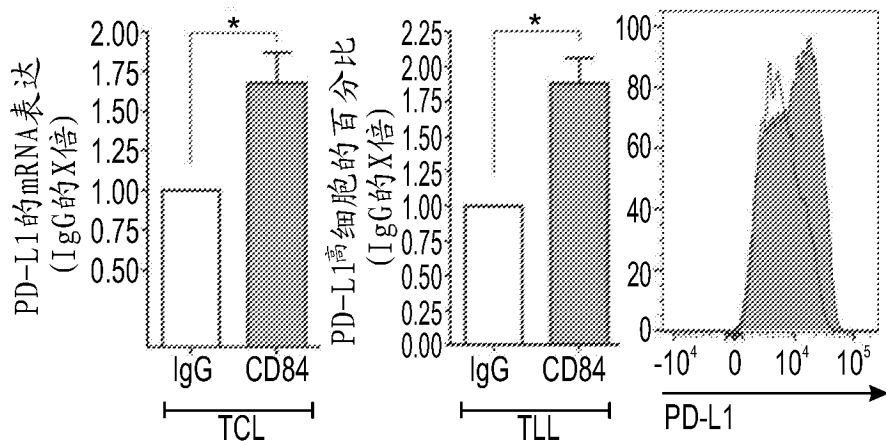


图 23B

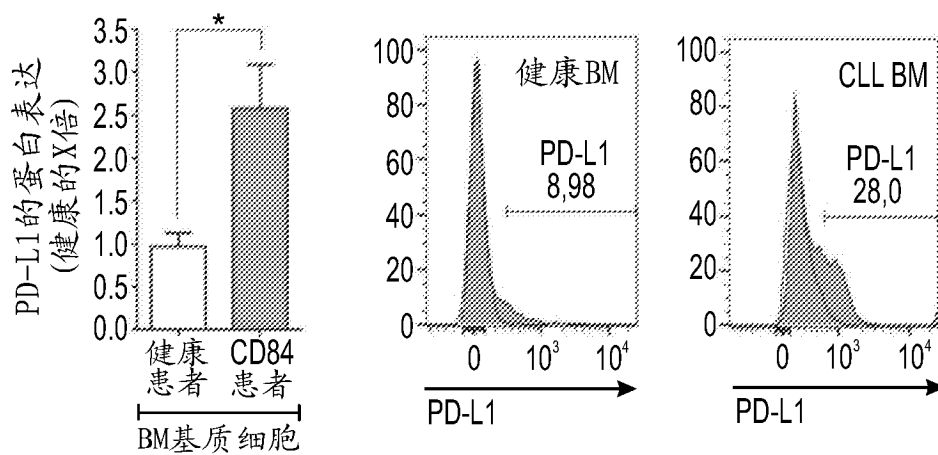


图 23C

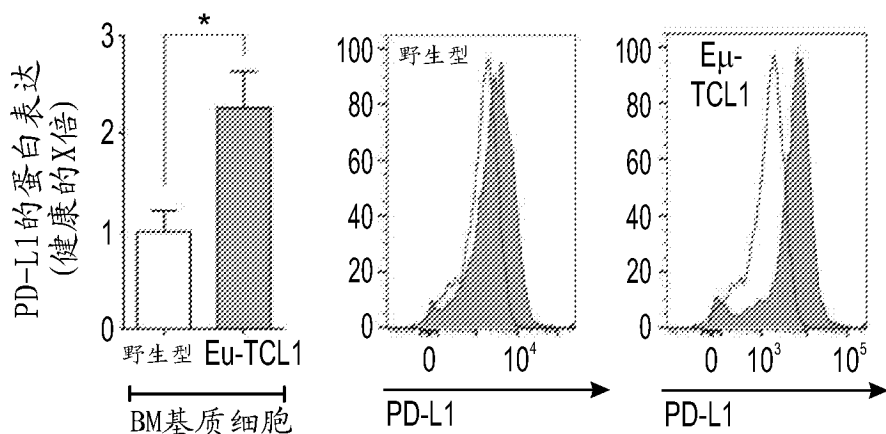


图 23D

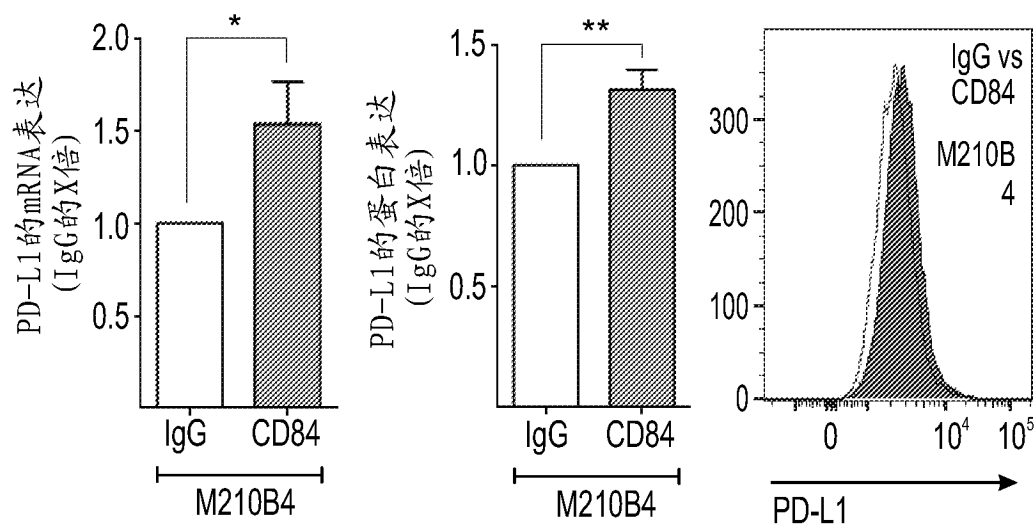


图 23E

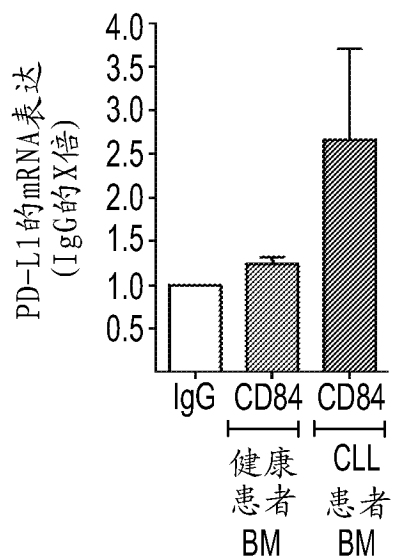


图 23F

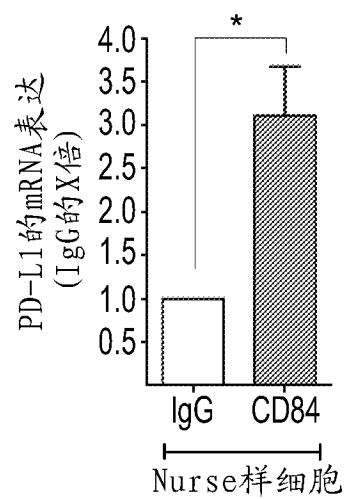


图 23G

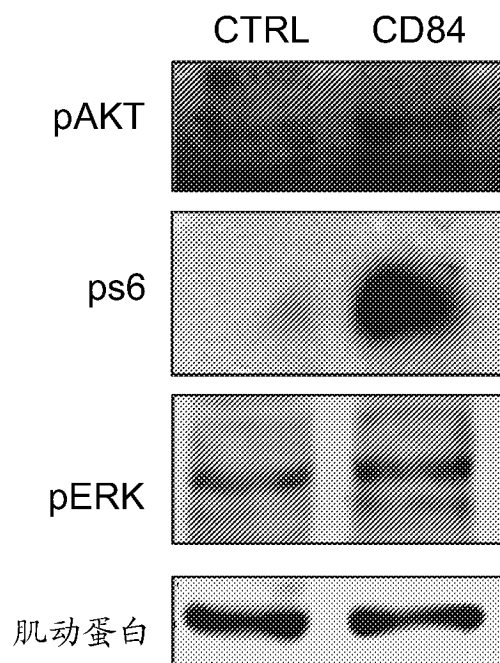


图 24A

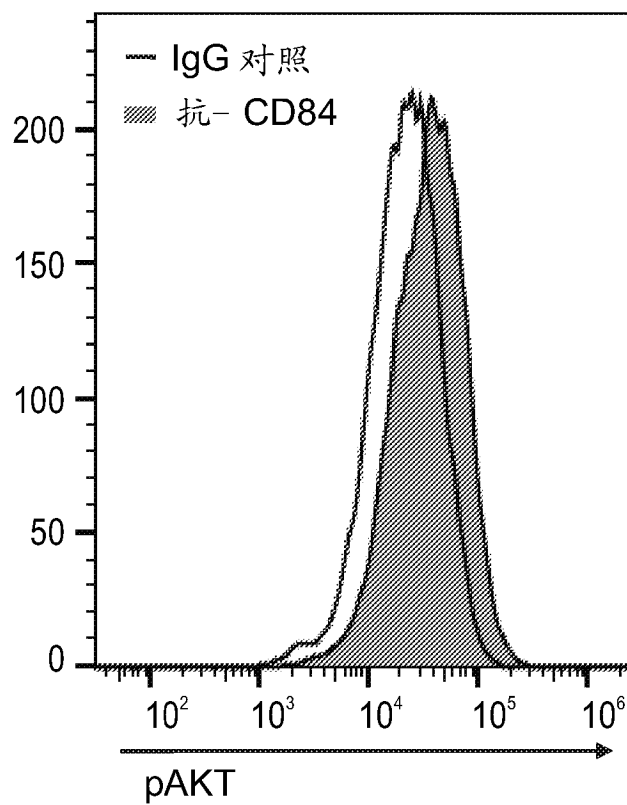


图 24B

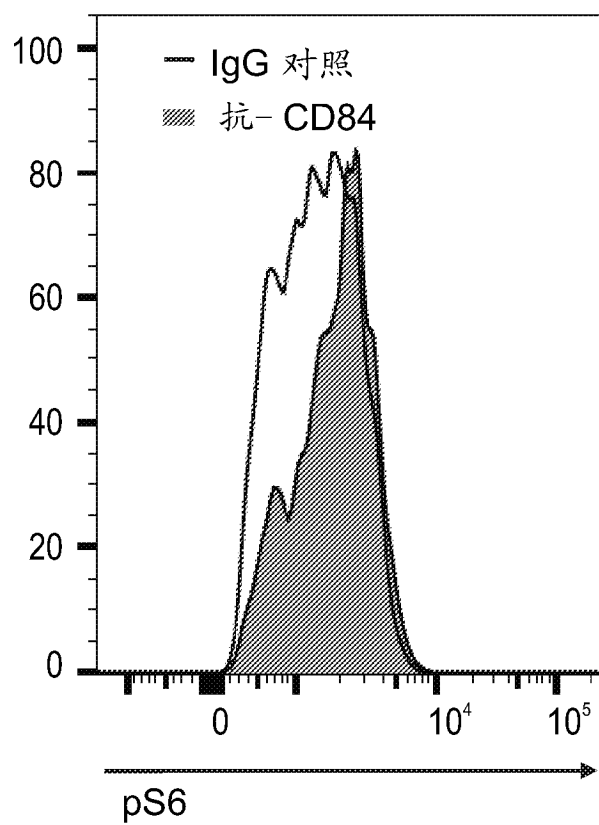


图 24C

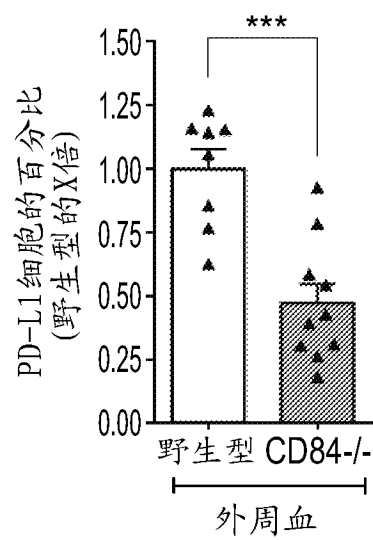


图 25A

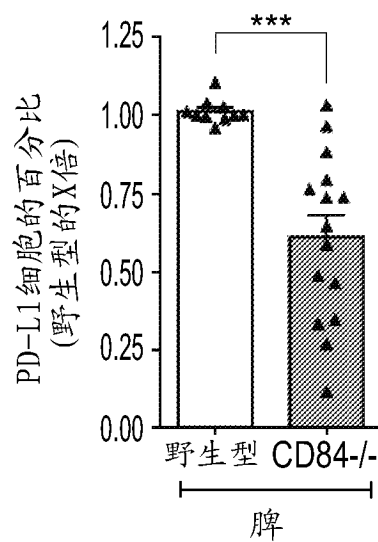


图 25B

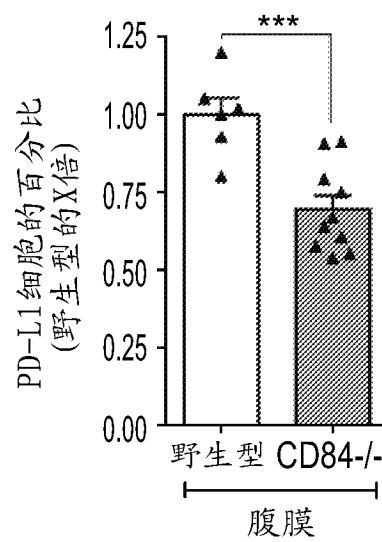


图 25C

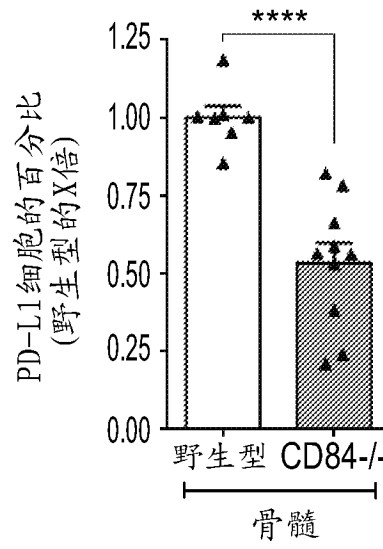


图 25D

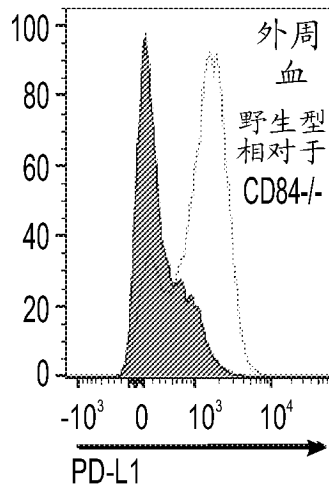


图 25E

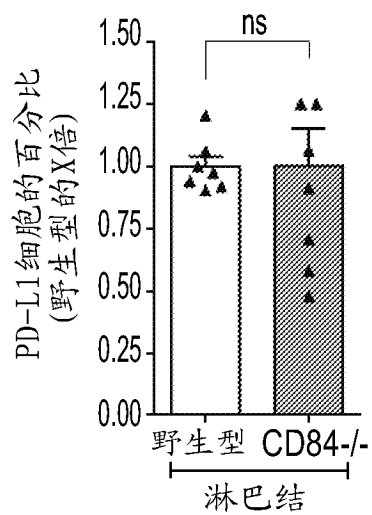


图 25F

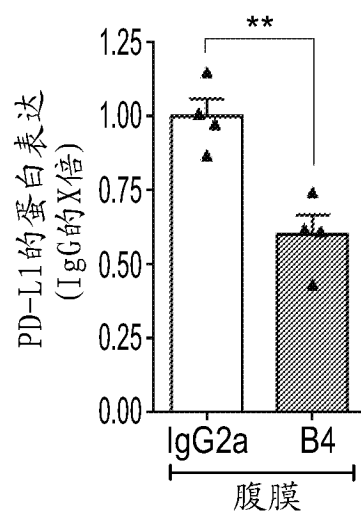


图 25G

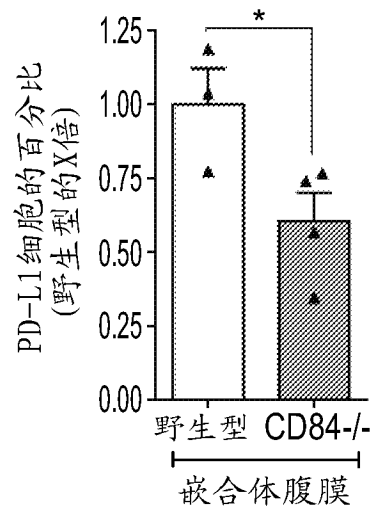


图 25H

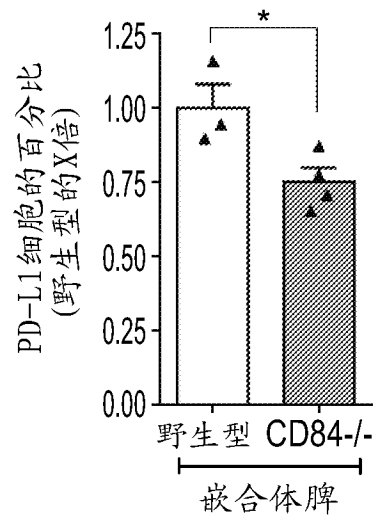


图 25I

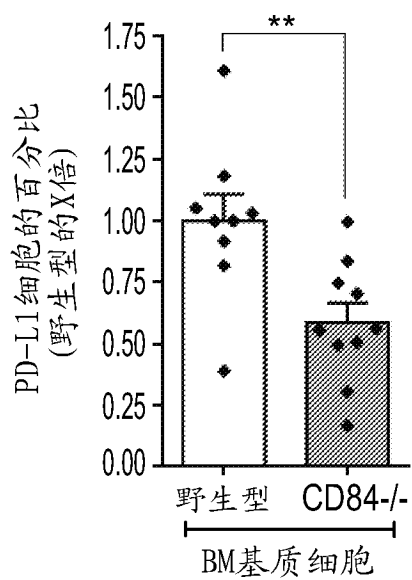


图 26A

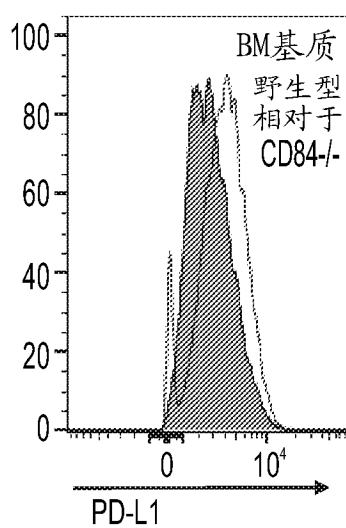


图 26B

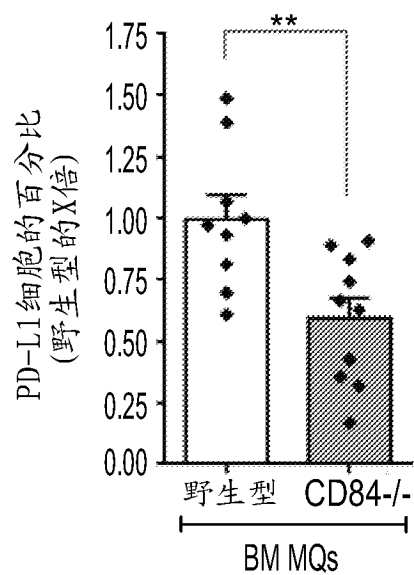


图 26C

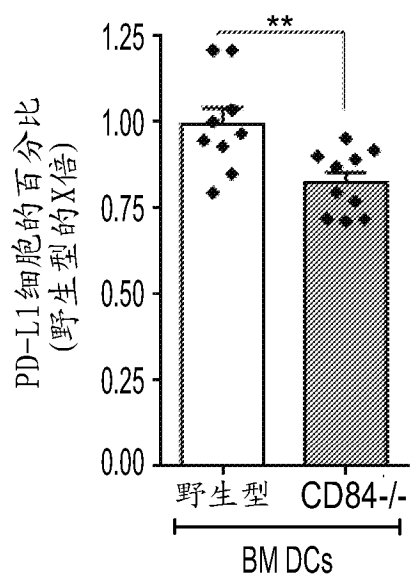


图 26D

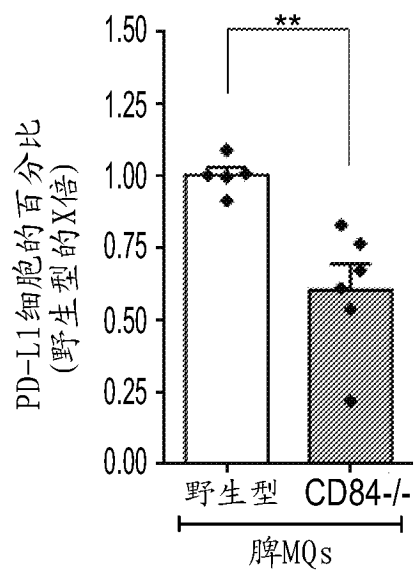


图 26E

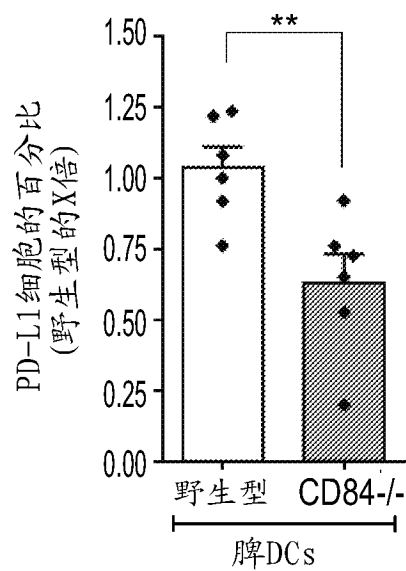


图 26F

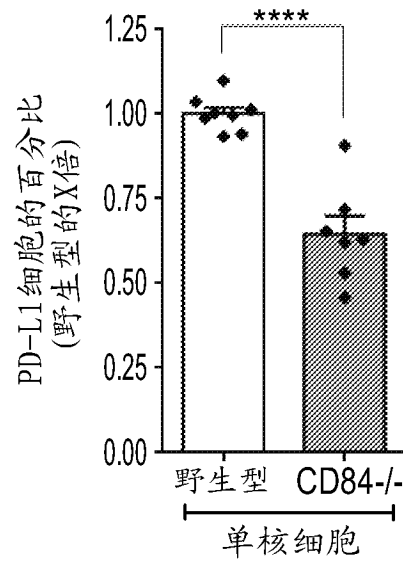


图 26G

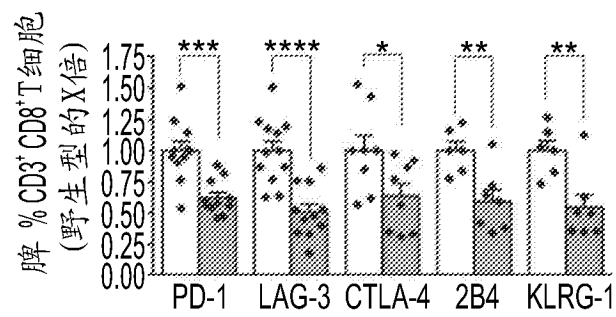


图 27A

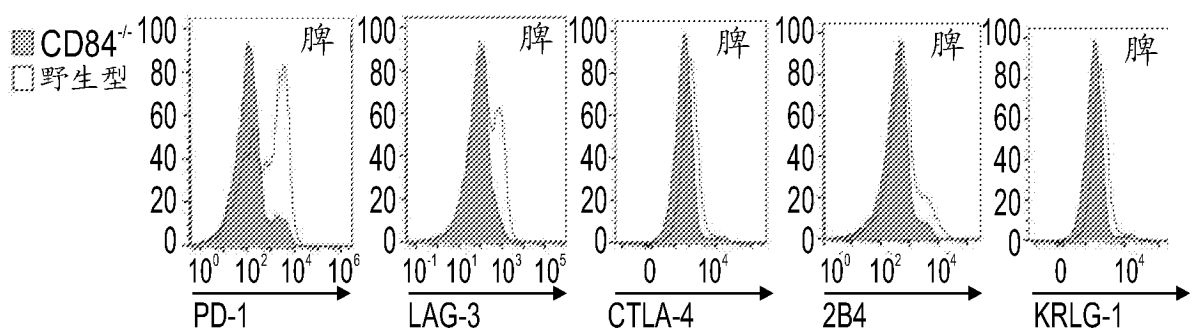


图 27B

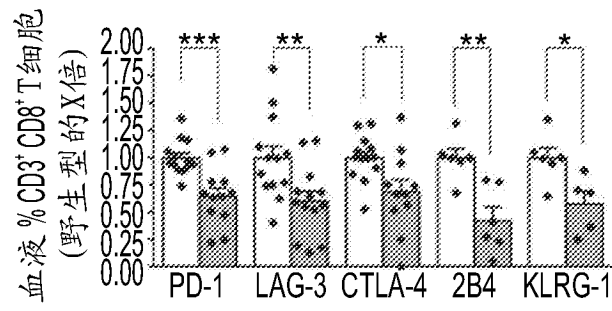


图 27C

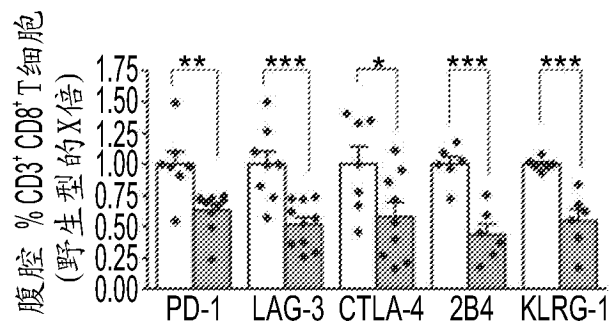


图 27D

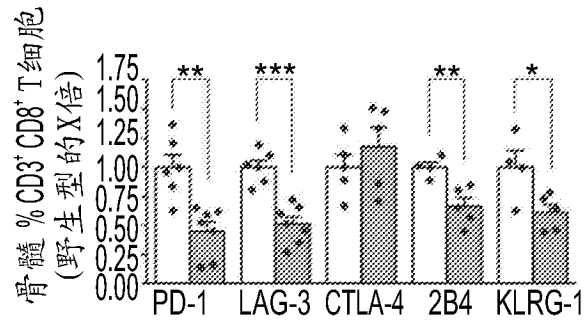


图 27E

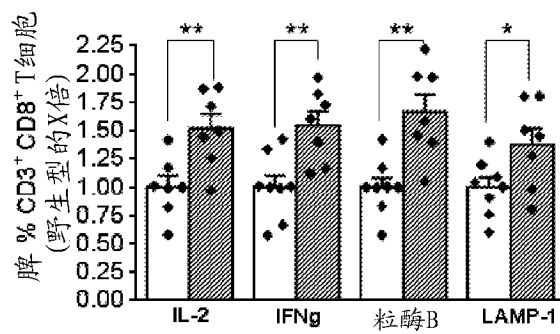


图 27F

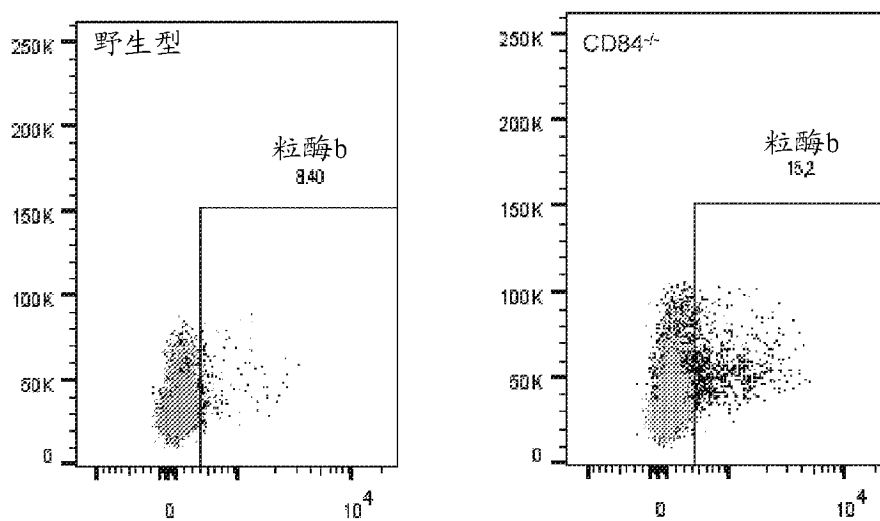


图 27G

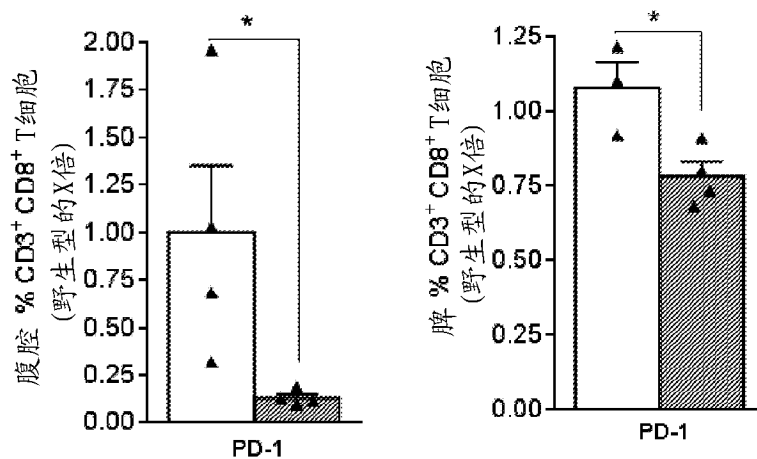


图 27H

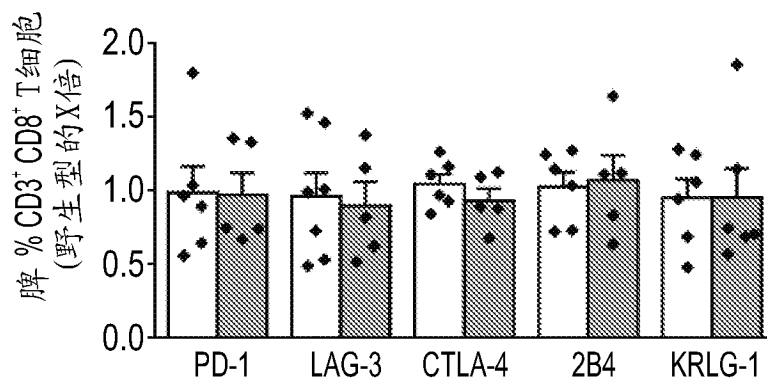


图 28A

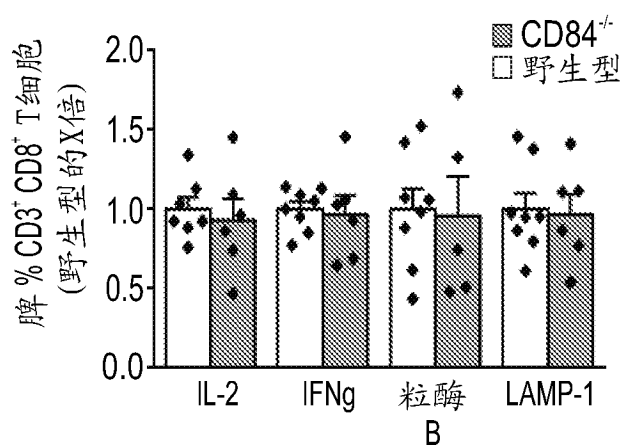


图 28B

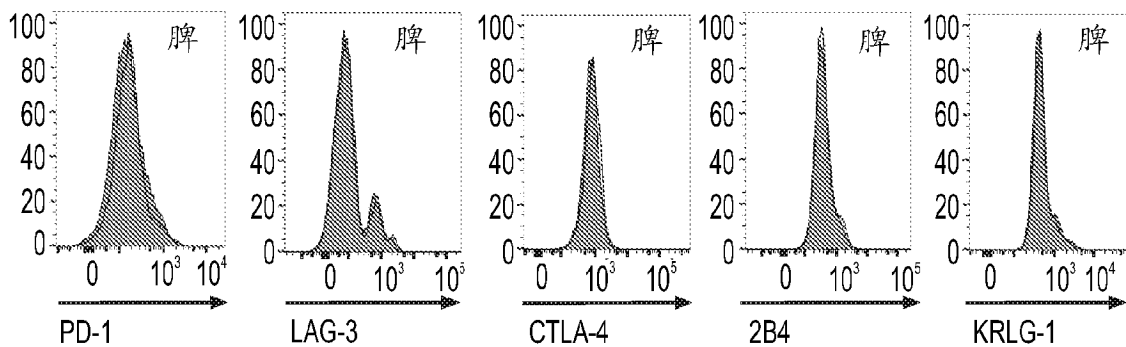


图 28C

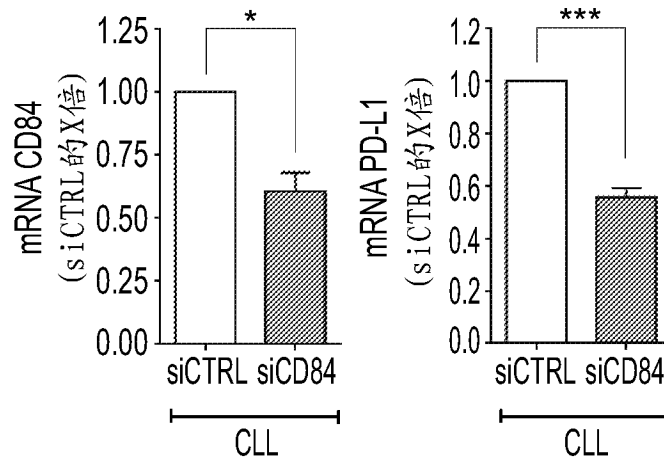


图 29A

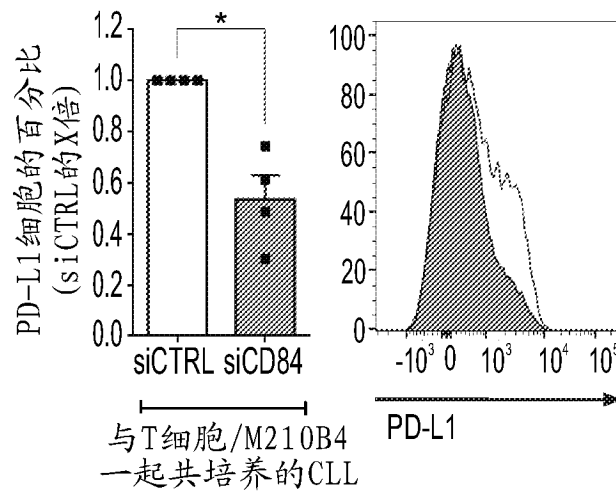


图 29B

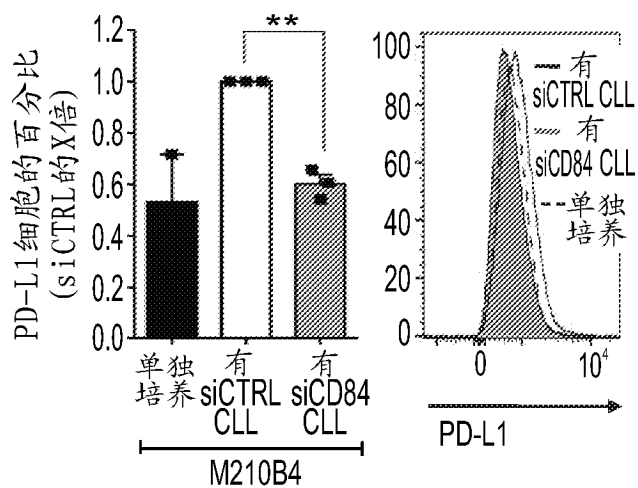


图 29C

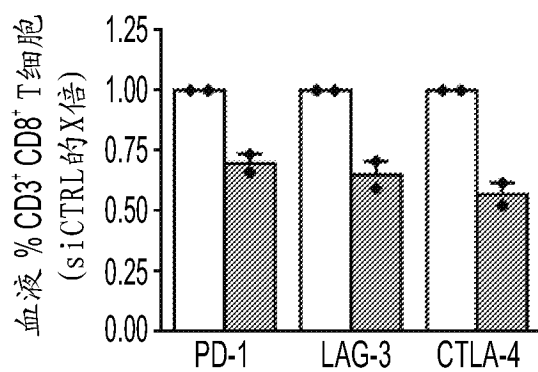


图 29D

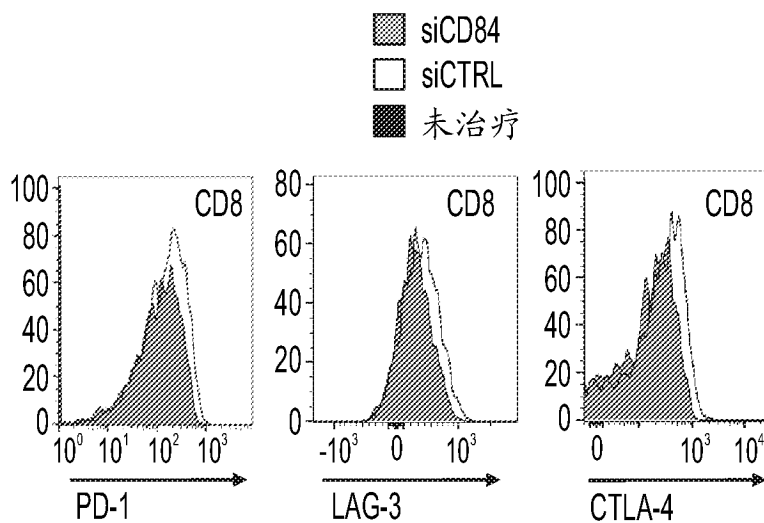


图 29E

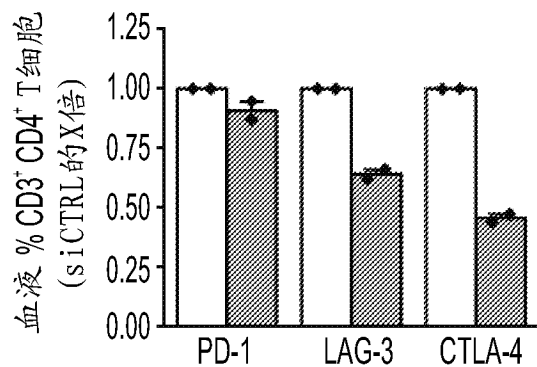


图 29F

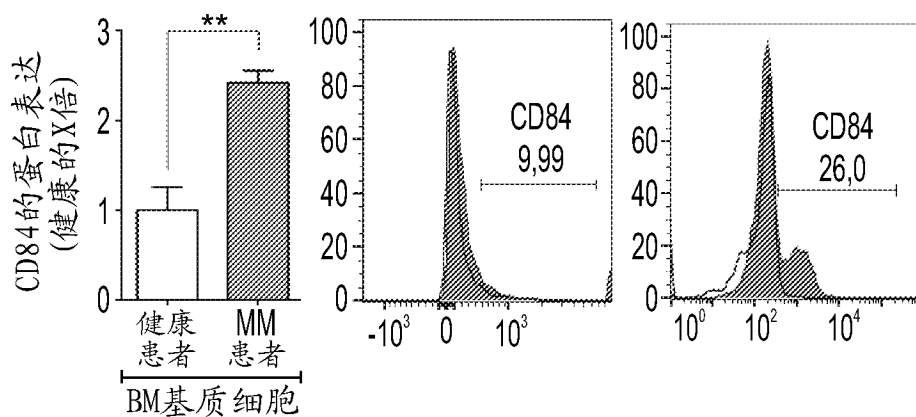


图 30A

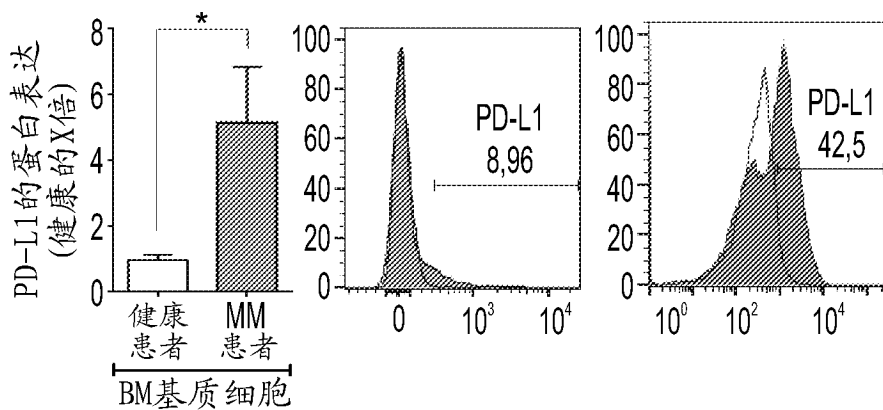


图 30B

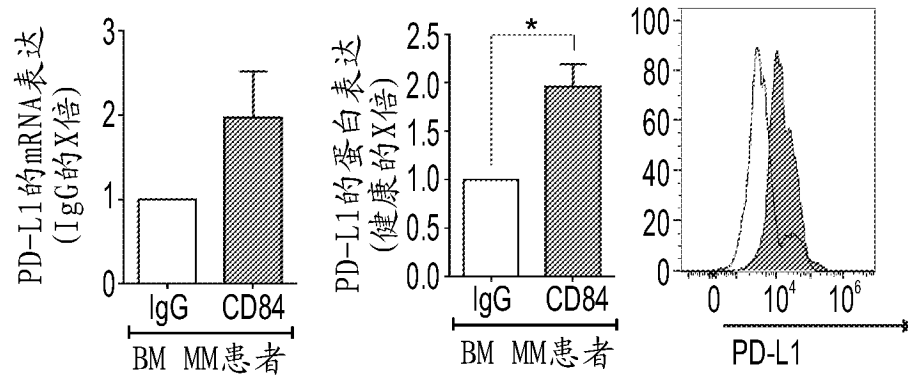


图 30C

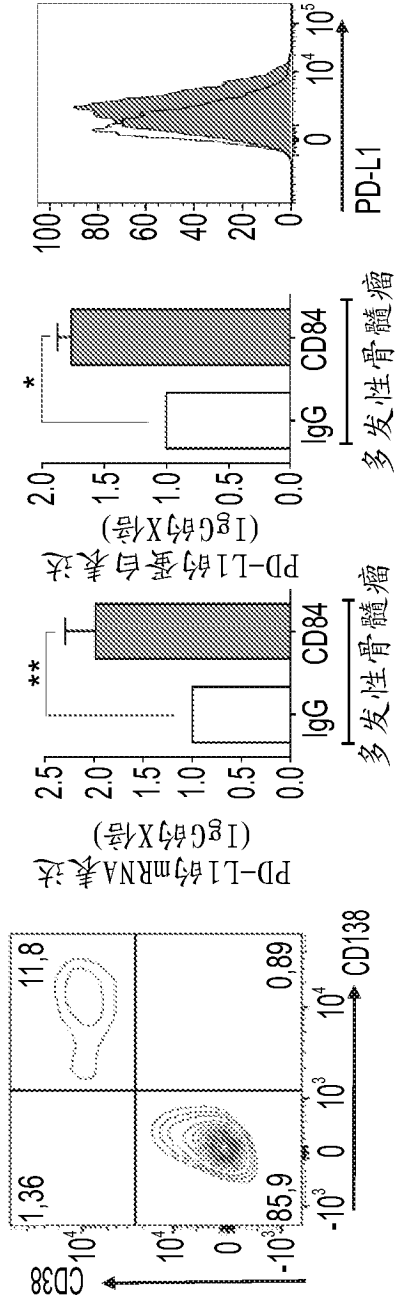


图 30D

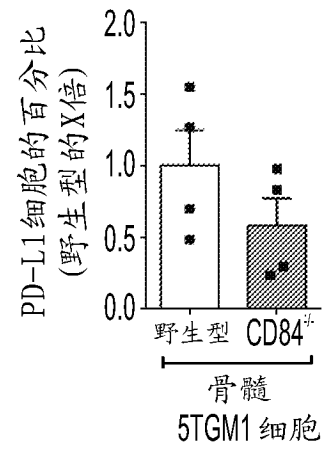


图 31A

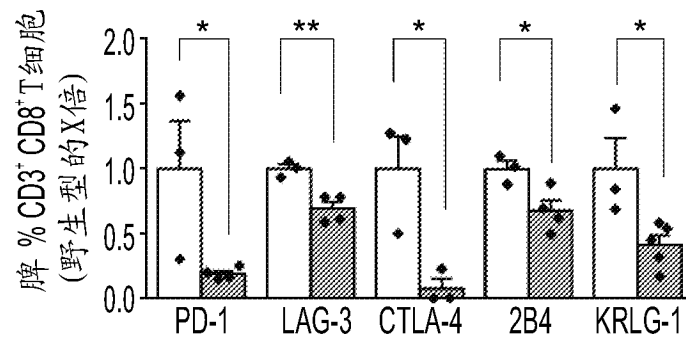


图 31B

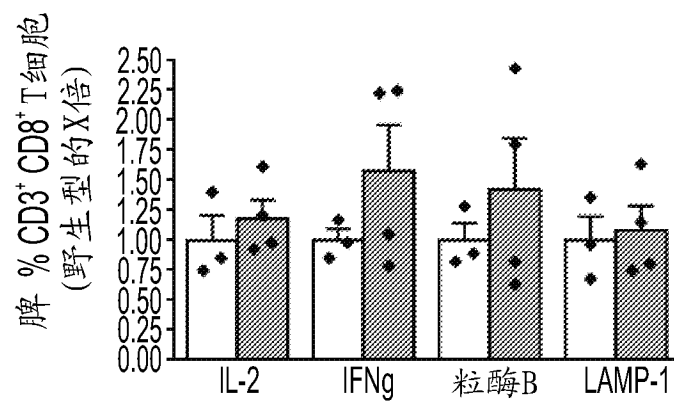


图 31C

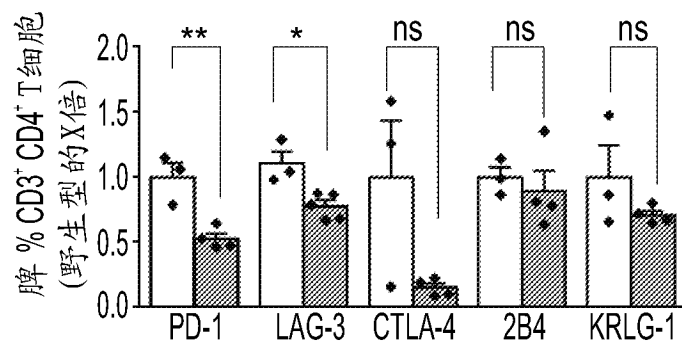


图 31D

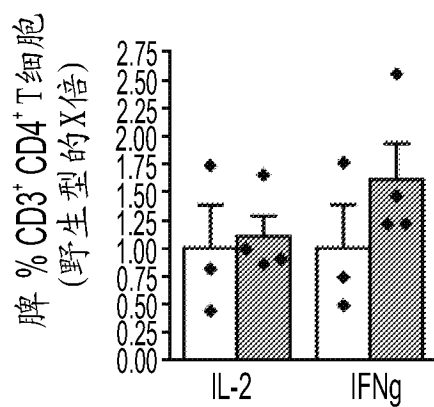


图 31E

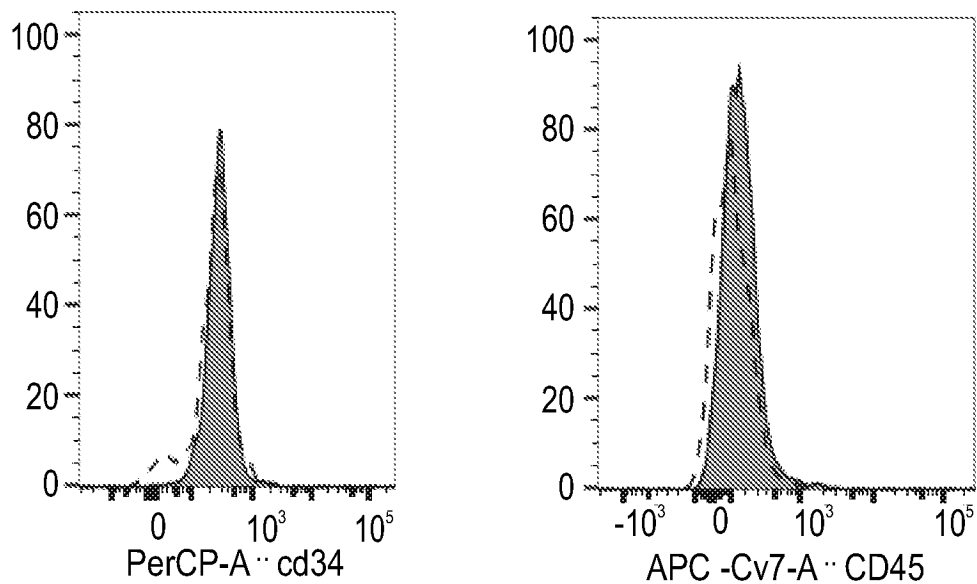


图 32A

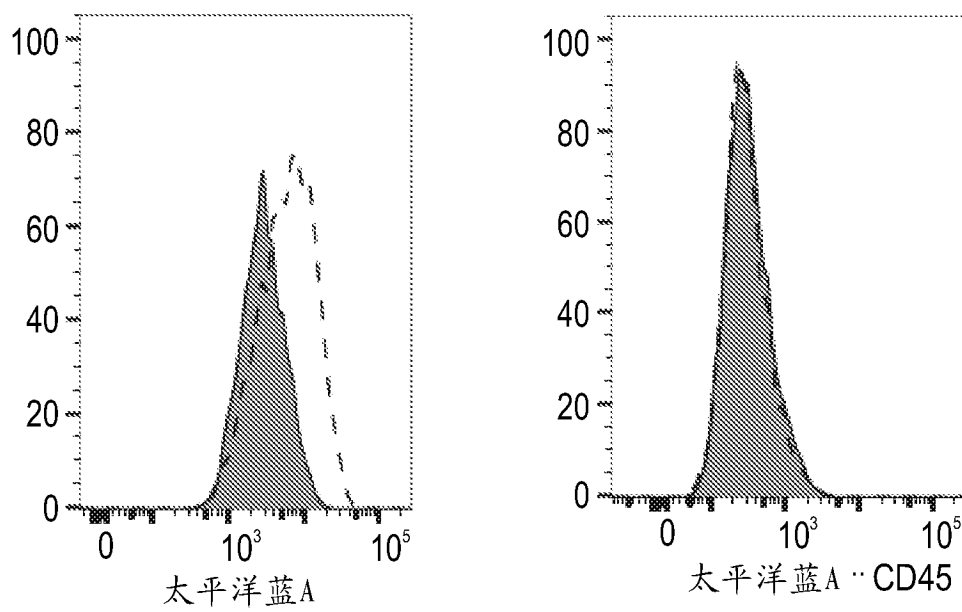


图 32B

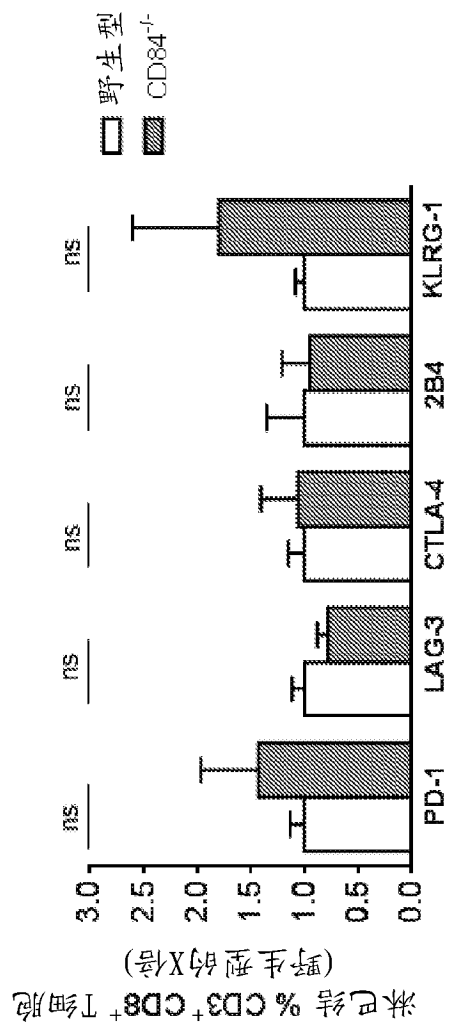


图 33

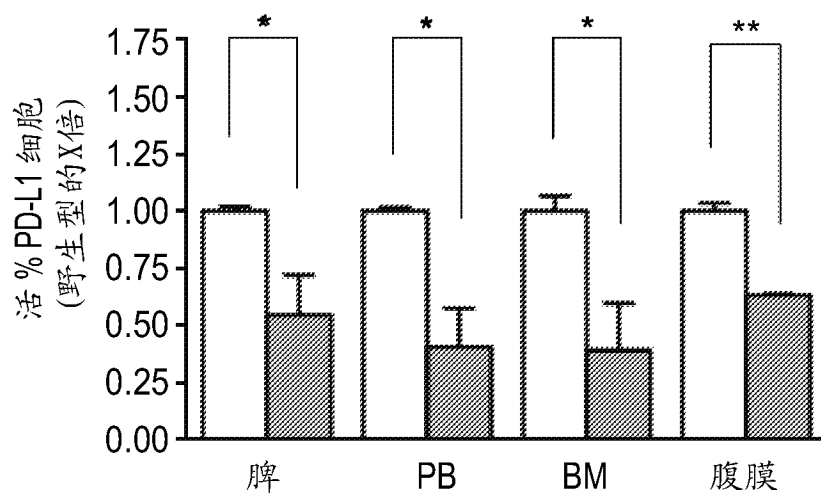


图 34A

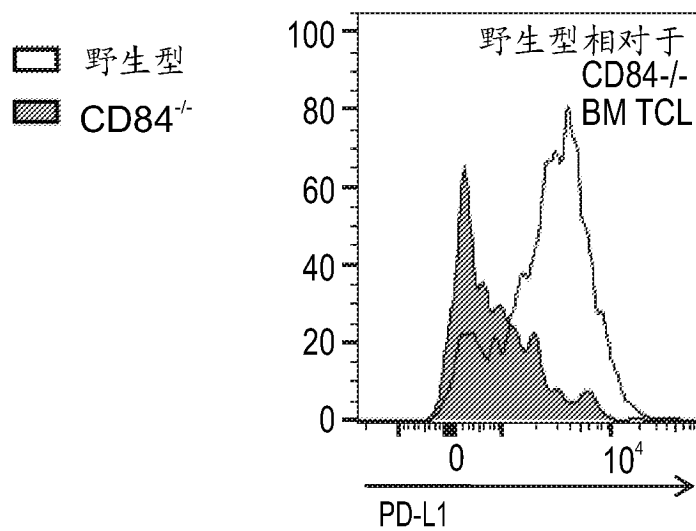


图 34B

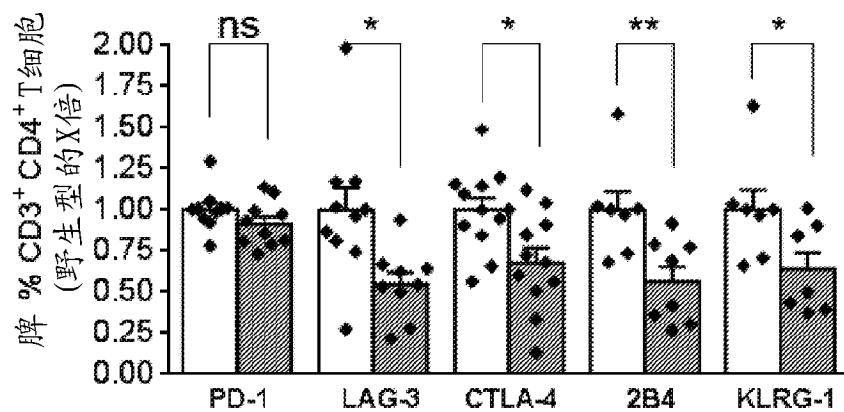


图 35A

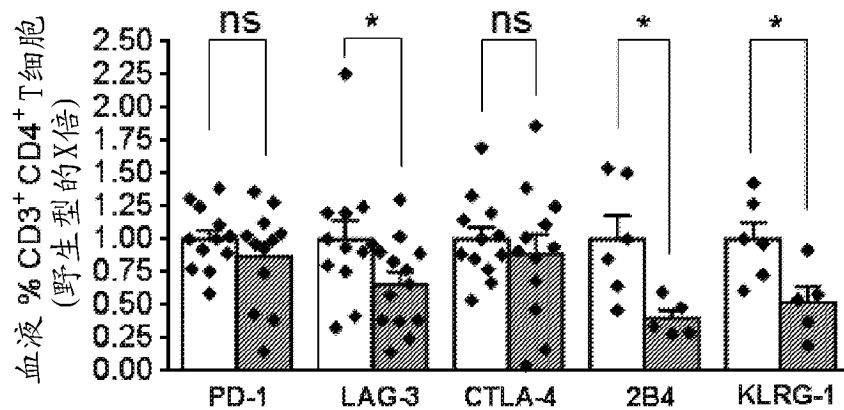


图 35B

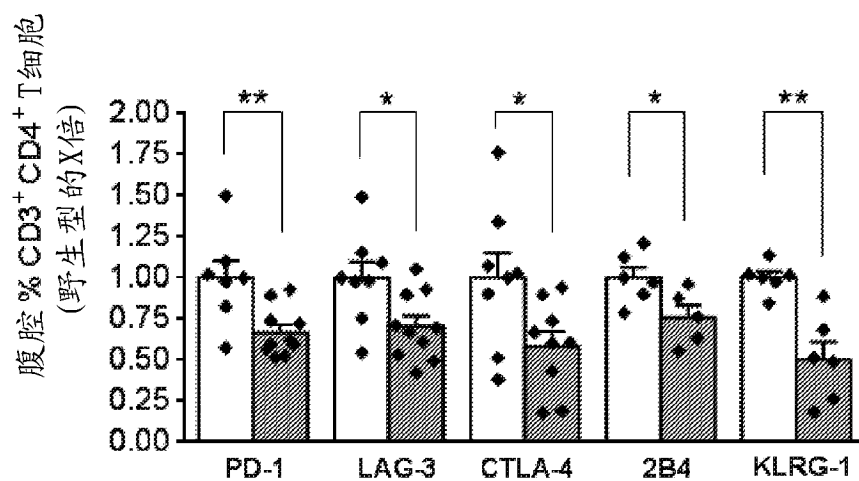


图 35C

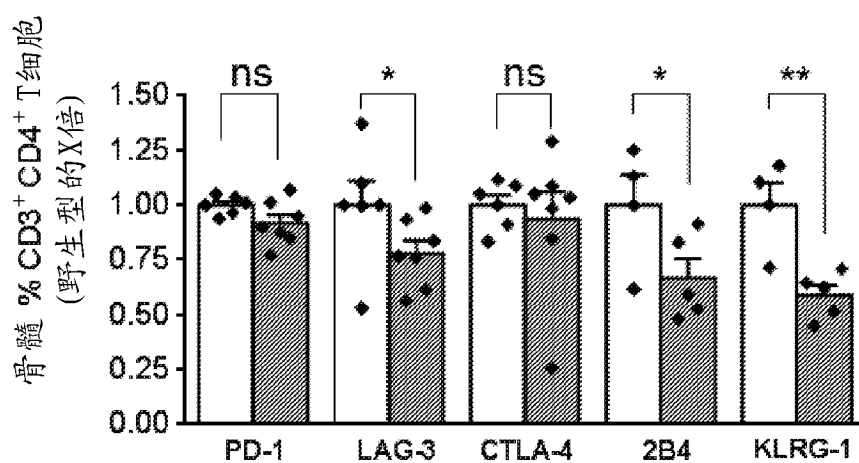


图 35D

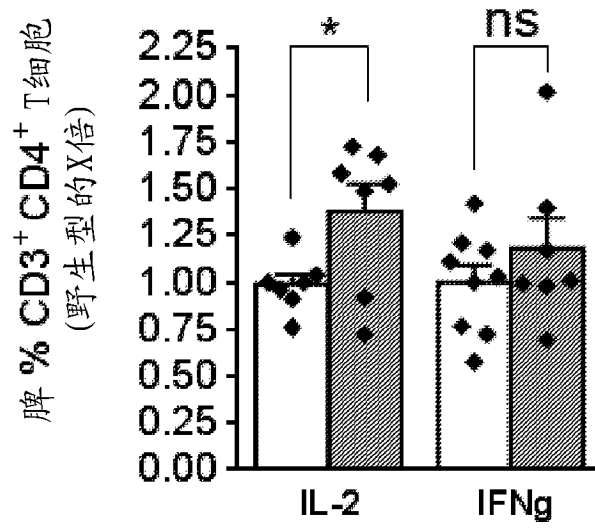


图 35E

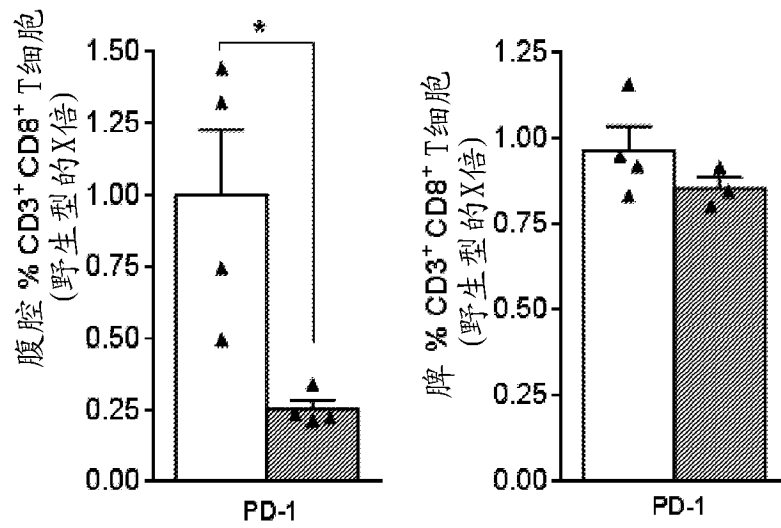


图 35F

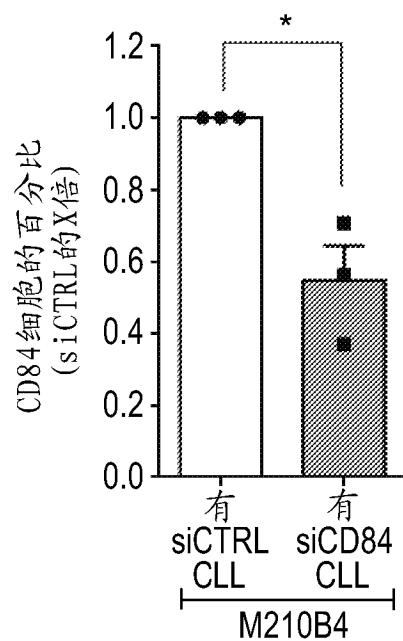


图 36A

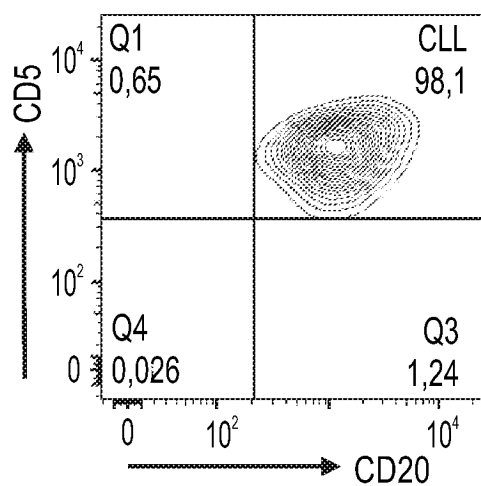


图 36B

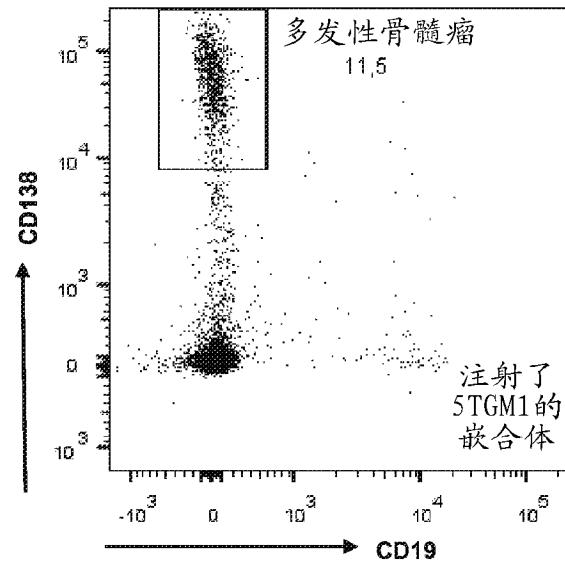


图 37A

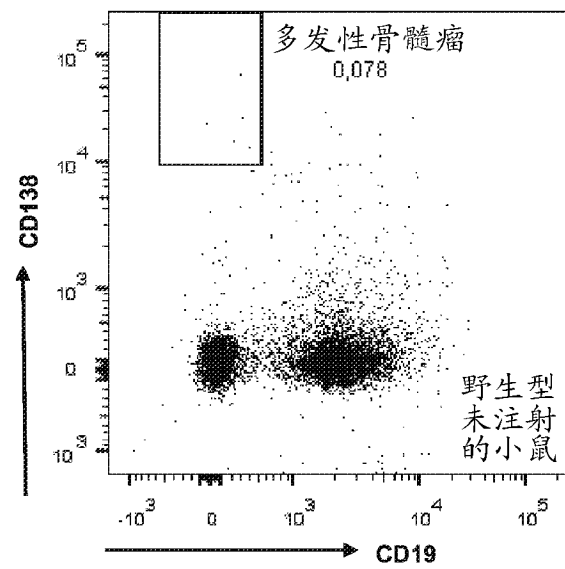


图 37B

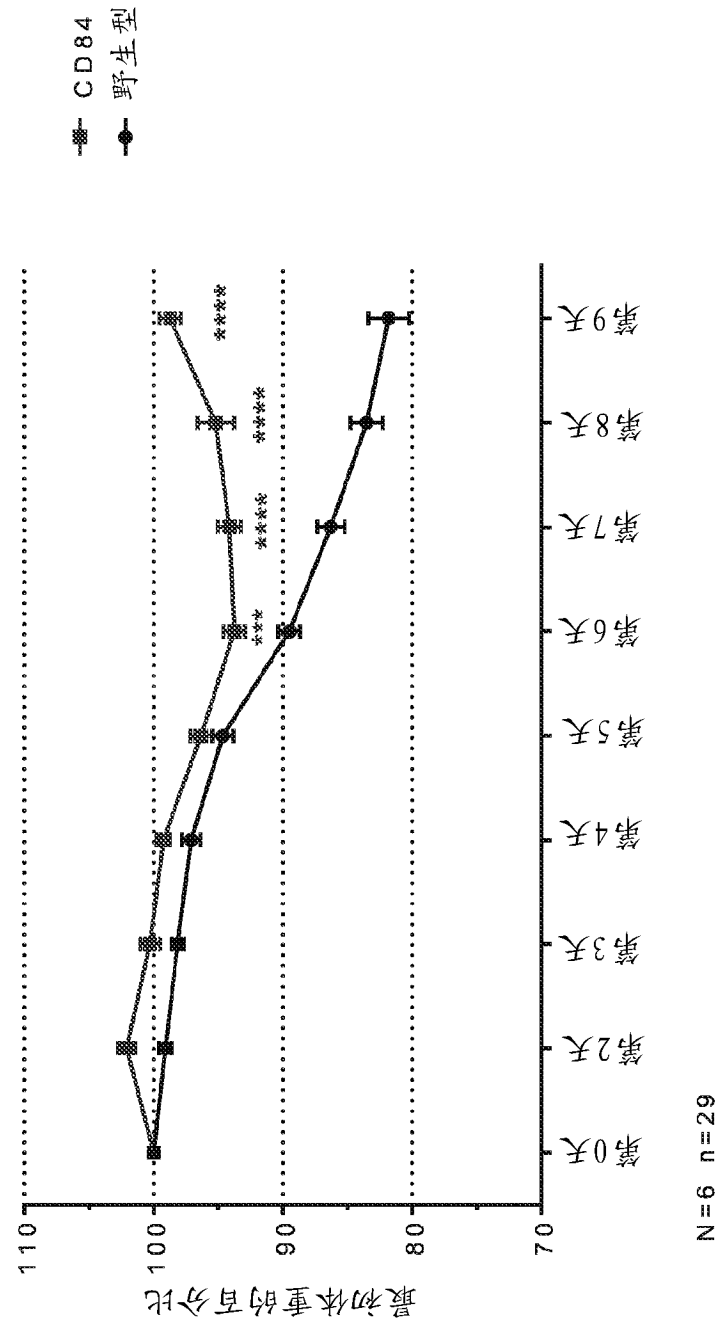


图 38

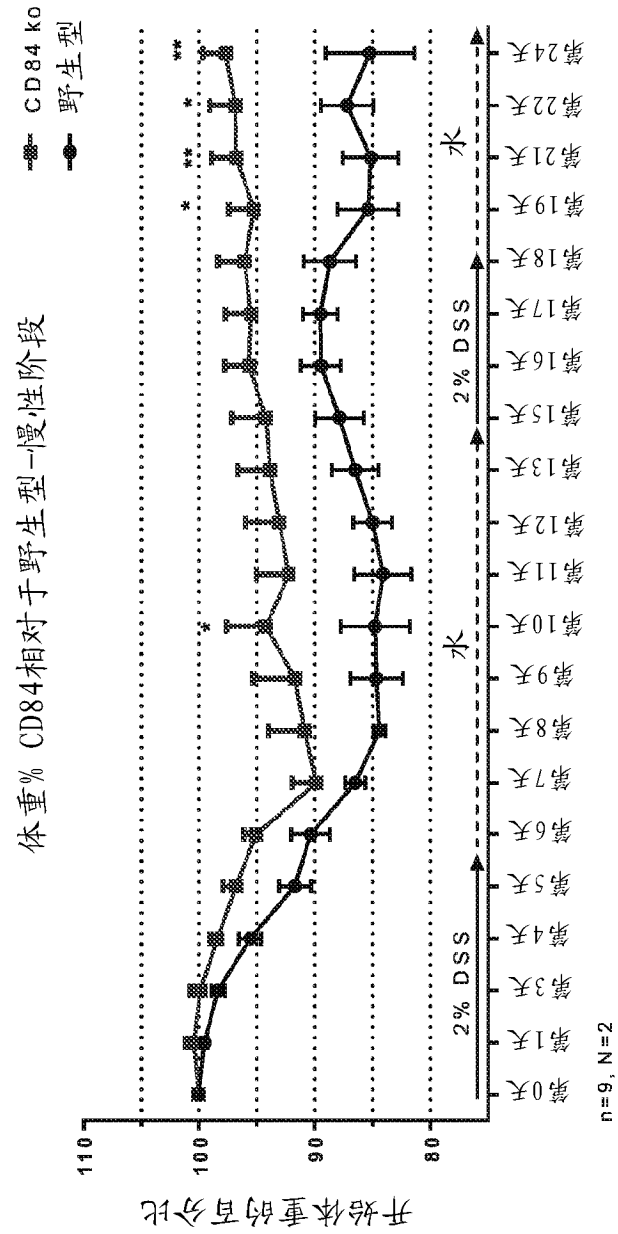


图 39

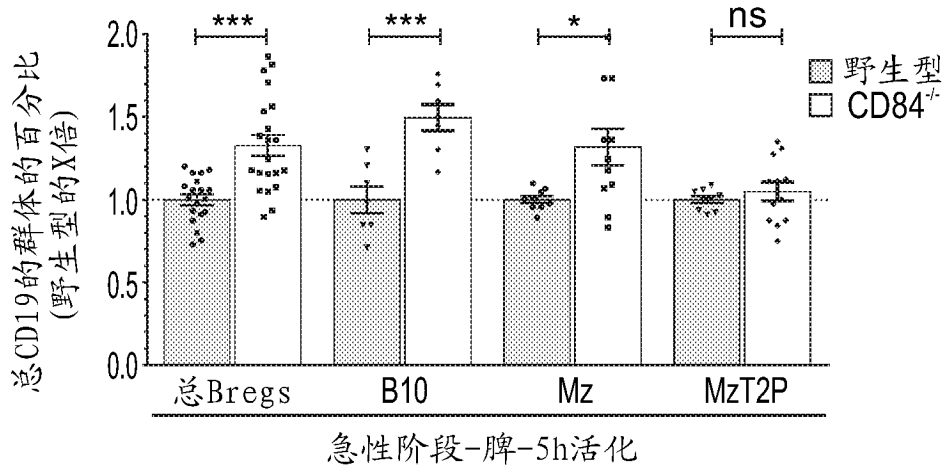


图 40A

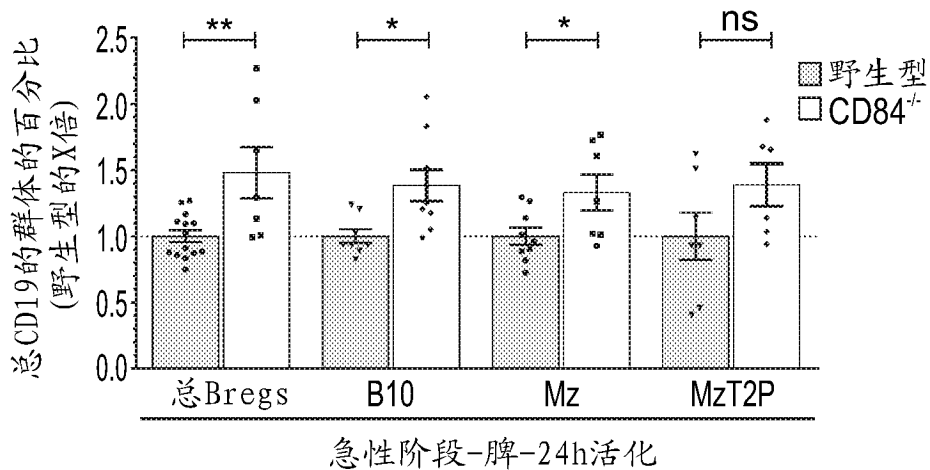


图 40B

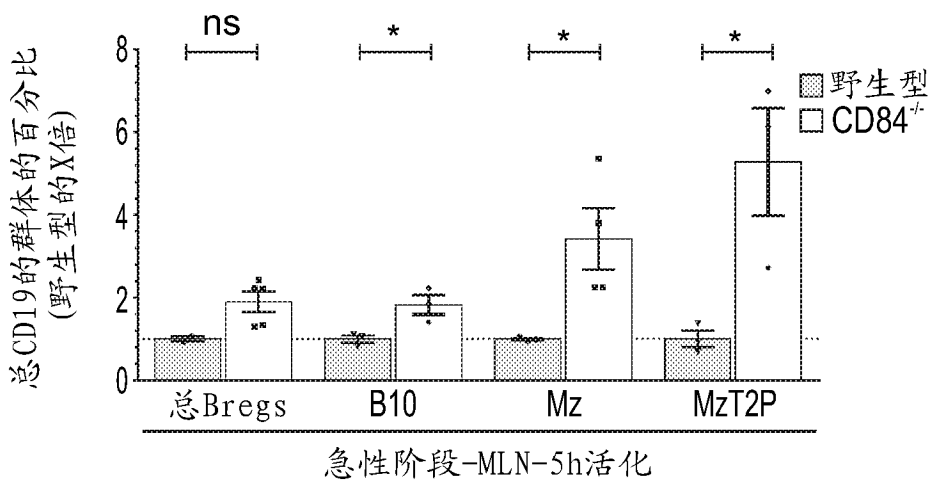


图 40C

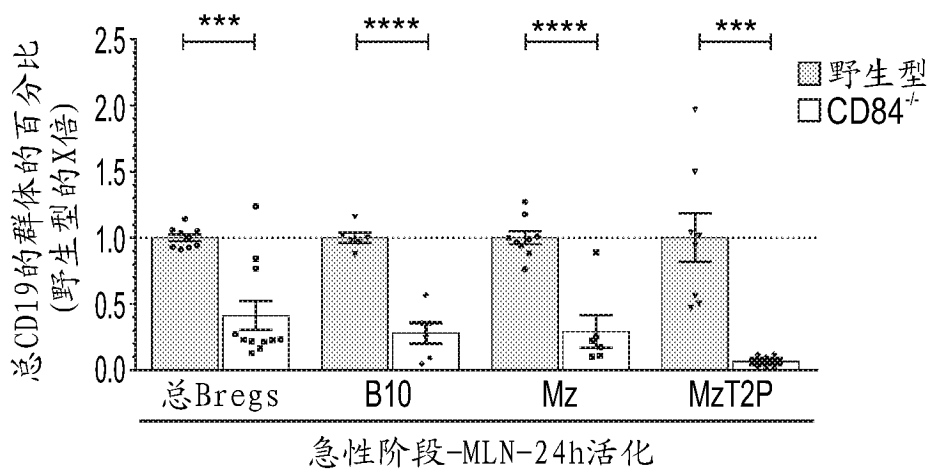


图 40D

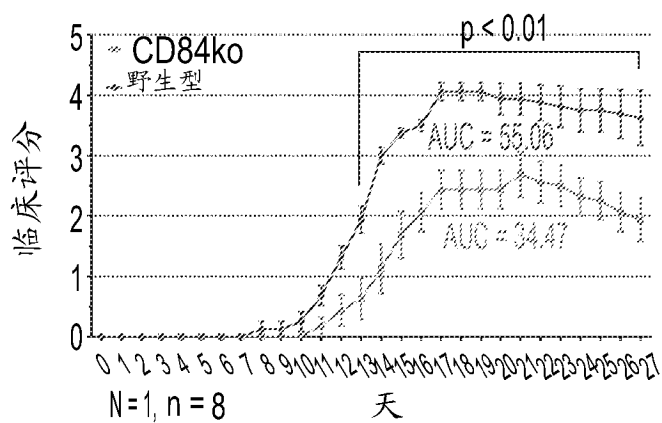


图 41A

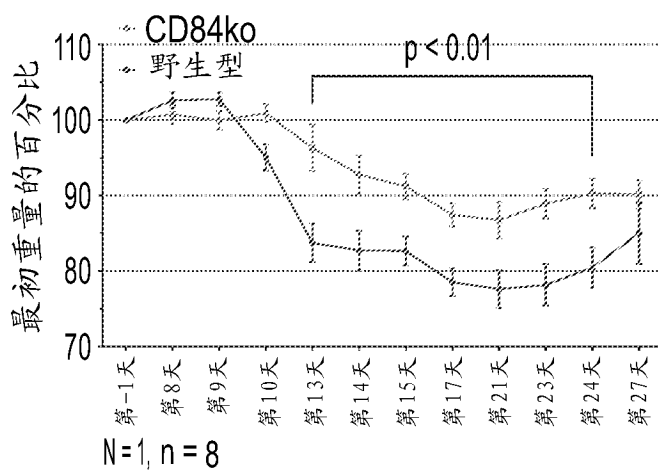


图 41B

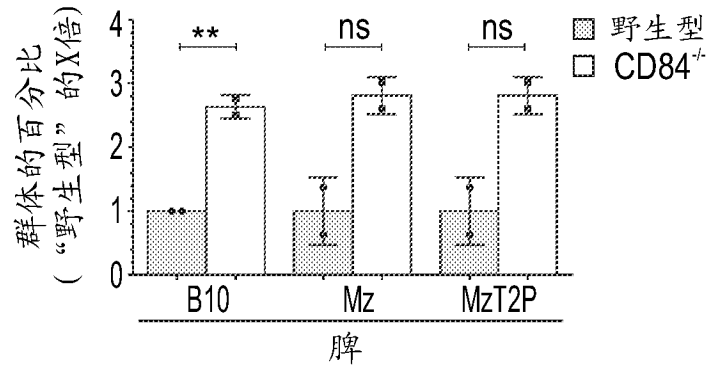


图 41C

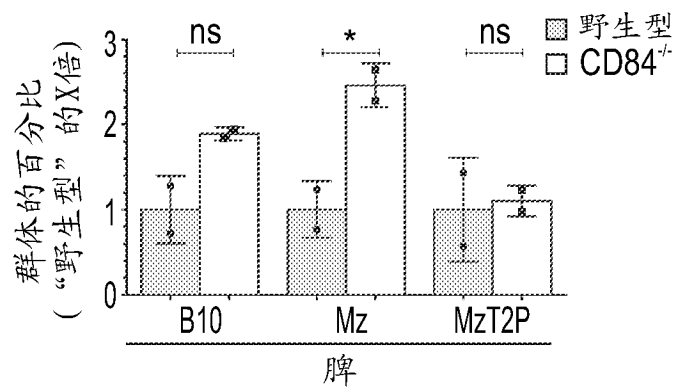


图 41D

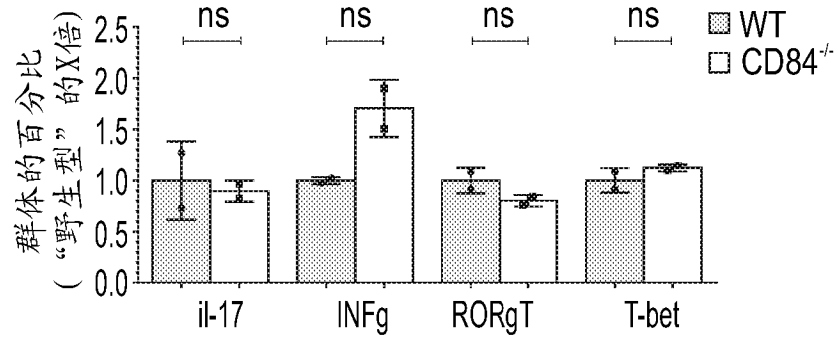


图 41E

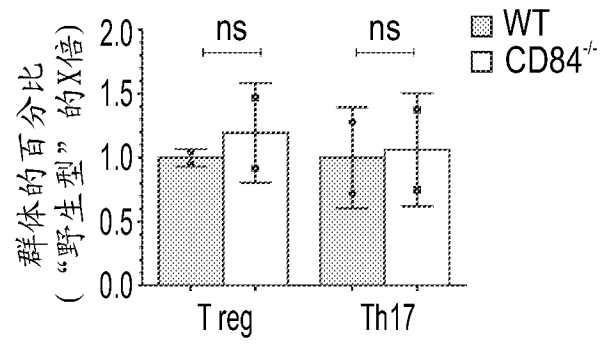


图 41F