



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114099686 A

(43) 申请公布日 2022.03.01

(21) 申请号 202111066530.2

(22) 申请日 2015.07.13

(30) 优先权数据

62/024,731 2014.07.15 US

62/069,881 2014.10.29 US

(62) 分案原申请数据

201580049041.2 2015.07.13

(71) 申请人 约翰·霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 S·周 B·沃格尔斯汀

K·W·凯泽 K·基姆

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 董志勇

(51) Int.Cl.

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01)

A61K 31/706 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书20页 附图7页

(54) 发明名称

源自骨髓的抑制细胞的抑制和免疫检查点
阻断

(57) 摘要

本发明的名称是源自骨髓的抑制细胞的抑制和免疫检查点阻断。已经观察到用检查点抑制抗PD-1抗体或抗CTLA-4抗体治疗的患者的不同寻常的反应。然而,针对免疫原性差的癌症的免疫疗法仍具有挑战性。用抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体两者的治疗不能根除适当免疫原性CT26大肿瘤或转移性4T1肿瘤。然而,用表观遗传调节药物和检查点抑制剂共同治疗显著改善治疗结果,将它们中超过80%治愈。功能研究揭示表观遗传调节剂的主要靶标是源自骨髓的抑制细胞(MDSC)。当与免疫检查点抑制剂组合时,减少循环MDSC的PI 3K抑制剂还治愈80%的具有转移性4T1肿瘤的小鼠。因此,通过消除MDSC可治愈耐免疫检查点阻断的癌症。

1. 一种治疗荷瘤哺乳动物的方法,其包含:
授予抑制源自骨髓的抑制细胞 (MDSC) 的至少一种第一药剂;以及
授予阻断免疫检查点的至少一种第二药剂。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一药剂选自由以下各项组成的群组:组蛋白脱乙酰基酶抑制剂、DNA甲基转移酶抑制剂、磷酸肌醇3激酶 (PI3K) 抑制剂p110 α 子单元以及它们的组合。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二药剂选自由以下各项组成的群组:抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体以及它们的组合。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第一药剂为组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,并且所述组蛋白脱乙酰基酶抑制剂为恩替诺特 (entinostat)。
5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第一药剂为DNA甲基转移酶抑制剂,并且所述DNA甲基转移酶抑制剂为5-氮杂胞苷。
6. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第一药剂为磷酸肌醇3激酶 (PI3K) 抑制剂的p110 α 子单元,并且所述磷酸肌醇3激酶 (PI3K) 抑制剂的p110 α 子单元为J32。
7. 根据权利要求3所述的方法,其中所述第二药剂为抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体的组合。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述第一药剂为恩替诺特和5-氮杂胞苷的组合。
9. 根据权利要求3所述的方法,其中所述第一药剂为恩替诺特和5-氮杂胞苷的组合。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一药剂为恩替诺特和5-氮杂胞苷的组合。

源自骨髓的抑制细胞的抑制和免疫检查点阻断

[0001] 本申请是分案申请,原申请的申请日为2015年7月13日、申请号为2015800490412、发明名称为“源自骨髓的抑制细胞的抑制和免疫检查点阻断”。

[0002] 本发明利用来自美国政府的基金进行。根据来自美国国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 的拨款号CA062924和CA043460的条款,美国政府保持在本发明中的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及癌症治疗领域。具体地说,其涉及解决治疗顽固性肿瘤的组合疗法。

背景技术

[0004] 哺乳动物免疫系统为经精密调节的,使其以最小旁观者伤亡发挥对抗外来侵入者如细菌和病毒的有效攻击。这需要功能上冗余调节机制以确保安全(1-3)。癌症呈现能够劫持这些机制以避免免疫破坏。由癌症采用的若干调节机制已经被鉴别。这些包括调节性T细胞(Treg)、循环MDSC、驻留肿瘤相关的巨噬细胞和嗜中性白细胞,抑制在T细胞上的受体的检查点和免疫抑制细胞激素(4-8)。最近,由于可抑制其功能的抗体可用性,由PD-1和CTLA-4受体保护的检查点已经进行深入研究。利用抗CTLA-4、抗PD-1和抗Pd-L1单克隆抗体(mAb)的当前临床试验示出显著治疗性反应(9-12),强调扰乱免疫检查点的构思可在治疗上有效。然而,目标反应在经治疗的患者和肿瘤类型中的少数中观察到,并且为何某些肿瘤作出反应而其它不作出反应的原因是神秘的。CT26和在BALB/c小鼠中通过反复直肠内滴注N-亚硝基-N-甲基尿烷而诱发的未分化结肠直肠癌,并且示出适当地免疫原性(13、14),然而4T1来源于在BALB/c小鼠中的自发乳腺肿瘤的(15)。4T1免疫原性差并且高转移性,这是与晚期人类癌症共享的特征(16)。尽管在癌症研究中广泛使用这些肿瘤细胞系,但是极少基因表征可用于它们中的任一个。

[0005] 本领域中存在解决治疗顽抗癌症的问题的持续需要,使得缓解可持续更长时间并且在经治疗人口中更广泛推广。

发明内容

[0006] 根据本发明的一个方面,提供一种治疗荷瘤哺乳动物的方法。将抑制源自骨髓的抑制细胞(MDSC)的至少一种第一药剂投予哺乳动物。将阻断免疫检查点的至少一种第二药剂投予哺乳动物。肿瘤可为或可不为非小细胞肺癌(NSLC)。

[0007] 根据本发明的另一方面,提供一种试剂盒。试剂盒包括单个封装并且含有抑制源自骨髓的抑制细胞(MDSC)的至少一种第一药剂。其进一步含有阻断至少两种免疫检查点的至少两种第二药剂。

[0008] 在本发明的又一方面,提供一种组合物。组合物包含抑制源自骨髓的抑制细胞(MDSC)的至少一种第一药剂并且阻断至少两种免疫检查点的至少两种第二药剂。

[0009] 根据本发明的另一方面,提供一种治疗荷瘤哺乳动物的方法。将抑制源自骨髓的抑制细胞(MDSC)的至少一种第一药剂投予哺乳动物。将阻断至少两种免疫检查点的至少两种第二药剂投予哺乳动物。

[0010] 在本发明的又一方面,提供一种治疗具有细菌或病毒感染的哺乳动物的方法。投予抑制源自骨髓的抑制细胞(MDSC)的至少一种药剂。药剂选自由以下各项组成的群组:组蛋白脱乙酰基酶抑制剂、DNA甲基转移酶抑制剂、磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制剂的 p110 α 子单元,及其组合。

[0011] 所属领域的技术人员当阅读本说明书时将明白这些和其它实施例提供用于治疗难治疗肿瘤的治疗性制剂和方法。

附图说明

[0012] 图1A至1G。荷瘤小鼠的治疗性反应。携带不同肿瘤的BALB/c小鼠用如指示的各种治疗性方式治疗。IgG、IgG对照;P,抗PD-1抗体;C,抗-CTLA-4抗体;AZA,5氮杂胞苷;ENT,恩替诺特(entinostat)。记录肿瘤体积(图1A、图1C和图1E)和动物存活(图1B、图1D和图1F)。(图1A和图1B)具有适中大小的CT26肿瘤的BALB/c小鼠。(图1C和图1D)具有大CT26肿瘤的BALB/c小鼠。(图1E和图1F)具有转移性4T1肿瘤的BALB/c小鼠。(图1G)在肿瘤植入6周之后4T1荷瘤小鼠如指示治疗并且安乐死。测量来自每一小鼠的原发肿瘤并且统计在不同器官中的转移性病变(代谢当量)病变。示出平均值与标准偏差。还指示用于每一实验组的动物的数量(n)和P值。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns,不显著。

[0013] 图2A至图2H。在免疫检查点阻断和表观遗传调节之后的免疫细胞反应。携带转移性4T1肿瘤的BALB/c小鼠以指示治疗性方式进行治疗,随后FACS和免疫组织荧光分析以评估肿瘤-浸润和循环免疫细胞。示出平均值和标准差,其中指示p值。(图2A)用于肿瘤-浸润CD8⁺T细胞的FACS结果。(图2B)肿瘤-浸润CD8⁺T细胞的代表性免疫组织荧光染色。比例尺,50 μ m。(图2C)用于肿瘤-浸润CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg的FACS结果。(图2D)示出FoxP3和CD25双阳性细胞在CD45⁺CD3⁺CD4⁺门控肿瘤-浸润细胞中的百分比的代表性FACS数据。(图2E)用于循环G-MDSC的FACS结果。(F)示出Ly6G⁺Ly6C^{lo}细胞在CD45⁺CD11b⁺F4/80⁻MHC-II⁻门控循环细胞中的百分比的代表性FACS数据。(图2G)用于肿瘤-浸润G-MDSC的FACS结果。(图2H)肿瘤-浸润Ly6G⁺细胞的代表性免疫组织荧光染色。比例尺,50 μ m。

[0014] 图3A至图3C。源自骨髓的Ly6G⁺细胞造成对免疫检查点阻断的抵抗。(图3A)携带4T1肿瘤的BALB/c小鼠如指示用各种抗体或抗体组合治疗并且随着时间记录肿瘤体积。 α Ly6G、抗Ly6G抗体; α CD25、抗CD25抗体。(图3B)在用不同抗体或抗体组合治疗之后用于循环G-MDSC的FACS结果。(图3C)4T1荷瘤小鼠用抗PD-1/抗CTLA-4抗体加表观遗传调节剂治疗,该表观遗传调节剂含或不含通过亲和纯化从4T1荷瘤动物分离的过继转移的MDSC。在治疗之后记录肿瘤体积。示出平均值和标准差,其中指示p值。

[0015] 图4A至图4D。表观遗传调节剂对于培育的细胞的直接效应。(图4A和图4B)4T1细胞、经纯化CD8⁺T细胞或G-MDSC用不同浓度的恩替诺特(图4A)或AZA(图4B)处理。使用基于代谢的比色检定评估细胞存活率。(图4C)分析来自不同比率的G-MDSC和CD8⁺T细胞的共培育的经调节的培育基的IFN- γ 含量。(图4D)在用恩替诺特增加投予持续24小时治疗之后收集来自G-MDSC与CD8⁺T细胞比率为1:1的共培育的经调节的培育基并且分析IFN- γ 含

量。示出来自至少三个重复槽孔的数据的平均值和标准差。指示 p 值。

[0016] 图5。体重测量结果。携带4T1肿瘤的BALB/c小鼠用指示的治疗性方式治疗。在治疗之后有规律地测量并记录它们的体重。示出平均值与标准偏差的数据。

[0017] 图6A至图6B。由4T1肿瘤诱发的较高G-MDSC水平。(图6A)在4T1肿瘤植入之后 指示的时间点处收集周边血液并且由FACS分析G-MDSC的水平。(图6B)在4T1肿瘤植入之后第18天从健康小鼠或从荷瘤小鼠采集周边血液、脾和肿瘤并且通过FACS分析 G-MDSC的水平。示出平均值与标准偏差的数据。

[0018] 图7。基因的表达参与MHC-I呈递。在用表观遗传调节剂治疗之后, RNA从活体外 培育的4T1和CT26肿瘤细胞中分离。参与MHC-I呈递的不同基因的表达由RT-PCR评估。使用 β -肌动蛋白作为内参考物。图7中的A, 未治疗的, 图7中的B, 经AZA治疗的, 图7中的C, 经恩替诺特治疗的, 图7中的D经AZA/恩替诺特治疗的。

[0019] 图8A至图8C。在与免疫检查点阻断结合时, PI3K抑制剂通过消耗G-MDSC根除4T1肿瘤。(图8A) G-MDSCs、CD8⁺T细胞和4T1肿瘤细胞在体外用各种浓度的J32治疗。使用基于代谢的比色检定评估细胞存活率。示出来自三个重复槽孔的数据的平均值和标准差。(图8B) 携带4T1肿瘤的BALB/c小鼠用指示的治疗性方式治疗。执行FACS分析以 定量循环的G-MDSC。(图8C) 携带4T1肿瘤的BALB/c小鼠用J32、抗PD-1/抗CTLA-4 抗体或组合治疗并且记录肿瘤体积。示出平均值和标准差, 其中指示p值。

[0020] 图9。用于组合治疗的Meier Kaplan曲线。从最低至最高曲线: 单独的诺维氏梭菌-NT; 单独的抗PD-1/抗CTLA-4; 抗PD-1/抗CTLA-4+诺维氏梭菌-NT; 抗PD-1/抗CTLA-4+ENT/AZA; 抗PD-1/抗CTLA-4+ENT/AZA+诺维氏梭菌-NT。

具体实施方式

[0021] 本发明人已经开发治疗性方法, 该方法涉及作用于在免疫系统中的宿主细胞如MDSC 上以减弱和/或抑制它们的药剂。此类药剂可为表观遗传调节剂如组蛋白脱乙酰基酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂。在与免疫检查点阻断结合使用时, 表观遗传调节剂在比用于在体外杀灭肿瘤细胞所需的浓度低得多的浓度下杀灭MDSC。以使用剂量下, 表观遗传调节剂充其量仅对体内肿瘤细胞具有很小影响; 使用针对它们的抗体减少MDSC具有类似于用表观遗传调节剂观察的那些的抗肿瘤效应。在过继转移实验中, 从未经治疗的 荷瘤小鼠纯化的MDSC可消除表观遗传调节的治疗作用。用完全不同类别的药剂 (PIK3 抑制剂) 抑制MDSC具有与表观遗传调节剂的那些类似的效应。

[0022] 能够根据本发明的方法和/或使用试剂盒和/或使用本发明的组合物治疗的肿瘤的类型为实体肿瘤和血液癌两者。示例性的肿瘤包括肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、成人脑/CNS肿瘤、儿童脑/CNS肿瘤、乳癌、男性乳癌、青少年的癌、儿童的癌、年轻成人的癌、未知的原发性癌、卡斯尔曼疾病、宫颈癌、结肠/直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、肠胃类癌、胃肠道间质瘤 (GIST)、妊娠期滋养细胞疾病、霍奇金病、卡波西肉瘤、肾癌、喉和下咽癌、白血病、成人的白血病-急性淋巴细胞 (ALL)、白血病-急性骨髓 (AML)、白血病-慢性淋巴细胞 (CLL)、白血病-慢性骨髓 (CML)、白血病-慢性骨髓单核细胞性 (CMML)、儿童白血病、肝癌、肺癌-非小细胞、肺癌-小细胞、肺类肿瘤、淋巴瘤、皮肤淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良症候群、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽

癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、儿童非霍奇金淋巴瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体肿瘤、前列腺癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤-成人软组织癌、皮肤癌、皮肤癌-基底细胞和鳞状细胞、皮肤癌-黑素瘤、皮肤癌-梅克尔细胞、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和威尔姆斯肿瘤。

[0023] 可根据本发明的方法治疗的细菌感染的类型包括炭疽杆菌、百日咳博德特氏菌、伯氏疏螺旋体、流产布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、羊布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、空肠弯曲杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、鹦鹉热嗜衣原体、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、白喉杆菌、粪肠球菌和屎肠球菌、大肠杆菌(通常)、肠毒性大肠杆菌(ETEC)、肠致病性大肠杆菌、大肠菌0157:H7、土拉弗朗西斯菌、流感嗜血杆菌属、幽门螺旋杆菌、嗜肺军团菌、钩端螺旋体、单核细胞增生李斯特菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、支原体肺炎、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏菌、绿脓杆菌、立克次氏体属、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、索氏志贺杆菌属和金黄色葡萄球菌。

[0024] 可根据本发明治疗的病毒感染类型包括慢性和急性感染两者。示例性感染包括呼吸病毒,如腺病毒、禽流感、A型流感病毒、B型流感病毒、麻疹、副流感病毒、呼吸合胞体病毒(RSV)、鼻病毒、SARS-CoV、肠胃病毒,如柯沙奇病毒、肠道病毒、脊髓灰质炎病毒、轮状病毒、肝炎病毒如B型肝炎病毒、C型肝炎病毒、牛腹泻病毒(替代物)、疱疹病毒,如单纯疱疹病毒1、单纯疱疹病毒2、人类巨细胞病毒、水痘带状疱疹病毒、逆转录病毒如人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)、人类免疫缺陷病毒2(HIV-2)、猴免疫缺陷病毒(SIV)、猴人类免疫缺陷病毒(SHIV)、病毒选择药剂/新出现的病毒病原体,如禽流感、登革病毒、汉坦病毒、出血性发热病毒、淋巴细胞病毒、天花病毒替代物、牛痘、猴痘、兔痘、牛痘病毒、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒(VEE)、西尼罗病毒、黄热病病毒。

[0025] 可用于目标免疫检查点或MSDC的抗体的类型可具有任何同型。它们可人源化或嵌合或其它哺乳动物或动物。它们可结合到其它部分如毒素。它们可为单克隆或多克隆。它们可为单链抗体、抗体的片段或部分。

[0026] 用于治疗剂的授予模式可为本领域这使用的的那些。实例包括口服、局部、吸入和注射。用于授予的部位包括上表皮或局部、经鼻授予、动脉内、关节内、心内、肌内、皮内、病灶内、骨内输注、腹膜内、鞘内、子宫内、阴道内授予、静脉内、膀胱内灌注、玻璃体内、皮下、经皮、经粘膜、avitreal、皮下、经皮和经粘膜。

[0027] 可经治疗的哺乳动物包括易患肿瘤、血液癌、细菌感染或病毒感染的哺乳动物中的任一种。这些包括:南美刺豚长尾刺豚鼠(以前称为普氏蹄蝠)、羊驼、食蚁兽、大食蚁兽、犰狳、南方(以前称为拉普拉塔)三带球犰狳、缟獾、懒熊、熊、安第斯或有眼睛条纹的眼睛熊、河狸、美洲河狸、野牛、美洲野牛(仅SCBI Front Royal)、山猫-狞猫、猫、渔猫、豚鼠、岩豚鼠、猎豹-非洲猎豹、云豹-有云豹、南美浣熊-白鼻浣熊、疣猴、黑色和白色或东非黑白疣猴、母牛、赫勒福德种牛-温带黄牛、母牛、霍尔斯坦种乳牛-温带霍尔斯坦种乳牛、鹿、缅甸眉杈鹿(坡鹿(Eld's deer))-坡鹿(Cervus eldi thamin)(仅SCBI Front Royal)、鹿、簇毛冠鹿、(仅SCBI Front Royal)、八齿鼠-灌丛八齿鼠、驴、微型非洲野驴、大象、亚洲象、象鼩、短耳象鼩、雪貂、黑足鼬、羚羊-鹿瞪羚、长臂猿、白颊长臂猿、山羊、尼日利亚矮山羊、山羊、努比亚黑山羊、山羊、圣克利门蒂岛-圣克利门蒂岛黑山羊、大猩猩、威斯登低地大猩

猩、猪、奥斯本岛野猪、马、普氏家马或普氏野马、蹄兔-非洲蹄兔、狐猴、环尾狐猴、红色正面褐狐猴(棕色 狐猴的亚种)-褐狐猴、狐猴、红领狐猴、狮子、非洲巴巴里狮、猕猴、西里伯斯(以前称为苏拉威西)黑冠猕猴、狮尾猴、(白头狨猴或丛生耳狨猴)-狨猴、猫鼬-狸属、鼯鼠、达马拉兰隐鼠、鼯鼠、裸鼯鼠、猴、黑吼猴-黑吼猴(black howler-*Alouatta caraya*)、猫鼬、侏獾、中亚野驴、波斯野驴(仅SCBI Front Royal)、猩猩、婆罗洲类人猿、猩猩、苏门答腊-婆罗洲类人猿、羚羊、弯角羚羊、水獭、亚洲小爪水獭、水獭、北美河流水獭、熊猫、大熊猫、红色小熊猫、野猪、带圈西貘、豪猪、巴西树豪猪、草原土拨鼠、土拨鼠、兔、银狐-穴兔、狐尾猴、圭亚那(灰头)白脸狐尾猴、海豹、灰色海豹、合趾长臂猿、树懒、两趾树懒、松鼠、普雷沃斯特松鼠、绢毛猴、金狮-狨叶猴、绢毛猴、金头狮面狨、马岛狨、大马达加斯加大马岛狨、小马达加斯加刺狨、虎、苏门答腊虎、狨、暗黑伶猴、树鼯、北方树鼯、狼、鬃鬣狼和斑马、细纹斑马、宠物、耕畜,并且野生动物可如同人类一样治疗。

[0028] 试剂盒通常为封装或包含多种组分的隔开或未隔开的容器。组分可为分开的或混合的。它们可为药剂和/或递送装置和/或说明书。它们可包括混合容器或装置。

[0029] 厌氧诺维梭菌的芽孢还可与此处描述的另一药剂组合使用。添加梭菌属芽孢实现在荷瘤个体中任意甚至较高水平的存活,即使其单独不如其它治疗有效。投予的芽孢量可为例如 10^5 至 10^9 , 10^6 至 10^8 , 或 1×10^7 至 10^8 /小鼠。在一个实施例中芽孢的量为 5.0×10^7 /小鼠。Balb/c小鼠平均约20g30g。芽孢的量可根据接受者的体重按比例调整。

[0030] 虽然还不知道芽孢的精密作用机制,但是众所周知诺维梭菌-NT感染可诱发具体对抗已感染的肿瘤诺维梭菌-NT的CD8⁺T细胞介导适应性免疫反应。此外,众所周知,来自诺维梭菌-NT-治愈小鼠的CD8⁺T细胞可在肿瘤特定方式中赋予过继抗扰性。因此CD8⁺T细胞参与有益的影响。参见Agrawal等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A.)》,2004年10月19;101(42):15172-----15177。一个假说为经由细菌感染诱发稳定性炎性应答反应一般来说促进适应性免疫反应(对抗细菌和肿瘤细胞两者)。

[0031] 虽然申请人不希望受关于所述作用机制的任意理论束缚,有理由假定,为了生成有效抗肿瘤免疫反应,两种至关重要组分应当在合适的位置:(a)如果强肿瘤抗原不存在,强肿瘤抗原或稳定炎症反应以增强适应性抗肿瘤免疫反应(如可以经由诺维梭菌NT感染提供);及(b)未通过免疫检查点灭活的细胞毒性T细胞(如可以由抗PD-1/抗CTLA/4抗体治疗提供)或MDSC(如可由恩替诺特/5-阿扎胞苷提供)。

[0032] 当前的临床研究表明,表观遗传调节对于一小部分的具有非小细胞肺癌(NSCLC)(36)的患者发挥主要治疗作用。其它研究已表明5-阿扎胞苷上调关于先天性和适应性免疫两者的基因和路径和关于在NSCLC系(35)中的免疫逃避基因。具有免疫检查点阻断这些至关重要研究以及当前的临床试验引起在NSCLC患者中组合PD-1抗体、5-阿扎胞苷和恩替诺特的临床试验的开始(<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01928576?term=entinostat+pd-1&rank=1>)。确定在肿瘤细胞中的基因表达的变化和在该试验中MDSC的数量和功能的变化两者的重要性是有意义的。我们的观察结果引起多个问题。举例来说,通过表观遗传和PI3K抑制剂MDSC的选择性抑制的基本机制是什么?靶向免疫抑制细胞的其它方法(例如骨髓抑制性药剂)可与免疫检查点阻断具有协同作用以便彻底的根除实体肿瘤及其转移灶吗?在免疫检查点阻断之前用表观遗传抑制剂起动,与如在当前研究中进行伴随两种投予一样起作用?解决这些问题的实验可引起产生利用抗扰性能力的更有

效疗法。

[0033] 以上公开内容通常描述本发明。本文公开的所有参考文件以引用的方式明确地并入。参考以下具体实例可获得更彻底的理解,仅出于说明的目的在本文提供实例,并且并不旨在限制本发明的范围。

[0034] 实例1

[0035] 材料和方法

[0036] 试剂。具有L-麸酰胺酸的海克隆RPMI 1640和McCoy's 5A购自英杰生命技术公司(Invitrogen Life Technologies)。海克隆胎牛血清(FBS)购自赛默科技(Thermo Scientific)。来自溶组织梭菌的胶原蛋白酶,类型IV购自西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich)。所述以下抗体和试剂用于动物实验:mCD152(mCTLA-4)单克隆抗体(9H10, BioXCell),mPD-1单克隆抗体(RMP1-14, BioXCell),mCD25单克隆抗体(PC61.5.3, BioXCell),mLy6G单克隆抗体(RB6-8C5, BioXCell),多克隆HampsterIgG(BioXCell),恩替诺特(BPS生物科学(BPS Bioscience)),5-氮杂胞苷(Invivogen)。

[0037] 细胞系。4T1(CRL-2539,鼠乳腺肿瘤细胞)和CT26(CRL-2638,鼠结肠直肠腺癌)购自ATCC。肿瘤细胞系两者在补充有10%胎牛血清的McCoy's 5A中在37℃、5%CO₂下生长。

[0038] Illumina基因组DNA文库的制备。基因组DNA文库按照Illumina's(Illumina)的推荐方法使用以下更改制备。2μg至3μg基因组DNA用TE稀释至最终100μl体积并且在Covaris超声发生器(Covaris)中剪切至200bp的平均尺寸。DNA然后用Nucleospin试剂盒(Macherey-Nagel)纯化,并且利用50μl洗脱缓冲液洗脱。除非另外指出,否则用于以下步骤的全部试剂来自新英格兰生物实验室(New England Biolabs)(NEB)。45μl经纯化的DNA然后与40μl ddH₂O、10μl的末端修复缓冲液和5μl的末端修复酶缓冲液混合。混合物在20℃下培育30min,由凯杰PCR纯化试剂盒(凯杰(Qiagen))纯化并且用升温至70℃的42μl洗脱缓冲液(EB)洗脱。然后末端修复反应为使用42μl的末端修复的DNA、5μl的10×dA加尾反应缓冲液和5μl克列诺片段(3'至5'外)进行A加尾,并且在37℃培育30min,然后利用MinElute PCR纯化试剂盒(凯杰)纯化。经纯化的DNA利用27μl的65℃的EB洗脱。用25μl的A加尾的DNA、10μl的PE接合体(Illumina)、10μl的5X接合缓冲液和5μl的快速T4接合酶执行接合体接合。将接合混合物在20℃下培育15分钟。使用通过将50μl的接合混合物与来自NucleoSpin萃取物II试剂盒(克隆科技公司)的200μl的NT缓冲液混合并且装载至NucleoSpin柱中进行纯化。柱在台式离心中在14,000g离心1min,用600μl的洗涤缓冲液(来自克隆科技公司(Clontech)的NT3)洗涤一次,并且再次离心2min至完全无水。在包含于试剂盒中的50μl洗脱缓冲液中洗脱DNA。经纯化接合DNA在下以下条件进行扩增。大约设置10次反应,由以下组成,32.5μl H₂O、2.5μl (DMSO)、10μl的5X PhusionHF缓冲液、含有10mM各dNTP的1.0μl的dNTP混合物、0.5μl的Illumina PE引物#1、0.5μl的Illumina PE引物#2、0.5μl的Hotstart Phusion聚合酶、和5μl的接合DNA。使用的PCR程序是:98℃1分钟;98℃的20秒,65℃30秒,72℃30秒的10次至16次循环;以及72℃5min。反应然后汇聚并且用来自NucleoSpin萃取物II试剂盒的PCR产品和NT缓冲液的1:2的混合物纯化,并且经含在试剂盒内的方案纯化。文库DNA利用70℃洗脱液洗脱,DNA浓度用nanodrop通过260nm处的吸光度来评估,并且然后样品进行Sureselect外显子组分离。

[0039] 外显子组捕获。小鼠外显子组按照来自安捷伦SureSelect双端小鼠外显子组试剂

盒(安捷伦(Agilent))的方法捕获,具有以下更改。(1)制备杂化混合物,其含有25 μ l的SureSelect Hyb#1、1 μ l的SureSelect Hyb#2、10 μ l的SureSelect Hyb#3、和13 μ l的SureSelect Hyb#4。(2)3.4 μ l (0.5 μ g)的上述PE-文库DNA、2.5 μ l的SureSelect阻断#1、2.5 μ l的SureSelect阻断#2和0.6 μ l的阻断#3;加入在384孔钻石PCR板(目录号AB-1111、热-科学)中的一个凹孔中,用2层的微安培透明胶粘膜(目录号4306311;ABI)密封,并且在95 $^{\circ}$ C放入GeneAmp系统9700(生命科学公司)中5min,然后保持在65 $^{\circ}$ C(在其上加盖)。(3)来自步骤(1)的25 μ l的杂化缓冲液在具有加热盖的另一个密封板中在65 $^{\circ}$ C下加热至少5min。(4)5 μ l的SureSelect寡聚捕获文库(SureSelect Oligo Capture Library)、1 μ l的不含核酸酶的水和1 μ l经稀释之RNA酶阻断(A 1:1RNA酶阻断、不含核酸酶的水混合)混合并且在另一个密封384孔板中在65 $^{\circ}$ C下加热2min。(5)在65 $^{\circ}$ C保持全部反应,来自步骤(3)的13 μ l的杂化缓冲液快速加入至来自步骤(4)的7 μ l的SureSelect捕获文库混合物,然后和来自步骤(2)的文库的全部内容物(9 μ l)。混合物上下吹打10次。(6)384孔板紧紧地密封并且杂化混合物在65 $^{\circ}$ C用加热盖培育24小时。在杂化之后,执行5个步骤以恢复和扩增捕获的DNA文库:

(1)50 μ l的Dyna1 MyOne抗生蛋白链菌素C1磁珠(CAT#650.02,Invitrogen Dynal英杰)放入1.5ml微量离心套管中并且剧烈在涡流混合器上再悬浮。珠粒经添加200 μ l的SureSelect结合缓冲液洗涤3次,在涡旋式混合器中混合五秒,并且然后在清除上清液之后,放入在戴诺磁性隔板中套管中。在第三次洗涤之后,珠粒在200 μ l的SureSelect结合缓冲液中再悬浮。(2)为了结合捕获的DNA,上述全部杂化混合物(29 μ l)直接从热循环仪传送至珠粒溶液并且紧接着翻转4次以混合;杂化混合物/珠粒溶液然后在Eppendorf热混合器中以850rpm在室温下培育30min。(3)为了洗涤珠粒,在施加Dyna1磁性隔板之后从珠粒去除上清液,并且珠粒经由在涡流混合器上混合4秒在500 μ l SureSelect洗涤缓冲液#1中再悬浮并且在室温下培育15min。在磁性分离之后,然后从珠粒去除洗涤缓冲液#1。在65 $^{\circ}$ C下培育10min之后,珠粒进一步洗涤3次,每一次用500 μ l预升温的SureSelect洗涤缓冲液#2。在最终洗涤之后,SureSelect洗涤缓冲液#2完全去除。(4)为了洗脱捕获的DNA,珠粒悬浮于50 μ l SureSelect洗脱缓冲液,涡流-混合并且在室温下培育10min。在磁性分离之后去除上清液,收集在新1.5ml微量离心机套管中,并且与50 μ l的SureSelect中和缓冲液混合。利用凯杰MinElute柱纯化并且在17 μ l的65 $^{\circ}$ C缓冲液EB中洗脱以得到15 μ l的捕获DNA文库。(5)捕获的DNA文库按照以下方法扩增:大约15次PCR反应,每一个含有9.5 μ l的H₂O、3 μ l的5x Phusion HF缓冲液、0.3 μ l的10mM dNTP、0.75 μ l的DMSO、0.15 μ l的Illumina PE底涂剂#1、0.15 μ l的伊路米那PE底涂剂#2、0.15 μ l的Hotstart Phusion聚合酶并且设置1 μ l的捕获的外显子组文库。使用的PCR程序是:98 $^{\circ}$ C 30分钟;98 $^{\circ}$ C 10秒,65 $^{\circ}$ C 30秒,72 $^{\circ}$ C、30秒的14次循环;以及72 $^{\circ}$ C 5min。为了纯化PCR产品,225 μ l的PCR混合物(来自15次PCR反应)与来自NucleoSpin 萃取物II试剂盒的450 μ l的NT缓冲液混合并且如上文所描述纯化。最终文库DNA用30 μ l的65 $^{\circ}$ C洗脱缓冲液洗脱并且DNA浓度由OD₂₆₀量测估计。

[0040] 用于定序分析的cDNA的制备。使用两轮聚-A选择使用Dyna1寡脱氧胸苷酸磁珠按照制造商方法(生命技术)由5 μ g至10 μ g总RNA制备mRNA,并用13 μ l的洗脱缓冲液洗脱第二次。双链(ds) cDNA使用上标ds-cDNA试剂盒(英杰公司(Invitrogen))制备,具有以下更改。12 μ l的分离的mRNA添加到2 μ l的50ng/ μ L随机六聚体并且在处70 $^{\circ}$ C培育10分钟,然后放在冰上。4.4 μ l的5X第一链缓冲液、2.2 μ l的0.1 M DTT和1.1 μ l的10mM dNTP混合物添加到套管

并且45℃培育2分钟,在其上添加 1.5μl的SSII酶并且全部混合物再培育1小时,并且然后放在冰上。经由添加90μl的ddH₂O、30μl 5X第二链缓冲液、3μl的10mM dNTP、4μl的DNA Pol I、1μl的RNaseH和1μl的大肠菌DNA接合酶至第一链反应制得第二链cDNA。然后混合物在16℃培育2小时,在之后添加2μl的T4接合酶并且再培育5分钟。所得cDNA然后使用凯杰PCR纯化试剂盒按照制造商的说明书纯化,并且用每次50μl的70℃洗脱缓冲液洗脱两次。100μl的cDNA按照具有代替基因组DNA的cDNA的基因组DNA文库方法用于构造illumina文库。

[0041] 体细胞突变鉴别。在Illumina GAIIx或HiSeq基因组分析器上对文库进行测序。测序读数用CASAVA (Illumina) 分析并且与小鼠基因组mm9比对。仅当(i)不匹配的碱基由含有在向前方向的至少2个读数和在反方向的2个时四个或四个以上相异对鉴别时不匹配的碱基被鉴别为突变;(ii)含有具体不匹配的碱基的不同标记的数量为总不同标记的至少30%。

[0042] 假定的表达H2-(d)表位的鉴别鉴别的体细胞突变交叉参照对照RNASeq数据以确定哪些突变表达了。通过分离突变残基的上和下游的8个氨基酸,对应于阳性突变的氨基酸变化然后用于突变表位鉴别。这十七个氨基酸序列使用用于到H2-K(d), H2-L(d)和 H2-d(d)潜在9个氨基酸结合剂的netMHC表位鉴别算法(netMHC v3.4)处理。使用的截止值是500nM亲和力或更高,这对应于适中到高亲和力结合剂。如果RNASeq数据的归一化的计数(归一化之长度/百万读数)大于0.5,则基因确定表达。

[0043] 动物模型。动物研究由约翰霍普金斯大学机构动物护理及使用委员会(Johns Hopkins University Institutional Animal Care and Use Committee)审批通过和监管。第6至8周大雌性BALB/c小鼠(哈兰公司实验室(Harlan Laboratories))用于全部动物实验。5×10⁶4T1肿瘤细胞或5×10⁶CT26肿瘤细胞皮下接种到每一小鼠的合宜的侧。在随机化和治疗之前,使肿瘤生长11天。在肿瘤植入后第11天、第13天、第15天、第17天、第20天、第23天和第26天携带CT26的小鼠腹膜内给予10mg/kg的抗PD-1和/或抗CTLA-4抗体,和携带4T1的小鼠在肿瘤植入的第11天、第13天、第15天和第17天后腹膜内给予10mg/kg抗PD-1和/或抗CTLA-4抗体。携带4T1肿瘤的小鼠在肿瘤植入后第12天腹膜内给予单个剂的10mg/kg抗CD25抗体或10mg/kg抗Ly6G抗体用于细胞消耗研究。全部抗体在100μl灭菌的PB中、pH 7.4(英杰生命技术(Invitrogen Life Technologies))稀释至合适浓度。在肿瘤植入后第12天分别以20 mg/Kg和0.8mg/Kg的剂量开始恩替诺特和5-氮杂胞苷治疗。携带4T1的小鼠在第12天、第14天、第16天和第18天腹膜内注入。J32在4T1肿瘤植入的第12天、第14天、第16天和第18天以22mg/kg经由腹膜内注射给予。在结果部分中的指定间隔,从治疗的开始肿瘤测量30天。以长度×宽度²×0.5计算肿瘤体积。

[0044] 转移分析。在肿瘤植入后的第46天,携带4T1肿瘤的小鼠根据IACUC指导原则安乐死。采集肺、肝和脾并且将其固定在10%中性缓冲的福马林溶液(西格玛-奥德里奇)中并且从每组至少三个小鼠统计转移瘤。

[0045] 流式细胞测量术。以下抗体和试剂用于流式细胞测量术:CD16/32 (BD生物科学(BD Biosciences))、CD3e Alexa荧光剂488 (14-C11;BD生物科学)、CD4 Brilliant Violet 421 (GK1.5, BD生物科学)、CD8a PerCP-Cy5.5 (53-6.7, BD生物科学)、CD25 PE (PC61, BD生物科学)、Foxp3 Alexa荧光剂647 (MF23, BD生物科学)、CD11b Alexa荧光剂700 (M1/70, BD生物科学)、I-a/I-e Alexa荧光剂488 (M5/114.15.2, BD生物科学) Ly-6C PerCP-Cy5.5 (A1-21,

BD生物科学)、CD11c PE (HL3, BD生物科学)、F4/80 APC (BM8, Biolegend)、Ly-6G Pacific Blue (1A8, Biolegend)、CD45 Pacific Orange (30-F11, 英杰生命技术), 和存活/死可固定的几乎IR死细胞染色(英杰生命技术)。用LSR II (BD生物科学) 执行流式细胞测量术并且数据利用FACS Diva软件(BD生物科学) 分析。为了评定循环G-MDSC细胞数的水平, 在含或不含5氮杂/恩替诺特的情况下开始抗PD-1/ 抗CTLA-4抗体治疗7天之后从小鼠收集血液样本。从右侧或左侧表面静脉150 μ l的血 收集到K₂EDTA BD微量采血 (BD生物科学)。来自抗凝固的血液样本的RBC使用2ml的 1XBD FACS裂解 (BD生物科学) 即刻裂解3分钟并且样品在冰-冷BD FACS缓冲液 (BD 生物科学) 中洗涤两次。在与存活/死可固定的几乎IR死细胞染色一起培育5分钟之后, 并且利用冰冷BD FACS缓冲液洗涤两次之后, 样品利用合适抗体染色。为了分析, 我们 使用这些细胞指标CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo}F4/80MHCII细胞和总CD45阳性细胞此前的建 立的表现型指标用作共同特性。为了平定瘤内CD8⁺和调节性T细胞群的水平, 淋巴细胞 首先通过在含或不含5-AZA/恩替诺特的情况下开始抗PD-1/抗CTLA-4抗体治 疗7天之 后从小鼠离体的肿瘤样本纯化。简单来说, 原发肿瘤组织经采集、称量和剁碎的至 细微 的片段。在HBSS (英杰生命技术) 中的1mg/ml胶原蛋白酶IV (西格玛-阿尔德里奇) 以 1ml/200mg的肿瘤组织比率添加到每一样品。样品在37 $^{\circ}$ C在直立元通除杂机上培 育30分 钟。所得组织匀浆是0.4 μ m, 过滤, 在冰-冷BD FACS缓冲液 (BD生物科学) 中洗涤3次, 并且5 $\times 10^6$ 个细胞/样品用于抗体标记。使用CD45⁺CD3⁺CD8⁺的此前建立表 现型指标评定CD8⁺T细 胞水平并且整体CD45⁺CD3⁺细胞用作共同特性。使用 CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺的此前建立 表现型指标Treg细胞水平并且整体CD45⁺CD3⁺CD4⁺细胞用作共同特性。

[0046] 细胞分离。使用源自骨髓的抑制细胞分离试剂盒、小鼠 (美天旎生物技术公司 (Miltenyi Biotec)) 和BD FACS Aria III细胞分选器 (BD生物科学) 从脾中分离来自 携带 4T1荷瘤的动物的MDSC。使用CD8a⁺T细胞分离试剂盒II、小鼠 (美天旎生物技术 公司) 和BD FACS Aria III细胞分选器 (BD生物科学) 从用抗PD-1和抗CTLA-4抗体 治疗的携带4T1的动 物的脾中分离CD8⁺细胞。按照制造商的方案和公布方案分离和培育 MDSC、Treg和CD8⁺T细胞 (38, 39)。如通过流式细胞测量术确定的, G-MDSC (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo}F4/80⁻MHC-II⁻) 和CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) 群的纯度大于95%, 并且对于这些 群, 如通过锥虫蓝染色确定的, 存活力大于 95%。

[0047] 体外存活检定。MDSC和CD8⁺T细胞以在补充有10%FBS的RPMI1640介质中的2 $\times 10^6$ 个细胞/毫升涂布在96孔板。CD8⁺T细胞培养基补充有2000U/mL的重组白介素-2 (英 杰生命 技术)。4T1在补充有10%FBS的McCoy 5A中的细胞在96孔板上涂布并且培育 直至它们达到 >70%融合度。细胞利用恩替诺特、5-氮杂胞苷或J32在浓度范围0 μ M至 50 μ M在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下培育24小时。通过用10% (v/v) 细胞增殖试剂WST-1 (罗氏 应用科学 (Roche Applied Science)) 将细胞在37 $^{\circ}$ C下培育3小时并且测量所得甲腊产 品的OD₄₅₀吸光度测量活细胞比 例。

[0048] IFN- γ 检定。刚从携带4T1荷瘤的动物分离的MDSC和CD8⁺T细胞以MDSC比上CD8⁺T 细胞比率5:1、2:1、1:1、1:2和1:5在2000U/mL和重组IL-2 (英杰生命技术) 存在 下和CD3/ CD28抗体涂布珠粒 (Miltenyi) 存在下培育。MDSC和CD8⁺T细胞利用浓度范 围0 μ M以0.25 μ M 的恩替诺特以1:1比率培育。在37 $^{\circ}$ C下24小时培育之后收集无细 胞上清液并且使用小鼠 IFN- γ DuoSet Elisa开发试剂盒 (R&D系统 (R&D Systems)) 根 据制造商的说明测定IFN- γ

水平。

[0049] MDSC消耗和过继转移。为了体内消耗MDSC,携带4T1荷瘤的小鼠用单个药团的mLy6G 单克隆抗体在肿瘤植入11后以10mg/kg腹膜内投予治疗。为了MDSC的过继转移,收集来自携带4T1的小鼠的脾并且MDSC利用骨髓-衍生抑制细胞分离试剂盒纯化,小鼠(美天旌生物技术公司)。在两种序列的色谱柱纯化之后,细胞在冰-冷1×PBS(英杰生命技术)中洗涤两次并且细胞浓度调节至 1×10^8 个细胞/毫升。如利用锥虫蓝染色检验的,细胞存活率大于95%并且如经由流式细胞测量术确定的细胞纯度大于90%。即刻按照分离, 1×10^8 个细胞/毫升的100 μ l的MDSC在4T1肿瘤植入后的第11天、第13天和第15天经由拖尾静脉注入投予。

[0050] 免疫荧光。根据JHU IUCAC指导原则将小鼠安乐死,并且来自4T1荷瘤的小鼠的原发肿瘤使用灭菌的一次性手术解剖刀(Bard-Parker)离体。离体组织放入充满组织-Tek 低温-10月(Andwin科学)碱模具中并且在-80℃储存直至使用。使用Leica CM3050 S 低温恒温器(徕卡生物系统(Leica Biosystems))切片冻结的组织,并且利用4%多聚甲醛(阿法埃莎(Alfa Aesar))、0.3%Triton X-100(西格玛-奥德里奇)在1X PBS(英杰生命技术)中固定组织10分钟。切片利用0.05%吐温-20(西格玛-奥德里奇)在1X PBS中洗涤3次,随后利用0.05%吐温-20在1X PBS中进行三个5分钟洗涤。利用3%BSA(西格玛-奥德里奇)、0.05%吐温-20在1X PBS中阻断组织30分钟,随后利用10%普通山羊血清(英杰生命技术)再阻断30分钟。阻断的组织在抗CD8(YTS 169.4,Abcam)中或以浓度为1:50、1:100和1:200的抗Ly6G(RB6-8C5,Abcam)中在4℃下培育过夜。在过夜之后,利用初级抗体染色,切片利用0.05%吐温-20在1×PBS中洗涤3次并且与1:500山羊抗大鼠AF488(英杰生命技术)或山羊抗大鼠AF594(英杰生命技术)二级抗体在20℃下一起培育1小时。利用0.05%吐温-20在1×PBS中切片洗涤5次,在放入盖玻片之前,一滴Gold/DAPI(英杰生命技术)添加到组织样本,并且切片在4℃下在暗处储存。为了成像,使用尼康C1激光扫描共焦系统(Nikon C1 Laser Scanning Confocal System),其包括用于尼康C1共焦v.2.30的ECLIPSE TE2000-E显微镜和EZ-LIMO。

[0051] 反转录PCR(RT-PCR)。 5×10^6 个CT26或4T1细胞在0.75ml Trizol LS试剂(英杰生命技术)和0.25ml氯仿(西格玛-阿尔德里奇)中再悬浮。样品涡动15秒并且在20℃下培育10分钟。在4℃下12000g离心15分钟之后,收集上水相并且添加0.5ml的100%异丙醇(西格玛-奥德里奇)。随后样品在4℃下12000g离心10分钟,在10分钟之后培育20℃。所得球粒风干持续小于10分钟,并且利用无RNA酶的水(英杰生命技术)再悬浮至最终浓度的500ng/ μ l。使用具有铂TaqDNA聚合酶(英杰生命技术)上标III单步RT-PCR系统执行PCR。对于H-2D(d)、 β 2m和TAP1,退火温度设定在55℃,并且对于 β 肌动蛋白设定为60℃。在1%琼脂糖胶上分析样品。以下引物用于RT-PCR: H-2D(d)前向5'-agggcaatgagcagagtttc-3'(SEQ ID NO:1)、H-2D(d)反向5'-CCACGTTTTTCAGGTCTTCGT-3'(SEQ ID NO:2)、 β 2m前向5'-ATTCACCCCACTGAGACTG-3'(SEQ ID NO:3)、 β 2m反向5'-GCTATTCTTTCTGCGTGCAT-3'(SEQ ID NO:4)、TAP1前向5'-GAGACATGCTGTGTCGGATG-3'(SEQ ID NO:5)、TAP1反向5'-TGGTGAGAATGGACATGAGC-3'(SEQ ID NO:6)、 β -肌动蛋白前向5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTTGCCG-3'(SEQ ID NO:7)、 β -肌动蛋白反向5'-TGGATGGCTACGTACATGGCTGGG-3'(SEQ ID NO:8)。

[0052] 统计。用Prism 5.0 (GraphPad软件公司 (GraphPad Software, Inc)) 执行全部 统计分析。首先用双向ANOVA分析原发肿瘤生长曲线, 并且每个组与两种加尾的威尔科 克森秩和检验 (Wilcoxon rank-sum test) 进行比较。用对数秩测试分析卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 存活曲线。转移性病变、流动式细胞测量术分析和体外测定的统计显 著性用两种加尾威尔科克森秩和检验评定。

[0053] 实例2

[0054] 基因分析。首先我们测序CT26和4T1细胞这两者的外显子组 (24,306个基因)。产生序列的八和3.5千兆碱基分别映射至用于CT26和4T1的基因组。在靶向区域中83.5% (CT26) 和72.3% (4T1) 的碱基通过在肿瘤DNA中的至少10个唯一读数涵盖。外显子组 的测序揭示分别在CT26和4T1中的683和47体细胞突变。

[0055] 已示出由在人类结肠直肠和乳癌中的体细胞突变创建的~10%的突变氨基酸引起表 位, 其预测待经由患者的MHC-I等位基因 (17) 识别。为了确定是否为真实的鼠结肠直肠 (CT26) 和乳腺 (4T1) 肿瘤, 我们使用建立的算法将体细胞突变表位映射至BALB/c MHC-I。如此, 仅当突变基因表达时预测才有意义, 我们使用RNA-seq确定两种细胞系 的转录组。在出现于已表达基因中的CT26中检测的683个突变体的三百一十四, 其中 28个突变表位预测利用至少适中亲和力结合至在BALB/c小鼠发现的H2- (d) MHC-I等位 基因 (表1) 中。4T1细胞在已表达基因中持有27个突变体, 其中仅一个预测结合到 H2- (d) MHC-I等位基因。这些数据符合暗示: CT26比4T1更为免疫原性, 因为形成体具 有更为突变的表位。其还符合观测: 与环境诱变剂 (如UV光和香烟烟雾) 关联的人类 肿瘤具有比其它肿瘤更多突变体 (18)。

[0056] 表1. 通过基因组和转录组分析预测的突变MHC-I表位

CT26 肿瘤细胞				4T1 肿瘤细胞			
名称	表位	亲和力 (nM)	H-2 等位 基因	名称	表位	亲和力 (nM)	H-2 Allele
AE2f8	SGPSYATYL	362	H-2Dd	Qars	FPPDAINNF	27	H-2Dd
Haus6	SYETLKKS	21	H-2Kd				
Slc20a1	SYTSYIMAI	28	H-2Kd				
Se111	RYWTGIGVL	46	H-2Kd				
Glud1	AYVNAIEKI	49	H-2Kd				
Noc31	SYIKKLKEL	58	H-2Kd				
Eml5	HYLNDGDAI	66	H-2Kd				
Gnas	KVLAGKSTI	74	H-2Kd				
Mtor	HHTMMVQAI	126	H-2Kd				
Map3k5	AYALNRRNL	131	H-2Kd				
Slc20a1	SYIMAICGM	146	H-2Kd				
[0057]	Dhx35	211	H-2Kd				
	Pigo	265	H-2Kd				
	Ptpn13	311	H-2Kd				
	Qsox1	316	H-2Kd				
	Tars12	332	H-2Kd				
	Anks6	338	H-2Kd				
	Slc41a2	365	H-2Kd				
	Pdgfra	404	H-2Kd				
	Rwdd2b	432	H-2Kd				
	Vps26b	460	H-2Kd				
	Qsox1	496	H-2Kd				
	Phf3	5	H-2Ld				
	Trim26	112	H-2Ld				
	Zfp449	115	H-2Ld				
	Csnk2b	184	H-2Ld				
	Zeb1	272	H-2Ld				
	Ttc15	485	H-2Ld				

[0058] 实例3

[0059] 免疫检查点阻断的效应。然后我们测试在来源于在小鼠中的这些细胞的肿瘤上的免疫检查点阻断抗体的效应。适中尺寸($\sim 400\text{mm}^3$)的携带皮下CT26肿瘤的BALB/c小鼠用于初步实验。虽然用抗CTLA-4或抗PD-1抗体如单个药剂延迟肿瘤生长反复治疗,未观测到肿瘤根除(图1A和图1B)。用两种抗体的组合疗法在大部分的小鼠中产生根除肿瘤。相反,大于 600mm^3 肿瘤不对结合的抗PD-1/抗CTLA4治疗作出反应(图1C),其中11个中仅4个示出长期存活(图1D)。

[0060] 随后,进行评价具有良好确立的4T1肿瘤的BALB/c小鼠($\sim 400\text{mm}^3$);这些肿瘤自发地转移至肺和其它器官。4T1肿瘤模型多数治疗剂高顽抗对大,包括免疫疗法(16)。动物通常死亡于转移性疾病,甚至当原发肿瘤以手术方式去除时(19)。较少数量的原发肿瘤示出对抗体治疗的持久反应。类似于具有大量CT26肿瘤的小鼠,在用抗PD-1和抗CTLA-4抗体治疗时,10个动物中仅3个示出完全的消退它们的原发肿瘤,并且仅这些是长期存活者(图1E和1F)。

[0061] 实例4

[0062] 表观遗传调节。我们假设,在动物中的未治愈的肿瘤可通过在肿瘤细胞中的表观

遗传沉默下调MHC-I-相关基因的表达。实际上,该假定形成用于包含表观遗传调节(20)疗法的基础,该疗法使用或DNA甲基转移酶或组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)的抑制剂。为了评估该可能性,我们利用抗PD-1/抗CTLA-4抗体以及5-氮杂胞苷(AZA、DNA甲基转移酶抑制剂)和恩替诺特(ENT、I类HDAC抑制剂)治疗如上文所描述的携带大量CT26 肿瘤($>600\text{mm}^3$)的动物。肿瘤对这疗程响应明显地好,在11小鼠中的10个中根除原发肿瘤并且在肿瘤植入60天之后100%存活(图1D)。类似地,对抗PD-1/抗CTLA-4加氮杂/ENT治疗,具有4T1肿瘤($\sim 400\text{mm}^3$)的小鼠示出在治疗第三周之后彻底的消退 全部原发肿瘤并且在肿瘤植入之后80%存活100天(图1E和1F)。当使用恩替诺特时观测到临时自我限制毒性,如由体重变化指示D。然而,添加抗PD-1/抗CTLA-4抗体并不 添加毒性。

[0063] 实验的同时,我们如上文所描述治疗4T1荷瘤的小鼠,但在肿瘤植入第6周之后处死它们。然后我们检测它们的原发肿瘤以及肺和其它器官的转移。在用抗PD-1/抗CTLA-4抗体加AZA/恩替诺特治疗的所有小鼠中根除原发肿瘤,并且它们中没有示出任意癌转移(图1G和表2)。相比而言,利用抗PD-1/抗CTLA-4治疗的全部5个小鼠仍独自具有大量原发肿瘤和平均11个肺癌转移灶。我们还用抗PD-1/抗CTLA-4抗体加恩替诺特或AZA任一者治疗荷瘤的小鼠。在用抗PD-1/抗CTLA-4抗体加恩替诺特治疗的任何小鼠中未发现肿瘤或转移灶,表明当与PD-1/CTLA-4双阻断结合时,I类HDAC抑制剂单独(在无DNA甲基化抑制剂的情况下)足以根除原发肿瘤和转移这两者(图1G和表2)。在用抗PD-1/抗CTLA-4抗体加氮杂治疗的小鼠中,未根除原发肿瘤,不过未观测到转移灶。在无PD-1/CTLA-4抑制的情况下,恩替诺特、氮杂,单独或在组合中,不能够根除原发肿瘤或转移(图1G和表2)。当不施加PD-1/CTLA-4抑制时,转移性病灶在除在肺中的那些之外,还在多个器官中观测到。

[0064] 表2. 4T1原发肿瘤和转移性病灶

[0065]

处理组	治疗组	小鼠编号	原发肿瘤体积 (mm ³)	肺转移	肝转移	脾转移
P+C	AZA+ENT	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
		4	0	0	0	0
		5	0	0	0	0
		平均值	0	0	0	0
		标准差	0	0	0	0
P+C	ENT	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
		4	0	0	0	0
		5	0	0	0	0
		平均值	0	0	0	0
		标准差	0	0	0	0
P+C	AZA	1	435	0	0	0
		2	595	0	0	0
		3	1069	0	0	0
		4	754	0	0	0
		平均值	713	0	0	0
		标准差	271	0	0	0
P+C		1	2221	12	0	0
		2	1768	14	0	0
		3	2456	21	0	0
		4	577	0	0	0
		5	1874	9	0	0
		平均值	1779	11	0	0
		标准差	726	8	0	0
AZA+ENT		1	2891	34	10	0
		2	2855	14	0	0
		3	3613	22	49	2
		4	2726	25	0	0
		5	3597	22	7	1
		平均值	3137	23	13	1
		标准差	432	7	20	1
ENT		1	3005	25	10	1
		2	5038	20	3	0
		3	2275	0	0	0
		4	3063	22	6	3
		5	4032	20	0	0
		平均值	3483	17	4	1
		标准差	1070	10	4	1
AZA		1	2345	20	0	0
		2	2454	16	43	3

		3	2477	20	0	1
		4	4358	17	16	0
		5	2117	14	0	0
		平均值	2750	17	12	1
		标准差	910	3	19	1
[0066]	未经治疗	1	4359	32	3	2
		2	3432	28	0	2
		3	3185	18	28	0
		平均值	3659	26	10	1
		标准差	619	7	15	1

[0067] 实例5

[0068] 机制性研究。如上所述,我们预期表观遗传调节剂增加MHC-I-相关基因的表达,从而使得癌细胞更为易被T细胞杀灭。为了测试该期望,我们分析在用AZA、恩替诺特或 两种的组合进行治疗的CT26和4T1细胞中经由反转录聚合酶链反应(RT-PCR)参与MHC-I 表达的基因的表达。MHC-I、 β -2微球蛋白(B2M)和与抗原处理1(TAP1)基因关联的 转运体的表达在无治疗存在下的两个肿瘤细胞系中检测。然而,暴露表观遗传调节剂并 不显著提高表达(图7中的A-D)。

[0069] 然后我们确定,表观遗传调节剂是否影响在肿瘤内T细胞聚积。如经由流式细胞测量术评定的,在PD-1/CTLA-4抑制之后肿瘤浸润的CD8⁺T细胞增加了大约4倍(图2A 和图2B)。添加AZA和恩替诺特不进一步提高肿瘤浸润的CD8⁺T细胞。然而,与未经治 疗的肿瘤或用抗PD-1/CTLA-4抗体治疗的肿瘤相比,在治疗方案中包含AZA和恩替诺特 产生显著肿瘤浸润FoxP3⁺Treg的降低(图2C和图2D)。

[0070] 我们随后通过流式细胞测量术分析MDSC,因为这些源自骨髓的不成熟细胞常常在荷 瘤宿主中较高并且具有强效免疫抑制活动(21,22)。我们发现,与无荷瘤动物相比,4T1 荷瘤小鼠在循环粒细胞MDSC(G-MDSC,被定义为CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo}MHC-II⁻)上具有 5倍至7 倍增加(图2E、图6A和图6B)。还在脾和肿瘤中观测到大量G-MDSC(图6B)。将恩替诺特或AZA 恩替诺特添加到PD-1/CTLA-4抑制产生G-MDSC的循环数量的惊人的 减少,使它们下降至类 似于在非荷瘤小鼠中观测的水平(图2E和图2F)。有趣的是,表 观遗传调节剂单独或AZA加 抗-PD-1/抗CTLA-4抗体未能减量所述G-MDSC。当与免疫检 查点阻断结合时,表观遗传调节 剂还大致上减少肿瘤浸润的G-MDSC的数量(图2G和图 2H)。

[0071] 这些数据符合假定:免疫检查点阻断引起细胞毒素效应T细胞(Teffs)的增大,但 T细胞(Teffs)不是彻底地有作用的,除非免疫抑制细胞经由用表观遗传调节剂治 疗而减少。为进一步测试该假定,我们使用中和抗体对照CD25或Ly6G以分别消耗在携 带4T1肿瘤 的小鼠中的Treg或G-MDSC(23-25)。我们发现当与抗PD-1/抗CTLA-4抗体 组合使用时抗 Ly6G如同表观遗传调节剂有效(图3A)。流式细胞测量术示出在抗Ly6G 治疗之后G-MDSC水 平的实质性减少(图3B)。相比之下,在与免疫检查点阻断结合时抗 CD25治疗仅示出在功效 上的微小改进(图3A)。然而,应注意抗CD25治疗还可影响激 活Teffs,其可瞬时表达CD25。 正如期望,在无免疫检查点阻断情况下,抗CD25和抗 Ly6G是低效的(图3A)。

[0072] 为了直接评估肿瘤诱发的G-MDSC干扰免疫检查点阻断效应的能力,我们通过亲和 纯化从4T1荷瘤的小鼠将其分离。然后我们注入经纯化G-MDSC到用抗PD-1/抗CTLA-4 抗体

加AZA/恩替诺特治疗的4T1荷瘤的小鼠。G-MDSC的过继转移显著减少组合疗法的 应答(图3C)。基于以上结果,我们作出结论,与直接消耗Treg相比,表观遗传调节效 应更为可能消耗G-MDSC的结果。

[0073] 为了调查表观遗传调节是否直接影响G-MDSC,我们纯化来自如上文所描述4T1荷瘤 的小鼠的这些细胞并且在体外用恩替诺特或AZA治疗它们。在以剂量依赖性方式的恩替诺特治疗之后,G-MDSC示出显著地减少存活力(图4A)。相反,AZA在相当浓度上没有 作用(图4B)。我们还用相同浓度的恩替诺特或AZA治疗4T1肿瘤细胞,并且发现它们 无反应的(图4A和图4B)。重要的是,恩替诺特仅在CD8⁺T细胞上具有适度的效应(图 4A),产生大量治疗窗,其中G-MDSC可以消耗同时避开CD8⁺T细胞。最后,我们利用 G-MDSC共同培育CD8⁺T细胞并且在利用CD3和CD28抗体的T细胞活化之后经由酶联免 疫吸附分析(ELISA)分析在培育基中干扰素- γ (IFN- γ) 的浓度。G-MDSC抑制的IFN- γ 分泌(图4C),然而在培育基中包含恩替诺特以剂量依赖性方式逆转抑制(图4D)。这些数据支持概念:G-MDSC直接抑制CD8⁺T细胞的功能并且恩替诺特经由直接遏抑 G-MDSC缓解抑制。

[0074] 为了进一步确认该结论,以及为了提供额外治疗性方法以达到相同目标,我们搜索 可抑制G-MDSC功能的其它治疗剂。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)为已知在造血细胞生物 学中发挥至关重要角色并且可以活化Gr1⁺/CD11b⁺骨髓细胞(26)。我们此前开发PI3K 抑制剂不同阵列并且用高细胞的效能选择测试一个(J32)(27-29)。J32被证明在纳摩 尔浓度(14.3nM的EC₅₀)下对于G-MDSC是细胞毒素并且对CD8⁺T细胞(94.6nM的EC₅₀) 为小得多毒性(图8A)。用相对低剂量的J32(22mg/Kg)与抗PD-1/抗CTLA-4抗体结 合治疗4T1荷瘤的小鼠产生循环G-MDSC显著减少(图8B),并且在80%的动物中根除4T1 肿瘤(图8C)。J32单独对4T1肿瘤生长不具有明显的影响。

[0075] 实例5

[0076] 4T1肿瘤细胞皮下注入到BALB/c小鼠中。在肿瘤细胞注入之后第10天、第12天、第14天和第16天,抗PD-1(10mg/kg)和抗CTLA-4(10mg/kg)抗体以腹膜内方式 注入到第2、3、4和5组的小鼠中。在第11天、第13天、第15天和第17天,恩替诺 特(ENT,20mg/Kg)和5-氮杂胞苷(AZA,0.8mg/Kg)腹膜内注入到第4和5组的小 鼠中。在第13天和第15天,诺维氏梭菌-NT芽孢(50百万/小鼠)直接皮下注入到在 第1、3和5组的小鼠上的4T1肿瘤中。然后密切地跟踪小鼠存活直至肿瘤细胞注入 之后第100天。在图9中示出存活曲线。为了病理的评估,解剖死的小鼠,其总是具有 广泛的肺转移灶。

[0077] 示出在该实验中检查点阻断(抗PD-1/抗CTLA-4)加表观遗传抑制(ENT/AZA)的 功效(50%治愈率)在某种程度上低于示出在之前实例中的治愈率(80%治愈率)。然而, 在该实验中抗PD-1/抗CTLA-4单独的功效较低(此处10%治愈率对之前实例中的30%)。在组 合疗法中观测的功效促进尚未减弱。功效的变化可能由于来自不同制造批次的抗体 的品质。

[0078] 参考文献

[0079] 引用每一参考的公开内容明确地并入本文中。

[0080] 1.Korman AJ,Peggs KS,&Allison JP(2006)在癌免疫疗法中的检查点阻断 (Checkpoint blockade in cancer immunotherapy)《免疫学发展(Advances in immunology)》90:297-339。

[0081] 2.Pentcheva-Hoang t,Corse E&Allison JP(2009),T细胞活化的负向调节因

子:用于癌、自体免疫疾病和持久的感染中治疗性干预的潜在靶标 (Negative regulators of T-cell activation:potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease,and persistent infections),《免疫学评论 (Immunol Rev)》229 (1):67-87。

[0082] 3.Pardoll DM(2012),在癌免疫疗法中的免疫检查点的阻断 (The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy)。《自然评论:癌 (Nat Rev Cancer)》12 (4):252-264。

[0083] 4.Nagaraj S,Youn JI&Gabrilovich DI (2013年) 在源自骨髓的抑制细胞和T细胞之间的倒数关系 (Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells)《免疫学杂志 (J Immunol)》191 (1):17-23。

[0084] 5.Chen L&Flies DB (2013年) T细胞共同刺激和共同抑制的分子机制 (Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition)。《自然》评论《免疫学 (Nature reviews.Immunology)》13 (4):227-242。

[0085] 6.Talmadge JE&Gabrilovich DI (2013年) 源自骨髓的抑制细胞的历史 (History of myeloid-derived suppressor cells)。《自然评论:癌 (Nat Rev Cancer)》13 (10):739-752。

[0086] 7.Lippitz (2013年) 在癌患者中的细胞活素模式:全身的检查 (Cytokine patterns in patients with cancer:a systematic review)《柳叶刀肿瘤学 (Lancet Oncol)》14 (6):e218-228。

[0087] 8.Zou W (2006) 调节性T细胞、肿瘤抗扰性和免疫疗法 (Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy.Nature reviews)。《自然评论,免疫学 (Nature reviews. Immunology)》6 (4):295-307。

[0088] 9.Hodi FS等 (2010) 利用伊派利单抗在转移性黑素瘤患者中改进存活 (Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma)《新英格兰医学杂志 (N Engl J Med)》363 (8):711-723。

[0089] 10.Topalian SL等 (2012) 在癌中的抗PD-1抗体安全、活性和免疫相关因素 (Safety,activity,and immune correlates of anti-PD-1antibody in cancer)《新 英格兰医学杂志 (N Engl J Med)》366 (26):2443-2454。

[0090] 11.Brahmer小等在晚期癌患者中的 (2012) 抗PD-L1抗体安全和活性 (Brahmer JR, et al. (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer)《新英格兰医学杂志 (N Engl J Med)》366 (26):2455-2465。

[0091] 12.Wolchok JD等人 (2013年) 在晚期黑素瘤中的尼沃单抗加伊派利单抗 (Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma)《新英格兰医学杂志 (N Engl J Med)》369 (2):122-133。

[0092] 13.Corbett TH、Griswold DP、Jr.Roberts BJ、Peckham JC&Schabel FM,Jr, (1975) 针对化学疗法测定的在小鼠结肠可移植癌演变中的肿瘤感应关系 (Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays,with a note on carcinogen structure)《癌研究 (Cancer Res)》35 (9):2434-2439。

- [0093] 14.Belnap LP、Cleveland PH、Colmerauer ME、Barone RM&Pilch YH(1979) 化学诱发的鼠结肠癌的免疫原性(Immunogenicity of chemically induced murine colon cancers)《癌研究(Cancer Res)》39(4):1174-1179。
- [0094] 15.Dexter DL等人(1978) 来自单个小鼠乳腺肿瘤的肿瘤细胞的不均匀性(Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor)《癌研究(Cancer Res)》38(10):3174-3181。
- [0095] 16.Pulaski BA&Ostrand-Rosenberg S(1998) 在利用主要组织相容性复合体II类和基于B7.1单元的肿瘤疫苗的免疫疗法之后建立的自发乳房癌转移灶的减少(Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines)《癌研究(Cancer Res)》58(7):1486-1493。
- [0096] 17.Segal NH等人(2008) 乳房和结肠直肠癌的表位前景(Epitope landscape in breast and colorectal cancer)《癌研究(Cancer Res)》68(3):889-892。
- [0097] 18.Vogelstein B等人(2013年) 癌基因组前景(Cancer genome landscapes)《科学(Science)》339(6127):1546-1558。
- [0098] 19.Rashid OM等人(2013年) 切除原发肿瘤经由减少整体肿瘤负荷改进转移性 乳癌的存活(Resection of the primary tumor improves survival in metastatic breast cancer by reducing overall tumor burden)《手术(Surgery)》153(6):771-778。
- [0099] 20.Lampen MH&van Hall T(2011) 在肿瘤中抵消MHC-I缺陷的策略(Strategies to counteract MHC-I defects in tumors)《免疫学当前观点(Current opinion in immunology)》23(2):293-298。
- [0100] 21.Ostrand-Rosenberg S&Sinha P(2009) 源自骨髓的抑制细胞:键联发炎 和癌(Myeloid-derived suppressor cells:linking inflammation and cancer)《免疫学杂志(J Immunol)》182(8):4499-4506。
- [0101] 22.Gabrilovich DI、Ostrand-Rosenberg S&Bronte V(2012) 骨髓肿瘤细胞 的配合调节(Coordinated regulation of myeloid cells by tumours)。《自然评论, 免疫学(Nature reviews.Immunology)》12(4):253-268。
- [0102] 23.Couper KN等人(2009) T细胞群效应子的抗CD25抗体-调节消耗促进小鼠 急性易感性但不是慢性刚地弓形虫感染(Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic Toxoplasma gondii infection)《免疫学杂志(J Immunol)》182(7):3985-3994。
- [0103] 24.Setiady YY、Coccia JA&Park PU(2010) 通过PC61抗CD25单克隆抗体的 CD4+FOXP3+Treg细胞的活体内消耗经由FcγRIII+吞噬细胞调节(In vivo depletion of CD4+FOXP3+Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIII+phagocytes)《欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol)》40(3):780-786。
- [0104] 25.Srivastava MK等人(2012) 在肺癌中骨髓抑制细胞消耗加强抗肿瘤活性(Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer)《公共科学图书馆综合(PLoS One)》7(7):e40677。
- [0105] 26.Schmid MC等人(2011) 受体酪氨酸激酶和TLR/IL1Rs出乎意料地活化骨髓 细

胞PI3kgamma、促进肿瘤发炎和发展的单个汇集点 (Receptor tyrosine kinases and TLR/IL1Rs unexpectedly activate myeloid cell PI3kgamma,a single convergent point promoting tumor inflammation and progression)《癌细胞 (Cancer Cell)》19(6):715-727。

[0106] 27.Schmidt-Kittler O等人(抑制转移的PI3Kalpha抑制剂 (PI3Kalpha inhibitors that inhibit metastasis)《Oncotarget》1(5):339-348。

[0107] 28.Mandelker D等人(2009)使在PI3Kalpha和细胞膜之间互动变化的频繁激酶功能域突变 (A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3Kalpha and the membrane)《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci U S A)》106(40):16996-17001。

[0108] 29.Zheng Z等人(2012)使用未保存氨基酸的活体外突变诱发新类别的磷酸肌醇3-激酶α-选择性抑制剂的结合模式的定义和动力分析 (Definition of the binding mode of a new class of phosphoinositide 3-kinase alpha-selective inhibitors using in vitro mutagenesis of non-conserved amino acids and kinetic analysis)。《生物化学杂志 (Biochem J)》444(3):529-535。

[0109] 30.Dokmanovic M,Clarke C&Markes PA(2007)组蛋白脱乙酰基酶抑制剂:概述和观点 (Histone deacetylase inhibitors:overview and perspectives)《分子 癌研究 (Mol Cancer Res)》5(10):981-989。

[0110] 31.Khan O&La Thangue NB(2012)在癌生物学中的HDAC抑制剂:新出现的机理和临床应用 (HDAC inhibitors in cancer biology:emerging mechanisms and clinical applications)《免疫学和细胞生物学 (Immunology and cell biology)》90(1):85-94。

[0111] 32.Lyko F&Brown R(2005)DNA甲基转移酶抑制剂和表观遗传癌疗法的演变 (DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies)《国家癌研究所杂志 (J Natl Cancer Inst)》97(20):1498-1506。

[0112] 33.Griffiths EA&Gore SD(2008)在骨髓发育不良综合症的治疗中的DNA甲基转移酶和组蛋白脱乙酰基酶抑制剂 (DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes)《Semin 血液学 (Semin Hematol)》45(1):23-30。

[0113] 34.Baylin SB&Jones PA(2011)探究癌表观基因组-生物和转译含义的十年 (A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications)《自然评论:癌 (Nat Rev Cancer)》11(10):726-734。

[0114] 35.Wrangle J等人(2013年)利用氮杂胞苷的非小细胞肺癌免疫反应的变化 (Alterations of immune response of non-small cell lung cancer with Azacytidine)。《Oncotarget》4(11):2067-2079。

[0115] 36.Juergens RA等人(2011)表观遗传疗法组合在具有顽固性晚期非小细胞肺癌患者中具有功效 (Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer)《癌发现 (Cancer Discov)》1(7):598-607。

[0116] 37.Pulaski BA,Ostrand-Rosenberg S,小鼠4T1乳房肿瘤模型《免疫学最新 方案

(Mouse 4T1 breast tumor model.Current protocols in immunology)》/由John E Coligan[等人]编,2001;第20章:第202单元。

[0117] 38.Youn JI、Collazo M、Shalova IN、Biswas SK、Gabrilovich DI在携带荷 瘤的小鼠中的自然粒细胞源自骨髓的抑制细胞的表征 (Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice)白细胞生物学杂志 (Journal of leukocyte biology),2012;91:167-81。

[0118] 39.Hamilton MJ、Banath JP、Lam V、Lepard NE、Krystal G、Bennewith KL 血清抑制源自骨髓的抑制从携带4T1荷瘤的小鼠中分离细胞的免疫抑制功能 (Serum inhibits the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells isolated from 4T1 tumor-bearing mice)《癌免疫学,免疫疗法:CII (Cancer immunology, immunotherapy:CII))。2012;61:643-54。

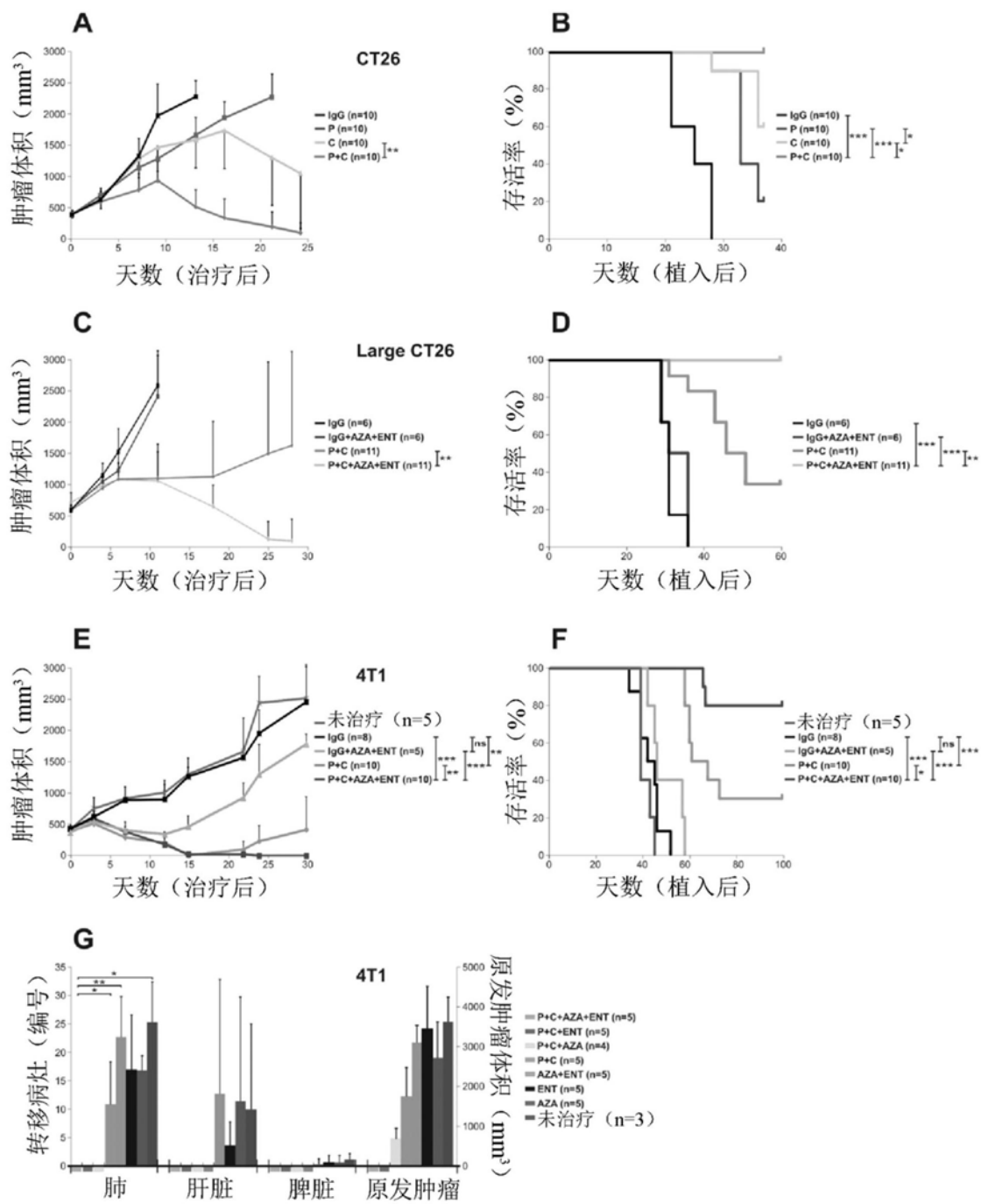


图1A-1G

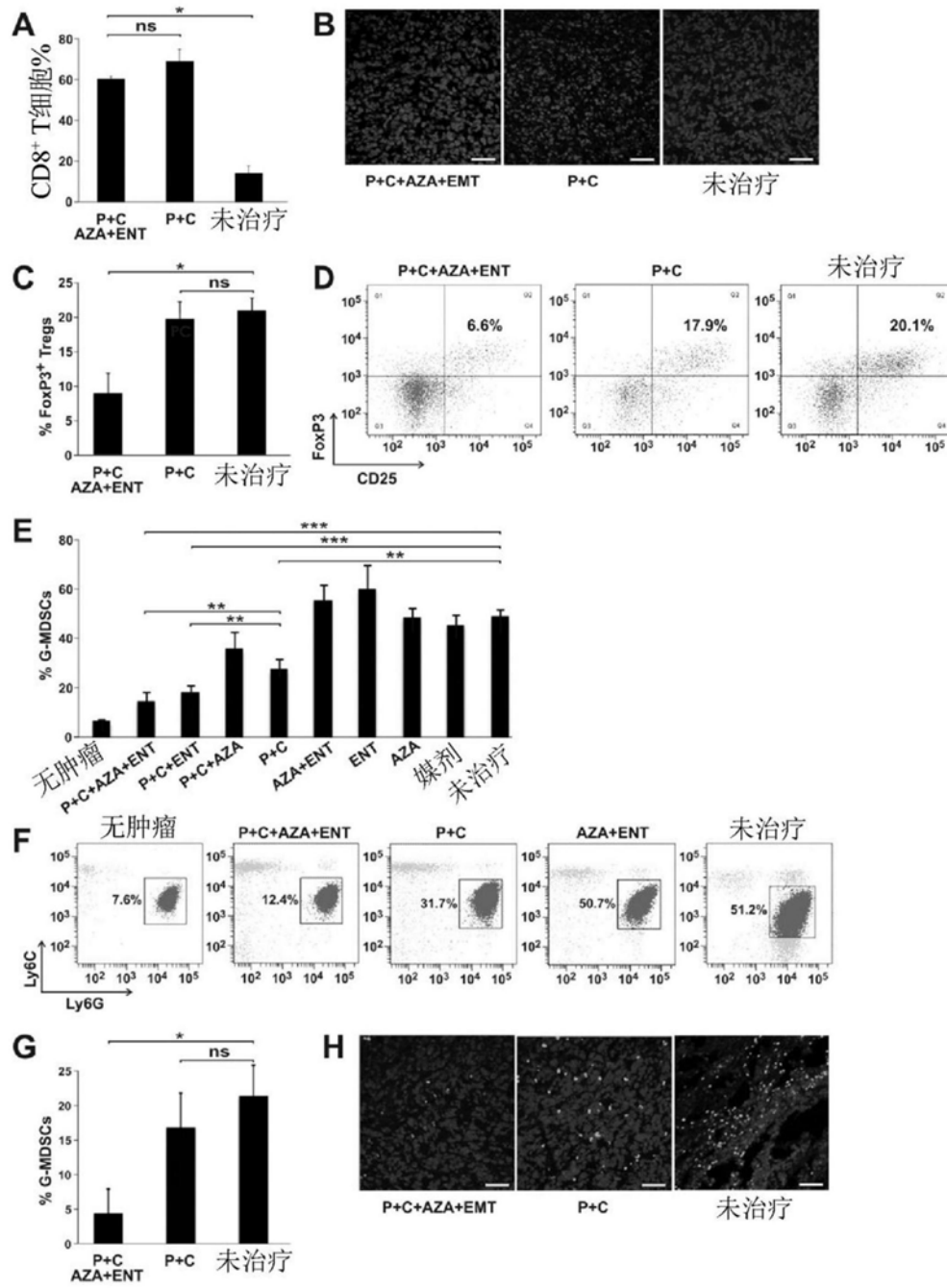


图2A-2H

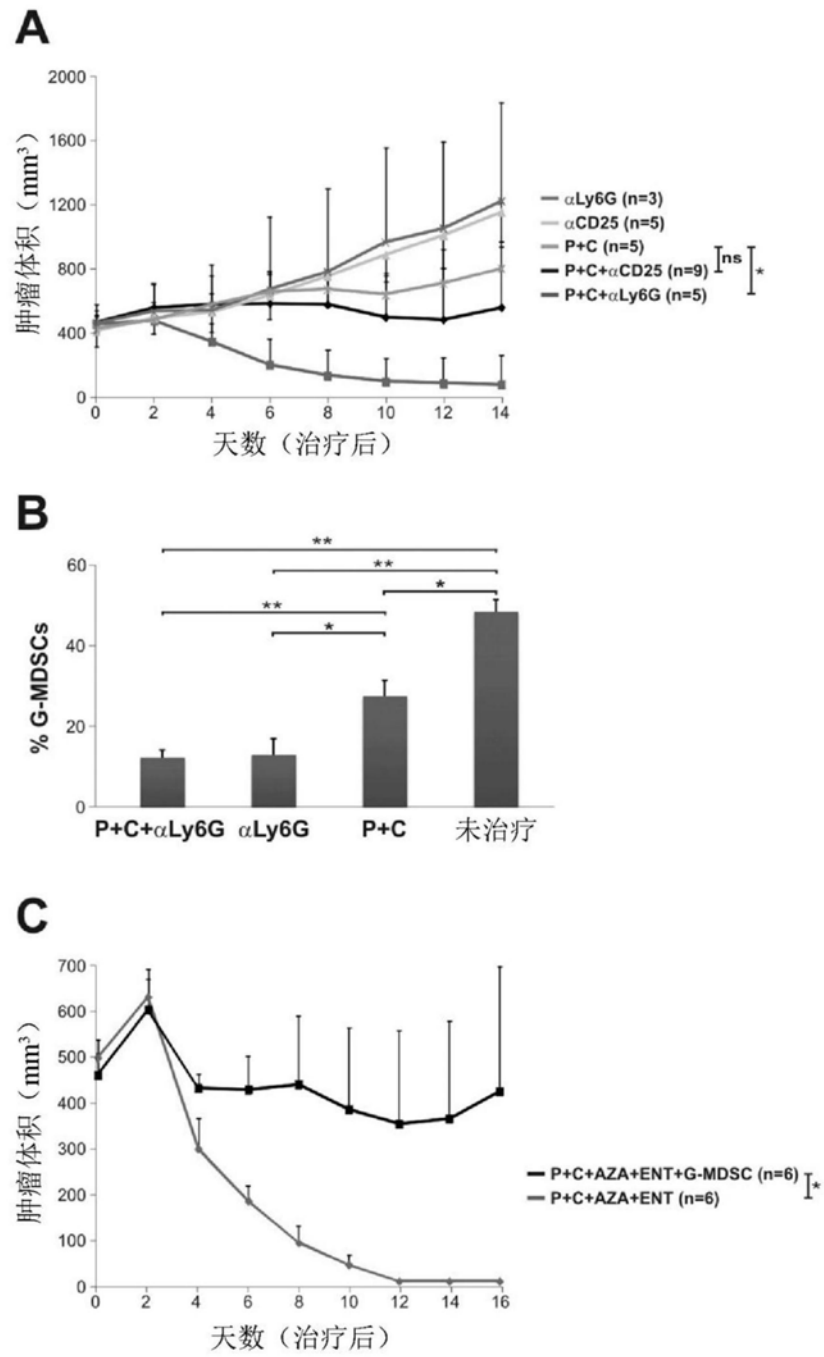


图3A-3C

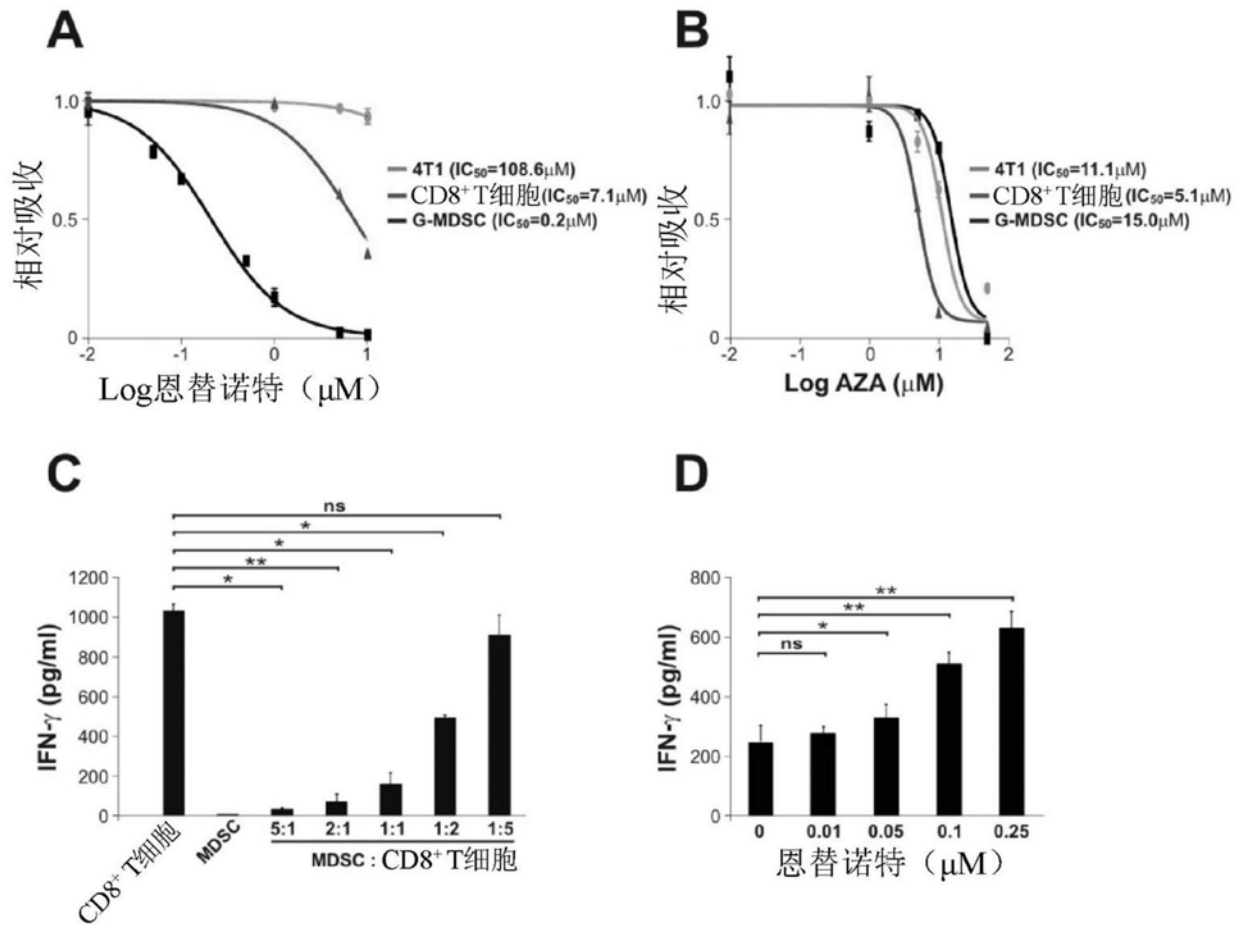


图4A-4D

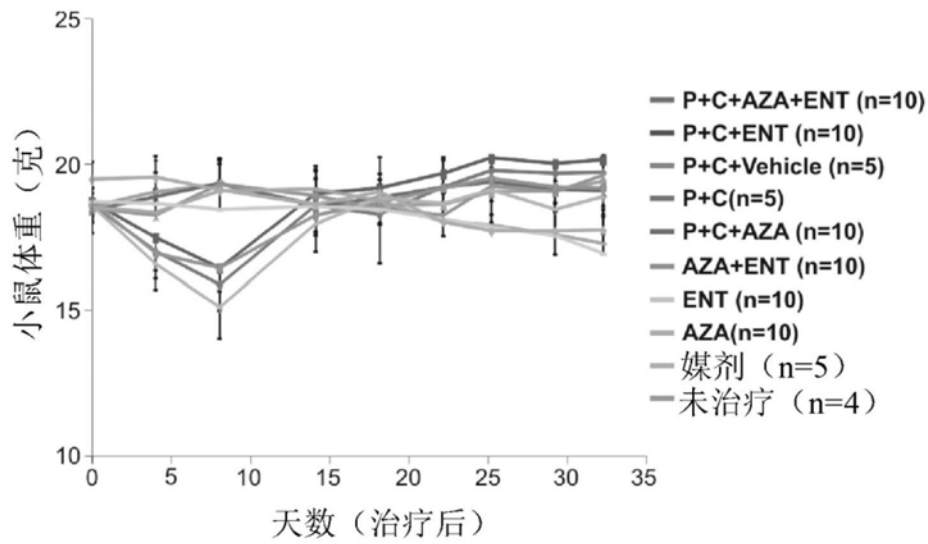


图5

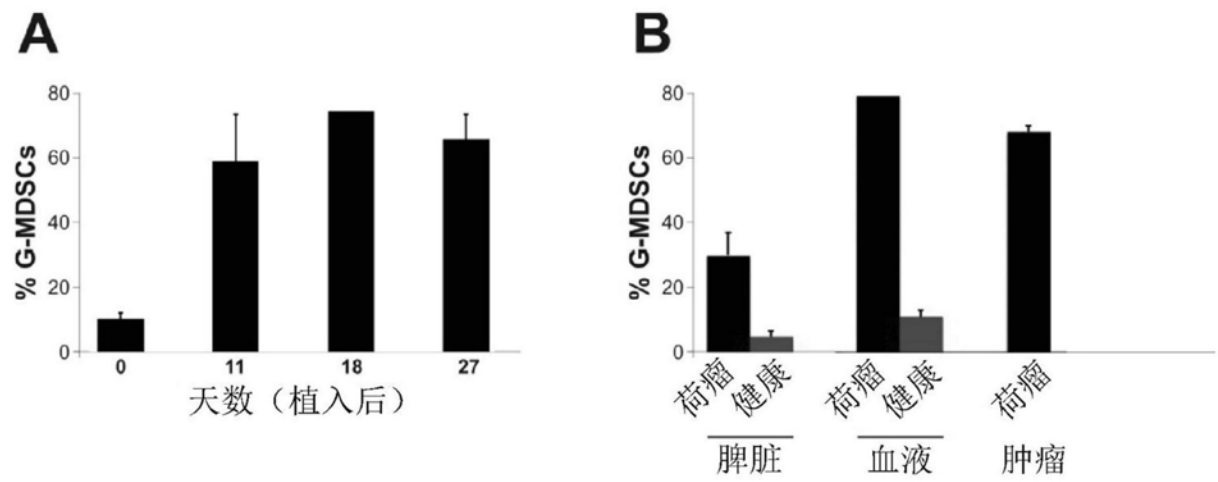


图6A-6B

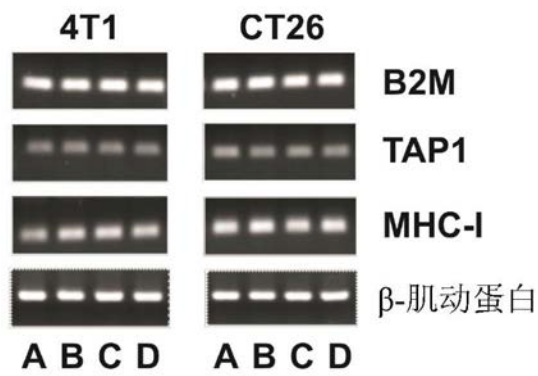


图7

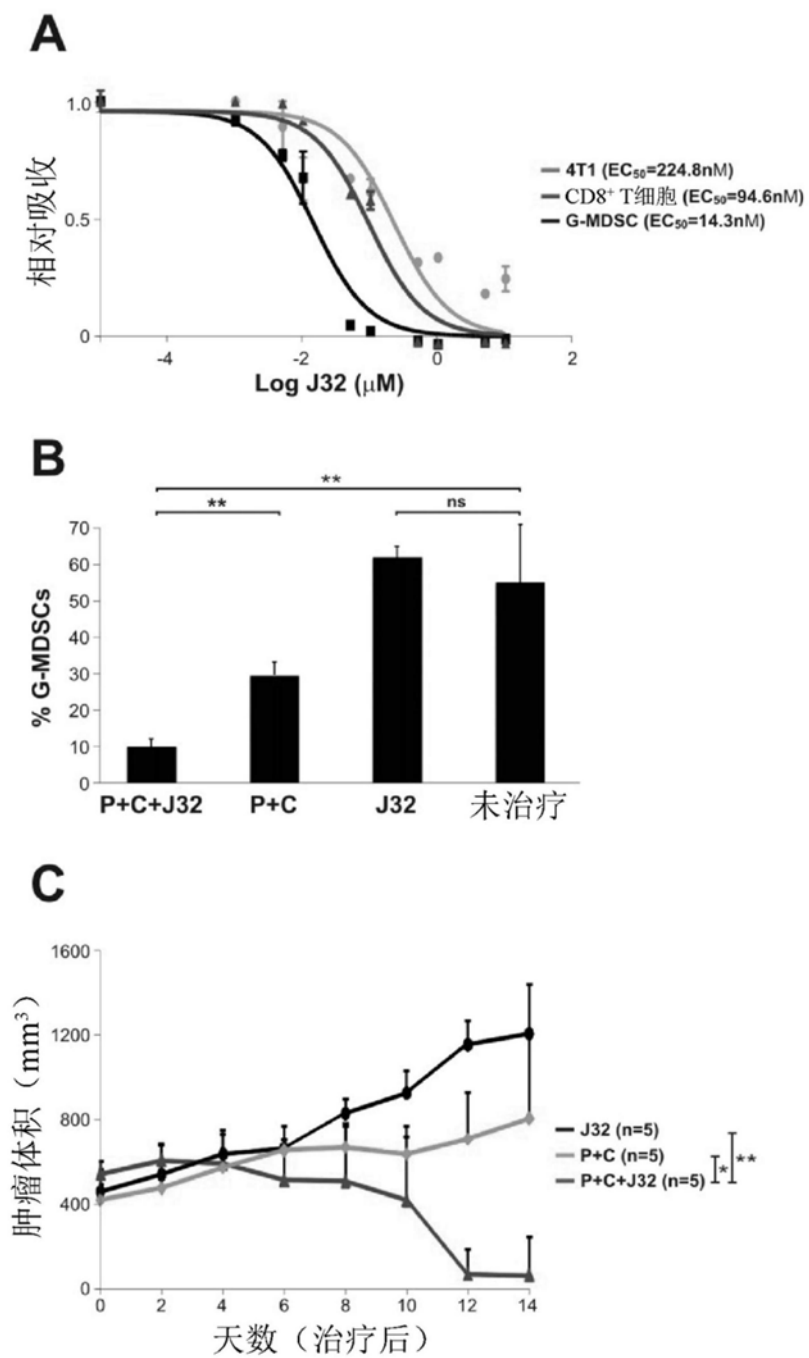


图8A-8C

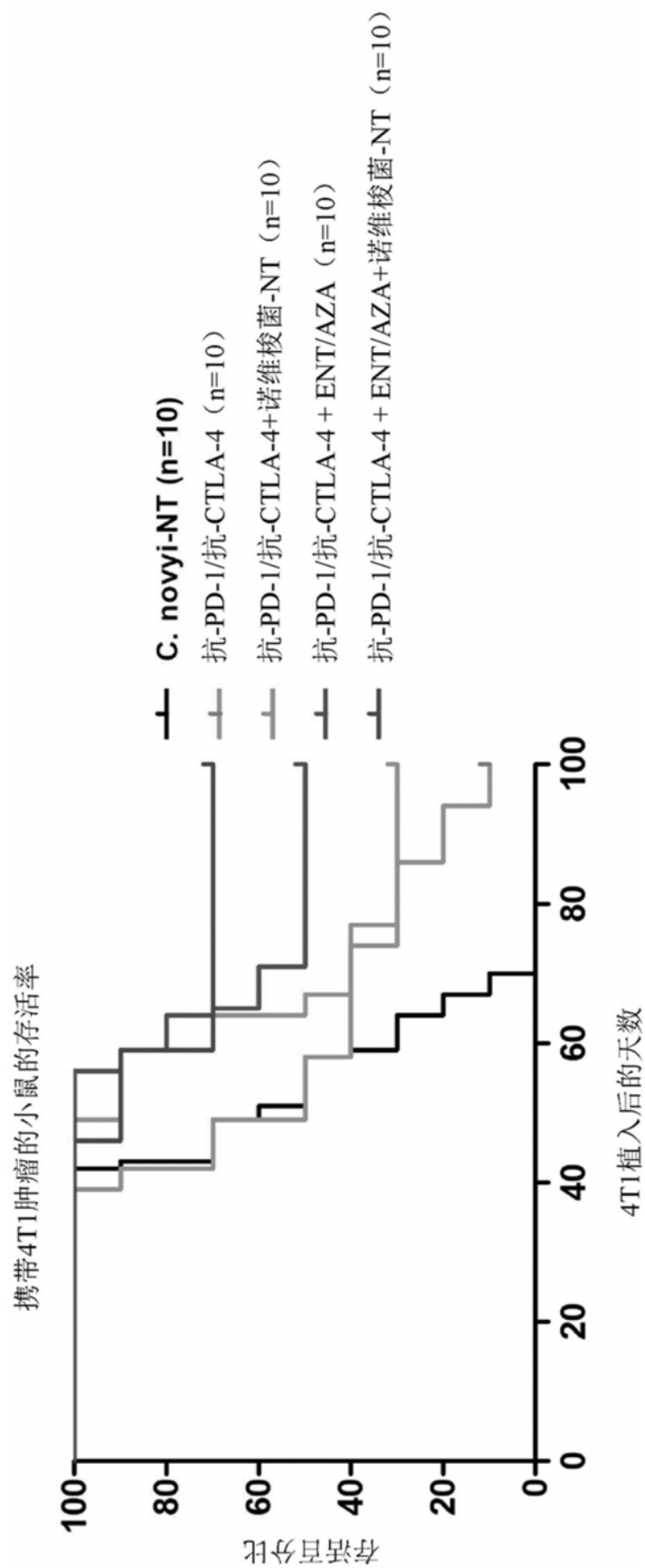


图9

摘要

本发明的名称是源自骨髓的抑制细胞的抑制和免疫检查点阻断。已经观察到用检查点抑制抗PD-1抗体或抗CTLA-4抗体治疗的患者的不同寻常的反应。然而，针对免疫原性差的癌症的免疫疗法仍具有挑战性。用抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体两者的治疗不能根除适当免疫原性CT26大肿瘤或转移性4T1肿瘤。然而，用表观遗传调节药物和检查点抑制剂共同治疗显著改善治疗结果，将它们中超过80%治愈。功能研究揭示表观遗传调节剂的主要靶标是源自骨髓的抑制细胞（MDSC）。当与免疫检查点抑制剂组合时，减少循环MDSC的PI3K抑制剂还治愈80%的具有转移性4T1肿瘤的小鼠。因此，通过消除MDSC可治愈耐免疫检查点阻断的癌症。

Abstract

The title of the invention is SUPPRESSION OF MYELOID DERIVED SUPPRESSOR CELLS AND IMMUNE CHECKPOINT BLOCKADE. Impressive responses have been observed in patients treated with checkpoint inhibitory anti-PD-1 or anti-CTLA-4 antibodies. However, immunotherapy against poorly immunogenic cancers remains a challenge. Treatment with both anti-PD-1 and anti-CTLA-4 antibodies were unable to eradicate large, modestly immunogenic CT26 tumors or metastatic 4T1 tumors. However, co-treatment with epigenetic modulating drugs and checkpoint inhibitors markedly improved treatment outcomes, curing more than 80% of them. Functional studies revealed that the primary targets of the epigenetic modulators were myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). A PI3K-inhibitor that reduced circulating MDSCs also cured 80% of mice with metastatic 4T1 tumors when combined with immune checkpoint inhibitors. Thus, cancers resistant to immune checkpoint blockade can be cured by eliminating MDSCs.