



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110582701 A

(43)申请公布日 2019.12.17

(21)申请号 201880028524.8

(22)申请日 2018.05.10

(30)优先权数据

2017-094986 2017.05.11 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/018083 2018.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/207866 JA 2018.11.15

(71)申请人 学校法人 川崎学园

地址 日本国冈山县仓敷市松岛577番地

(72)发明人 冈三喜男 中山睿一 大植祥弘

黑濑浩史

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 马云华

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

A61K 38/03(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C07K 14/82(2006.01)

G01N 33/15(2006.01)

权利要求书2页 说明书25页

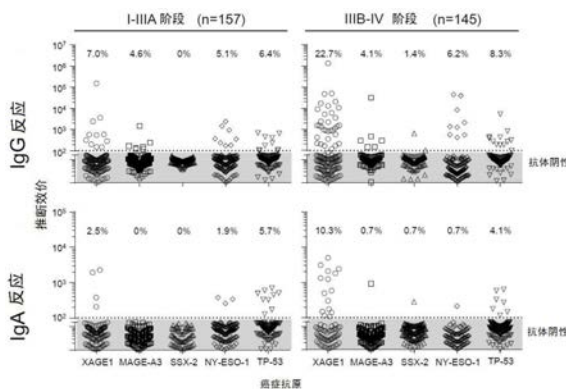
序列表6页 附图17页

(54)发明名称

检查癌症治疗效果的方法和用于诱导免疫应答的组合物

(57)摘要

为了提供一种癌症治疗效果的新型检查方法、癌症疫苗肽的筛选方法以及用于诱导针对癌症的免疫应答的肽和组合物。本发明提供了癌症治疗效果检查方法和癌症疫苗肽的筛选方法，每种方法均包括检测样本中的抗肿瘤/睾丸抗原的抗体或抗p53的抗体。检测抗XAGA1抗体(IgG和/或IgA)或抗NY-ESO-1抗体(IgG)是合适的。本发明还提供了用于诱导针对癌症的免疫应答的新型肽或新组合物。



1. 一种癌症治疗效果的检查方法,其特征在于包括检测样本中的抗肿瘤/睾丸抗原的抗体。

2. 根据权利要求1所述的检查方法,其特征在於,所述肿瘤/睾丸抗原为选自于由XAGE1、NY-ESO-1、MAEL、BAGE、BORIS、MAGE-B3和SSX4组成的群组中的至少一种肿瘤/睾丸抗原。

3. 根据权利要求1或2所述的检查方法,其特征在於,所述检测包括检测IgG型抗体和IgA型抗体。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的检查方法,其特征在於,所述样本为在癌症治疗前从受试者采集的样本;并且,所述方法包括预测癌症治疗效果的检查。

5. 一种癌症治疗效果的检查方法,其特征在於包括检测样本中的抗p53抗体。

6. 根据权利要求1~5任一项所述的检查方法,其特征在於,还包括在选自于由以下1)到4)情况组成的群组中的至少一种情况下判断癌症治疗有效果:

1) 抗肿瘤/睾丸抗原抗体或抗p53抗体呈阳性;

2) 抗肿瘤/睾丸抗原的IgG型抗体或抗p53抗体呈阳性;

3) 抗肿瘤/睾丸抗原的IgG型抗体或抗p53抗体呈阳性,并且抗肿瘤/睾丸抗原的IgA型抗体或抗p53抗体呈阴性;及

4) 针对多种肿瘤/睾丸抗原的抗体呈阳性。

7. 一种检查癌症治疗效果的试剂盒,其特征在於包括:

其上固定有选自于由肿瘤/睾丸抗原、肿瘤/睾丸抗原的一部分形成的肽、p53和p53的一部分形成的肽组成的群组中的至少一者的载体;

含抗人IgG抗体的试剂;及

含抗人IgA抗体的试剂。

8. 选自于由以下a)~f)项组成的群组中的至少一种肽:

a) 由SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列形成的XAGE1的一部分形成的肽,所述肽具有允许在SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的N端侧和/或C端侧延伸和/或缺失最多5个氨基酸的氨基酸序列;

b) 具有通过保守置换a)项所述肽的氨基酸序列中的一个或两个氨基酸而获得的氨基酸序列的肽;

c) a)项或b)项所述肽的药学上可接受的盐或溶剂化物;

d) 由SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列形成的XAGE1的一部分形成的肽,所述肽具有允许在SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的N端侧和/或C端侧延伸和/或缺失最多5个氨基酸的氨基酸序列;

e) 具有通过保守置换d)项所述肽的氨基酸序列中的一个或两个氨基酸而获得的氨基酸序列的肽;

f) d)项或e)项所述肽的药学上可接受的盐或溶剂化物。

9. 一种用于诱导针对癌症的免疫应答的组合物,其特征在於包括:

选自于由权利要求8所述a)~c)项组成的群组中的至少一种肽;及

选自于由权利要求8所述d)~f)项组成的群组中的至少一种肽。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其特征在於,所述癌症为XAGE1呈阳性的肺癌、肝癌、

前列腺癌、胃癌、恶性黑色素瘤、乳腺癌、食管癌、肾癌或膀胱癌。

11. 根据权利要求9或10所述的组合物,其特征在于,所述组合物在免疫治疗前或化疗前给药。

12. 一种增强癌症免疫治疗或化疗效果的药物,其特征包括:
选自于由权利要求8所述a)~c)项组成的群组中的至少一种肽;及
选自于由权利要求8所述d)~f)项组成的群组中的至少一种肽。

13. 一种用于癌症疫苗的肽的筛选方法,其特征包括检测样本中的抗肿瘤/睾丸抗原的抗体或抗p53抗体。

14. 根据权利要求13所述的筛选方法,其特征包括,所述样本是从含有B细胞的液体收集的样本,所述B细胞经癌症疫苗的候选肽进行刺激培养。

15. 一种制备活化CD4阳性T细胞或活化CD8阳性T细胞的方法,其特征包括将从外周血获得的CD4阳性T细胞或CD8阳性T细胞用SLP1和SLP2进行刺激培养的步骤;其中,所述SLP1具有如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;所述SLP2具有如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列。

检查癌症治疗效果的方法和用于诱导免疫应答的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症治疗效果预测或预后预测的检查,以及免疫应答诱导肽的利用。

背景技术

[0002] 在日本,11万人患有肺癌,2013年肺癌在主要癌症种类中死亡人数排名第一。其组织学类型大致分为小细胞肺癌(10%)和非小细胞肺癌(NSCLC)(90%),同时肺腺癌占非小细胞肺癌数量的70%~80%。其常见的治疗方法包括外科治疗、放疗和化疗。作为化疗,进行主要使用酪氨酸激酶抑制剂药物或铂试剂的联合化疗。小细胞肺癌和非小细胞肺癌的中位生存期(OSs)分别约为12个月和30个月。

[0003] 近年来,在晚期NSCLC的一线和二线治疗中,发现使用抗PD-1抗体(纳武单抗(nivolumab)或派姆单抗(pembrolizumab))作为免疫检查点分子抑制剂药物的疗法,与标准治疗相比,能提供显著高的应答率或延长总生存期。目前,抗PD-1抗体疗法在日本、美国和欧盟使用。

[0004] 用于免疫检查点分子抑制剂药物的应答病例的一种有用的生物标志物是在肿瘤或肿瘤的免疫活性细胞中表达的PD-L1分子。然而,即使是PD-L1高表达组的应答率也在30%到40%之间。此外,免疫检查点分子抑制剂药物非常昂贵。因此,人们希望发现一种新型的生物标志物。

[0005] 此外,人们也希望研发出一种新型的治疗方法,所述治疗方法比免疫检测点抑制药物更具潜在的抗肿瘤效果。

[0006] 到目前为止,我们已经鉴定出一种在最常见的肺癌-肺腺癌中表达的XAGE1抗原。已经表明:XAGE1抗原在40%到50%的晚期肺腺癌中表达;观察到有大约一半的表达XAGE1抗原的患者存在抗XAGE1抗体(IgG)反应;并且抗XAGE1抗体(IgG)呈阳性患者预后延长(非专利文献1和2)。

[0007] XAGE1抗原是一种肿瘤/睾丸抗原。肿瘤/睾丸抗原(CT抗原)是多种抗原的总称,所述多种抗原中的每一种在多种癌症中表达,但仅在正常组织中的睾丸中表达,大量的CT抗原是已知的(非专利文献3和4)。

[0008] CheckMate-017试验是一项比较纳武单抗和多西他赛靶向先前治疗的鳞状细胞肺癌的Ⅲ期临床试验,CheckMate-017试验中纳武单抗组和多西他赛组的应答率分别是36%和31%。中位生存期(以下有时称为OSs)作为主要疗效判定指标,纳武单抗组和多西他赛组的中位生存期分别为9.2个月和6.0个月,表明明显延长。此外,在类似的比较纳武单抗和多西他赛靶向先前治疗的非鳞状非小细胞肺癌的CheckMate-057试验中,纳武单抗组和多西他赛组的应答率分别为19%和12%。OSs作为最主要的疗效判定指标,纳武单抗组和多西他赛组的OS分别是12.2个月和9.4个月,表明明显延长。因此,与多西他赛相比,用纳武单抗单药治疗证明了在有治疗史的无法切除或转移性非小细胞肺癌中纳武单抗的有效性。

[0009] 在疾病进展率方面,尽管在CheckMate-017试验或CheckMate-057试验中纳武单抗组与多西他赛组相比并不显著,然而,在CheckMate-017试验中,纳武单抗组和多西他赛组

的疾病进展率分别为33%和30%；在CheckMate-057试验中，纳武单抗组和多西他赛组的疾病进展率分别为44%和29%。

[0010] 此外，为了寻找一种生物标志物，研究了肿瘤表达的PD-L1的量和OS之间的关系，PD-L1低表达或PD-L1呈阴性的肿瘤在OS方面是较差的。

[0011] 在靶向先前治疗的非小细胞肺癌的KEYNOTE-001和KEYNOTE-010试验中研究了作为另一种抗PD-1抗体的派姆单抗的有效性。在KEYNOTE-001试验中，总应答率为18%~20%，PD-L1阳性肿瘤的应答率为19%~23%，甚至在PD-L1阴性肿瘤中应答率为9%~13%。KEYNOTE-010试验是比较派姆单抗和多西他赛靶向肿瘤PD-L1表达为1%或更高的III期临床治疗，在KEYNOTE-010试验中，派姆单抗组和多西他赛组的应答率分别是18.0%~18.5%和9.3%。派姆单抗组的OS为10.4到12.7个月，多西他赛组的OS为8.5个月。因此，派姆单抗组的OS比多西他赛组有显著的延长。无进展生存期(PFS)和多西他赛组之间没有显著差异。对于肿瘤PD-L1表达为50%或更高的患者，派姆单抗组的应答率为29.1%~30.2%，而多西他赛组的应答率为7.9%。派姆单抗组的OSs为14.9个月~17.3个月。对于肿瘤PD-L1表达为50%或更高的患者人群，PFS组与多西他赛组相比也有显著的提高。由此表明，在肿瘤PD-L1高表达的肿瘤中，派姆单抗具有较高的抗肿瘤作用以及延长的预后。

[0012] 在BIRCH试验(该试验用于检查单药给药的效果)和POPLAR试验(该试验是对比阿特珠单抗(atezolizumab)和多西他赛的II期临床试验，在该试验中，阿特珠单抗组和多西他赛组的OS分别为12.6个月和9.7个月)中，抗PD-L1抗体阿特珠单抗与纳武单抗和派姆单抗一样，表现出靶向先前治疗的非小细胞肺癌的显著的延长效果。此外，当PD-L1在肿瘤或癌症免疫微环境中的肿瘤浸润性免疫细胞中表达时，OS为15.1个月~15.5个月，这表明预后进一步延长。除此之外，在癌症免疫微环境中高表达PD-L1的阿特珠单抗组的应答率为38%，而在癌症免疫微环境中不表达PD-L1的多西他赛组的应答率仅为15%。在OAK试验(该试验是一项比较阿特珠单抗和多西他赛靶向先前治疗的非小细胞肺癌的III期试验)中也观察到了类似于POPLAR试验的结果。

[0013] 如上所述，PD-L1在肿瘤或肿瘤中的免疫活性细胞中的表达被认为是目前用于免疫检查点分子抑制剂药物应答病例的生物标记物。然而，即使PD-L1高表达(1%或更高、或50%或更高)，免疫检查点分子抑制剂药物的应答率也在30%至40%之间。此外，发现了10%的PD-L1低表达或PD-L1呈阴性的病例是应答病例。

[0014] 此外，对于每种免疫检查点分子抑制剂药物(纳武单抗、派姆单抗和阿特珠单抗)，都会进行其自身的伴随诊断方法(PD-L1表达分析)，导致临床环境混乱。

[0015] 引用文献

[0016] 专利文献

[0017] [1]JP 5709108 B2

[0018] [2]WO 2016/181912 A1

[0019] 非专利文献

[0020] [1]OhueY, et al. Clin Cancer Res. 20 (19), 5052-5063 (2014)

[0021] [2]OhueY, et al. Cancer Immunol Res. 4 (12), 1049-1060 (2016)

[0022] [3]Hofmann O, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 23; 105 (51), 20422-7 (2008)

[0023] [4]Wang C,et al.Nat Commun.2016Jan 27;7:10499

发明内容

[0024] 技术问题

[0025] 本发明的目的是提供一种能够准确预测癌症治疗效果或能够准确预测预后的检查方法。本发明的另一个目的是提供一种用于诱导针对癌症的免疫应答的新型肽和新型组合物,以及所述肽的筛选方法。

[0026] 技术方案

[0027] 本发明的发明人为了实现上述目的进行了广泛的研究,结果发现,通过检测抗肿瘤/睾丸抗原的抗体或抗p53抗体可以预测或确认对癌症的治疗效果。发明人发现,IgG型XAGE1抗体(下文中有时称为XAGE1-IgG)和IgA型XAGE1抗体(下文中有时称为XAGE1-IgA)或IgG型抗NY-ESO-1抗体(下文中有时称为NY-ESO-1-IgG)适合用作癌症治疗效果的预测和癌症治疗前的预后预测的指标。发明人还发现了一种新型的癌症疫苗肽及其组合物。发明人还发现了一种癌症疫苗肽的筛选方法。即,本发明包括以下方面。

[0028] 1、一种癌症治疗效果的检查方法,包括检测样本中抗肿瘤/睾丸抗原的抗体。

[0029] 2、根据上述项1的检查方法,所述肿瘤/睾丸抗原为选自于由XAGE1、NY-ESO-1、MAEL、BAGE、BORIS、MAGE-B3和SSX4组成的群组中的至少一种肿瘤/睾丸抗原。

[0030] 3、根据上述项1或2所述的检查方法,所述检测包括检测IgG型抗体和IgA型的抗体。

[0031] 4、根据项1至3中任一项所述的检查方法,所述样本为在癌症治疗前从受试者采集的样本;并且所述方法包括预测癌症治疗效果的检查。

[0032] 5、一种癌症治疗效果的检查方法,包括检测样本中的抗p53抗体。

[0033] 6、根据上述项1~5任一项所述的检测方法,还进一步包括在选自于由以下1)~4)情况组成的群组中的至少一种情况下判断癌症治疗有效果:

[0034] 1) 抗肿瘤/睾丸抗原抗体或抗p53抗体呈阳性;

[0035] 2) 抗肿瘤/睾丸抗原的IgG型抗体或抗p53抗体呈阳性;

[0036] 3) 抗肿瘤/睾丸抗原的IgG型抗体或抗p53抗体呈阳性,并且抗肿瘤/睾丸抗原的IgA型抗体或抗p53抗体呈阴性;及

[0037] 4) 针对多种肿瘤/睾丸抗原的抗体呈阳性。

[0038] 7、一种检查癌症治疗效果的试剂盒,包括:

[0039] 其上固定有选自于由肿瘤/睾丸抗原、肿瘤/睾丸抗原的一部分形成的肽、p53和p53的一部分形成的肽组成的群组中的至少一者的载体;含抗人IgG抗体的试剂;及含抗人IgA抗体的试剂。

[0040] 8、选自于由以下a)~f)项组成的群组中的至少一种肽:

[0041] a) 由SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列形成的XAGE1的一部分形成的肽,所述肽具有允许在SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的N端侧和/或C端侧延伸和/或缺失最多5个氨基酸的氨基酸序列;

[0042] b) 具有通过保守置换a)项所述肽的氨基酸序列中的一个或两个氨基酸而获得的氨基酸序列的肽;

[0043] c) a) 项或b) 项所述肽的药学上可接受的盐或溶剂化物;

[0044] d) 由SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列形成的XAGE1的一部分形成的肽,所述肽具有允许在SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的N端侧和/或C端侧延伸和/或缺失最多5个氨基酸的氨基酸序列;

[0045] e) 具有通过保守置换d) 项所述肽的氨基酸序列中的一个或两个氨基酸而获得的氨基酸序列的肽;

[0046] f) d) 项或e) 项所述肽的药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0047] 9、一种用于诱导针对癌症的免疫应答的组合物,包括:

[0048] 选自于由上述项8所述a) ~c) 项组成的群组中的至少一种肽;及选自于由上述项8所述d) ~f) 项组成的群组中的至少一种肽。

[0049] 10、根据上述项9所述的组合物,所述癌症为XAGE1呈阳性的肺癌、肝癌、前列腺癌、胃癌、恶性黑色素瘤、乳腺癌、食管癌、肾癌或膀胱癌。

[0050] 11、根据上述项9或10所述的组合物,所述组合物在免疫治疗前或化疗前给药。

[0051] 12、一种增强癌症免疫治疗或化疗效果的药物,包括:

[0052] 选自于由上述项8所述a) ~c) 项组成的群组中的至少一种肽;及选自于由上述项8所述d) ~f) 项组成的群组中的至少一种肽。

[0053] 13、一种用于癌症疫苗的肽的筛选方法,包括检测样本中的抗肿瘤/睾丸抗原的抗体或抗p53抗体。

[0054] 14、根据上述项13所述的筛选方法,所述样本是从含有B细胞的液体收集的样本,所述B细胞经用于癌症疫苗的候选肽刺激培养。

[0055] 15、一种制备活化CD4阳性T细胞或活化CD8阳性T细胞的方法,包括将从外周血中获得的CD4阳性T细胞或CD8阳性T细胞用SLP1和SLP2进行刺激培养的步骤,其中,所述SLP1具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;所述SLP2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列。

[0056] 16、一种诱导免疫应答的方法,包括使用选自于上述项8的项a) 到c) 中的至少一种肽和选自于上述项8的项d) 到f) 中的至少一种肽。

[0057] 17、一种增强免疫治疗或化疗效果的方法,包括在免疫治疗或化疗开始前给予选自于上述项8的项a) 至c) 中的至少一种肽和选自于上述项8的项d) 至f) 中的至少一种肽。

[0058] 18、一种将免疫治疗引入应答者病例的方法,包括根据项1所述检查方法未判断出癌症治疗有效果时提高抗体效价。

[0059] 本发明产生的有益效果:

[0060] 本发明提供的检查方法能够在癌症治疗前准确预测癌症治疗的效果和预后。此外,癌症治疗效果可以在癌症治疗后得到证实。更具体地说,能够准确预测化疗效果(抗癌药物效果)、免疫治疗效果以及免疫检查点分子抑制剂药物效果。特别是,可以在不使用PD-L1表达的情况下确定患者对免疫检查点分子抑制剂药物是否有应答。本发明甚至可以预测对不能根据PD-L1表达来预测效果的患者的效果,这是一项创新。

[0061] 免疫检查点分子抑制剂是一种非常昂贵的药物,而且目前还没有指示治疗结束的有效生物标志物。此外,令人担心的是,与常规化疗不同,虽然免疫检查点分子抑制剂药物对一些患者有效,但也可能导致严重的不良反应,特别是系统性自身免疫性疾病的发展。即使对治疗效果较低的患者,本发明的检查方法也能够实现预测,并且,考虑到与副作用的平

衡,可停止治疗。鉴于上述内容,本发明允许选择对免疫检查点分子抑制剂药物有明显应答的病例的这一事实在医疗经济方面也是创新的,所述医疗经济方面,例如,包括治疗成本和应对副作用措施所需的成本。

[0062] 本发明提供的新型肽和包含该新型肽的用于诱导免疫应答的组合物可以分别作为癌症治疗药物(癌症疫苗),通过主动诱导XAGE1免疫来诱导针对癌症的免疫应答。本发明提供的新型肽和用于诱导免疫应答的组合物可以诱导XAGE1特异性抗体,特别是IgG型抗XAGE1抗体,并且还可以诱导抗原特异性T细胞。

[0063] 本发明提供的新型肽和本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物能使这种创新治疗通过积极诱导XAGE1免疫,将化疗、免疫治疗和免疫检查点分子抑制剂药物治疗的无应答或预后差的病例组,引向治疗应答和预后良好组。此外,所述肽和所述组合物能够通过通过与现有治疗方法或新治疗方法联合使用来实现有效的癌症免疫治疗。此外,本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物在安全性方面也非常好。

[0064] 本发明提供的新型肽是一种长链肽,不同于由T细胞识别的表位疫苗。因此,所述肽包含多种表位,并且可以诱导比相关技术的表位疫苗更有效的免疫应答。此外,选自于上述a)至c)项中的至少一种肽与选自于上述d)至f)项中的至少一种肽的组合可诱导更加有效的免疫应答。

[0065] 本发明提供的筛选方法能够选择适合癌症疫苗的肽。

[0066] 采用本发明提供的活化CD4阳性T细胞或活化CD8阳性T细胞的制备方法获得的活化CD4阳性T细胞或活化CD8阳性T细胞可用于细胞治疗,例如,过继免疫(T细胞)治疗。

附图说明

[0067] 图1中各图显示了针对从157例早期或局部晚期肺腺癌(cStage I-III A)患者和145例晚期(cStage III B-IV)肺腺癌患者采集的血清,抗癌相关抗原XAGE1、MAGE-A3、SSX-2、NY-ESO-1和TP53的抗原特异性IgG和抗原特异性IgA的检测结果。

[0068] 图2中各图显示了抗癌相关抗原XAGE1、MAGE-A3、SSX-2、NY-ESO-1和TP53的特异性IgG阳性患者的发生率和抗上述抗原的特异性IgA阳性患者的发生率,其是对从157例早期或局部晚期肺腺癌(cStage I~III A)患者和145例晚期(cStage III B-IV)肺腺癌患者采集的血清进行检测的结果。

[0069] 图3A为从55例XAGE1抗原阳性肺腺癌患者获得的血清中针对51种癌症抗原的自身抗体反应的检查结果矩阵图。结果表明,XAGE1-IgG和XAGE1-IgA用作对自体肿瘤免疫应答的替代标志物。在XAGE1-IgG阳性且XAGE1-IgA阴性组中,观察到对多种肿瘤抗原的免疫应答。同时,IgA型抗XAGE1抗体(XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性组)的出现表明,对自体肿瘤的免疫应答减弱。结果表明,在XAGE1免疫阴性的病例(XAGE1-IgG阴性和XAGE1-IgA阴性组)中,几乎没有观察到对自体肿瘤的免疫应答。图3B中各图显示了XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性的个体对多种癌症抗原具有免疫应答并且处于对癌症有潜在高免疫应答的状态(免疫活化状态),并且,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性个体处于免疫活性均高于XAGE1-IgG阴性和XAGE1-IgA阴性的个体的状态,但处于免疫活性比XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性个体更受抑制的状态。

[0070] 图4中各图显示了145例肺腺癌晚期患者血清中免疫抑制细胞因子的测定结果。

[0071] 图5中各图显示了对肺腺癌早期或肺腺癌局部晚期患者癌症局部部位的B细胞和T细胞的状态分析结果。图5A和图5B显示了癌症局部(TIL)细胞积聚状态。与外周血相比,肿瘤局部IgA阳性B细胞增多。图5C表明具有高IgA阳性B细胞浸润的病例约占30%。图5D表明在具有高IgA阳性B细胞浸润的病例中,肿瘤局部调节性T细胞增加。图5E表明与外周血相比,在肿瘤浸润淋巴细胞中,发现产生免疫抑制细胞因子IL-10,同时B细胞和T细胞产生IL-10。图5F表明如图5E所示产生IL-10的肿瘤浸润的B细胞为IgA阳性细胞。

[0072] 图6中各图显示了对在肺腺癌患者IgA⁺B细胞中表达的免疫检查点分子的分析结果。结果表明,高表达免疫检查点分子PD-L1和Galectin-9的PD-L1⁺GAL-9⁺IgA⁺B细胞在肿瘤局部有明显聚集。

[0073] 图7中各图显示了XAGE1-IgG阳性组的中位生存期明显延长,并且这种趋势在EGFR基因突变阴性病例中显著。

[0074] 图8显示了与无免疫应答组和XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性组相比,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性组对初始化疗有显著较高的应答率。

[0075] 图9显示了对XAGE1和NY-ESO-1的免疫应答可作为使用抗PD-1抗体作为免疫检查点分子抑制剂药物的治疗的效果的指标。显示了对XAGE1或NY-ESO-1有免疫应答的组(XAGE1-IgG阳性或NY-ESO-1-IgG阳性组)和无免疫应答组(无抗XAGE1和NY-ESO-1的抗体的组)中靶病变的最佳变化率。

[0076] 图10中的表和图显示了对XAGE1或NY-ESO-1(XAGE1-IgG阳性或NY-ESO-1-IgG阳性组)产生免疫应答的组和无免疫应答组(无抗XAGE1和NY-ESO-1抗体的组)用作为免疫检查点分子抑制剂药物的抗PD-1抗体治疗后的应答率、无进展生存率和总生存率。

[0077] 图11中各图显示了对图3A所示的XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性组、XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性组和XAGE1-IgG阴性和XAGE1-IgA阴性组中抗癌症抗原免疫反应结果的进一步分析结果。

[0078] 图12中各图像和曲线图显示了对抗PD-1抗体疗法有应答的病例中,对抗NY-ESO-1抗体、抗XAGE1抗体和抗P53抗体的监测结果。

[0079] 图13A是使用经抗PD-1抗体疗法治疗的患者的预处理血清来分析的对包括XAGE1和NY-ESO-1抗体在内的50种癌症抗原的免疫应答结果的矩阵图。表明XAGE1-IgG阳性或NY-ESO-1-IgG阳性患者对多种抗原免疫应答,并且处于免疫活化状态。图13B中各图显示了在抗PD-1抗体治疗前通过检测抗BAGE抗体或抗BORIS抗体可预测抗PD-1疗法的治疗效果。

[0080] 图14A显示了通过抗PD-1抗体治疗的靶病变的变化率(负值表示肿瘤消退)和抗CT抗原抗体的抗体效价(XAGE1-IgG和NY-ESO-IgG)之间的关系。图14B显示了通过抗PD-1抗体治疗的靶病变的变化率与治疗后针对多种抗原产生的增强免疫反应(抗原扩散)的数量之间的关系。

[0081] 图15A为显示抗PD-1抗体治疗前后对多种抗原的免疫应答之间的差异的矩阵图。图15B的表显示了在抗PD-1抗体治疗的应答病例中发现对MAGE-B3抗原和SSX4抗原的免疫应答的传播频率较高,而在无应答案例中则未见。

[0082] 图16中图像和矩阵图显示了在一项由研究者发起的研究中,在一个完全应答的病例中观察到了对SSX4抗原的免疫反应,该研究在术前联合使用了抗CCR4抗体+抗PD-1抗体。

[0083] 图17中曲线图和图像显示了彼此相关的肿瘤消退过程与抗SSX4免疫反应。

[0084] 图18中各图显示了抗CT抗原抗体(抗XAGE1抗体和抗NY-ESO-1抗体)的阳性比已知的生物标志物更能清楚地确定抗PD-1抗体治疗的效果。

[0085] 图19中各图显示了由4C34-1和8C34TY识别的肽,其中,4C34-1是针对SLP2特定的CD4阳性T细胞克隆(下文有时称为CD4克隆),8C34TY是针对SLP1特定的CD8阳性T细胞克隆(下文有时称为CD8克隆)。

[0086] 图20中各图显示了用单独SLP1、单独SLP2、或SLP1和SLP2的组合对CD4克隆(4C34-1) T细胞、CD8克隆(8C34TY) T细胞以及这些T细胞的混合物进行刺激的结果。结果表明,用SLP1和SLP2联合刺激可诱导更有效的免疫应答。

[0087] 图21中各图显示了在CD4克隆T细胞和CD8克隆T细胞存在的情况下,单独使用SLP1、单独使用SLP2或SLP1和SLP2联合刺激外周血单核细胞后B细胞表面的IgG和IgA的检测结果。结果发现,SLP1和SLP2联合应用可增加B细胞表面IgG的表达。同时,IgA的表达量无变化。

[0088] 图22中各图显示了在CD4克隆T细胞和CD8克隆T细胞存在的情况下,单独使用SLP1、单独使用SLP2或SLP1和SLP2联合刺激B细胞后培养上清中XAGE1特异性抗体的检测结果。在SLP1和SLP2结合的情况下,产生了XAGE1-IgG,但未发现产生IgA。

[0089] 图23中各图显示了注射含有SLP1和SLP2的XAGE1疫苗后,发现有4/7的患者XAGE1-IgG抗体效价增加,且未诱导产生XAGE1-IgA和NY-ESO-1-IgG。

[0090] 图24中各图显示了通过注射XAGE1疫苗,有4/7的病例观察到肿瘤标志物的增加抑制或降低。

[0091] 图25中各图显示了低剂量注射XAGE1疫苗能够诱导免疫应答。表明从患者获得的CD4阳性T细胞主要对SLP1产生反应,并且SLP1和SLP2联合应用可增强免疫应答。

[0092] 图26中各图显示了中剂量注射XAGE1疫苗能够诱导免疫应答。表明从患者获得的CD4阳性T细胞对SLP1和SLP2产生反应,SLP1和SLP2联合应用可增强免疫应答。

具体实施方式

[0093] 本发明提供的检查方法包括检测样本中的抗肿瘤/睾丸抗原的抗体或抗p53抗体。此外,本发明提供的癌症疫苗的肽的筛选方法也包括检测样本中的抗肿瘤/睾丸抗原的抗体或抗p53抗体。

[0094] 在本发明提供的每一种检查方法和筛选方法中,肿瘤/睾丸抗原(下文有时称为CT抗原)并不特别受限制,它是一种在癌细胞中表达并仅在正常组织中的睾丸中表达的抗原。本发明包括检测抗CT抗原的抗体,所述CT抗原优选包括XAGE1、NY-ESO-1、MAEL、BAGE、BORIS、MAGE-B3和SSX4。所述CT抗原更优选包括XAGE1和NY-ESO-1。

[0095] 在本发明的每种检查方法和筛选方法中,优选检测抗CT抗原的IgG型抗体或抗p53抗体。所述抗CT抗原的抗体优选包括抗XAGE1抗体、抗NY-ESO-1抗体、抗MAEL抗体、抗BAGE抗体、抗BORIS抗体、抗MAGE-B3抗体和抗SSX4抗体。这些抗体中的每一种优选为IgG型抗体。所述抗体的更优选示例包括IgG型抗XAGE1抗体和IgG型抗NY-ESO-1抗体。

[0096] 除抗CT抗原的IgG型抗体外,还更优选检测抗CT抗原的IgA型抗体。抗CT抗原的IgA型抗体的合适例子为IgA型抗XAGE1抗体。优选检测IgG型抗XAGE1抗体和IgA型抗XAGE1抗体。

[0097] 在本发明中,术语“癌症疫苗”是指能够诱导针对癌症的免疫应答的药物成分,所述免疫应答的诱导包括体液免疫诱导和/或细胞介导的免疫诱导。

[0098] 在本发明提供的一个实施例的检查方法中,检测从癌症治疗前的受试者身上采集的样本中的抗CT抗原的抗体或抗p53抗体。此外,在本发明提供的一个实施例的检查方法中,检测从癌症治疗后的受试者身上采集的样本中的抗CT抗原的抗体或抗p53抗体。

[0099] 当检测从癌症治疗前的受试者身上采集的样本中的抗CT抗原的抗体或抗p53的抗体后,可以在癌症治疗前预测癌症治疗的效果和预后。

[0100] 当检测从癌症治疗后的受试者身上采集的样本中的抗CT抗原的抗体或抗p53抗体后,可以在癌症治疗后确定癌症治疗的效果并且可预测其预后。进一步的,可以预测后续治疗的效果及预后。

[0101] 本发明提供的检查方法适用于各种癌症治疗效果的预测、确认及其预后的预测,同时也适用于化疗或免疫治疗的效果预测、确认及其预后的预测。本发明提供的检查方法更适用于免疫治疗效果的预测,特别适合于免疫检查点分子抑制剂药物治疗效果的预测。

[0102] 化疗包括通过服用任何一种抗癌药物(如铂类药物)进行治疗。免疫治疗包括免疫抑制疗法(使用免疫检查点分子抑制剂药物进行治疗)、细胞因子(例如,IL-2)疗法、BRM疗法(例如,免疫刺激剂)、癌症疫苗疗法等。使用免疫检查点抑制剂进行治疗包括通过施用PD-1抑制剂(如纳武单抗(nivolumab))进行治疗,使用CTLA-4抑制剂(如,ipilimumab)治疗,等等。

[0103] 在本发明提供的一个实施例的检查方法中,从癌症治疗前的受试者采集的样品被用作检查对象。在本发明中,术语“癌症治疗前”是指要预测其效果的癌症治疗开始前。即,本发明中的“癌症治疗前”包括:新开始癌症治疗前;施用用于癌症治疗的药剂前;在癌症治疗期间施用药剂之前;在改变用于癌症治疗的药剂之前;在改变癌症治疗计划之前;以及在观察癌症治疗是否停止的期间。

[0104] 在本发明提供的一个实施例的检查方法中,从癌症治疗后的受试者身上采集的样本被用作检测对象。在本发明中,术语“癌症治疗后”是指在已选定特定癌症治疗药物的癌症治疗开始一段时间后,确定该癌症治疗药物的疗效的阶段。即,本发明中的“癌症治疗后”包括:在癌症治疗期间施用额外的药剂之前;在改变癌症治疗药物前;在改变癌症治疗计划之前;以及在观察是否停止癌症治疗的期间。

[0105] 本发明提供的筛选方法中的“样本”优选为从包含用癌症疫苗候选肽刺激培养的B细胞的液体收集的样本。例如,可以使用在CD4阳性T细胞和CD8阳性T细胞存在的情况下从人血液获取的含单核细胞部分或含B细胞的部分使用癌症疫苗的候选肽进行刺激培养后的培养基的上清液。

[0106] 在本发明中,“治疗效果”概念包括对癌症病理发展的抑制、癌症的消退、癌症的消失、对复发的抑制、对转移的抑制以及存活时间的延长等。治疗效果用应答率、存活率、存活时间等来表示。

[0107] 本发明提供的检查方法中,“癌症治疗”中的癌症并不特别受限制,可以是任何癌症。一个合适的例子是XAGE1阳性或NY-ESO-1阳性癌。此外,通过本发明提供的筛选方法获得的“用于癌症疫苗的肽”中的癌症并不特别受限制,可以为任何癌症。一个合适的例子是XAGE1阳性癌。在本发明提供的检查方法和本发明提供的筛选方法中的癌症的示例包括肺

癌、肝癌、前列腺癌、胃癌、恶性黑色素瘤、乳腺癌、食管癌、肾癌和膀胱癌。所述癌症的合适示例为肺癌，其特别合适的示例为非小细胞肺癌。此外，本发明提供的检查方法适于预测难治性晚期非小细胞肺癌治疗的效果或晚期肺腺癌治疗的效果。

[0108] XAGE1 (X抗原家族,成员1) 是已知的由XAGE1基因编码的肿瘤/睾丸抗原,也称为肿瘤/睾丸抗原12.1 (CT12.1)。迄今已鉴定出5种基因,即XAGE1a到XAGE1e。已知相关蛋白是GAGED2,有两种亚型,即GAGED2a和GAGED2d。除此之外,迄今已确认四种可供选择的剪接变体,即XAGE1a、XAGE1b、XAGE1c和XAGE1d (Sato等人,Cancer Immunity,第7卷,第5页(2007年))。XAGE1a和XAGE1b编码81个氨基酸组成的XAGE1 (GAGED2a) 蛋白,XAGE1d编码69个氨基酸组成的XAGE1 (GAGED2d) 蛋白。

[0109] 各种动物的XAGE1的氨基酸序列是已知。例如,人类XAGE1 (GAGED2a) 的序列可从NCBI参考序列:NP_001091073.2和NP_001091063.2获得,人类XAGE1 (GAGED2d) 的序列可从NCBI参考序列:NP_001091074.1获得。

[0110] 人类XAGE1 (GAGED2a) : (SEQ ID NO.3)

[0111] mespkknq lkvgilhlgs rqqkiriqlr sqcatkwkvic kscisqtpgi nldlgsgvk
kiipkeehck mpeageeqpq v

[0112] 本发明提供的检查方法或筛选方法中作为检测对象的抗XAGE1抗体是抗XAGE1 (GAGED2a) (在下文中简称为XAGE1) 的抗体。

[0113] 在本发明的检查方法或筛选方法中,检测作为待检测对象的抗XAGE1抗体的方法并不特别受限制,但是其示例是一种涉及检测与抗原结合的方法。用于结合的抗原可以是全长XAGE1,或者可以是由其部分氨基酸序列形成的部分肽。优选使用全长XAGE1。

[0114] 根据本发明提供的一个实施例的检查方法或筛选方法中,检测IgG型抗XAGE1抗体。优选检测IgG型抗XAGE1抗体 (XAGE1-IgG) 和IgA型抗XAGE1抗体 (XAGE1-IgA)。IgG型抗体的检测方法不是特别受限制,就比如,可使用标记的抗人IgG抗体。此外,IgA型抗体的检测方法也不是特别受限制,就比如,可以使用标记的抗人IgA抗体。

[0115] 根据本发明一个实施例的检查方法或筛选方法包括检测XAGE1-IgG和/或XAGE1-IgA的步骤。XAGE1-IgG是一种指示对自体肿瘤的免疫应答增强的生物标志物,而XAGE1-IgA是一种指示对自体肿瘤的免疫应答降低(抑制)的生物标志物。首次发现这些标志物可用于预测癌症治疗药物的治疗效果。

[0116] NY-ESO-1也是已知的肿瘤/睾丸抗原。NY-ESO-1在多种肿瘤中均有表达,包括恶性黑色素瘤,表达水平在5%~40%之间,但仅在正常组织中的睾丸中表达。NY-ESO-1蛋白由180个氨基酸组成,其序列可以在GenBank:CAA05908.1获得。

[0117] 人NY-ESO-1: (SEQ ID NO.4)

[0118] mqaegrgtgg stgdadgpgg pgipdgpggn aggpgeagat ggrgprgaga arasgpggga
prgphggaas glngccrcga rgpesrllf ylampfatpm eaelarrsla qdapplpvpg vllkeftvsg
niltirltaa dhrqlqlsis sclqqlsllm witqcflpvflaqqpsgrr

[0119] 本发明的检查方法或筛选方法中,作为待检测对象的抗NY-ESO-1抗体的检测方法不受限制,但其示例是涉及检测与抗原结合的方法。用于结合的抗原可以是全长NY-ESO-1,或者可以是由其部分氨基酸序列形成的部分肽。优选使用全长NY-ESO-1。

[0120] 根据本发明一个实施例的检查方法或筛选方法中,检测IgG型抗NY-ESO-1抗体。此

外,可以检测IgA型抗NY-ESO-1抗体。IgG型抗体的检测方法并不特别受限制。例如,可使用标记的抗人IgG抗体。此外,IgA型抗体的检测方法也不特别受限制,就比如,可以使用标记的抗人IgA抗体。

[0121] MAEL、BAGE、BORIS、MAGE-B3和SSX4也是已知的肿瘤/睾丸抗原。这些抗原在各种肿瘤中以不同水平表达,但只在正常组织中的睾丸中表达。p53被称为癌症抑制蛋白。

[0122] 在本发明的检查方法或筛选方法中,每个作为待检测对象的抗MAEL抗体、抗BAEG抗体、抗BORIS抗体、抗MAGE-B3抗体、抗SSX4抗体和抗p53抗体的检测方法不受限制,其示例是一种涉及检测与抗原结合的方法。用于结合的抗原可以是全长抗原,或者可以是由其部分氨基酸序列形成的部分肽。

[0123] 在本发明提供的检查方法或筛选方法中,检测IgG型抗MAEL抗体、IgG型抗BAGE抗体、IgG型抗BORIS抗体、IgG型抗MAGE-B3抗体、IgG型抗SSX4抗体和IgG型抗p53抗体。此外,可以检测IgA型抗体。IgG型抗体的检测方法并不特别受限制,就比如,可使用标记的抗人IgG抗体。此外,IgA型抗体的检测方法也不特别受限制,就比如,可以使用标记的抗人IgA抗体。

[0124] 检测抗各CT抗原的抗体或抗p53抗体的方法并不受限制,只要抗体的量、浓度或抗体效价可以通过该方法测得,并且可以使用本领域公知技术进行测定。例如,可通过ELISA方法、放射免疫测定法、免疫沉淀法、亲和柱法等方法进行测定。

[0125] 本发明提供的检查方法中的“受试者”并不特别受限制,广泛包括通常意义上的哺乳动物(例如,人类、小鼠、大鼠、猴子、狗、猫、牛、马、猪、绵羊、山羊、兔子和仓鼠)。其中,人类是首选。当受试者是人时,不仅是癌症患者或疑似癌症患者,也可以将健康的个体作为受试者。受试者的性别、年龄等并不特别受限制。

[0126] 本发明提供的检查方法中的“样本”的例子可以包括血液(例如,血清、血浆或血细胞)、尿、粪便、痰、胸膜液/腹水、支气管肺泡灌洗液、腹腔灌洗液、活检组织和手术切除标本。样本的优选示例为血清。

[0127] 根据本发明优选实施例的检查方法或筛选方法中,在选自于由以下1)到4)种情况组成的群组中的至少一种情况下判断癌症治疗有效果:

[0128] 1) 抗肿瘤/睾丸抗原的抗体或抗p53抗体呈阳性;

[0129] 2) 抗肿瘤/睾丸抗原的IgG型抗体或抗p53抗体呈阳性;

[0130] 3) 抗肿瘤/睾丸抗原的IgG型抗体或抗p53抗体呈阳性,并且抗肿瘤/睾丸抗原的IgA型抗体或抗p53抗体呈阴性;

[0131] 4) 针对多种肿瘤/睾丸抗原的抗体呈阳性。

[0132] 根据本发明优选实施例的检查方法或筛选方法中,在抗CT抗原的抗体或抗P53抗体呈阳性的情况下,则判断癌症治疗有效果,其优选的具体示例包括抗XAGE1抗体、抗NY-ESO-1抗体、抗MAEL抗体、抗BAGE抗体,抗BORIS抗体、抗MAGE-B3抗体、抗SSX4抗体和抗p53抗体。抗CT抗原抗体或抗p53抗体仍然更优选IgG型抗体。其优选的具体示例是XAGE1-IgG或NY-ESO-1-IgG。

[0133] 此外,在优选实施例中,在抗CT抗原的IgG型抗体或抗p-53抗体呈阳性和抗CT抗原的IgA型抗体或抗p-53抗体呈阴性的情况下则判断为癌症治疗有效果。其优选的具体示例是XAGE1-IgG或NY-ESO-1-IgG呈阳性且XAGE1-IgA呈阴性的情况,其特别优选的具体示例是

XAGE1-IgG呈阳性且XAGE1-IgA呈阴性的情况。

[0134] 抗CT抗原抗体或抗p53抗体呈阳性的情况是抗CT抗原抗体或抗p53抗体的量、浓度或抗体效价等于或高于临界值(cutoffvalue)的情况。抗CT抗原抗体或抗p53抗体呈阴性的情况是抗CT抗原抗体或抗p53抗体的量、浓度或抗体效价等于或低于临界值的情况。临界值可以是,例如,相对于健康个体的抗体效价,10到1000倍的抗体效价、20到500倍的抗体效价、50到200倍的抗体效价或100倍的抗体效价。此外,临界值可以设置为健康成年人等的50个或更多个血清标本的平均值+3SD。优选地,在XAGE1-IgG或NY-ESO-1-IgG的量、浓度或抗体效价等于或高于临界值的情况下判断癌症治疗具有效果。

[0135] 根据本发明一个实施例的检查方法包括检测样本中抗CT抗原的抗体或抗p53抗体的步骤。所述样本优选为从癌症治疗前的受试者身上采集的样本。抗CT抗原的抗体的具体示例包括抗XAGE1抗体和抗NY-ESO-1抗体。其更优选的具体示例包括:XAGE1-IgG;XAGE1-IgG和XAGE1-IgA的组合;NY-ESO-1-IgG;以及NY-ESO-1-IgG和XAGE1-IgA的组合。

[0136] 根据本发明的一个实施例,检查方法包括以下步骤:检测从受试者身上采集的样本中XAGE1-IgG的量、浓度或抗体效价;以及检测同一样本中XAGE1-IgA的量、浓度或抗体效价。XAGE1-IgA的存在表明免疫受到抑制,因此在XAGE1-IgG的量、浓度或抗体效价等于或高于临界值同时XAGE1-IgA的量、浓度或抗体效价等于或低于临界值的情况下,可以判断癌症治疗有效果。

[0137] XAGE1-IgG是一种指示对自体肿瘤的免疫应答增强的生物标志物。同时,发现IgA阳性的调节性B细胞在癌中局部地增加,因此XAGE1-IgA可作为指示对自体肿瘤的免疫应答降低的生物标志物。在大约一半的具有XAGE1-IgG的患者中,观察到XAGE1-IgA反应。

[0138] 本发明提供的筛选方法包括例如以下步骤:用疫苗候选肽对从人血液中分离出来的B细胞进行刺激培养;并且检测培养基上清液中的抗CT抗原抗体或抗p53抗体。

[0139] 优选地,所述筛选方法进一步包括在抗CT抗原抗体或抗p53抗体呈阳性的情况下,判断候选肽具有癌症治疗效果的步骤。所述筛选方法适当地包括在XAGE1-IgA呈阴性且XAGE1-IgG或NY-ESO-1-IgG呈阳性的情况下,候选肽具有癌症治疗效果的步骤。

[0140] 另外,根据本发明的其他优选实施例的检查方法或筛选方法中,在抗多种CT抗原的抗体呈阳性的情况下判断癌症治疗具有效果。在本实施例中,所述检查方法或筛选方法包括以下步骤:检测从受试者身上采集的样本中抗CT抗原的抗体的量、浓度或抗体效价;以及检测同一样本中抗不同于前述CT抗原的另一CT抗原的抗体的量、浓度或抗体效价。待检抗CT抗原的抗体并不特别受限制,但优选地包括抗XAGE1抗体、抗NY-ESO-1抗体、抗MAEL抗体、抗BAGE抗体、抗BORIS抗体、抗MAGE-B3抗体或抗SSX4抗体。检测到抗多种CT抗原抗体的患者对多种抗原产生免疫应答并处于免疫激活状态,从而对癌症治疗(例如,免疫疗法)作出应答。多种抗原需要是2种或更多,并且优选3种或更多;其上限不受限制,但上限特别是例如,从检测的复杂性的角度考虑,50种或以下、40种或以下、30种或以下、20种或以下、或10种或以下。

[0141] 通过使用抗CT抗原抗体或抗p53抗体作为指示物(通过检测对CT抗原或p53的免疫应答),可以准确预测癌症的治疗效果,优选使用抗XAGE1抗体或抗NY-ESO-1抗体作为指示物(检测对XAGE1或NY-ESO-1的免疫应答)。抗XAGE1抗体或抗NY-ESO-1抗体的阳性比已知的生物标志物更清楚地确定抗PD-1抗体治疗的效果。特别的,可以清楚地确定免疫检查点分

子抑制剂药物的应答病例。甚至当PD-L1表达呈阳性时,应答率为30%,即使是阴性病例也有10%是应答病例。因此,利用这些生物标志物可以清楚地确定应答病例具创新性。

[0142] 当通过本发明提供的检查方法判断癌症治疗有效果时,可实施免疫治疗或化疗。当通过本发明的检查方法未判断出癌症治疗有效果时,可提高抗体效价以将免疫治疗或化疗引向应答病例。在一个实施例中,提高抗体效价的方法例如为施用疫苗。所述疫苗优选含有CT抗原的疫苗,更优选包含选自以下CT抗原组成的群组中的至少一种CT抗原的疫苗: XAGE1、NY-ESO-1、MAEL、BAGE、BORIS、MAGE-B3和SSX4,或由上述任一抗原的一部分形成的肽。

[0143] 本申请还包括涉及试剂盒的发明。涉及一种试剂盒的发明是用于检测癌症治疗效果的试剂盒,包括:其上固定有选自于由CT抗原、CT抗原的一部分形成的肽、p53和p53的一部分形成的肽组成的群组中的至少一者的载体、含有抗人IgG抗体的试剂和含有抗人IgA抗体的试剂。

[0144] 优选实施例中的用于检查癌症治疗效果的试剂盒包括:其上固定有选自于由XAGE1、XAGE1的一部分形成的肽、NY-ESO-1和NY-ESO-1的一部分形成的肽组成的群组中的至少一种肽的载体;含有抗人IgG抗体的试剂;以及含有抗人IgA抗体的试剂。所述试剂盒是用于检测癌症治疗效果的试剂盒。

[0145] 由XAGE1的一部分形成的肽是具有由SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的一部分形成的氨基酸序列的肽。所述肽优选包含10个或更多个氨基酸且包含一个或多个表位。由NY-ESO-1的一部分形成的肽是具有由SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的一部分形成的氨基酸序列的肽。所述肽优选包含10个或更多个氨基酸且包含一个或多个表位。

[0146] 本发明提供的试剂盒中,固定有肽的载体具有固定在其上的选自于由CT抗原、CT抗原的一部分形成的肽、p53和p53的一部分形成的肽组成的群组中的至少一者。优选地,固定有选自于由XAGE1、XAGE1的一部分形成的肽、NY-ESO-1和NY-ESO-1的一部分形成的肽组成的群组中的至少一者。所述载体并不特别受限制,其示例包括板和棒。

[0147] 除了其上固定有肽的载体外,本发明提供的试剂盒还包括含有抗人IgG抗体的试剂和含有抗人IgA抗体的试剂。这些抗体优选被标记。此外,本发明提供的试剂盒可包括用于引起与标记、稀释剂等的反应的试剂、其他试剂和检查仪器。

[0148] 本申请涉及肽的发明涉及选自于由以下a)~f)项组成的群组中的至少一种肽:

[0149] a) 由SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列形成的XAGE1的一部分形成的肽,所述肽具有允许在SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的N端侧和/或C端侧延伸和/或缺失最多5个氨基酸的氨基酸序列;

[0150] b) 具有通过保守置换a)项所述肽的氨基酸序列中的一个或两个氨基酸而获得的氨基酸序列的肽;

[0151] c) a)项或b)项所述肽的药学上可接受的盐或溶剂化物;

[0152] d) 由SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列形成的XAGE1的一部分形成的肽;所述肽具有允许在SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的N端侧和/或C端侧延伸和/或缺失最多5个氨基酸的氨基酸序列;

[0153] e) 具有通过保守置换d)项所述肽的氨基酸序列中的一个或两个氨基酸而获得的氨基酸序列的肽;及

[0154] f) d) 项或e) 项所述肽的药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0155] 本发明提供的肽的氨基酸序列是基于SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3的序列设计得到。所述肽可通过一般方法合成。所述肽的氨基酸数量优选在20到30的范围内。此外,本发明提供的肽是可通过上述用于癌症疫苗的肽的筛选方法选择得到的肽。

[0156] 在保守性置换中,例如,一种氨基酸被具有类似结构或类似特征的氨基酸置换,比如,一种疏水性氨基酸用另一种疏水性氨基酸的置换。此外,一种氨基酸被与之在大小和化学性质上相同或相似的氨基酸取代,例如,用异亮氨酸置换亮氨酸。在研究自然存在的同源蛋白质家族的序列多样性时,在许多情况下,某些氨基酸置换物比其他氨基酸置换物更可被接受。在更可接受的氨基酸置换物中,原始氨基酸与其置换物之间往往表现出尺寸、电荷、极性和疏水性相似的相关性。这是“保守性置换”定义的基础。在本发明中,保守性置换可被定义为以下五组中的一组内的取代:组1-每个都具有小分子量的脂肪族、非极性或非极性残基(Ala、Ser、Thr、Pro和Gly);组2-极性、带负电的残基及其酰胺(Asp、Asn、Glu和Gln);第3组-极性、带正电的残基(His、Arg和Lys);第4组-每个都具有大分子量的脂肪族非极性残基(Met、Leu、Ile、Val和Cys);及第5组-每个都具有大分子量的芳香族残基(Phe、Tyr和Trp)。

[0157] 本发明的肽的C-末端可以是酰胺或酯。此外,分子内氨基酸的N-末端的氨基或侧链上的例如OH、NH₂或SH可以用适当的保护基(例如,C₁₋₆酰基,如甲酰基或乙酰基)保护。此外,本发明的肽还包括具有与其相连的聚糖的所谓糖肽等。另外,有些氨基酸可以是D-氨基酸。

[0158] 作为本发明提供的肽的盐,例如,特别给出生理上可接受的酸加成盐。本发明提供的肽可以是溶剂化物的形式。溶剂并不特别受限制,只要溶剂在药学上是可接受的,其示例包括水、乙醇、甘油和乙酸。本发明提供的肽可转化为前药。所述前药在体内生理条件下可设计转化成本发明提供的肽。

[0159] 本发明提供的肽可以根据肽的已知合成方法生产。所述肽的合成方法,例如,可以基于固相合成方法和液相合成方法中的任何一种。也就是说,目标肽可以通过以下方式生产:将可构成本发明肽的部分肽或氨基酸与剩余部分缩合;当产品具有保护基时,根据需要移除保护基。

[0160] 在上述a) 项所定义的肽中,延伸和/或缺失中的氨基酸的数目最多为5个,优选4个,更优选3个,更优选2个,更优选1个,最优选0个。

[0161] 在上述b) 项所定义的肽中,保守置换的氨基酸的数目为2或1,更优选为1。

[0162] 在上述d) 项所定义的肽中,延伸和/或缺失中的氨基酸的数量最多为5个,优选4个,更优选3个,更优选2个,更优选1个,最优选0个。

[0163] 在上述e) 项所定义的肽中,保守地被置换的氨基酸的数目为2或1,更优选为1。

[0164] 本发明提供的肽的优选示例是选自于由以下项a1) 至f1) 组成的群组中的至少一种肽:

[0165] a1) 由SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列形成的XAGE1的一部分形成的肽,所述肽具有允许在SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的N端侧和/或C端侧延伸和/或缺失最多3个氨基酸的氨基酸序列;

[0166] b1) 具有通过保守置换a1) 项所述肽的氨基酸序列中的一个氨基酸而获得的氨基

酸序列的肽；

[0167] c1) 上述a1) 项或b1) 项所述肽的药学上可接受的盐或溶剂化物；

[0168] d1) 由SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列形成的XAGE1的一部分形成的肽，所述肽具有允许在SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的N端侧和/或C端侧延伸和/或缺失最多3个氨基酸的氨基酸序列；

[0169] e1) 具有通过保守置换d1) 项所述肽的氨基酸序列中的一个氨基酸而获得的氨基酸序列的肽；及

[0170] f1) 上述d1) 项或e1) 项所述肽的药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0171] 本发明的肽的最优选示例包括SLP1和SLP2。SLP1和SLP2都是具有25个氨基酸残基的长链肽。SLP1具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，SLP2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列。

[0172] SLP1: (SEQ ID NO.1) NQQLKVGILHLGSRQKKIRIQLRSQ

[0173] SLP2: (SEQ ID NO.2) ISQTPGINLDLGSQVKKIIPKEEH

[0174] SLP1具有XAGE1 (SEQ ID NO.3) 的8~32个氨基酸的氨基酸序列，SLP2具有XAGE1的44~68个氨基酸的氨基酸序列。

[0175] 本发明涉及一种用于诱导针对癌症的免疫应答的组合物，包含选自于上述a) 至c) 项中的至少一种肽和选自于上述d) 至f) 项中的至少一种肽。所述组合物更优选地包含选自于上述a1) 至c1) 项中的至少一种肽和选自于上述d1) 至f1) 项中的至少一种肽。该组合物更优选地包含SLP1和SLP2。通过这些肽的联合使用，已经达到了单用其中一种肽无法达到的效果。

[0176] 本发明涉及一种用于增强免疫疗法或化疗对癌症的效果的试剂，其含有选自于由上述a) 至c) 项组成的群组中的至少一种肽和选自于由上述d) 至f) 项组成的群组中的至少一种肽。所述试剂更优选含有选自上述a1) 至c1) 项中的至少一种肽和选自上述d1) 至f1) 项中的至少一种肽。所述试剂更优选的含有SLP1和SLP2。通过这些肽的联合使用，已经达到了单用其中一种肽无法达到的效果。

[0177] 本发明用于诱导免疫应答的组合物和本发明提供的效果增强试剂也都可以被称为癌症疫苗。

[0178] 本发明用于诱导免疫应答的组合物用于诱导哺乳动物(例如，小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、猫、狗、牛、羊、猴子和人类)的免疫应答。

[0179] 本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物激活体液免疫或细胞介导免疫以增强针对癌症的免疫应答，可用于癌症的治疗。此外，本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物可以增强化疗、免疫治疗或用免疫检查点抑制剂治疗癌症的效果。此外，本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物可通过主动诱导XAGE1免疫，使化疗、免疫治疗和免疫检查点分子抑制剂药物治疗中的每一种的无应答病例或预后不良组进入治疗应答和预后良好组。此外，本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物在安全性方面也极好。

[0180] 本发明提供的组合物可以诱导对表达XAGE1的癌症的免疫应答，也可以用于癌症的治疗，并且可以增强对癌症的治疗效果。此外，所述组合物还可通过积极诱导XAGE1免疫，将癌症治疗的无应答病例或预后不良组引向治疗应答和预后良好组。治疗的癌症的例子可包括肺癌、肝癌、前列腺癌、胃癌、恶性黑色素瘤、乳腺癌、食道癌、肾癌和膀胱癌。肺癌被认

为是所述组合物特别适合的癌症,在肺癌中,所述组合物特别适合诱导对非小细胞肺癌或肺腺癌的免疫应答,特别是晚期非小细胞肺癌或肺腺癌。

[0181] 本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物可诱导产生抗XAGE1抗体。尤其是,所述组合物可诱导产生XAGE1-IgG。XAGE1-IgG阳性的患者或待治疗对象具有良好的预后和治疗应答性,因此本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物可以,例如,使对于每种化疗、免疫治疗和用免疫检查点抑制剂治疗预期有预后不良或治疗无应答的患者获得良好的预后或治疗应答。

[0182] 本发明的发明人先前已经制备了含有16或17个氨基酸的表位疫苗,所述16或17个氨基酸属于XAGE1的一部分。然而,本发明提供的肽是一种长链肽,不同于由T细胞识别的表位疫苗,因此所述肽包含各种表位。此外,由选自于由上述a)至c)项组成的群组中的至少一种肽和选自于由上述d)至f)项组成的群组中的至少一种肽形成的组合可以诱导比相关技术表位疫苗更有效的免疫应答。

[0183] 本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物可以包含佐剂以增强免疫应答。此外,所述组合物可包含药理学上可接受的载体或稳定剂。本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物是采用常规使用的药物制剂的生产方法制备,并且可以安全地施用,例如,通过肠外途径注射(例如,静脉注射或者肌肉注射)。

[0184] 可用于制备本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物药理学上可接受的载体的示例包括常用作制剂材料的各种有机或无机载体物质,其示例包括:固体制剂中的赋形剂、润滑剂、粘合剂和崩解剂;液体制剂中的溶剂、增溶剂、悬浮剂、张度剂(tonicity agent)、缓冲剂和舒缓剂(soothing agent)。此外,根据需要,一般添加剂,例如防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂、吸附剂或保湿剂,也可以以适当地剂量适当的使用。

[0185] 所制备的注射剂可以是溶液,也可以是在使用前要溶解的固体制剂。在给药时,在固体制剂的情况下,固体制剂可溶解于常用的水性稀释剂中然后作为溶液使用。所述水性稀释剂包括葡萄糖水溶液、生理盐水、林格溶液、营养补充溶液等。

[0186] 在本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物中,本发明提供的肽的含量根据制剂的形式而变化,但通常为相对于整个配方的约0.1wt%~约100wt%,优选约10wt%~约99.9wt%,更优选约20wt%~约90wt%。适当调整从上述a)至c)项中选择的至少一种肽与从上述d)至f)项中选择的至少一种肽的含量之间的比率。例如,该比率是1:9~9:1、或3:7~7:3、或为5:5。本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物剂量取决于例如给药途径、症状和患者年龄。例如,当所述组合物是通过静脉给药或类似方式经肠外给药时,所述组合物可以按照每日剂量根据每千克体重约0.005mg至约50mg、优选约0.05mg至约10mg的肽给药。

[0187] 根据本发明的一个方面的用于诱导免疫应答的组合物可在其他化疗、免疫治疗或免疫检查点分子抑制剂药物的施用之前给药。当预先施用本发明提供的用于诱导免疫应答的组合物时,可以增强化疗、免疫治疗或免疫检查点分子抑制剂药物的效果。例如,所述组合物可在施用任何所述药物制剂之前给药1天到半年,优选1周到3个月,更优选2周到2个月。在一个优选实施方案中,可在施用免疫检查点分子抑制剂药物之前,所述组合物给药28天至3个月。

[0188] 本发明还涉及制备活化CD4阳性T细胞或活化CD8阳性T细胞的方法,包括将从患者外周血中获得的CD4阳性T细胞或CD8阳性T细胞用具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的

SLP1和具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列的SLP2进行刺激培养的步骤。

[0189] 更具体地说,CD4阳性T细胞或CD8阳性T细胞从外周血单核细胞中分离,并且在SLP1和SLP2存在下进行刺激培养3天至21天,优选7天至18天。之后,在抗原呈递细胞存在下,用SLP1和/或SLP2重新刺激所述细胞3~24h,优选6~18h。以此方法,可以获得活化的CD4阳性T细胞或活化的CD8阳性T细胞。所述刺激培养时,SLP1和SLP2的浓度均为0.1 μ M~10 μ M,优选为0.1 μ M~1 μ M。

[0190] 获得的活化CD4阳性T细胞和活化CD8阳性T细胞可用于细胞治疗。例如,活化的CD4阳性T细胞和活化的CD8阳性T细胞可通过给予捐献了自己的外周血的患者用于过继性免疫治疗。

[0191] 现在,通过实例和测试实例更具体地描述本发明。然而,本发明并不限于此。

[0192] 实例

[0193] 各实例中所用的血液是在患者接受癌症治疗前经知情同意捐献的。

[0194] [实例1]

[0195] <XAGE1-IgG和XAGE1-IgA的检测>

[0196] 使用的XAGE1蛋白(81个氨基酸,SEQ ID NO.3)由吉尔生化(上海)有限公司合成。合成的XAGE1蛋白经高效液相色谱柱纯化,纯度经检测达到90%以上。

[0197] 将浓度为1 μ g/ml(碳酸盐缓冲液,pH 9.6)的XAGE1固定在96孔板(由Nunc制造)上,4 $^{\circ}$ C条件过夜。之后,用洗涤液(PBS/0.1%吐温)清洗96孔板,添加5%FCS/PBS,并在37 $^{\circ}$ C下封闭1小时。封闭结束后,加入100倍、400倍、1600倍或6400倍稀释的血清,在37 $^{\circ}$ C下反应2小时。然后,用洗涤液洗涤后,加入过氧化物酶标记的山羊抗人IgG抗体(稀释5000倍)(由Jackson Immuno Research制造)或过氧化物酶标记的山羊抗人IgA抗体(稀释8000倍)(由Jackson ImmunoResearch制造),在37 $^{\circ}$ C下反应1小时。反应完成后,用洗涤液洗涤所得产物,并添加添加有过氧化氢的底物溶液(通过将邻苯二胺溶解在0.05M柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)中获得的溶液)用于显色。显色后,加入6N硫酸终止反应,用酶标仪(microplate reader,Bio-Rad生产)测量吸光度(波长490nm)。在这些吸光度的基础上,用常规的确定抗体效价的方法(Autoantibodies Against Cancer Antigens:Sacha Gnjatich,Lloyd J.Old,Yao-Tseng Chen)计算抗体效价。对于IgG和IgA而言,相对于健康个体对照血清抗体效价的100倍或更多被定义为阳性,小于100倍被定义为阴性。

[0198] <NY-ESA-1-IgG的检测>

[0199] NY-ESA-1(180个氨基酸,SEQ ID NO.4)是用大肠杆菌通过通用方法制备的。NY-ESA-1-IgG的检测方法与上述XAGE1-IgG的检测方法类似。

[0200] <抗CT抗原抗体或抗p53抗体的检测>

[0201] CT抗原或p53都是以固定在微球上的状态从冈山大学获得的(Bioconjugate Chem.2015,26,2076-2084)。CT抗原或p53的检测方法与上述XAGE1抗体的检测方法相似。

[0202] [测试实例1]

[0203] <XAGE1-IgG和XAGE1-IgA反应>

[0204] 检查了从145例晚期(临床IIIIB-IV阶段)肺腺癌患者采集的血清中的抗肿瘤抗原XAGE1、MAGE-A3、SSX-2、NY-ESO-1和TP53的特异性IgG和IgA。

[0205] MAGE-A3获自ATgen(韩国),SSX-2获自ATgen(韩国),TP53获自RayBiotech(美国)。

使用大肠杆菌采用常规方法制备了NY-ESO-1 (180个氨基酸, SEQ ID NO.4)。用类似于上述XAGE1-IgG和XAGE1-IgA的检测方法的方法检测了针对每种抗原的特异性IgG和IgA。

[0206] 有33例XAGE1-IgG阳性者(22.7%),其中证实约一半,15例(10.3%)有XAGE1-IgA免疫应答(图1)。这相对对MAGE-A3、SSX-2、NY-ESO-1和TP53抗原(据说在肺癌中具有高免疫原性)的免疫应答而言是较高的频率(抗相应抗原的IgG反应:4.1%、1.4%、6.2%和8.3%, IgA反应:0.7%、0.7%、0.7%和4.1%) (图2)。所有XAGE1-IgA阳性患者均为XAGE1-IgG阳性。

[0207] [测试实例2]

[0208] <作为替代标志物的XAGE1-IgG和XAGE1-IgA反应>

[0209] 检查了从55例XAGE1抗原阳性肺腺癌患者获得的血清中对抗51种癌症抗原的自身抗体反应,结果表明(图3A),在XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性的组中观察到对各种癌症抗原的免疫应答,表明XAGE1-IgG和XAGE1-IgA作为自身肿瘤免疫应答的替代标志物。同时,随着XAGE1-IgA免疫应答的出现,对自体肿瘤的免疫应答降低(XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性组)。此外,在XAGE1免疫阴性病例(XAGE1-IgG阴性和XAGE1-IgA阴性组)中,几乎没有观察到对自体肿瘤的免疫应答。

[0210] 如图3B所示,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性个体对多种癌症抗原有免疫反应,并且与XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性个体相比,处于对癌症有潜在高免疫应答的状态(免疫活化状态)。同时,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性个体的免疫活性高于XAGE1-IgG阴性和XAGE1-IgA阴性个体,但处于比XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性个体更具抑制免疫活性的状态。

[0211] 作为免疫活化状态和免疫抑制状态的原因,肿瘤本身的性质首先是可以想到的。145例肺腺癌患者血清中免疫抑制细胞因子的测定结果如图4所示。与没有XAGE1免疫的患者相比,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性的患者的免疫抑制细胞因子TGF- β 值显著偏低,且与XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性个体的具有可比性。此外,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性个体的IL-6值(IL-6是一种不良预后因子,是一种在免疫衰竭时增大的细胞因子),与XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性个体相比,显著偏高,这表明XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性个体与XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性个体相比,处于免疫衰竭状态。

[0212] 此外,在癌症局部部位的分析中(图5),调节性T细胞作为癌症局部抑制免疫的细胞,其频率在IgA⁺B细胞高度局部积聚的患者中明显偏高(图5D),表明这种局部积累的IgA⁺B细胞本身产生免疫抑制细胞因子IL-10(图5F)。因此,这表明IgA⁺B细胞参与局部免疫抑制和调节性T细胞的积聚(局部IL-10参与了积聚)。此外,分析了在IgA⁺B细胞中表达的免疫检查点分子(抑制T细胞功能的分子),结果表明,高表达免疫检查点分子PD-L1和Galectin-9的PD-L1⁺GAL-9⁺IgA⁺B细胞在癌症局部显著积聚(图6)。

[0213] 上述结果表明,在XAGE1-IgG⁺IgA⁺患者中,由于例如肿瘤中的基因异常产生免疫抑制细胞因子(如IL-6和IL-10);癌症局部抑制免疫的IgA⁺B细胞(调节性B细胞)积聚。认为IgA⁺B细胞不仅通过自身产生的IL-10和免疫检查点分子直接抑制T细胞的功能,而且通过局部积累调节性T细胞间接抑制免疫。

[0214] [测试实例3]

[0215] <XAGE1免疫的化疗的应答率及预后预测>

[0216] 以XAGE1-IgG、XAGE1-IgA、无免疫应答、无XAGE1表达为指标,分析了145例肺腺癌晚期患者的生存曲线。结果如下:XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性组有33.8个月的中位生存期,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性组有19.7个月的中位生存期。无免疫应答组(XAGE1-IgG阴性组和XAGE1-IgA阴性组)有11.9个月的中位生存期,无XAGE1表达组有13.6个月的中位生存期;这表明,XAGE1-IgG阳性组具有显著延长了的中位生存期。特别是,在XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性组中,中位生存期的延长是显著的(图7)。

[0217] 这种趋势在EGFR基因突变阴性的病例中是显著的。在对101例EGFR基因突变阴性的肺腺癌晚期的研究中,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性组有32.0个月的中位生存期,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性组有16.0个月的中位生存期,无免疫应答组(XAGE1-IgG阴性和XAGE1-IgA阴性组)有15.4个月的中位生存期,无XAGE1表达组有11.7个月的中位生存期(图7)。

[0218] 此外,在36例EGFR基因突变阴性并可检测到XAGE1抗原表达病变的肺腺癌晚期患者中,发现:与XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性组和无免疫应答组相比,XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性组对初次化疗具有显著偏高的应答率(图8)。

[0219] 因此,这表明以针对XAGE1的免疫应答作为指标(XAGE1-IgG,XAGE1-IgA,无免疫应答),能清楚的预测化疗的应答率和预后。

[0220] [测试实例4]

[0221] <XAGE1和NY-ESO-1免疫作为免疫检查点分子抑制剂药物的应答案例的生物标志物>

[0222] 以53例晚期非小细胞肺癌患者为研究对象,用对高度免疫原性的XAGE1和NY-ESO-1的免疫应答(存在对XAGE1或NY-ESO-1的免疫应答及无任何免疫应答)作为指标,研究了抗PD-1抗体作为免疫检查点分子抑制剂的治疗效果。在抗PD-1抗体治疗开始前约28天采集了患者的血清。

[0223] 对XAGE1有免疫应答的组(XAGE1-IgG阳性)或对NY-ESO-1有免疫应答的组(NY-ESO-1-IgG阳性):16例患者

[0224] 无免疫应答组(无抗XAGE1抗体和抗NY-ESO-1抗体的组):37例患者

[0225] 在图9中,显示了靶病变的最佳变化率。在对XAGE1或NY-ESO-1有免疫应答的组中,在大多数病例中发现了靶病变中肿瘤有明显的消退作用,但在无免疫应答组中,未见明显的肿瘤消退作用。应答率在图10中显示。在对XAGE1或NY-ESO-1有免疫应答的组中,有5例完全应答(CR)病例,6例部分应答(PR)病例,3例稳定疾病(SD)病例和2例进行性疾病(PD)病例。在无免疫应答组中,PR 2例,SD 9例,PD 26例。此外,图10中显示了对XAGE1或NY-ESO-1有免疫应答的组和没有任何免疫应答的组的无进展生存率和总生存率。结果表明,有免疫应答组和无免疫应答组在无进展生存率和总生存率方面存在显著差异。

[0226] [测试实例5]

[0227] 根据目前的指导原则,基于免疫检查点抑制剂药物对具有驱动基因突变(例如,EGFR基因突变或EML-4/ALK融合基因异常)的肺癌有较低的免疫治疗作用,已有关于应慎重考虑(应避免)决定免疫疗法的应用的通告。然而,对两名XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性患者进行免疫治疗(使用抗PD-1抗体作为免疫检查点分子抑制剂药物进行治疗),其中一名患者具有EGFR基因突变,另一名患者具有EML-4/ALK融合基因异常,结果发现:具有EGFR基

因突变的患者为SD,具有EML-4/ALK融合基因异常的患者有明显应答,其肿瘤消退率达90%以上。根据现行指南被忽视的对免疫治疗(抗PD-1抗体作为免疫检查点分子抑制剂药物的治疗)有明显应答的病例可以使用XAGE1-IgG和XAGE1-IgA作为指标而不被忽略。

[0228] 综上所述,XAGE1-IgG和XAGE1-IgA的存在与否与化疗和免疫治疗的预后有关,将IgG和IgA作为一组进行检测是合适的。

[0229] 在图11中,示出了图3AXAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性组、XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阳性组和XAGE1-IgG阴性和XAGE1-IgA阴性组对癌症抗原的免疫应答结果的进一步分析结果。如图11所示,在XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性个体中发现了MAEL抗原和p53抗原的免疫应答。因此,抗MAEL抗体阳性个体和抗p53抗体阳性个体为XAGE1-IgG呈阳性和XAGE1-IgA呈阴性,并且处于免疫活化状态。

[0230] 此外,对抗p53抗体的免疫应答可以预测化疗的效果和免疫治疗的效果。在图12中,在抗PD-1抗体治疗的应答病例中监测抗NY-ESO-1抗体、抗XAGE1抗体和抗p53抗体。结果发现,在应答病例中发现了增强的针对抗p53抗原的免疫应答,因此抗p53抗体的变化有助于判断抗PD-1抗体治疗的治疗效果。

[0231] <抗NY-ESO-1抗体、抗BAGE抗体和抗BORIS抗体>

[0232] 使用经抗PD-1抗体治疗的患者的预处理血清分析对包括XAGE1和NY-ESO-1抗体在内的50种癌症抗原的免疫应答。如图13A所示,XAGE1-IgG和NY-ESO-1-IgG呈阳性个体对多种抗原有免疫应答,且处于免疫活化状态。此外,如图13B所示,八分之三的抗PD-1抗体应答病例对BAGE抗原或BORIS抗原的免疫应答呈显著阳性(12例无应答病例中为零例),因此,通过检测抗BAGE抗体或抗BORIS抗体可以预测抗PD-1治疗的效果。

[0233] <抗原扩散(Antigen Spreading)>

[0234] 在图14A中,显示了通过抗PD-1抗体治疗的靶病变的变化率(负值表示肿瘤消退)与抗CT抗原抗体(XAGE1-IgG和NY-ESO-1-IgG)的抗体效价之间的关系。在图14B中,显示了通过抗PD-1抗体治疗的靶病变的变化率与治疗中对多种抗原增强的免疫反应(抗原扩散)的数量之间的关系。结果表明:随着抗CT抗原抗体效价的升高,抗PD-1疗法的肿瘤消退率也随之升高;随着对各种CT抗原的免疫反应的数量增加(抗原扩散增加),抗PD-1疗法的肿瘤消退率也随之升高。因此,抗PD-1疗法的效果可以通过检测针对多种CT抗原的抗体来预测。

[0235] <抗MAGE-B3抗体和抗SSX4抗体>

[0236] 在图15A中,示出了抗PD-1抗体治疗前后对多种抗原的免疫应答之间的差异。在图15B中,在抗PD-1抗体治疗的应答病例中发现对MAGE-B3抗原和SSX4抗原的免疫应答的扩散频率很高,而在非应答病例中并未发现。因此,抗MAGE-B3抗体和抗SSX4抗体是影响抗PD-1抗体治疗效果的重要因素,并且对预测治疗效果是有用的。

[0237] 图16和图17显示了同一患者的图像和免疫反应,所述患者在研究者发起的研究中是一个完全应答的病例,术前联合使用抗CCR4抗体+抗PD-1抗体。在图16中,观察到对SSX4抗原的免疫反应。图17是胸部CT图像,“基线”图像为抗CCR4抗体+抗PD-1抗体给药前的CT图像,“第3周”和“第7周”为研究药物给药后和术前的CT图像。术前给予抗CCR4抗体4次,术前给予抗PD-1抗体3次,第8周进行手术。CT图像显示肿瘤经免疫治疗后消退。这个病人抗SSX4抗体呈阳性,是一个对免疫治疗有明显应答的病例。可见,检测抗SSX4抗体可作为预测免疫

治疗效果的一种方法。

[0238] [实例2]

[0239] <XAGE1长链肽的合成及诱导免疫应答的成分(疫苗)的制备方法>

[0240] 通过Peptide Institute, Inc的通用方法合成了GMP级的各具有25个氨基酸残基的长链肽SLP1和SLP2(其为XAGE1的部分肽)。SLP1是由XAGE1(由81个氨基酸形成的蛋白质)的8~32个氨基酸形成的肽, SLP2是由XAGE1的44~68个氨基酸形成的肽。SLP1和SLP2的纯度均在99%以上。

[0241] SLP1氨基酸序列(SEQ ID NO.1): NQQLKVGILHLGSRQKKIRIQLRSQ

[0242] SLP2氨基酸序列(SEQ ID NO.2): ISQTPGINLDLGSQVVKVIIPKEEH

[0243] 将上述获得的SLP1和SLP2混合以提供用于诱导免疫应答的组合物(疫苗)。

[0244] <SLP1和SLP2对细胞的刺激>

[0245] a. 细胞的分离

[0246] 采用密度梯度离心法从XAGE1抗体阳性患者(XAGE1-IgG阳性和XAGE1-IgA阴性患者)的外周血获得单核细胞。然后, 使用抗CD4抗体结合珠和抗CD8抗体结合珠(由Miltenyi Biotec生产), 用磁激活细胞分选法(MACS, 由Miltenyi Biotec生产)依次分离CD8阳性细胞、CD4阳性细胞、CD4阴性细胞和CD8阴性细胞。

[0247] b. SLP1或SLP2特异性CD4阳性T细胞克隆的建立

[0248] b1. 经40Gy辐照后的 1×10^6 CD4阳性T细胞和 1×10^6 CD4阴性且CD8阴性细胞在96孔U底培养板中, 在存在 $1 \mu\text{M}$ SLP1和 $1 \mu\text{M}$ SLP2的条件下, 在 $200 \mu\text{l}$ 的含2%血清的AIM培养基(含IL-2和IL-7)中进行刺激培养14天。

[0249] 此外, 在以下实验的培养中, 除非另有说明外, 使用 $200 \mu\text{l}$ 含2%血清的AIM培养基(含IL-2和IL-7)。

[0250] b2. 为用作抗原呈递细胞, 用PHA刺激a部分中获得的患者的CD4阳性T细胞的一部分来制备T-APC细胞。

[0251] b3. 将 $30 \mu\text{l}$ 经b1部分刺激培养14d后的从96孔板上采集的细胞置于新鲜的96孔板中以便使用SLP1和SLP2进行再刺激和无刺激, 并将 1×10^4 ($30 \mu\text{l}$) 作为抗原呈递细胞制备的T-APCs添加到每个孔中。此外, SLP1和SLP2分别以 $1 \mu\text{M}$ 的浓度加入到孔中以用SLP1和SLP2进行再刺激, 再刺激进行12个小时。

[0252] b4. 12个小时后, 采用ELISA法检测96孔中培养上清液中的IFN γ 。

[0253] b5. 比较了用SLP1和SLP2刺激的培养上清液和未刺激的培养上清液的IFN γ 活性, 并采用有限稀释法克隆了具有很强活性的孔(在这些孔中具有抗原特异性T细胞)。

[0254] b6. 用b3~b5部分的方法再次筛选克隆的细胞, 并选择SLP1或SLP2特异性CD4阳性T细胞克隆(下文中有时将其称为CD4克隆)。因此, 获得了多个T细胞克隆。

[0255] b7. 对产生的克隆T细胞进行PHA刺激以使细胞生长, 然后冷冻保存。获得的CD4克隆之一是4C34-1。

[0256] c. SLP1或SLP2特异性CD8阳性T细胞克隆的建立方法

[0257] 采用与部分“b”相同的方式制备了SLP1或SLP2特异性CD8阳性T细胞克隆(下文中有时称为CD8克隆)。获得的CD8克隆之一为8C34TY。

[0258] d. 获得的克隆T细胞对SLP1和SLP2的反应及表位分析

[0259] 分析了部分“b”获得的CD4克隆4C34-1和部分“c”获得的CD8克隆8C34TY。

[0260] 合成了20条由XAGE1的部分氨基酸序列形成的多肽。它们各自的氨基酸序列如SEQ ID NOS:5~24所示。此外,各肽在XAGE1氨基酸序列上的位置在序列表和图19中示出。各肽由PH Japan(日本)的通用方法合成。每条肽的纯度都在95%以上。

[0261] 2×10^4 CD4克隆或CD8克隆T细胞在相同数量的T-APCs存在下,用1 μ M的每种肽刺激培养12h,并通过ELISA法检测上清液中的IFN γ 。

[0262] 结果如图19所示。CD4克隆4C34-1识别SLP2(44-68)中的52-68个氨基酸。此外,CD8克隆8C34Y识别SLP1(8-32)和氨基酸19-33,表明其中存在表位。

[0263] 通过用SLP1和SLP2对抗XAGE1抗体阳性患者的外周血单核细胞的刺激培养,成功地检测到识别SLP1和SLP2的多个CD4 T细胞和CD8 T细胞。这表明SLP1和SLP2疫苗是一种含有多种表位的多抗原性肿瘤疫苗,而不同于由T细胞识别的表位疫苗。

[0264] <SLP1和SLP2联合治疗的有效性>

[0265] 在相同数量的T-APCs存在的情况下,将 1×10^4 CD4克隆(4C34-1) T细胞用单独SLP1(1 μ M)、单独SLP2(1 μ M)或上述两种肽的组合(各1 μ M)进行刺激培养12个小时,并采用ELISA法检测上清液中的IFN γ (图20)。CD4克隆T细胞识别SLP2。

[0266] 以相同的方式,在相同数量的T-APCs存在的情况下,将 1×10^4 CD8克隆(8C34TY) T细胞用单独的SLP1(1 μ M)、单独的SLP2(1 μ M)或上述两种肽的组合(各1 μ M)进行刺激培养12个小时,并采用ELISA法检测上清液中的IFN γ (图20)。CD8克隆T细胞识别SLP1。

[0267] 综上所述,将 1×10^4 CD4克隆(4C34-1) T细胞和 1×10^4 CD8克隆(8C34TY) T细胞用单独的SLP1(1 μ M)、单独的SLP2(1 μ M)或上述两种肽的组合(各1 μ M)进行刺激培养12h,并通过ELISA法检测上清液中的IFN γ 。结果发现,SLP1和SLP2的组合增加反应。

[0268] 人外周血不含单独的CD4阳性T细胞或CD8阳性T细胞,因此,SLP1和SLP2联合应用可诱导比单独SLP1或单独SLP2更有效的免疫应答。

[0269] <诱导IgG免疫的能力>

[0270] 在 2×10^4 CD4克隆4C34-1 T细胞、 2×10^4 CD8克隆C34TYT细胞和蛋白质转运抑制剂混合物(Protein Transport Inhibitor Cocktail,eBioscienc,美国)(500倍稀释)存在的条件下,将 1×10^5 个部分“a”获得的外周血单核细胞分别用单独SLP1(1 μ M)、单独SLP2(1 μ M)或上述两种肽的组合(各1 μ M)进行刺激培养12个小时。

[0271] 采用流式细胞术对B细胞进行门控,并在每个肽的刺激下检测B细胞表面的IgG或IgA(图21)。发现SLP1和SLP2联合应用可增加IgG在B细胞表面的表达,同时IgA的表达量无变化。

[0272] 接下来,在 2×10^4 CD4克隆4C34-1 T细胞和 2×10^4 CD8克隆8C34TYT细胞的存在下,将 1×10^5 个从与部分“a”中相同的患者的血清中分离出来的B细胞用单独SLP1(1 μ M)、单独SLP2(1 μ M)或上述两种肽的组合(各1 μ M)进行刺激培养72个小时。

[0273] 检测存在于培养上清液中的XAGE1特异性抗体。结果发现,在SLP1和SLP2联合的情况下,检测到了XAGE1-IgG,而没有发现IgA(图22)。

[0274] 如上所述,通过利用SLP1和SLP2的组合在体外刺激抗XAGE1抗体阳性患者的外周血单核细胞,从B细胞中检测到了抗原特异性IgG。因此,含有SLP1和SLP2的组合物是一种能够诱导XAGE1-IgG产生并能够诱导对癌症的免疫应答的癌症疫苗。XAGE1-IgG阳性表示治疗

应答组和预后良好组,因此含有SLP1和SLP2的组合物可以使患者对治疗有应答和预后良好。

[0275] <安全性>

[0276] 开展了毒性试验,是将SLP1和SLP2的混合物与佐剂重复给药10周(每14天间歇性给药5次),将其注入Sprague-Dawley大鼠背部皮肤(CRL:CD(SD),给药开始时6周大,一组包括10只雄性和10只雌性)。

[0277] 受试物的剂量采用以下两种剂量:0.2mg/kg (SLP1:0.2mg/kg+SLP2:0.2mg/kg) 和2mg/kg (SLP1:2mg/kg+SLP2:2mg/kg)。将溶解在注射用水中的SLP1和SLP2及溶链菌制剂与等量的油佐剂MONTANIDE ISA 51VG (ISA51) 混合制成乳剂,将其按1mL/kg的注射量注入背部皮肤。此外,形成了被给予注射用水、溶链菌制剂与ISA51的乳剂的溶媒对照组和被给予生理盐水的生理盐水对照组。

[0278] 在给药期间,进行常规观察、体重测定和食物摄入量测定,并在给药后第10周进行尿检和眼科检查。给药结束时,进行血液学检查、血液化学检查、尸检、器官重量测量和组织病理学检查。

[0279] 未观察到因服用受试物而导致的死亡,且在任何检查中未观察到因服用受试物而引起的变化。

[0280] 在给药部位(背部皮肤下),在所述溶媒对照组和受试物给药组的几乎所有雄性和雌性病例中,在尸检中都观察到一个白色的焦点(focus),可能是由于所给物质滞留所致,并且,除了所给物质的滞留外,还在组织病理学上观察到淋巴细胞/浆细胞和组织细胞的浸润和纤维化。另外,在溶媒对照组的少数雌性患者中还观察到中性粒细胞浸润。然而,受试物给药组的所有变化与溶媒给药组的变化具有可比性,并且未发现由于SLP1和SLP2引起的变化增强。

[0281] 观察到佐剂引起的给药部位皮下炎症反应,但未发现由于SLP1和SLP2引起的增强,也未发现因受试物给药引起的毒理学上的显著变化。观察到受试物给药引起的显著变化。因此,认为在本试验中,无论雄雌,SLP1和SLP2的未观察到不良反应的水平均未超过2mg/kg。

[0282] <人类疫苗的生产>

[0283] 将SLP1和SLP2与佐剂OK432溶链菌制剂一起在Montanide (ISA51,由SEPPIC制造)中乳化,以提供用于诱导免疫应答的组合物(下文中有时称为XAGE1疫苗)。更具体地说,以GMP级制备的两种长链肽形成的肽混合物是以三种剂量水平制备的。

[0284] 低剂量:500 μ g (SLP1:250 μ g+SLP2:250 μ g)

[0285] 中剂量:1mg (SLP1:500 μ g+SLP2:500 μ g)

[0286] 高剂量:2mg (SLP1:1mg+SLP2:1mg)

[0287] 每种肽混合物与0.2KE的OK432 (Chugai Pharmaceutical Co.,Ltd.) 一起混入1.25mL的生食品(raw diet)中,并在1.25mL的Montanide中乳化。

[0288] <安全性(I期临床试验)>

[0289] 对肺腺癌晚期患者施用XAGE1疫苗。本试验为I期临床试验,以确定安全性为主要目的,并以调查试验药物给药引起的XAGE1抗体效价的变化作为次要目的。这项临床试验是根据《赫尔辛基宣言》、《Ethical Guidelines for Medical and Health Research

Involving Human Subjects》和XAGE1疫苗临床试验实施计划工作表进行的,并尽可能符合ICH E6(R1)-Guideline for Good Clinical Practice (GCP)。

[0290] 使用上述三种剂量水平的XAGE1疫苗针对晚期或术后复发的肺腺癌进行了该项试验。XAGE1疫苗每次接种于两个不同的肢体部位。每隔2周总共给药4次。每一剂量分别给予3个病例。

[0291] 关于安全性,观察了不良反应的种类、频率和程度。对于不良反应的分级,使用《通用不良反应术语标准(Common Terminology Criteria for Adverse Events)》(CTCAE) V4.0日文翻译JCOG版本。根据CTCAE V4.0判断不良反应。不良反应的观察期定为从试验药物初次给药之日到最终给药后6周(个人试验结束)。

[0292] 安全性评估共完成7例,即,低剂量组3例,中剂量组3例,高剂量组1例。如表1所示,由XAGE1疫苗引起的所有不良反应都是轻微的,而没有观察到严重的不良反应。

[0293] 表1

受试者识别号	反应名称	严重程度	严重性	治疗	结果
[0294] KMX-01	肌肉痛	G2	非严重	无	康复
KMX-01	皮肤硬结	G1	非严重	无	未康复
KMX-03	发热	G1	非严重	其他药剂处方 (CALONAL)	康复
KMX-03	食欲不振	G1	非严重	无	缓解
KMX-01	头痛	G1	非严重	无	康复
KMX-01	恶心	G1	非严重	无	康复
KMX-02	疼痛(注射部位)	G1	非严重	无	康复
KMX-02	皮肤硬结	G1	非严重	无	未康复
KMX-02	白细胞增多	G1	非严重	无	未康复
KMX-03	萎靡不振	G1	非严重	无	缓解
KMX-03	畏寒	G1	非严重	无	康复
KMX-03	白细胞增多	G1	非严重	无	康复
KMX-03	皮肤硬结	G1	非严重	无	未康复
[0295] KMX-03	瘙痒(注射部位)	G1	非严重	局部类固醇	康复
KMX-02	发热	G1	非严重	其他药剂处方 (CALONAL)	康复
KMX-02	肺炎	G2	非严重	其他药剂处方 (Prednisolone)	康复
KMX-04	白细胞增多	G1	非严重	无	未康复
KMX-05	皮肤硬结	G1	非严重	无	未康复
KMX-05	发热	G1	非严重	其他药剂处方 (CALONAL)	缓解
KMX-06	呼吸困难	G1	非严重	无	康复
KMX-06	发热	G1	非严重	其他药剂处方 (CALONAL)	康复
KMX-06	皮肤硬结	G1	非严重	无	未康复
KMX-07	皮肤硬结	G1	非严重	无	未康复

[0296] <关于XAGE1疫苗的有效性>

[0297] 1. XAGE1-IgG的诱导

[0298] 注射XAGE1疫苗发现在七分之四的病例中提高了XAGE1-IgG抗体效价,并且不诱导XAGE1-IgA和NY-ESO-1-IgG(图23)。

[0299] a. 在XAGE1疫苗低剂量组中,在三分之二的病例中发现了XAGE1-IgG抗体效价增加。

[0300] b. 在XAGE1疫苗中剂量组中,在三分之二的病例中发现了XAGE1-IgG抗体效价增加。

[0301] c. 从治疗前7例患者中有1例为XAGE1-IgA阳性(KMX-01),其余均为阴性。未发现XAGE1疫苗提高XAGE1-IgA抗体效价。

[0302] 因此,也在体内观察到了在体外观察到的SLP1和SLP2对XAGE1-IgG免疫的特异性诱导作用。

[0303] 2. 肿瘤标志物

[0304] 如图24所示,在七分之四的病例中观察到肿瘤标志物的增强抑制或降低。

[0305] a. 在XAGE1疫苗低剂量组的三分之二的病例中发现了肿瘤标记物的增强抑制。

[0306] b. 在XAGE1疫苗中剂量组的三分之二病例中观察到了肿瘤标志物降低。

[0307] c. 在XAGE1-IgG抗体效价增高的病例中有四分之三的病例发现了肿瘤标志物的增强抑制或降低。同时,在未发现XAGE1-IgG抗体效价增加的病例中有三分之二的病例中观察到了肿瘤标记物的增加。

[0308] 因此,通过使用XAGE1疫苗,观察到了肿瘤标志物的增强抑制或减少。

[0309] 3. 抗原特异性T细胞的诱导

[0310] 从低、中剂量给药患者的外周血中分别分离出了CD4阳性T细胞,并研究了通过施用XAGE1疫苗对抗原特异性T细胞的诱导。在低剂量给药患者和中剂量给药患者中,通过SLP1和SLP2联合刺激产生了IFN γ ,这表明诱导了对SLP1抗原和SLP2抗原具有反应性的T细胞(图25和图26)。

[0311] 在中剂量给药患者中,发现单用SLP1和SLP2刺激可引起IFN γ 的产生。这表明SLP1和SLP2含有多个表位,并且说明XAGE1疫苗比单独SLP1疫苗和单独SLP2疫苗更有效。此外,通过用SLP1和SLP2联合刺激,可以证实更有效地产生IFN γ (图26)。

[0312] 因此,体内实验证明,含有SLP1和SLP2的XAGE1疫苗是一种能够诱导癌症患者抗原特异性T细胞的疫苗,也是一种含有多个表位的多抗原性疫苗,因此,是一种通过SLP1和SLP2的混合能诱导更有效免疫应答的疫苗。

[0313] 实验方案如下所述:

[0314] a) 接种疫苗后第12周,用密度梯度离心法从外周血中获得单核细胞部分。然后,使用抗CD4抗体结合珠、抗CD8抗体结合珠和抗CD19抗体结合珠(由Miltenyi Biotec制造),通过磁激活细胞分选法(MACS,由Miltenyi Biotec制造)依次分离CD8阳性部分、CD4阳性部分、CD19阳性部分和CD4⁻CD8⁻CD19⁻部分。

[0315] b) 在1 μ M SLP1和1 μ M SLP2存在的条件下,将1 \times 10⁶CD4阳性T细胞和作为抗原提呈细胞的等量X射线照射(60Gy)的CD4⁻CD8⁻T细胞使用96孔板在CO₂培养箱中共培养12天。作为培养T细胞的培养基,除非另有说明,否则使用5%混合血清/AIM-V(IL-210IU/ml,IL-

710ng/ml)。

[0316] c) 产IFN γ 细胞的检测

[0317] 包括通过刺激培养生长的抗原特异性T细胞的细胞群进行如下所述的二次刺激，并检测抗原特异性细胞因子的产生。

[0318] 对已进行刺激培养的细胞，加入等量的自体EBV-B细胞 (EB病毒 (Epstein-Barrvirus) 感染的B细胞：用作抗原提呈细胞) 和肽 (SLP1、SLP2或SLP1+SLP2)，并在37°C的CO₂培养箱中进行二次刺激四个小时。作为对照组，在不添加任何肽的情况下，在37°C的CO₂培养箱中进行二次刺激4h。

[0319] 之后，为了用2 μ l人IFN- γ 捕获抗体 (由Miltenyi Biotec制造) 标记培养的细胞，将培养的细胞悬浮在10mlAIM-V培养基中，并在37°C的CO₂培养箱中反应45min，同时使用旋转器悬浮 (MACSmix, 由Miltenyi Biotec制造)。洗涤后，加入2 μ lPE标记的人IFN- γ 抗体 (由Miltenyi Biotec制造)、2 μ l 7AAD (由BD制造) 以及1 μ l FITC标记的抗人CD4抗体或FITC标记的抗人CD8抗体 (由Miltenyi Biotec制造) 对细胞进行染色。

[0320] 染色后，加入FACS缓冲液 (1%FCS/PBS, 0.02%叠氮钠) 来洗涤细胞，并使用FACS Calibur (由BD制造) 进行流式细胞术来检测产生IFN γ 的细胞。用数据分析软件 (Tree Star公司生产的FlowJo) 分析了产IFN γ 细胞的频率。结果如图25和图26所示。

[0321] 工业适用性

[0322] 本发明的检测方法可以预测癌症治疗的效果，从而扩大了癌症治疗的可能性。此外，该检测方法也有助于提高医疗经济性。另外，本发明的用于诱导免疫应答的组合物可以直接用于癌症的治疗，并且可以增强化疗、免疫治疗或用免疫检查点抑制剂药物治疗的效果，从而使治疗无应答者对治疗有反应。

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 6
 Pro Lys Lys Lys Asn Gln Gln Leu Lys Val Gly Ile Leu His Leu
 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 7
 Lys Asn Gln Gln Leu Lys Val Gly Ile Leu His Leu Gly Ser Arg
 1 5 10 15
 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 8
 Gln Leu Lys Val Gly Ile Leu His Leu Gly Ser Arg Gln Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 9
 Val Gly Ile Leu His Leu Gly Ser Arg Gln Lys Lys Ile Arg Ile
 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 10
 Leu His Leu Gly Ser Arg Gln Lys Lys Ile Arg Ile Gln Leu Arg
 1 5 10 15
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

Gly Ser Arg Gln Lys Lys Ile Arg Ile Gln Leu Arg Ser Gln Cys
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 12

Gln Lys Lys Ile Arg Ile Gln Leu Arg Ser Gln Cys Ala Thr Trp
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 13

Ile Arg Ile Gln Leu Arg Ser Gln Cys Ala Thr Trp Lys Val Ile
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 14

Gln Leu Arg Ser Gln Cys Ala Thr Trp Lys Val Ile Cys Lys Ser
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 15

Ser Gln Cys Ala Thr Trp Lys Val Ile Cys Lys Ser Cys Ile Ser
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 16

Lys Val Ile Cys Lys Ser Cys Ile Ser Gln Thr Pro Gly Ile Asn
1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 17

Cys Lys Ser Cys Ile Ser Gln Thr Pro Gly Ile Asn Leu Asp Leu

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 18

Cys Ile Ser Gln Thr Pro Gly Ile Asn Leu Asp Leu Gly Ser Gly

1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 19

Gln Thr Pro Gly Ile Asn Leu Asp Leu Gly Ser Gly Val Lys Val

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 20

Gly Ile Asn Leu Asp Leu Gly Ser Gly Val Lys Val Lys Ile Ile

1 5 10 15

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 21

Leu Asp Leu Gly Ser Gly Val Lys Val Lys Ile Ile Pro Lys Glu Glu

1 5 10 15

His

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 22

Gly Ser Gly Val Lys Val Lys Ile Ile Pro Lys Glu Glu His Cys Lys
1 5 10 15

Met

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 23

Val Lys Val Lys Ile Ile Pro Lys Glu Glu His Cys Lys Met Pro Glu
1 5 10 15

Ala

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 24

Lys Ile Ile Pro Lys Glu Glu His Cys Lys Met Pro Glu Ala Gly Glu
1 5 10 15

Glu

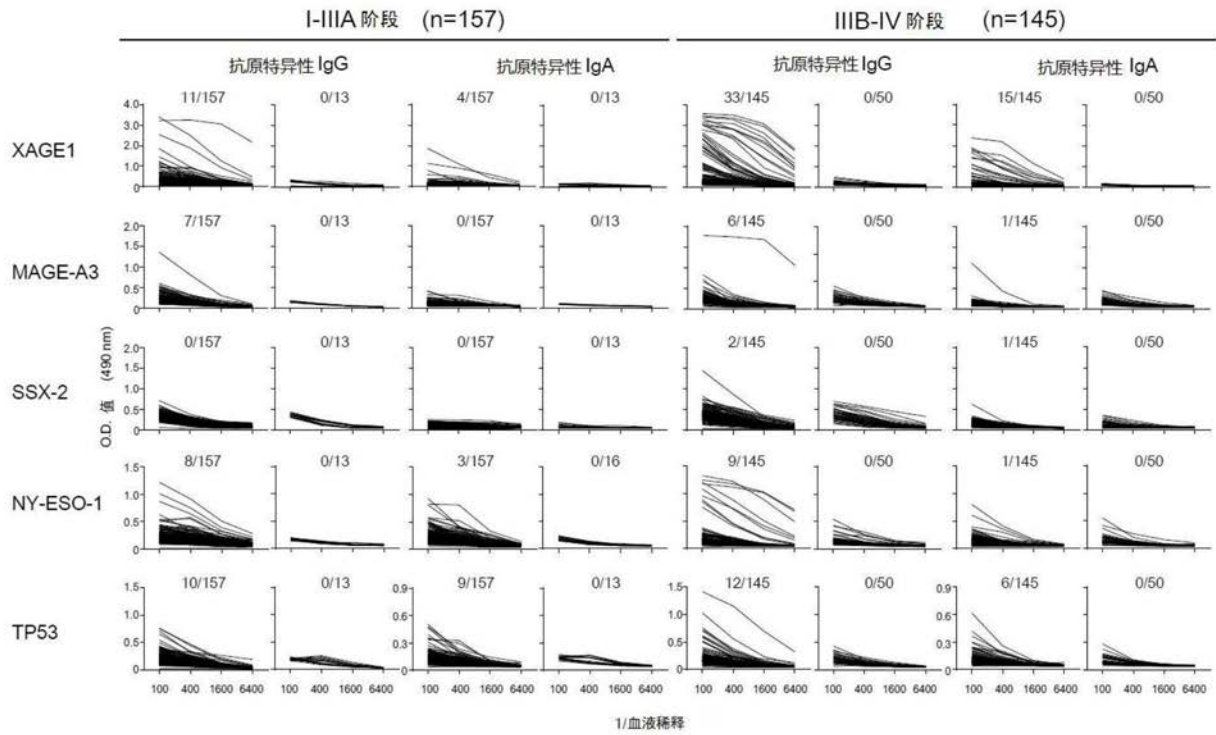


图1

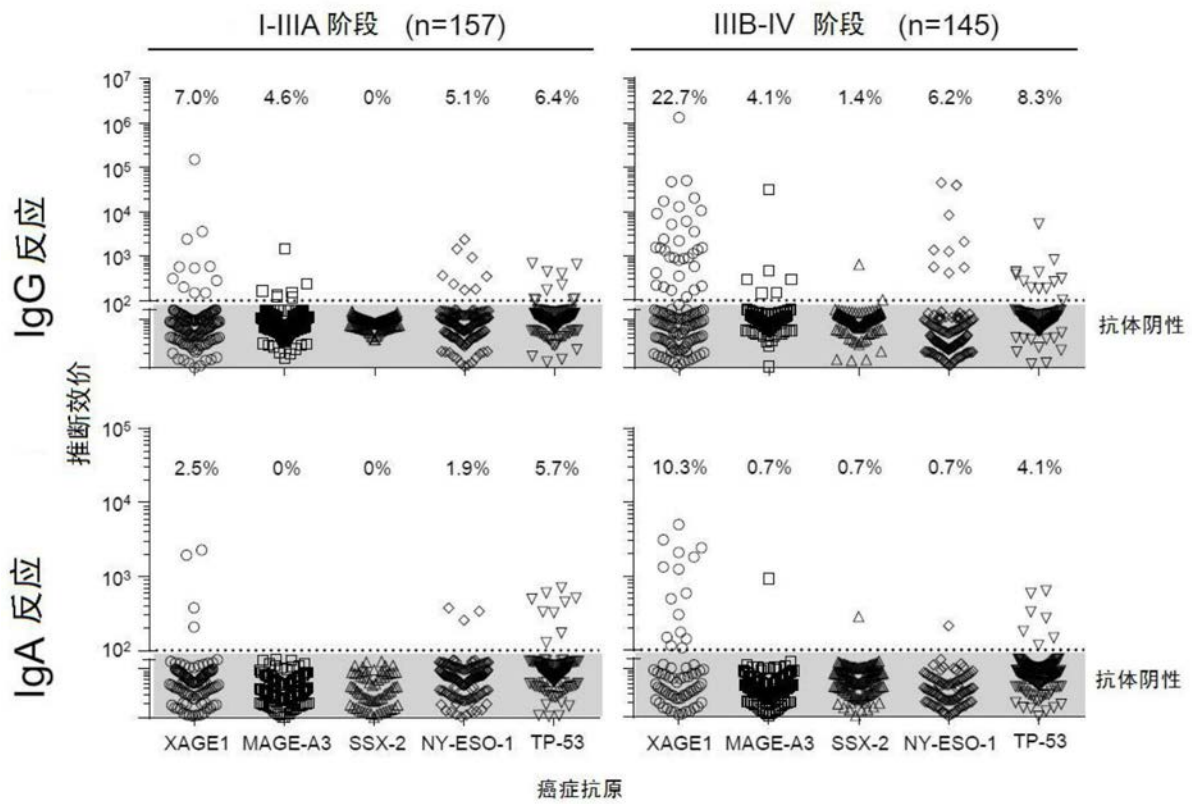


图2

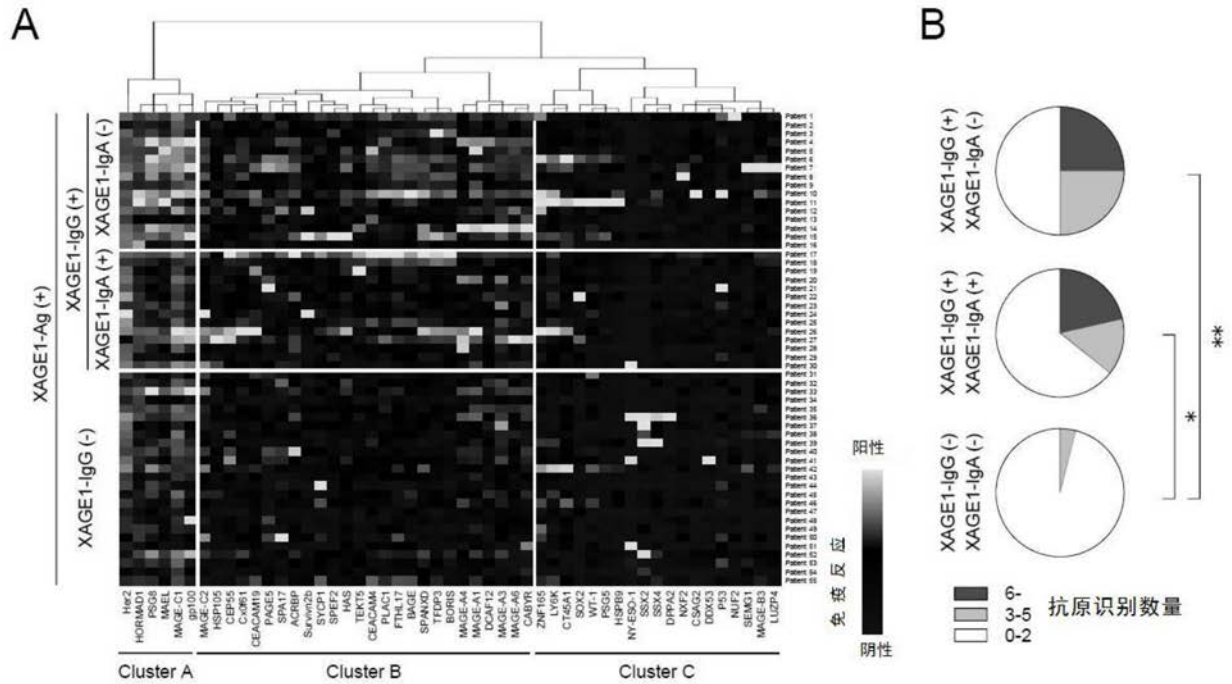


图3

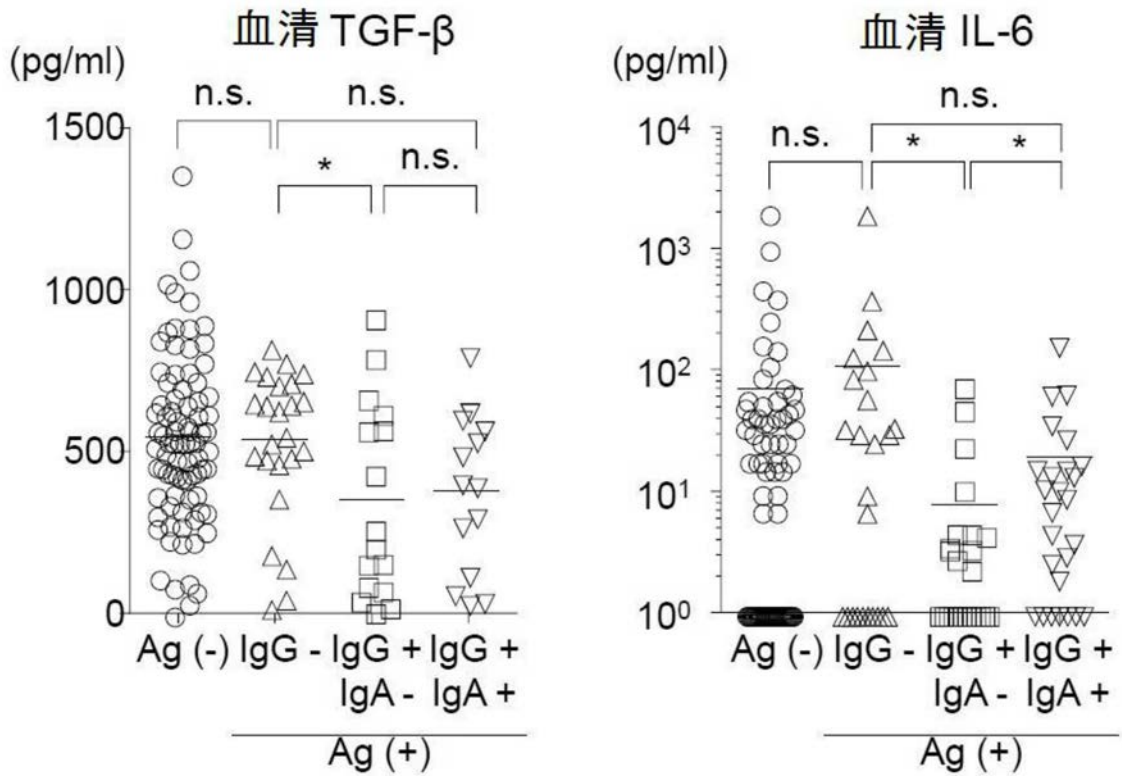


图4

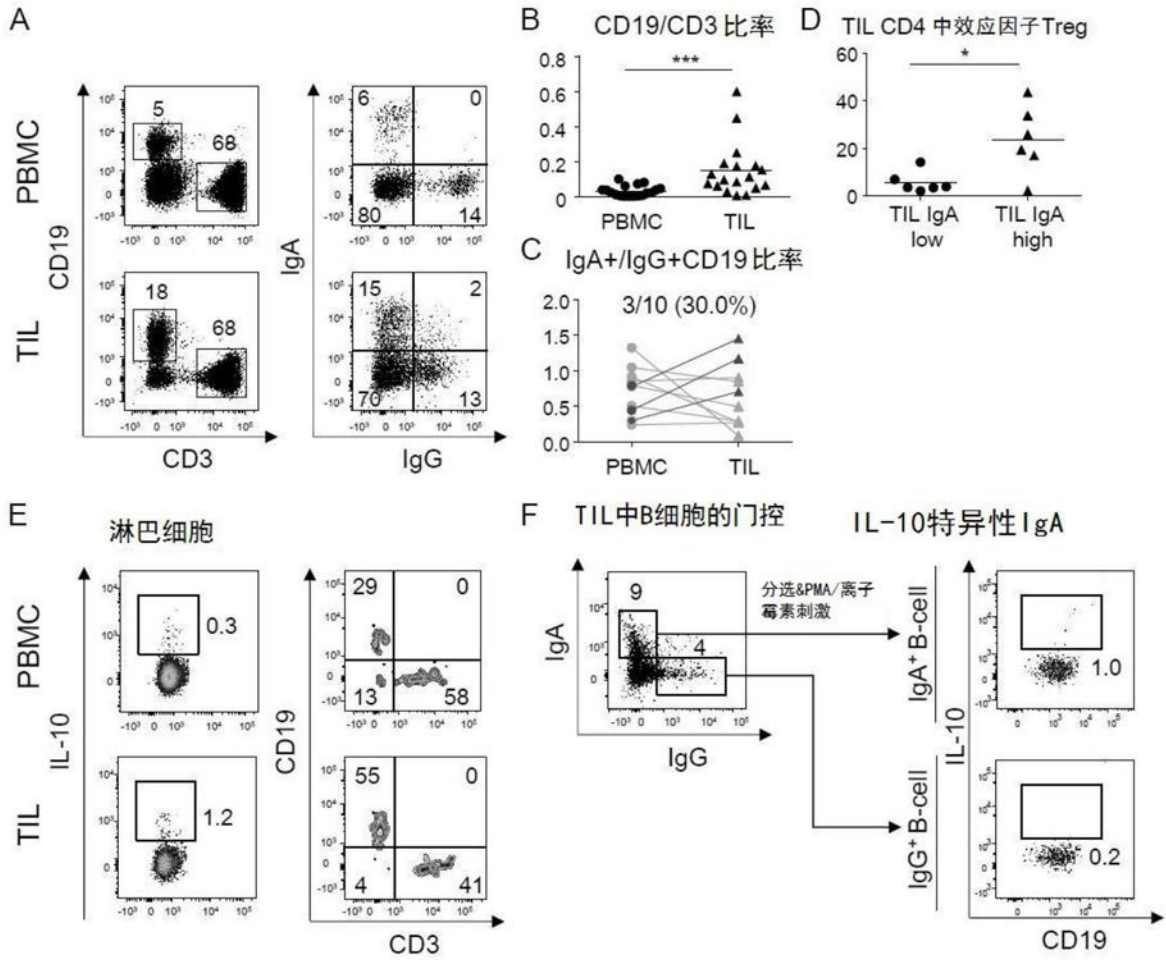


图5

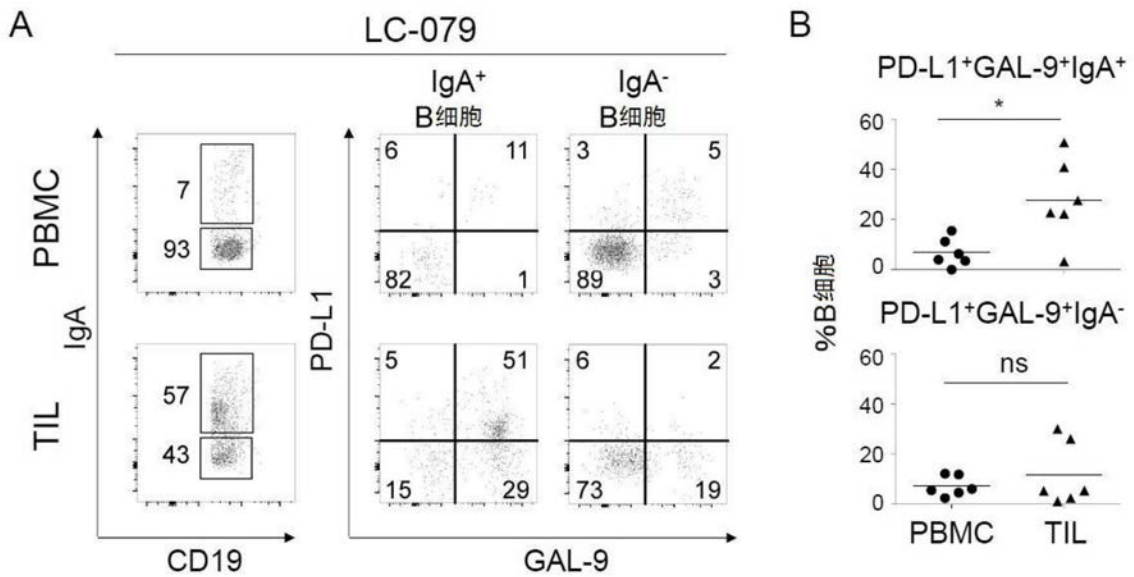


图6

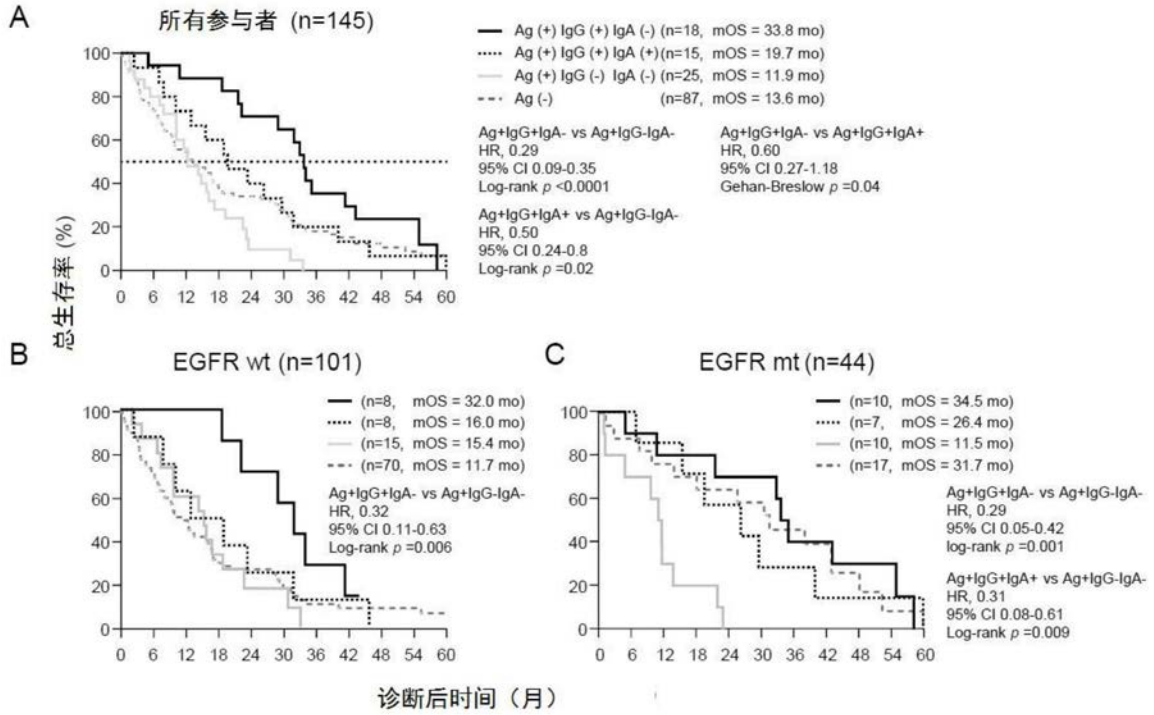


图7

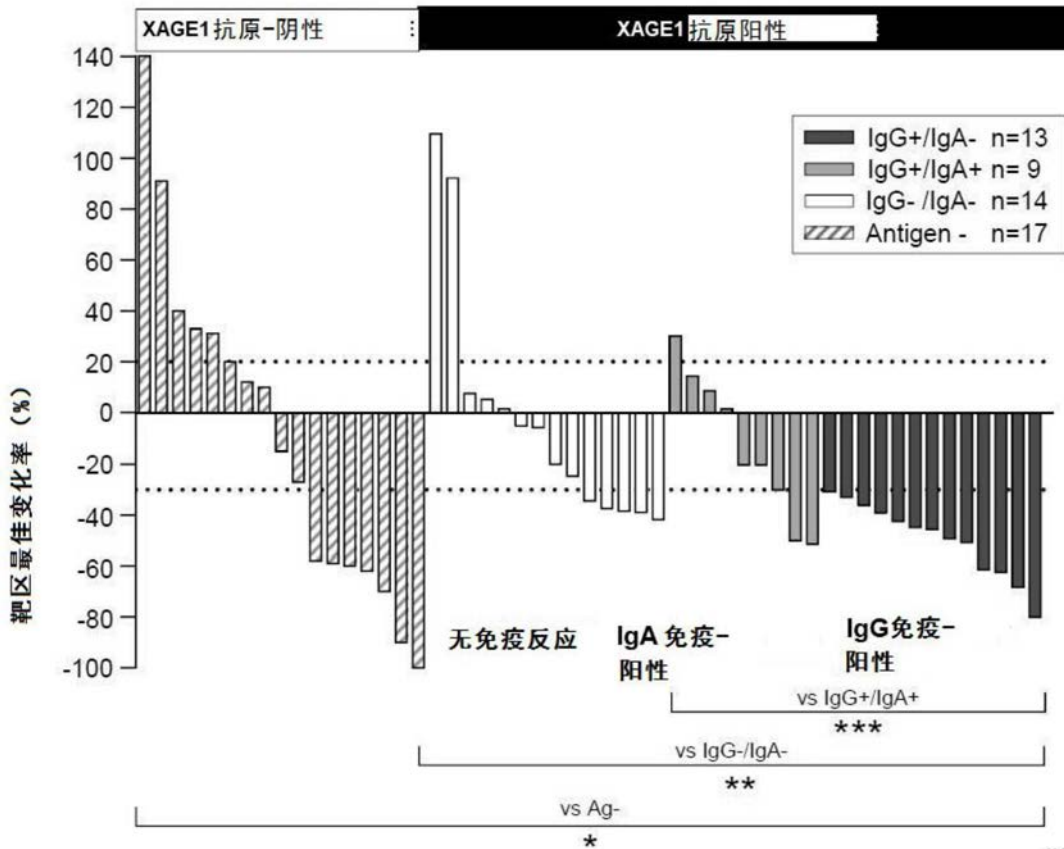


图8

多中心研究 (n=53)

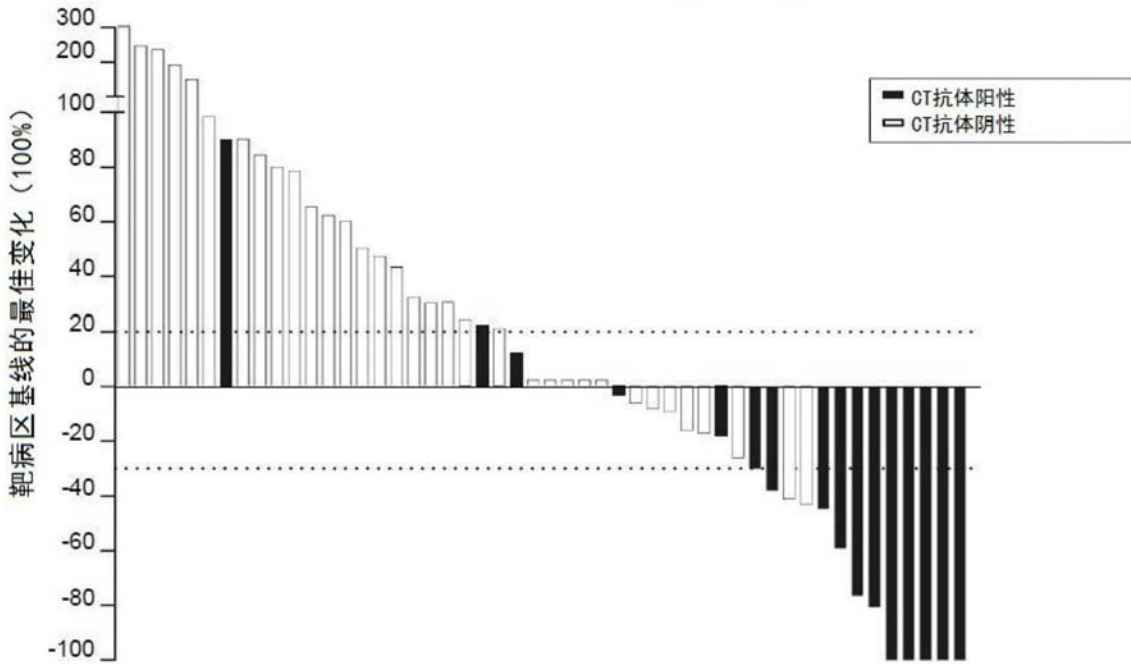


图9

多中心研究 (n=53)

临床反应, n(%)	总计	生物标志物	
		阳性	阴性
完全缓解	5 (9)	5 (31)	0
部分缓解	8 (15)	6 (38)	2 (5)
稳定型疾病	12 (23)	3 (19)	9 (17)
进展性疾病	28 (53)	2 (13)	26 (70)

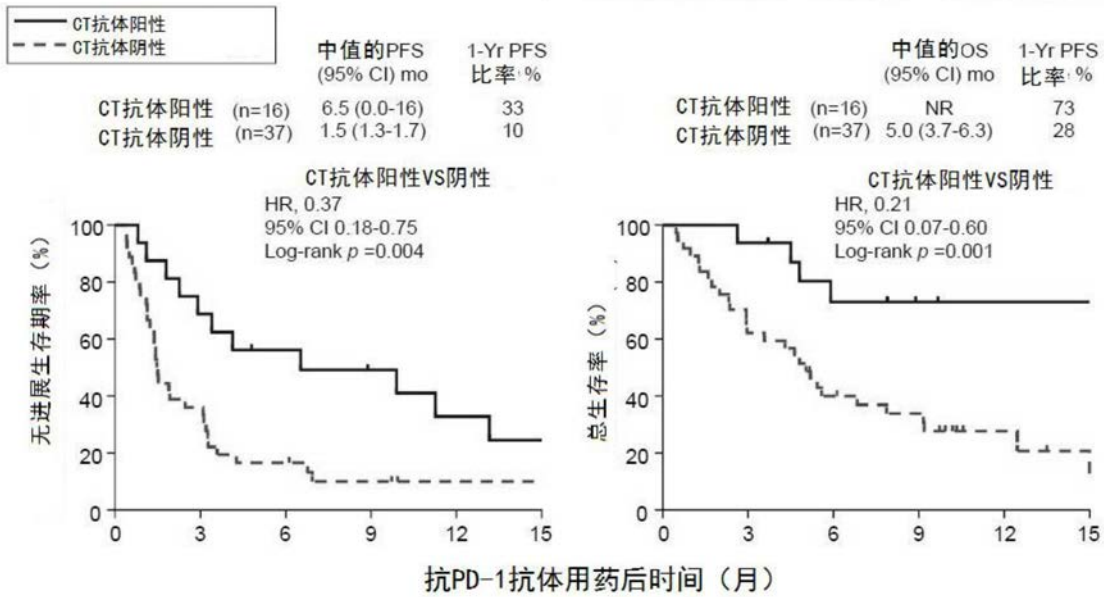


图10

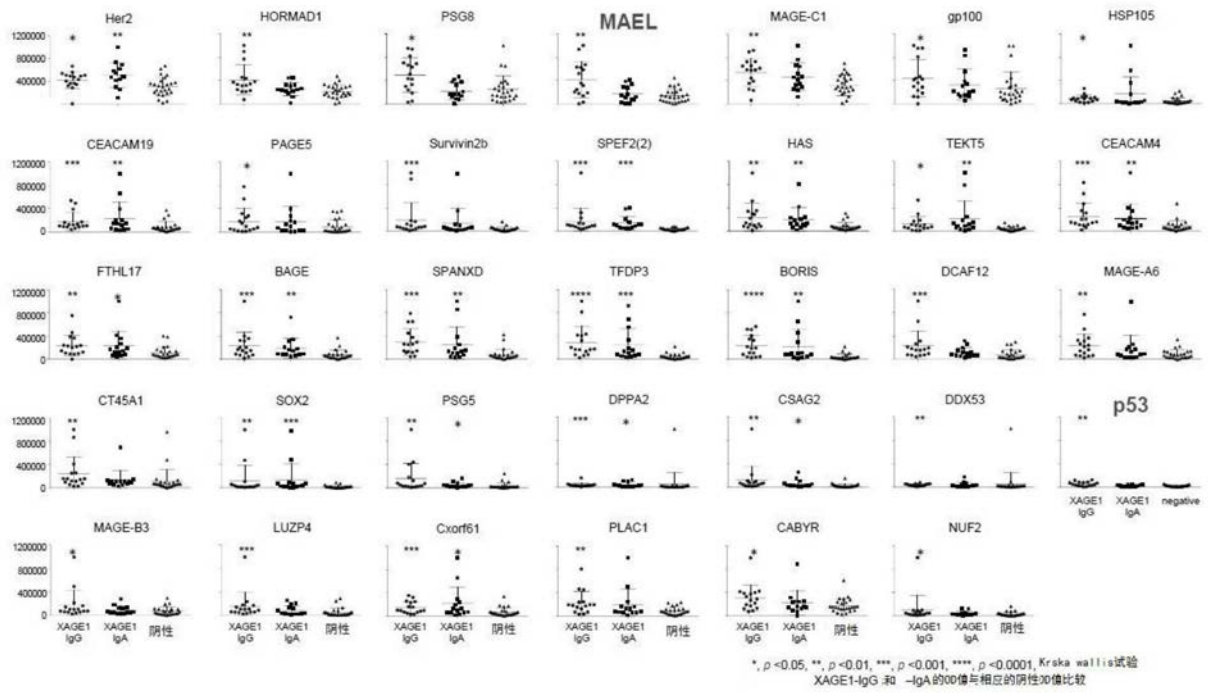
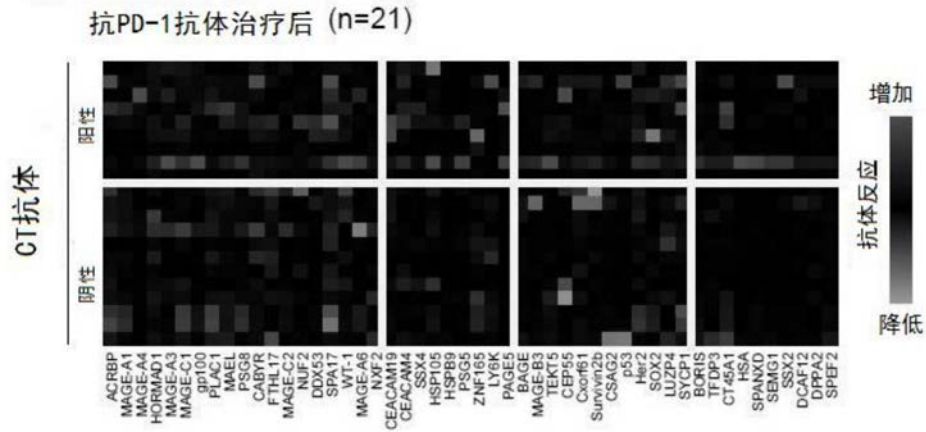


图11

A



B

抗原扩散	应答者	无应答者	p值
MAGE-B3	6/8	0/6	0.01
SSX4	5/8	0/6	0.03

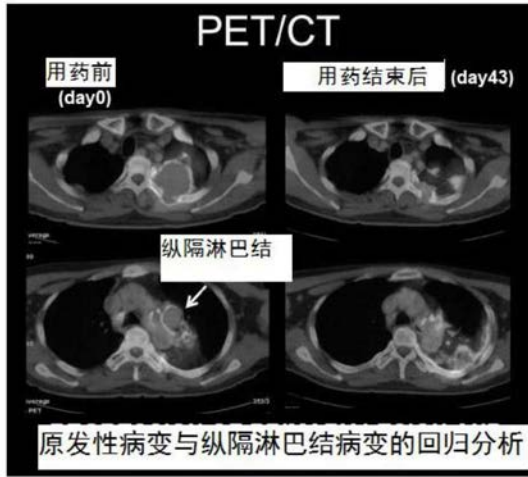
图15

KMSH-C01

53岁男性，非小细胞肺癌

cT3N2M0 IIIA 阶段

EGFRwt, EML4-ALK 融合(-)



MULTIPLEX ANALYSIS

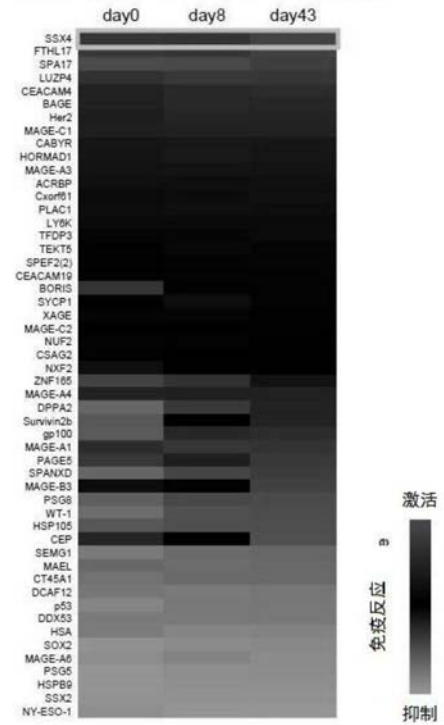


图16

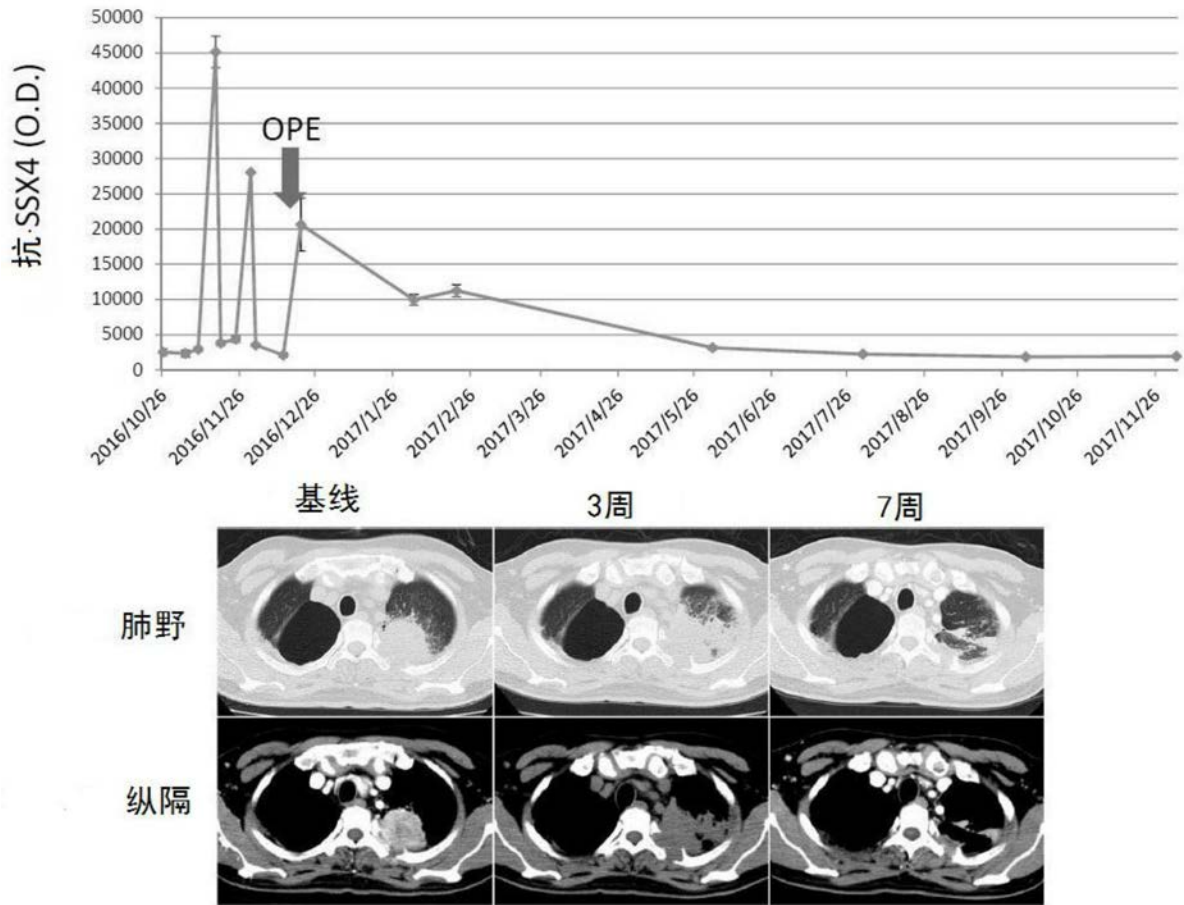


图17

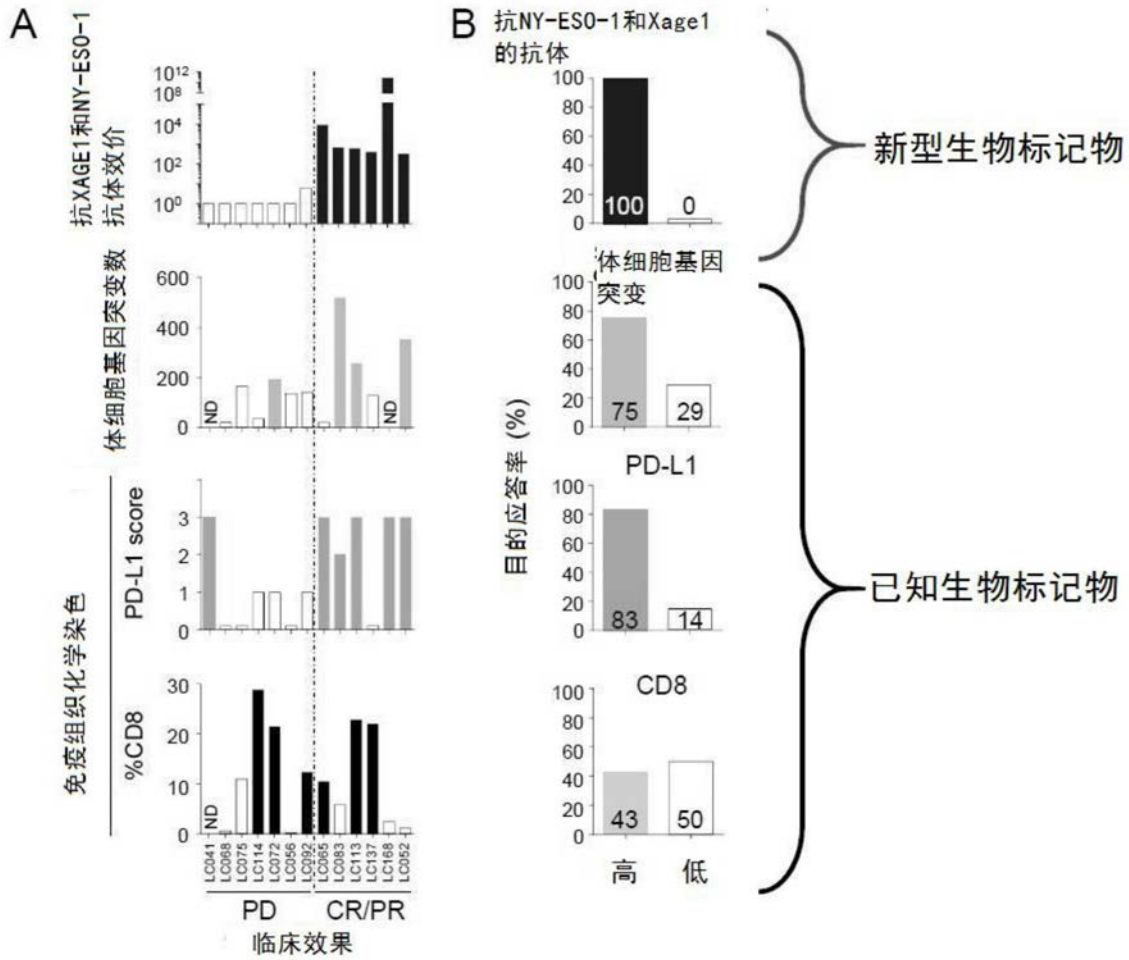


图18

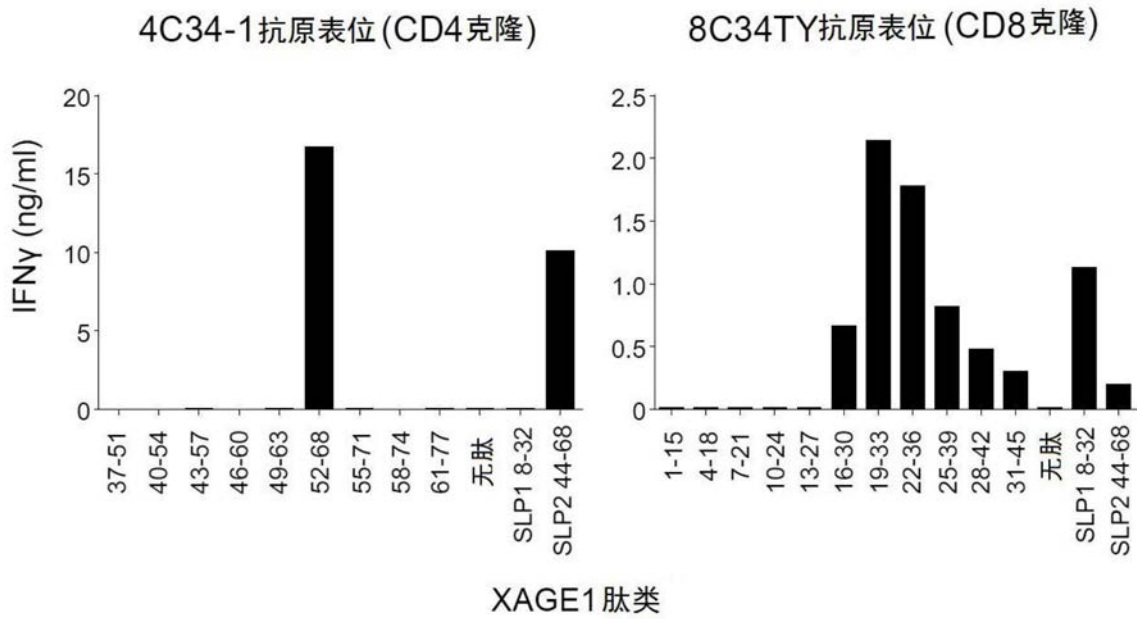


图19

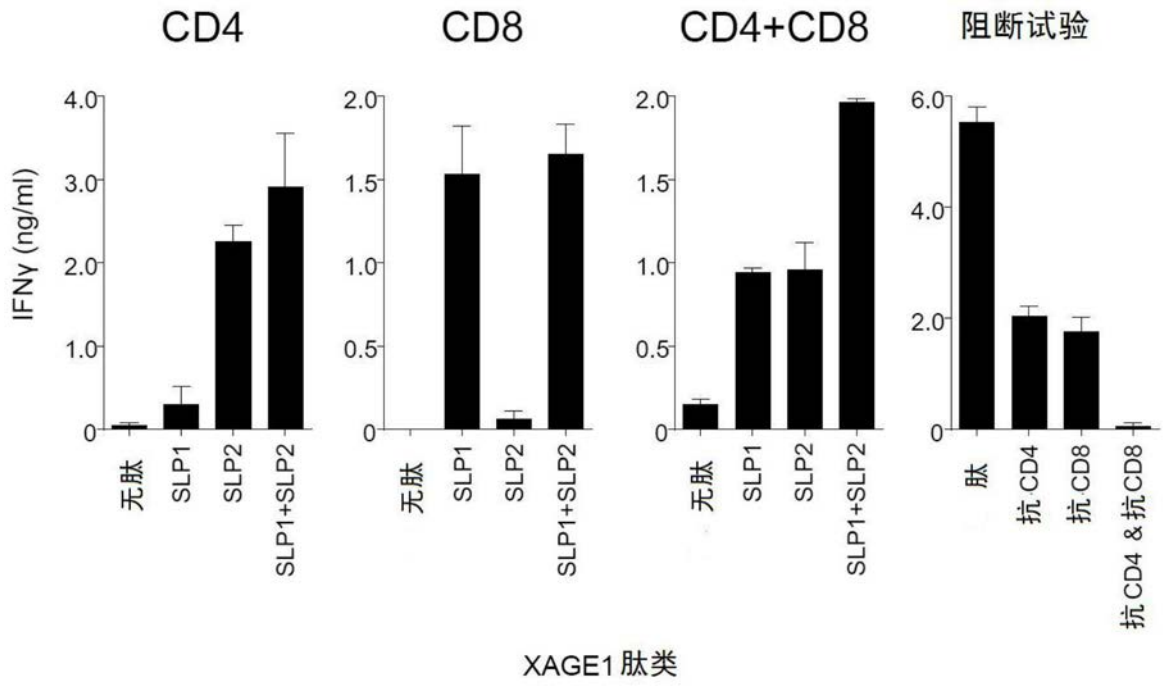


图20

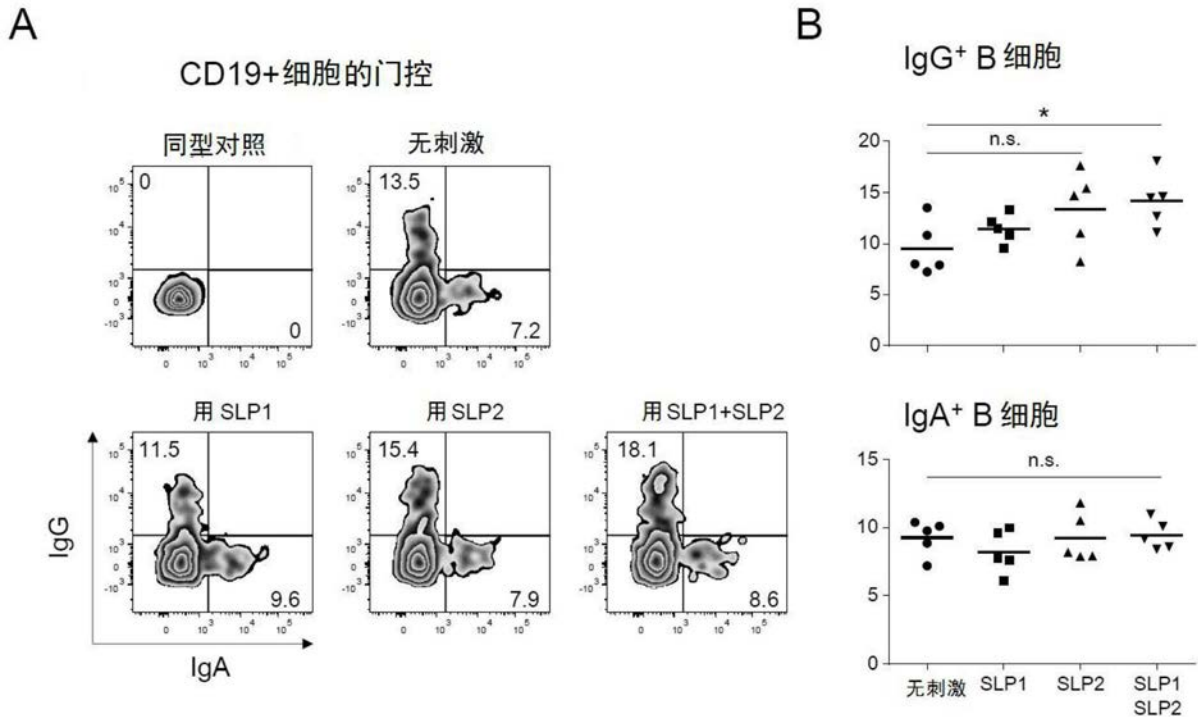


图21

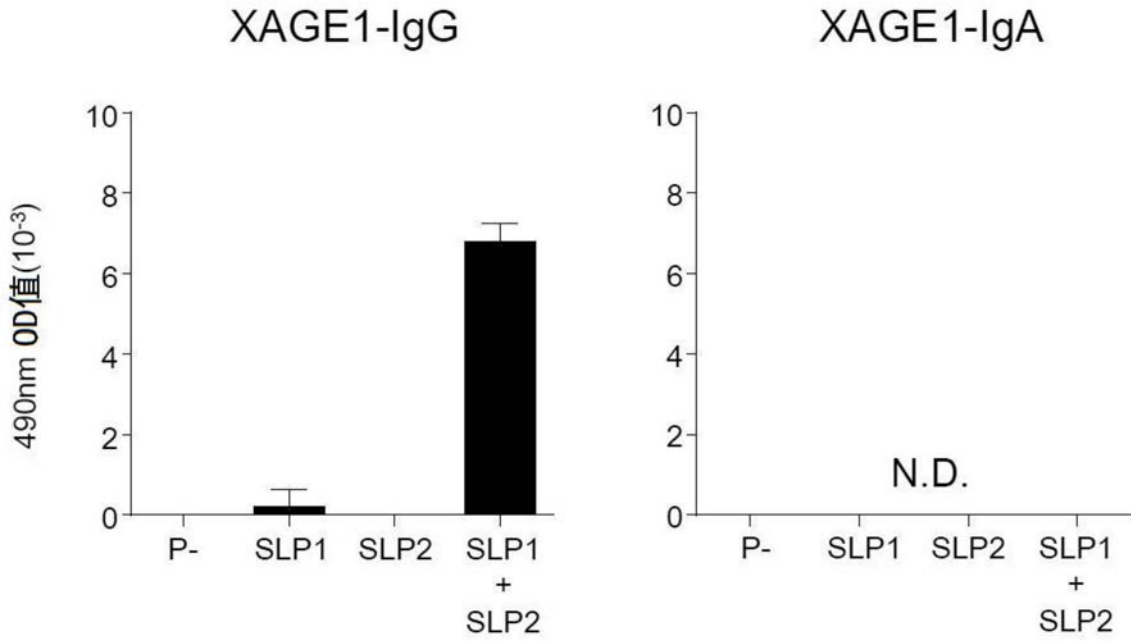


图22

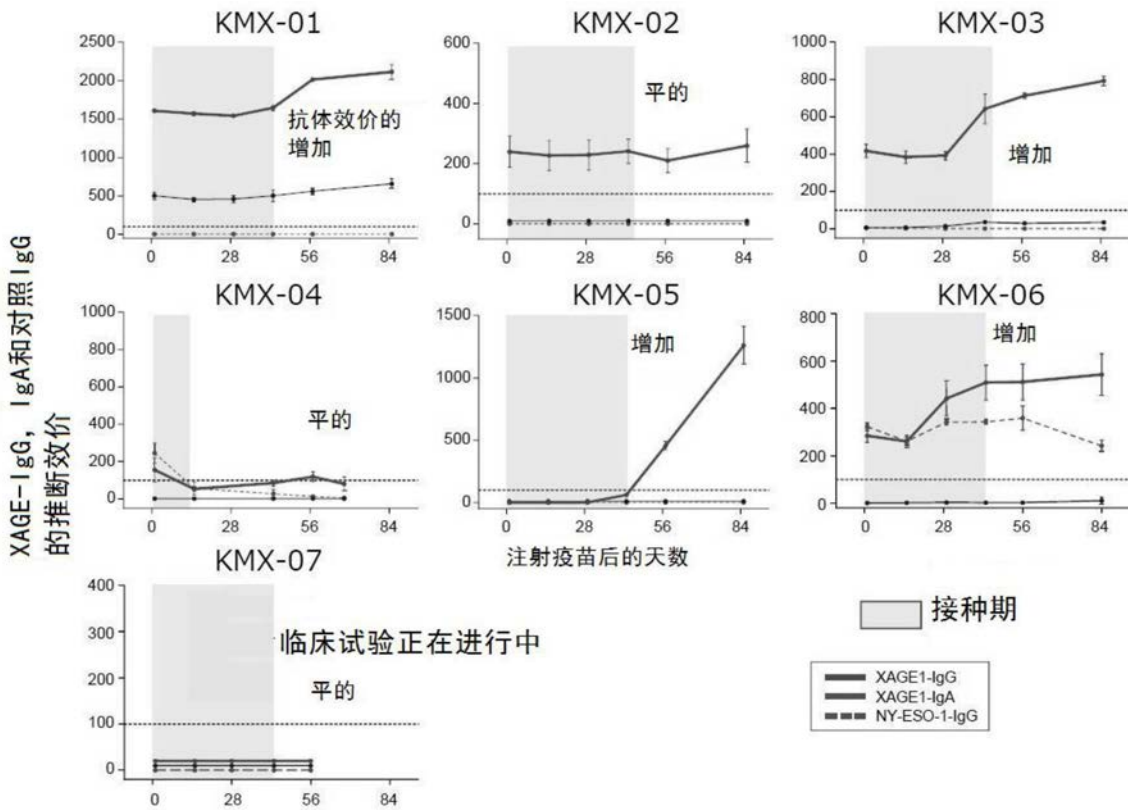


图23

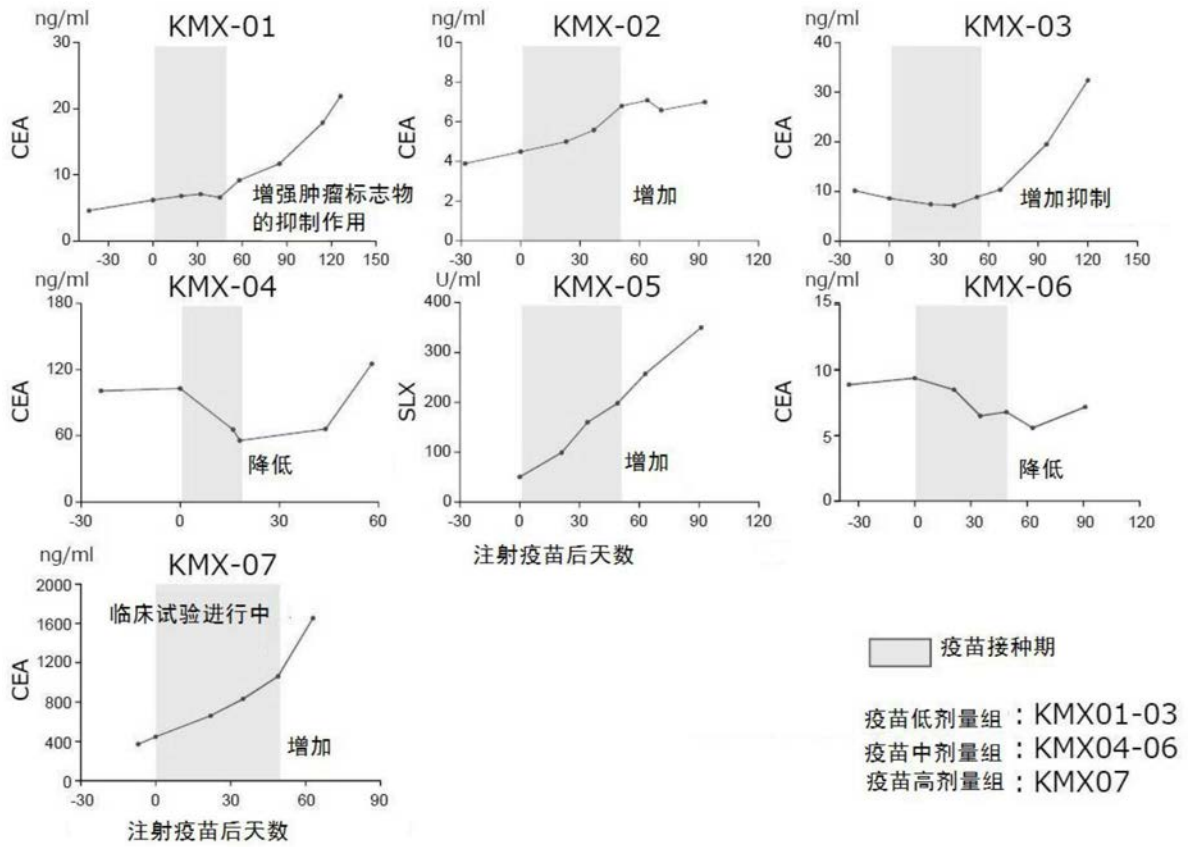


图24

KMX-3 疫苗低剂量组

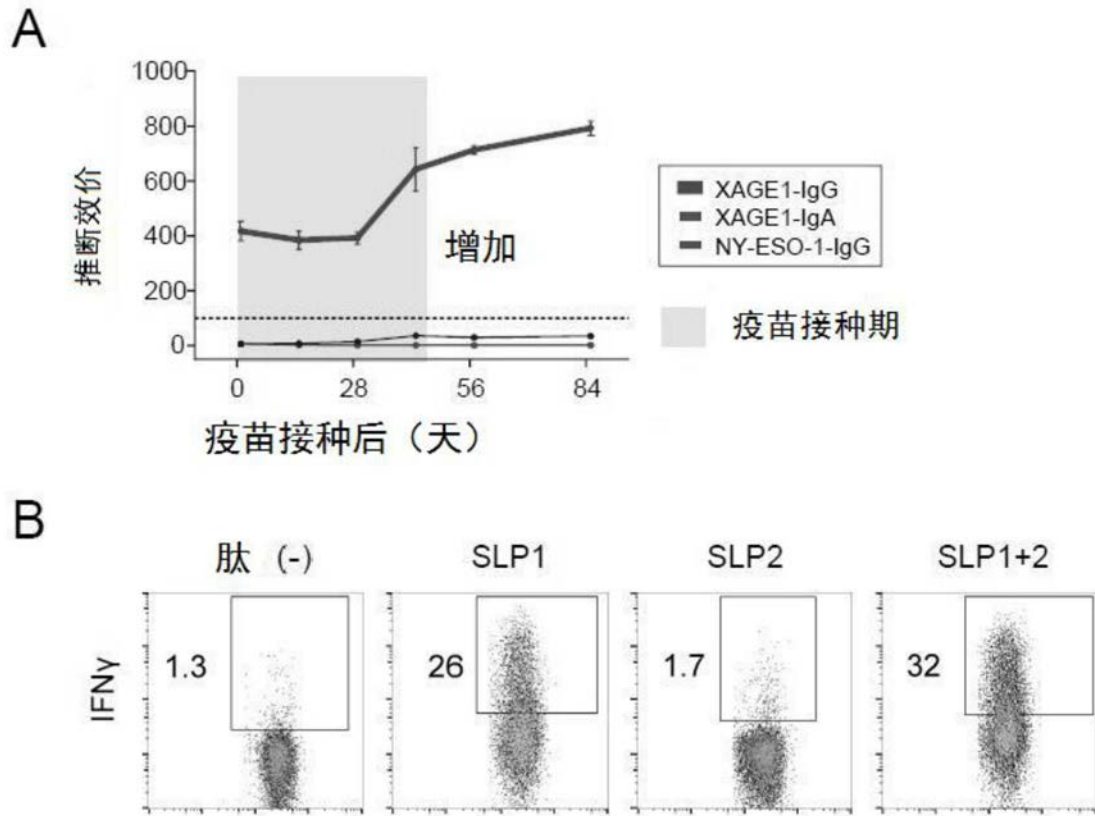
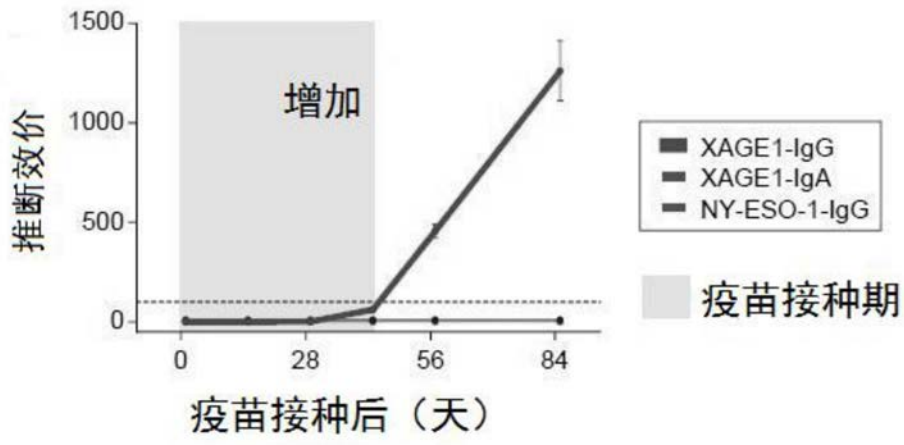


图25

KMX-5 疫苗中剂量接种组

A



B

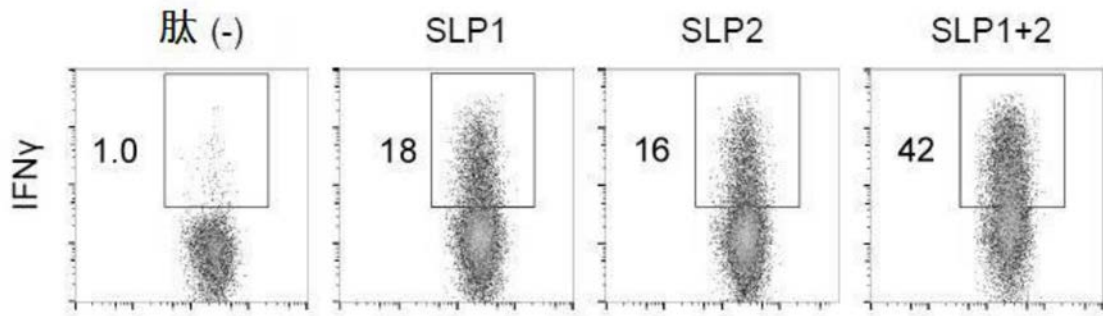


图26