



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103180739 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 201180045200.3

(22)申请日 2011.09.21

(30)优先权数据

1015765.9 2010.09.21 GB

61/384,784 2010.09.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.04.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/066397 2011.09.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/038463 EN 2012.03.29

(73)专利权人 伊玛提克斯生物技术有限公司

地址 德国蒂宾根

(72)发明人 哈普利特·辛格 斯特芬·沃尔特

蕾吉娜·门德日克

文森佐·勃朗特

苏珊娜·曼德鲁扎托

(74)专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

31213

代理人 俞滢

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

(56)对比文件

Suzanne Ostrand-Rosenberg. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. 《Cancer Immunol Immunother》. 2010, 第59卷(第10期), 第1593-1600页.

P. Filipazzi. Identification of a New Subset of Myeloid Suppressor Cells in Peripheral Blood of Melanoma Patients With Modulation by a Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulation Factor-Based Antitumor Vaccine. 《Journal of Clinical Oncology》. 2007, 第25卷(第18期),

(续)

审查员 刘迎鸣

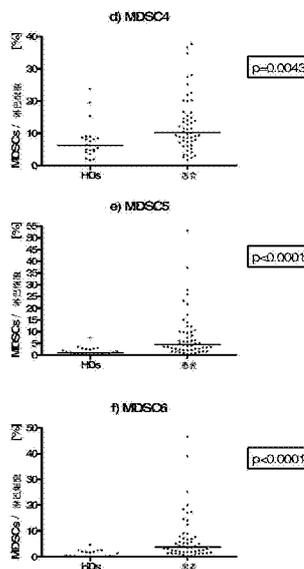
权利要求书1页 说明书16页
序列表7页 附图4页

(54)发明名称

利用骨髓细胞生物标记诊断癌症

(57)摘要

本发明涉及骨髓细胞生物标记用于肾细胞癌(RCC)或结肠直肠癌(CRC)的鉴别诊断、预后和监测。本发明还涉及对肾细胞癌(RCC)或结肠直肠癌(CRC)治疗效果的监测以及确定肾细胞癌(RCC)或结肠直肠癌(CRC)治疗效果的预后。本发明还涉及在上述方法中使用的细胞生物标记面板,尤其是用于测量上述生物标记的多色面板。



CN 103180739 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Arnold H.Zea.Arginase-Producing Myeloid Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Patients: A Mechanism of Tumor Evasion.《Cancer Res.》.2005,第65卷(第8期),
DELANO MATTHEW J.MyD88-dependent

expansion of an immature GR-1+CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis.《THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE》.2007,第20卷(第6期),

1. 特异性抗体在制备用于预后癌症的试剂盒中的用途,所述特异性抗体用于基于髓源性抑制细胞(MDSC)5表型标记CD11b+、CD14-、和CD15+确定含有外周血单核细胞(PBMC)的生物样品中MDSC5表型的水平;其中,与非癌症患者样品相比,在肾细胞癌患者的用抗癌疫苗IMA901治疗前的样品中的上述MDSC5表型的水平升高与较短的总存活期有关。

2. 根据权利要求1的用途,其中上述用途包括含有单一多色染色步骤的流式细胞术。

3. 根据权利要求1的用途,其中上述MDSC5表型选自转移性肾细胞癌患者。

4. 根据权利要求1的用途,其中上述含有外周血单核细胞(PBMC)的样品选自全血和外周血。

5. 根据权利要求1的用途,其中上述含有外周血单核细胞(PBMC)的样品选自全血或外周血的一部分。

6. 根据权利要求5的用途,其中所述一部分是血沉棕黄层。

7. 特异性抗体在制备用于预测癌症治疗对肾细胞癌患者的效果的试剂盒中的用途,所述特异性抗体用于基于髓源性抑制细胞(MDSC)5表型标记CD11b+、CD14-、和CD15+确定取自正在接受癌症治疗患者的生物样品中的髓源性抑制细胞(MDSC)5表型的水平,上述患者已经用环磷酰胺预先治疗并正在接受抗癌疫苗IMA901的治疗,上述患者的癌症治疗效果由肾细胞癌患者中MDSC5表型水平降低来表明。

8. 根据权利要求7的用途,还包括患者癌症治疗效果的预后。

9. 根据权利要求7的用途,还包括对上述患者的上述癌症治疗效果的监测,包括至少重复一次MDSC5表型水平的测量。

10. 根据权利要求7的用途,其中上述抗癌疫苗是从含有致免疫肽混合物的抗癌疫苗中选出的,致免疫肽含有从SEQ编号1至10中选出的序列。

利用骨髓细胞生物标记诊断癌症

[0001] 概述

[0002] 本发明涉及骨髓细胞生物标记用于肾细胞癌(RCC)或结肠直肠癌(CRC)的鉴别诊断、预后和监测。本发明还涉及对肾细胞癌(RCC)或结肠直肠癌(CRC)治疗效果的监测,以及确定肾细胞癌(RCC)或结肠直肠癌(CRC)治疗效果的预后。本发明还涉及在上述方法中使用的细胞生物标记面板,尤其是用于测量上述生物标记的多色面板。

[0003] 考虑到本发明的目的,文中引用的所有参考文献通过引用的方式被完整地并入本文。

[0004] 发明背景

[0005] 在欧洲,肾细胞癌(RCC)是男性中第七大最常见的恶性肿瘤,每年在男性中新增29,600病例(占全部癌症的3.5%)。在女性中,每年有16,700例(在全部癌症中排名第二十二位或占全部癌症的2.3%)。RCC在40岁之前很少见。超过这个年龄后,男性患病率是女性的两倍。随着年龄增长,发病率迅速攀升,从每年40岁以下的100,000人中少于两例患者到每年65-69岁年龄段的100,000人中有38例患者。此后,每年上升到75岁以上的100,000人中有46例患者。

[0006] 共有25-30%的RCC患者在首发症状时出现明显的转移。大约三分之一的肾癌患者会随着时间推移而患转移性疾病。因此,在所有RCC患者中,有将近50-60%的患者最终会出现转移性疾病。在转移性疾病患者中,约75%的患者有肺转移瘤,36%的患者有淋巴结和/或软组织受累,20%的患者累及骨骼,18%的患者累及肝脏。

[0007] 与五年存活率分别为82%和100%的膀胱癌或前列腺癌相比,RCC是泌尿生殖系统肿瘤中最致命的癌症,其五年存活率为65%(根据美国1972-2001年的数据)。在欧洲,肾癌诊断(1990-1994)后的平均五年存活率(截至1999年)大约是58%,RCC被几位论文作者归类为仅中度预后的癌症。总的来说,RCC对近80%的患者有致命性。这个数据表明,对有效和早期的临床随访和复发治疗有强烈的医疗需求。

[0008] 美国癌症联合委员会(AJCC)已经根据TNM分类确立了RCC的分期。(肾脏,《2002年美国癌症联合委员会,肾细胞癌的TNM分类》)。肾细胞癌的分期系统是基于肿瘤在肾脏外的扩散程度。

[0009] 存活率在很大程度上取决于肿瘤是在哪一分期诊断出来的:对于有远处转移病变的患者,其5年存活率仅为12%;而对于患有局部恶性肿瘤的患者,其5年存活率为80%。

[0010] 在全球,结肠直肠癌(CRC)是第三大常见癌症。结肠直肠癌患者每年大约新增一百万例,与大多数其他肿瘤不同,其男性和女性患者数量并无显著区别(比例为1.2:1)。在欧洲,CRC是第二大常见癌症,也是男性和女性第二大常见癌症相关死因,每年新增约380,000例,疾病相关的死亡约为每年200,000例。2002年,男性和女性的原始发病率分别为88.3/100,000和84.0/100,000,原始死亡率分别为34.8/100,000和35.2/100,000。这些数据清楚地反映了CRC作为个人和社会负担一大来源的重要性。CRC是一种老年人癌症,因为男性和女性病症表现的平均年龄分别是69和75岁。除了饮食和生活方式因素(如肥胖、缺乏身体锻炼、吸烟、经常饮酒)外,其他危险因素是CRC的家族性发病、遗传性CRC(家族性腺瘤性息肉

病[FAP]、衰减型FAP[衰减型腺瘤性息肉病;AAPC]、遗传性非息肉病性结肠直肠癌[HNPCC]、错构瘤息肉综合征)和炎性肠疾病,例如溃疡性结肠炎或克罗恩病。

[0011] CRC主要表现为直肠、乙状结肠、横结肠/降结肠和升结肠/盲肠黏膜上的腺癌。早期结肠直肠癌可以通过一期手术治愈。但是,远处转移扩散到局部淋巴结和肝、肺以及其他器官(如CNS)。因为具有非特异性症状,CRC经常在相对晚期被诊断出来,约有25%的CRC患者会在第一次就医时有转移性疾病(mCRC)。在新诊断出患有局部可切除CRC的患者中,另外有30%的患者随后会出现转移复发。

[0012] 除了Dukes系统外,通常使用AJCC制定的TNM系统(2002年最新版本)来对CRC进行分期。该系统是根据原发肿瘤浸润深度、是否有区域淋巴结转移以及是否有远处转移来划分癌症的。因为产生的类别数量可能会非常大,所以按照I至IV期对各种类别进行分组。最近,III期被进一步细分为IIIA到IIIC期,因为这些分期被确定为显著的独立预后变量。

[0013] 在过去的三十年里,癌症相关死亡率持续下降。与此同时,男性和女性的总体5年存活率提高到63%。该存活率的提高在很大程度上可能归功于手术治疗的改善、局部高危疾病的辅助治疗和晚期转移性疾病的综合治疗。

[0014] 髓源性抑制细胞(MDSC)是描述具有免疫抑制特性骨髓细胞其几个细胞亚群的术语。经过讨论,这些免疫抑制特性被认为与癌症免疫编辑生物学有关。

[0015] 髓源性抑制细胞(MDSC)在实验模型和患者中促成肿瘤诱导的免疫紊乱。在荷瘤小鼠中,MDSC是表型异质细胞,其表面标记不同,这可能取决于不同肿瘤在不同成熟阶段产生的可溶性因子,以及在癌症患者中非常有效地抑制T细胞功能。众所周知,生长中的肿瘤刺激骨髓细胞生成,并通过产生生长因子和细胞因子来影响细胞分化。

[0016] Lechner等,(在:Lechner MG,Liebertz DJ,Epstein AL,正常人外周血单核细胞的细胞因子诱导髓源性抑制细胞的特性研究。《免疫学杂志》,2010年8月15日;185(4):2273-84。电子版2010年7月19日)中描述癌症患者的MDSC增加与病情更严重和预后差有关。借助于RT-PCR,对MDSC-诱导人实体瘤细胞系15种免疫因子(TGF β 、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10、GM-CSF、M-CSF、IDO、fms-相关酪氨酸激酶3配体、c-kit配体、诱导型NO合酶、精氨酸酶-1、TNF- α 、环氧合酶2、血管内皮生长因子[VEGF])的表达进行评估。根据这些数据,然后通过测量CD3/CD28刺激后细胞因子混合物抑制增殖、IFN- γ 产生、新鲜人自体T细胞的能力,来检测它们在体外利用健康供者PBMC产生抑制性CD33(+)细胞的能力。论文作者认为某些细胞因子是抑制癌症患者体内MDSC诱导的潜在治疗靶点。

[0017] Allan(在2008年11月的《自然:免疫学综述》第8卷828期中)描述髓源性抑制细胞(MDSC)是异质性免疫细胞群体,它在荷瘤寄主中累积并对炎症产生反应。尽管已经确定MDSC抑制T-细胞反应能够防止肿瘤排斥,但是引起MDSC累积和抑制功能的机制并不清楚。

[0018] 尽管在RCC和CRC诊断和治疗方面取得了上述最新进展,但是为了进一步提高存活率和更好地调整患者的治疗,仍然需要能够用来提高诊断、尤其是鉴别诊断、预后、疗效监测、了解肾细胞癌(RCC)和/或结肠直肠癌(CRC)最佳疗程的生物标记。此外,标记也应该考虑到上述对肾细胞癌(RCC)或结肠直肠癌(CRC)的治疗效果的预后。因此,本发明的目的是提供各自的生物标记以及诊断、预后和预测方法。

[0019] 本发明的详细说明

[0020] 在本发明的第一个方面,上述目的是通过提供诊断和/或预后癌症的方法来实现

的,包括根据至少一个髓源性抑制细胞(MDSC)表型标记,确定样品中MDSC群体至少一个MDSC表型的水平。该样品中含有来源于患者的外周血单核细胞(PBMC),其中上述标记是从一组CD15、IL4Ra、CD14、CD11b、HLA-DR、CD33、Lin、FSC、SSC标记和可选的CD45、CD18、CD80、CD83、CD86、HLA-I标记以及存活/死亡识别子中选出的,其中与非癌症患者样品进行比较,上述MDSC表型水平升高表明癌症和/或上述癌症治疗的预后指标。

[0021] 上述所有标记都是已知处于先进行列。关于存活/死亡识别子,活细胞有完整的细胞膜,染料如碘化丙啶(PI)不能渗透,只能透入细胞膜受损伤的细胞。噻唑橙*(TO)是一种渗透染料,不同程度地进入所有细胞,包括活细胞和死细胞。对于革兰氏阴性菌,用EDTA去除脂多糖层可以大大促进TO吸收。因此,这两种染料组合为辨别活细胞和死细胞提供了一种快速可靠的方法。如果细菌计数很重要,那么BD液体计数微球(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司),一种流式细胞仪微珠标准,可以用来准确定量样品中活菌、死菌和细菌总数。在文中对其他存活/死亡识别子进行了介绍或已知它们处于先进行列,例如在下面文献中进行描述,Perfetto等(Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Lamoreaux L, Nguyen R, Ambrozak D, Koup RA, Roederer M. 胺活性染料:一种在多色流式细胞仪中辨别活细胞和死细胞的有效工具。《免疫学方法杂志》,2006年6月30日:313(1-2):199-208。电子版2006年5月19日。)

[0022] Peranzoni等,在“髓源性抑制细胞异质性和亚群定义”,《免疫学新见》,第22卷,第2期,电子版2010年2月,第238-244页中提到的CD15+/CD11b+/CD14-群体在肾细胞癌患者中观察到。提到健康供者缺少不同群体(CD14+CD11b+HLA-Dr10/neg)。此外,疫苗计划监测显示不同群体(CD11b+CD33+CD15+)。显示了不同群体(Lin-HLA-DR-CD33+CD11b+)在患者中显著增加,以及I到IV期的趋势。S. Kusmartsev等,在“膀胱癌患者CD11b(+)/CD33(low)/CD15(高)免疫抑制骨髓细胞群体的扩增”,《美国癌症研究协会会议录》年度会议,第51卷,2010年4月,第1291-1292页中,披露了与健康供者相比,癌症存在不同群体(CD11b+CD15hiCD33lo)的升高。除此之外,仅显示了在体外有助于免疫抑制。在W02010/055340 A1中,据报道与健康供者相比,癌症患者的CD11+CD15+群体增加。在Ko等,“舒尼替尼介导逆转肾细胞癌患者中髓源性抑制细胞的累积”,《临床癌症研究》,第15卷,第6期,2009年3月,第2148-2157页中,与健康对照供者相比,显示两个MDSC群体(CD14-CD15+和CD33+HLA-DR-)增加。所有这些论文可能仅对MDSC群体有一般性诊断价值,而没有预后或预测价值。

[0023] 刘建迎等,在“晚期非小细胞肺癌患者CD11b(+)/CD14(-)/CD15(+)/CD33(+)髓源性抑制细胞和CD8(+)T淋巴细胞表达的1-精氨酸酶和诱生型一氧化氮合酶群体改变”,《癌研究与临床肿瘤学杂志》,第136卷,第1期,2010年1月,第35-45页中披露NSCLC患者的CD11b+/CD14-MDSC水平与健康对照受试者相比升高。如果患者从之前的化疗中受益,那么NSCLC患者的CD11b+/CD14-MDSC水平降低(PR+SD对比PD:图5A)。但是,该项分析是在临床进展之后进行的,因此不能推断出其预后价值。此外,该细胞群的CD15+和CD33的表达没有用于分析。

[0024] M Diaz-Montero等,在“增加循环的髓源性抑制细胞与临床癌症分期、转移瘤负荷和阿霉素-环磷酰胺化疗相关联”,《肿瘤免疫与免疫治疗》,第58卷,第1期,2009年1月,第49-59页中,显示新诊断(各种)癌症患者的MDSC水平与健康供者相比升高(图2A)。高MDSC水平和较高的肿瘤分期有关(图2B-C)。在IV期患者中,有较高肿瘤负荷的患者具有较高的

MDSC水平(图3)。图5表明MDSC水平受不同化疗类型的影响。但是,从这些数据不能推断出治疗反应的预测价值。

[0025] S Mandruzzato等,在“癌症患者的IL4Ra(+)髓源性抑制细胞扩增”,《免疫学杂志》,第182卷,第10期,2009年5月,第6562-6568页中显示与健康供者相比,以下细胞群体CD14+(图5A),CD15+(图5B),IL4Ra+/CD14+(图2A)在患者的PBMC中增加。结肠癌和黑色素瘤组织中的CD14+细胞显示与肿瘤有关(图5C-D)。这些数据通常只对MDSC群体有诊断价值,没有预后或预测价值。

[0026] 最后,S Kusmartsev等,在“转移性肾细胞癌患者骨髓细胞介导的免疫抑制的逆转”,《临床癌症研究》,第14卷,第24期,2008年12月,第8270-8278页中显示与健康供者一般来说,本发明不限于特定的癌症或癌症分期。然而,根据本发明首选的是方法,其中上述癌症是一种可以用免疫疗法治疗的癌症,最好是从肾细胞癌(RCC)、结肠直肠癌(CRC)、胃癌(GC)、黑色素瘤和腺癌中选择。

[0027] 相比,RCC患者的PBMC中的Lin-HLA-DR-细胞群体增加(图1B)。文章还显示一个Lin-HLA-DR样品中有CD33表达。这些数据通常只对MDSC群体有诊断价值,没有预后或预测价值。

[0028] 在本发明背景下分析的样品可以是任意含有来自受试者(如患者、非癌症患者或健康个体)的MDSC的生物样品。上述样品优选是血液样品,如全血、冻存全血、外周血或其中的一部分,优选是包含外周血单核细胞(PBMC)的血沉棕黄层。同样地,从任意这些样品中可以获得RNA。而且,骨髓细胞也可以从肿瘤组织或骨髓中分离出来。

[0029] 一般来说,本发明不限于特定的癌症或癌症分期。然而,根据本发明首选的是方法,其中上述癌症是一种可以用免疫疗法治疗的癌症,最好是从肾细胞癌(RCC)、结肠直肠癌(CRC)、胃癌(GC)、黑色素瘤和腺癌中选择。

[0030] 在本发明背景下分析的样品可以是任意含有来自受试者(如患者、非癌症患者或健康个体)的MDSC的生物样品。上述样品最好是血液样品,如全血、冻存全血、外周血或其中的一部分,最好是去除血沉黄层的外周血单核细胞(PBMC)。同样地,从任意这些样品中可以获得RNA。而且,骨髓细胞也可以从肿瘤组织或骨髓中分离出来。

[0031] 本发明是基于一个惊人的发现,那就是治疗前的MDSC水平是癌症治疗患者免疫和/或其他临床反应的一个相关生物标记,诸如用抗癌疫苗,如IMA901-202(如在2007年6月2日至5日芝加哥举行的美国临床肿瘤学会(ASCO)年度会议上介绍的)或文中所述的其他IMA-疫苗治疗的免疫疗法患者。本发明还公开了在癌症患者尤其是RCC患者中,健康供者与RCC患者之间不同亚组之间治疗前MDSC水平不同(所有患者,+Cy、-Cy,治疗之前细胞因子、TKI、索拉非尼、舒尼替尼)。因此,本发明涉及癌症(尤其是RCC和CRC)的诊断、预后和预测标记,以及测量上述生物标记的多色面板。

[0032] 骨髓细胞来源于骨髓干细胞,其包括红细胞、血小板、中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞以及肥大细胞。在本发明背景下,在PBMC分析之后,对人类MDSC的六个表型(MDSC1-6)进行识别和定义,如表1所示。

[0033] 表1:主要出版物报道的在PBMC中发现的人类MDSC表型

[0034]

群体	参考文献	表型	样品类型	患者人群（根据文献）
MDSC1	(Mandrizzato 等, 2009)	CD14+ IL4Ra+	PBMC	RCC 和 CRC
MDSC2	(Mandrizzato 等, 2009)	CD14+ IL4Ra+	PBMC	RCC 和 CRC
MDSC3	(Kusmartsev 等, 2008; Mirza 等, 2006)	Lin- HLA- DR- CD33+ (CD18+ HLAI+)	PBMC	健康供者, III-IV 期 RCC 患者

[0035]

MDSC4	(Filipazzi 等, 2007)	CD14+ HLA- DR(-/lo) FSChi SSCim	PBMC	健康供者, IV 期黑 色素瘤患者
MDSC5	(Zea 等, 2005)	CD11b+ CD14- CD15+ (FSChi SSCim CD80- CD83- CD86- HLA- DR-)	PBMC	健康供者, 转移性 RCC 患者
MDSC6	(Schmielau 和 Finn, 2001)	CD15+ FSCloSSChi	PBMC	健康供者, 转移性 腺癌患者

[0036] 在本发明背景下,为了在诊断中快速有效地识别和鉴定MDSC-表型,建立MDSC-表型标记面板(或集)。为此,选择了对于不同表型包含最多信息的标记,如下面表2所示。

[0037] 表2:选择按照优先级降序排列的人类MDSC标记(括号中的标记是可选的)

[0038]

标记	在血液中的功能及细胞表达模式	PFC 类别 [#]	优先顺序（如果是在面板，可测量的表型数量）
CD15	CH 部分（3-岩藻糖-N-乙酰基乳糖胺）和黏附分子。在嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞中高表达。在单核细胞中部分表达。在淋巴细胞或嗜碱性粒细胞中不表达。	1 ^o	1/6
IL4Ra = CD124	IL4R 复合物的 α 亚基不同形式的 IL4R 可以结合到 IL-4 和/或 IL-13 上。在各种造血细胞中表达。	3 ^o	2/6
CD14	LPS 的高亲和力受体。在单核细胞中高表达。	1 ^o	3/6

[0039]

标记	在血液中的功能及细胞表达模式	PFC 类别 [#]	优先顺序（如果是在面板，可测量的表型数量）
CD11b	CD11b 部分：CD18 复合物。黏附分子和补体受体。结合到 ICAM1-3 上。在单核细胞、粒细胞、NK 细胞和激活淋巴细胞中表达。	2°	4/6
HLA-DR	II 类 MHC。在 B 细胞、T 细胞、激活的 T 细胞和 APC 中表达。	2°	5/6
CD33	功能未知，通常被认为有骨髓特异性。在未成熟骨髓细胞、成熟单核细胞和激活的 T 细胞中表达。在血小板、淋巴细胞和红细胞中不表达。	3°	5/6
Lin	CD3、CD14、CD19 和 CD56 组合 =>PBMC（T 细胞、B 细胞、单核细胞、NK 细胞）中传统谱系的谱系标记。	2°	6/6
(L/D)	死细胞（细胞膜不完整）	-	-
(CD45)	白细胞共同抗原在所有的白细胞中表达。不存在于少红细胞和血小板中。	1°	-

[0040] [#]多色流式细胞仪类别类同于(Mahnke和Roederer, 2007)

[0041] 因此, 首选基于本发明的一种方法, 其中上述MDSC表型是选自

[0042] a)MDSC1, 可以根据IL4Ra+和CD14+标记进行识别。

[0043] b)MDSC2, 可以根据IL4Ra+和CD15+标记进行识别。

[0044] c)MDSC1或MDSC2组, 可以根据IL4Ra+标记进行识别和/或分别与其他MDSC2至MDSC6或MDSC1以及MDSC3至MDSC6进行区分。

[0045] d)MDSC3, 可以根据Lin⁻、HLA-DR⁻和CD33⁺标记, 以及与可选的CD18⁺和HLAI⁺标记一并进行识别。

[0046] e)MDSC4, 可以根据CD14⁺、HLA-DR(-/lo)、FSChi和SSCim标记进行识别。

[0047] f)MDSC5, 可以根据CD11b⁺、CD14⁻和CD15⁺标记, 以及与可选的FSChi、SSCim、

CD80-、CD83-、CD86-和HLA-DR标记一并进行识别,和

[0048] g)MDSC6是根据CD15+、FSClo和SSChi标记进行识别。

[0049] 在本发明背景下,识别是指鉴定MDSC-表型或区别六种MDSC-表型。

[0050] 技术人员将会进一步了解,如果只有一种、两种或更多,但少于全部的六种文中所述的MDSC表型,应该选择性地鉴别,根据文中列出的标记,可以生成有效的标记面板。首选的例子是MDSC5-表型,其个体识别对治疗效果的预后诊断(见表3)和/或环磷酰胺预先治疗的患者是有益的,如下所示。

[0051] 文中所述的细胞标记可以按照最先进的方法进行识别。首选的例子是表观基因组学(即文中所述标记基因的甲基化分析,最好是它们的内含子、外显子、内含子/外显子边界、启动子及5'-或3'-端的UTR),转录组学或蛋白质组学。此外,首选是免疫染色,即检测样品中特异性标记的基于抗体的方法。免疫染色示例为流式细胞术、免疫印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)和免疫电镜术,首选是流式细胞术。此外,根据本发明首选的是方法,其中上述方法包括含有单一多色染色步骤的流式细胞术。“多色”是指使用如下所述的不同染料(尤其是荧光染料)。

[0052] 本发明的另一个重要方面是,本发明方法还包括预后,其中与样品中治疗前MDSC水平相比,上述MDSC表型水平升高与较短的总存活期、肿瘤生长或无进展存活期有关,首选是总存活期。表3显示本发明中研究组的治疗前MDSC水平和总存活期之间的相互关系。

[0053] 表3:治疗前MDSC水平和总存活期之间的相互关系(研究组亚组)

[0054]

	全部 (N=57)		+Cy (N=26)		-Cy (N=31)	
	危害比评估值	P	危害比评估值	P	危害比评估值	P
MDSC1	6,9617	0,6307	3743,4765	0,1766	0,0527	0,6061
MDSC2	2,0059	0,5076	1,1694	0,9640	1,4980	0,7150
MDSC3	<u>2,0681</u>	0,1133	2,8586	0,1841	1,7469	0,3629
MDSC4	<u>1,0693</u>	0,0332	<u>1,0885</u>	0,0987	1,0463	0,2539
MDSC5	<u>1,0965</u>	0,0053	<u>1,1499</u>	0,0837	<u>1,0745</u>	0,0499
MDSC6	<u>1,0703</u>	0,0687	0,9703	0,7992	<u>1,0621</u>	0,1057

[0055] 表3显示用于治疗前MDSC水平分析的危害比(HR)评估值(cox比例风险模型,评估的危害比)以及P值(似然比检测),MDSC水平用每个淋巴细胞与MDSC水平可评估、完成治疗人群总存活率的百分比表示。粗体数字如果是斜体,则显示趋势($p < 0.15$)或显著相关性($p < 0.05$)。

[0056] 危害比>1(带有下划线):数值越高的患者时间-事件越短。Cy=环磷酰胺预治疗。

[0057] 此外,根据本发明首选的是(最好是预后)方法,其中上述MDSC表型是选自MDSC2、MDSC3、MDSC4、MDSC5和MDSC6。研究发现,当患者和健康供者的MDSC1水平没有显著差异时,与健康供者相比,患者的MDSC2、MDSC3、MDSC4、MDSC5和MDSC6水平极显著升高,这可以从图2

中看出来。图2是根据MDSC可评估、年龄在70岁以下(N=52)的ITT人群个体患者和健康供者(N=22)的治疗前MDSC水平,对IMA901-202患者和年龄相仿的健康供者进行了比较。长柱表示中位数,p-值用双向曼-惠特尼检验计算。

[0058] 根据文中所引用的文献,已经在某些癌症患者组中鉴定出文中所述的几个MDSC表型,表明本发明在癌症、癌症诊断及治疗,尤其是对于肾细胞癌(RCC)、结肠直肠癌(CRC)、胃癌(GC)、黑色素瘤和腺癌具有广泛的适用性。因此,根据本发明首选的是方法,其中上述MDSC表型是选自RCC或CRC患者的MDSC1和/或MDSC2;III-IV期RCC患者的MDSC3;IV期黑色素瘤患者的MDSC4;转移性RCC患者的MDSC5;以及转移性腺癌患者的MDSC5。

[0059] 本发明的另一个重要方面是,本发明的方法涉及检测患者癌症治疗效果的方法,包括根据本发明方法,确定正在接受癌症治疗患者来源的生物样品中至少一个髓源性抑制细胞(MDSC)表型的水平,其中上述MDSC表型水平的下降表明可以有效治疗上述患者的上述癌症。与对照组相比,上述下降可以被检测出来,对照组是根据实际诊断方案选出的。鉴于非癌症患者,一个例子就是一个对照,然而,也可以在患者组内或组间对其他癌症和/或不同遗传背景进行比较。

[0060] 本发明的这一方面是基于在患者中发现对至少一个髓源性抑制细胞(MDSC)表型水平有效的癌症治疗的效果。总之,上述MDSC表型水平下降是有效治疗上述患者的上述癌症的指征。最理想的是,几种MDSC表型水平(至少一个髓源性抑制细胞(MDSC)表型的数量和/或百分比)下降将表明是有效的癌症治疗。治疗包括预防性和急性治疗,这可以通过所治疗的癌性疾病的缓解来进行评估。癌症治疗可以从适用于各类癌症的任意治疗中选择,例如从使用抗癌药的化疗中选择,和/或从细胞因子、索拉菲尼、舒尼替尼、环磷酰胺,以及酪氨酸激酶抑制剂(TKI)和/或免疫疗法中选择,最好包括抗癌疫苗的使用,例如文中所述的疫苗,可选择性地与GM-CSF一起使用。

[0061] 本发明的另一方面是,本发明方法还包括对上述患者的上述癌症治疗效果的监测,包括至少重复一次上述判断步骤。通常,在治疗过程中监测是定期进行的,如每周一次,每周两次,或甚至一月一次。

[0062] 本发明的另一重要方面涉及本发明的方法,其中在执行上述方法时上述患者已经使用从细胞因子、索拉菲尼、舒尼替尼、环磷酰胺和酪氨酸激酶抑制剂(TKI)中选出的抗癌药的预先治疗。在这种情况下,在首选方案中,本发明方法还包括患者癌症治疗效果的预后,其中上述患者已经用环磷酰胺预先治疗,与未治疗或预先治疗的患者样品相比,MDSC5表型水平下降,表明有效治疗上述患者的上述癌症。在这方面,上述癌症治疗可以从如上所述的化疗中选择,首选的是免疫疗法,最好包括抗癌疫苗的使用,可选择性地与GM-CSF一起使用。

[0063] 在本发明背景下,癌症治疗最好是免疫疗法,包括使用抗癌疫苗。描述的免疫疗法和各种疫苗都处于先进行列;癌症患者的免疫疗法目的是专门激活免疫系统的细胞,尤其是所谓的抗肿瘤细胞但不抑制健康组织的细胞毒性T细胞(CTL,也称为“杀伤细胞”、CD8-阳性T细胞)。与健康细胞不同,肿瘤细胞表达肿瘤相关蛋白。细胞表面的HLA分子把细胞内容物呈现在外部,从而能让细胞毒性T细胞区分健康细胞和肿瘤细胞。这是通过把细胞内的所有蛋白质分解成短肽,然后短肽附着到HLA分子上并在细胞表面呈现来实现的(Rammensee等,1993)。在人体肿瘤细胞上呈现而不在健康细胞上呈现或在小很多的范围内在健康细胞

上呈现的肽,被称为肿瘤相关肽(TUMAP)。肿瘤特异性T-淋巴细胞所识别的抗原,即它们的表位,可以是来自于所有蛋白质类,如酶、受体、转录因子等的分子。

[0064] 但是,激发一种CTL通常不足以去除所有的肿瘤细胞。肿瘤非常容易致突变,因而能够通过改变它们的蛋白质图谱来躲避CTL的识别从而快速对CTL攻击做出反应。为了反击肿瘤的逃避机制,接种时使用多种特异性肽。这样,几种CTL克隆可以同时肿瘤发起大范围的并行攻击。这可以减少肿瘤逃避免疫反应的机率。这种假设最近在治疗后期黑色素瘤患者的临床研究中得到证实。仅有少数例外情况,至少有三种不同T-细胞反应的患者出现客观临床反应或病情稳定(Banchereau等, 2001)及存活率升高(与J. Banchereau进行个人通信),然而T-细胞反应少于三种的大多数患者被诊断患有进行性疾病。

[0065] 在本发明方法的背景下使用的首选药剂是肿瘤疫苗。其他首选药剂包括基于DNA或RNA的疫苗,例如Weide等所述的疫苗。(Weide B, Garbe C, Rammensee HG, Pascolo S. 基于质粒DNA和信使RNA的抗癌疫苗接种。《免疫学快报》. 2008年1月15日; 115(1): 33-42. 电子版2007年10月26日)。药剂可以每天通过肌肉注射、皮下注射、腹腔注射及静脉注射直接注入患者、受影响的器官或全身,或在体外用于患者的细胞或随后注入患者中的人细胞系,或在体内用于选择来自患者的免疫细胞亚群,然后再注入患者体内。肽可能非常纯,或与免疫-刺激佐剂一起使用(如下所示)或与免疫-激活细胞因子一起使用,或与合适的缓释系统如脂质体一起使用。肽也可能与合适的载体如钥孔虫戚血蓝蛋白(KLH)或甘露聚糖(见W095/18145及Longenecker等(1993))结合。肽也可能被标记,可能是融合蛋白,或可能是杂交分子。在本发明中给出序列的肽预计能刺激CD4或CD8T细胞。然而,在有CD4T-辅助细胞的帮助时,CD8CTL刺激更加有效。因此,对于刺激CD8CTL的MHC I类表位而言,杂交分子的融合配偶体或融合部分适当提供刺激CD4-阳性T细胞的表位。所以杂交分子的融合配偶体或融合部分适当提供刺激CD4⁺T-细胞的表位。CD4⁺刺激表位是本领域众所周知的,它包括那些在破伤风类毒素中识别的表位。在进一步优选的实施方案中,肽是一种融合蛋白,尤其是含有HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸。在一个实施方案中,本发明肽是一种截断的人体蛋白或蛋白质片段和其他多肽部分的融合蛋白,条件是人体部分含有本发明的一个或多个氨基酸序列。

[0066] 为了便于使用,疫苗也可能含有一种或多种佐剂。首选佐剂是咪喹莫特、瑞喹莫德、GM-CSF、环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐单抗、干扰素 α 、CpG寡核苷酸及衍生物、多聚-(I:C)及衍生物、RNA、西地那非和PLG或病毒颗粒的微粒制剂。如前所述,使用药剂用于肠胃外给药,如皮下、皮内、肌肉注射或口服给药。为此,肽及可选的其他分子溶解或悬浮在药学上是可接受的、最好是在水性载体中。此外,组合物可能含有赋形剂,如缓冲液、粘合剂、爆破剂、稀释剂、香精、润滑剂等。肽也可能与免疫刺激物质如细胞因子一起给药。可以在此组合物中使用的赋形剂长名单可以从例如A. Kibbe《药用辅料手册》第3版,2000年,美国药学会和医药出版社中获得。组合物可以用于癌症疾病诸如RCC和CRC的防止、预防和/或治疗。在本发明背景下使用的有代表性的疫苗肽组合物见下面的表4A至表4D,并在此分别被指定为IMA901、IMA910、IMA941和IMA950。

[0067] 表4A IMA901(如在肾癌中使用)

SEQ 编号:	缩写	蛋白质	序列
1	MMP-001	基质金属蛋白酶 7	SQDDIKGIQKLYGKRS
2	ADF-002	脂肪分化相关蛋白	VMAGDIYSV
3	ADF-001	脂肪分化相关蛋白	SVASTITGV
4	APO-001	载脂蛋白 L1	ALADGVQKV
5	CCN-001	细胞周期蛋白 D1	LLGATCMFV
6	GUC-001	GUCY1A3	SVFAGVVG
7	K67-001	KIAA0367	ALFDGDPHL
8	MET-001	c met 原癌基因	YVDPVITSI
9	MUC-001	MUC1	STAPPVHNV
10	RGS-001	RGS 5	LAALPHSCL

[0068] 表4B IMA910(如在结肠癌中使用)

[0070]

SEQ编号:	缩写	序列
11	C20-001	ALSNLEVTL
12	NOX-001	ILAPVILYI
13	ODC-001	ILDQKINEV
14	PCN-001	KLMDLDVEQL
15	TGFBI-001	ALFVRLALA
16	TOP-001	KIFDEILVNA
17	TGFBI-004	TPPIDAHTRNLLRNH
18	CEA-006	SPQYSWRINGIPQQHT
5	CCN-001	LLGATCMFV
9	MUC-001	STAPPVHNV
1	MMP-001	SQDDIKGIQKLYGKRS
19	CEA-004	YLSGANLNL
8	MET-001	YVDPVITSI

[0071] 表4C IMA941(如在胃癌中使用)

[0072]

SEQ编号:	肽编号	序列
20	CDC2-001	LYQILQGIVF
21	ASPM-002	SYNPLWLRI
22	UCL5-001	NYLPFIMEL
23	MET-006	SYIDVLPEF

24	PROM1-001	SYIIDPLNL
25	UQCRB-001	YYNAAGFNKL
26	MST1R-001	NYLLYVSNF
27	PPAP2C-001	AYLVYTDRL
28	SMC4-001	HYKPTPLYF
29	MMP11-001	VWSDVTPLTF

[0073] 表4D IMA950(如在胶质母细胞瘤中使用)

[0074]

SEQ编号:	肽编号	序列
30	CSP-001	TMLARLASA
31	FABP7-001	LTFGDVVAV
32	NLGN4X-001	NLDTLMTYV
33	TNC-001	AMTQLLAGV
34	NRCAM-001	GLWHHQTEV
35	IGF2BP3-001	KIQEILTQV
36	BCA-002	ALWAWPSEL
37	MET-005	TFSYVDPVITSISPKYG

[0075] 因此,根据本发明方法的另一优选方面是,上述抗癌疫苗是从含有致免疫肽混合物的抗癌疫苗中选出的,致免疫肽含有的序列是从SEQ编号1至10;SEQ编号11至19,以及1、5、8和9;SEQ编号20至29,以及SEQ编号30至37中选出的。如上所述,上述疫苗最好含有疫苗如GM-CSF,以及任选的其他缓冲液和对照肽(如病毒肽)。

[0076] 此外,本发明另一优选方面涉及诊断试剂盒,它在一个或单独的容器内,含有根据本发明文中所述执行方法所需的材料,至少含有一种特异性抗体针对CD15、IL4Ra、CD14、CD11b、HLA-DR、CD33、Lin和CD45,以及可选的CD18、CD80、CD83、CD86、HLA-DR、HLA-I,可选择性地与说明书一起用于执行上述方法。

[0077] 本发明也包括一个试剂盒含有:

[0078] (a)一个容器,它含有致免疫TAA-肽和/或上述抗体的组合物,有溶液或冻干品两种剂型。

[0079] (b)可供选择的第二个容器,它含有冻干制剂的稀释剂或重组溶液;以及

[0080] (c)可选的说明书(i)供溶液使用或(ii)供重组和/或冻干制剂使用。

[0081] 试剂盒还可能包括一个或多个(iii)缓冲液、(iv)稀释剂、(v)过滤器、(vi)注射针或(v)注射器。容器首选的是瓶子、小瓶、注射器或试管,它可能是一种多用途容器。药物组合物最好是冻干的。容器可由各种各样的材料如玻璃或塑料制成。试剂盒和/或容器最好有容器或关于容器的说明,指明重组和/或使用的方法。例如,标签可能说明冻干制剂是用于重组为特定抗体或肽液浓度,适用于诊断和上述方法,如细胞术。

[0082] 根据本发明,首选的是诊断试剂盒,其中抗体用从Q605、V450、AF700、APC-H7、PE-Cy7、FITC和水剂染料(如英杰公司的存活/死亡[®]可固定的水剂死亡细胞染色试剂盒)中选出的荧光染料进行标记。更优先选择的试剂盒是含有CD15、IL4Ra、CD14、CD11b、HLA-DR、CD33、Lin标记,以及可选的CD45、CD18;CD80、CD83、CD86和HLA-I标记的至少一种特异性抗

体和一个存活/死亡识别子。最应优先选择的试剂盒是至少含有一种从CD15-V450、CD124-PE、CD11b-AF700、CD14-APC-H7、CD33-PE-Cy7、CD3-FITC、CD19-FITC、CD56-FITC和CD14-FITC中选出的抗体,以及可选的存活-死亡水剂染料和CD45-Q605。

[0083] 此外,本发明另一优选方面涉及诱导癌症患者免疫反应的方法,包括a)给上述癌症患者使用抗癌疫苗,b)根据本发明在生物样品中执行方法,生物样品来自正在接受癌症治疗的上述患者,其中与治疗前的患者样品相比,确定的上述MDSC表型水平下降,反映了癌症患者的免疫反应诱导,c)可选,根据步骤b)获得的结果重复步骤a)。

[0084] 据发明人所知,范围广泛的髓源性抑制细胞(MDSC)表型可能是第一次在癌症如肾细胞癌患者中被系统研究分析。对六种不同MDSC群体进行了前瞻性定义。所有群体都具有相关性,与健康供者相比,患者中5/6的MDSC群体极显著增加。有趣的是,在CY治疗后,低水平MDSC与多种免疫反应有关。而且,发现MDSC水平与总存活率呈极显著负相关。所以MDSC是RCC和CRC的诊断、预后和预测标记。

[0085] 此外,本发明另一优选方面涉及有需要的癌症患者的癌症治疗的改进方法,其中包括给上述癌症患者进行适当的抗癌治疗,与患者在上述治疗之前的样品相比,降低至少一个上述MDSC的表型水平,这是通过使用本发明方法,在来源于正在接受癌症治疗的患者的生物样品中确定的。根据需要,上述治疗可能是免疫疗法之前的预先治疗(或“一线治疗”)或辅助治疗。

[0086] 改变MDSC数量和/或群体的适当方法,以及其他影响MDSC途径的方法也在Ugel等的文献中加以描述(Ugel S, Delpozso F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, Zilio S, Bronte V. 髓源性抑制细胞的靶向治疗。《药理学新见》. 2009年8月:9(4):470-81. 电子版2009年7月16日。),可以由技术人员在本发明背景下使用。

[0087] 癌症治疗可以从适用于各类癌症的任意治疗中选择,例如,从使用抗癌药的化疗中选择,和/或从细胞因子、索拉菲尼、舒尼替尼、环磷酰胺,以及酪氨酸激酶抑制剂(TKI)和/或免疫疗法中选择,最好包括抗癌疫苗的使用,例如文中所述的疫苗,可选择性的与GM-CSF一起使用。

[0088] 此外,本发明另一优选方面涉及有需要的癌症患者的癌症治疗的改进方法,其中包括a)给上述癌症患者使用抗癌疫苗,b)根据本发明在生物样品中执行方法,生物样品来自正在接受癌症治疗的上述患者,其中与治疗前患者的样品相比,确定的上述MDSC表型水平下降,表明治疗和/或改善治疗上述癌症患者的上述癌症,c)可选,根据步骤b)获得的结果重复步骤a)。

[0089] 在本发明的这些治疗方面,为了改善癌症治疗尤其是免疫疗法的治疗方案,使用根据本发明的方法。根据本发明的方法提供关于癌症免疫疗法的需求和效果的额外和早期信息,因此可以对上述癌症的进一步治疗做出更明智的决定。因此,根据如上所述首选的是方法,它进一步包括对上述癌症患者免疫反应和/或治疗的监测,包括至少重复一次步骤b)和可选的步骤c)。

[0090] 根据本发明的方法也允许对现有治疗的未来结果有一个更好的预后,其中与样品中治疗前MDSC水平相比升高的上述MDSC表型水平与较短的总存活期、肿瘤生长或无进展存活期有关。同样地,这使得在对上述癌症的进一步治疗中可以作出更明智的决定。

[0091] 如上所述,除了上面描述的免疫治疗疫苗外,优选治疗或预先治疗是从细胞因子、

索拉菲尼、舒尼替尼、环磷酰胺和酪氨酸激酶抑制剂(TKI)的抗癌药中选出的。被治疗的癌症可以是对免疫疗法有反应的所有癌症,最好是从肾细胞癌(RCC)、结肠直肠癌(CRC)、胃癌(GC)、黑色素瘤和腺癌中选择。

[0092] 应该明白的是,文中披露和描述的发明特征不仅可以在规定的各自组合中使用,还可以在背离本发明指定范围以独特的方式使用。

[0093] 现在,本发明将会参考序列列表在示例中进行更加详细地描述。以下示例的提供,仅仅是为便于说明,而不是试图限定发明。

[0094] 图1显示的是具有各自门限策略的典型MDSC染色。所有的样品使用相同的门限。MDSC1-2和淋巴细胞是来自单态和活淋巴细胞的门限亚群,而MDSC3-6是来自单态的门限亚群。

[0095] 图2a)至2f)显示IMA901-202患者和年龄相仿健康供者的比较。显示的是MDSC可评估的、年龄在70岁以下(N=52)的ITT人群个体患者和健康供者(N=22)的治疗前MDSC水平。长柱表示中位数,p-值用双向曼-惠特尼检验计算。

[0096] 在序列列表中,SEQ编号:1至SEQ编号:37显示在本发明背景下使用、包含在首选疫苗中的TUMAP。

[0097] 示例

[0098] 建立流式细胞术面板,它可以通过单一多色染色识别所有六个MDSC群体。对受试的IMA901-202ITT人群(N=67可用,N=61可评估)其全部现有的治疗前患者样品和匹配的健康供者(N=22可用,N=22可评估)样品进行这种分析。

[0099] 研究患者与年龄相仿健康供者的比较

[0100] 为了对治疗前水平与健康供者进行比较,仅选择70岁以下的意向性治疗(ITT)患者来匹配年纪最大的健康对照供者。患者(N=52)和健康供者(N=22)所产生的分组在年龄、性别和CMV血清阳性方面是平衡的。研究发现——当患者和健康供者的MDSC1水平不同时——与健康供者相比,患者的MDSC2、MDSC3、MDSC4、MDSC5和MDSC6水平极显著增加。

[0101] 基线参数和MDSC水平之间的相互关系

[0102] 研究发现,在MDSC可评估的ITT人群(N=61)中,研究组(+或-Cy)的MDSC1-6水平是平衡的,因此显示没有显著性差异。先前治疗使用索拉菲尼与治疗前MDSC2水平显著降低有关($p=0.0278$ [曼-惠特尼检验];MDSC1水平也有相同的趋势)。这些数据符合索拉菲尼可能影响骨髓成熟过程的假设。潜在相关的前期观察结果是索拉菲尼通过抑制PI3和MAP激酶及NF κ B信号传导显示在体外损害人DC成熟。

[0103] 治疗前MDSC水平和免疫反应之间的相互关系

[0104] 在治疗前MDSC水平和总免疫反应(N=54)可评估的完成治疗PP患者人群中,对治疗前MDSC水平和免疫反应的相关性进行分析。对CY预先治疗进行亚组分析(是/否)。在总PP患者人群中发现免疫反应增加和治疗前MDSC1-6水平降低没有普遍关联。有趣的是,仅在CY亚组中,有一个很强烈的趋势,那就是多-TUMAP反应和MDSC5水平降低有相关性($p=0.0524$;双向曼-惠特尼检验)。

[0105] 表5:治疗前MDSC水平和总存活期之间的相互关系(研究组亚组)

	全部 (N=57)		+Cy (N=26)		-Cy (N=31)	
	危害比评 估值	P	危害比评 估值	P	危害比 评估值	P
[0106] MDSC1	6,9617	0,6307	3743,4765	0,1766	0,0527	0,6061
MDSC2	2,0059	0,5076	1,1694	0,9640	1,4980	0,7150
MDSC3	2,0681	<i>0,1133</i>	2,8586	0,1841	1,7469	0,3629
MDSC4	1,0693	<i>0,0332</i>	1,0885	<i>0,0987</i>	1,0463	0,2539
MDSC5	1,0965	<i>0,0053</i>	1,1499	<i>0,0837</i>	1,0745	<i>0,0499</i>
MDSC6	1,0703	<i>0,0687</i>	0,9703	0,7992	1,0621	<i>0,1057</i>

[0107] 表5显示危害比(HR)评估值(cox比例风险模型,评估的危害比)以及用于治疗前MDSC水平分析的P值,该P值用每个淋巴细胞与可用于评价MDSC水平的完成治疗人群的总存活期的百分比表示。斜体数字表明趋势($p < 0.15$)。粗体数字表明危害比 >1 :数值越高的患者时间-事件越短。

[0108] 治疗前MDSC水平和临床反应的相关性

[0109] 当总PP患者人群的治疗前MDSC水平与总存活期(N=57可评估)相比,发现了几个显著相关性(MDSC4,5)和趋势(MDSC3,6)。据猜测,治疗前MDSC水平升高总是与总存活期缩短有关。因此,MDSC明确的生物标记作用在IMA901-202中确定,IMA901-202是疾病的预后标记或预测IMA901治疗的反应。对于几种MDSC表型而言,在对IMA901产生免疫反应的患者以及CY预先治疗的患者中,预后和预测标记分化的趋势更加明显,这显示了作为预测生物标记的作用,预测生物标记可能通过抑制IMA901(在这种情况下)诱导的T-细胞反应的功能来影响IMA901诱导T细胞反应的有效性。

[0110] 检测

[0111] 利用来自一个治疗前时间点的所有可用IMA901-202患者的PBMC,年龄匹配的健康供者PBMC和内部对照PBMC(治疗前数据集)对IMA901-202样品(进行了前瞻性的定义)进行分析。

[0112] 对于该检测,低温保存的PBMC被解冻,并用核酸酶孵育来防止凝结。细胞用存活/死亡识别子染料进行首次染色。然后,用hIgG阻断细胞来减少后续Fc-介导的结合。接着用CD15、CD11b、CD124、CD14、CD33、CD3、CD19、CD56和CD45抗体标记的荧光染料对细胞进行表面染色。在红细胞溶解之后,细胞用甲醛进行固定。使用配有蓝色、紫色、红色和绿色激光的BD LSR II SORP仪器、优化双色镜和带通滤波器对所有染料进行测量。使用优化仪器设置,在每次实验之前进行自动仪器校准保证分析之间的可比性。利用FlowJo8.8.6.对原始数据进行分析。对所有样品进行分析以及在两分析之间使用相同的通路。如果至少有75,000个活CD45+淋巴细胞被计算在内,那么样品被设置成可评估的。使用GraphPad Prism4和Statgraphics Centurion XV对衍生数据进行统计分析。

[0113] 材料与方法

[0114] 外周血单核细胞(PBMC)是利用标准聚蔗糖梯度分离,在8小时内从肝素化血液样

本中获得的,并在批量分析之前进行低温保存。

[0115] 为了对PBMC中的MDSC水平进行定量,样品被解冻,用PBS(德国科隆龙沙公司)清洗两次,并用稀释在PBS的死细胞染料存活/死亡水剂(德国卡尔斯鲁厄的英杰公司)在进行染色30分钟。所有下一步骤的染色缓冲液是PBEA,它是补充以0.5%BSA(德国陶夫基兴的西格玛—奥德里奇公司)、2mM EDTA(德国卡尔斯鲁厄的罗斯公司)和10mg/ml叠氮化钠(德国达姆施塔特的默克公司)的PBS。细胞被进一步清洗。通过使用0.29mg/ml hIgG(德国杜塞尔多夫的AbD Serotec公司)在室温下孵育15分钟阻断Fc受体。然后,在存在0.29mg/ml hIgG的情况下,细胞用抗体CD45Q605(英杰公司)、CD15V450、CD124PE、CD11b AF700、CD14APC-H7、CD33PE-Cy7、CD3FITC、CD19FITC、CD56FITC和CD14FITC(全部来自BD公司)进行染色30分钟。

[0116] 引用的文献

[0117] Mandruzzato S,Solito S,Falisi E,Francescato S,Chiarion-Sileni V, Mocellin S,Zanon A,Rossi CR,Nitti D,Bronte V,Zanovello P(2009).IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients.J Immunol.182, 6562-6568.

[0118] Kusmartsev S,Su Z,Heiser A,Dannull J,Eruslanov E,Kubler H,Yancey D, Dahm P,Vieweg J(2008).Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma.Clin Cancer Res.14,8270-8278.

[0119] Mirza N,Fishman M,Fricke I,Dunn M,Neuger AM,Frost TJ,Lush RM,Antonia S,Gabrilovich DI(2006).All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients.Cancer Res66,9299-9307.

[0120] Filipazzi P,Valenti R,Huber V,Pilla L,Canese P,Iero M,Castelli C, Mariani L,Parmiani G,Rivoltini L(2007).Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine.J Clin Oncol25,2546-2553.

[0121] Schmielau J,Finn OJ(2001).Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients.Cancer Res.61,4756-4760.

[0122] Zea AH,Rodriguez PC,Atkins MB,Hernandez C,Signoretta S,Zabaleta J, McDermott D,Quiceno D,Youmans A,O'Neill A,Mier J,Ochoa AC(2005).Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients:a mechanism of tumor evasion.Cancer Res.65,3044-3048.

序列表

<110> 伊玛提克斯生物技术有限公司
 <120> 利用骨髓细胞生物标记诊断癌症
 <130> I31986CN
 <150> US61/384,784
 <151> 2010-09-21
 <150> GB1015765.9
 <151> 2010-09-21
 <160> 37
 <170> Patent in version 3.5
 <210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Lys Leu Tyr Gly Lys Arg Ser
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Ala Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val
 1 5
 <210> 5
 <211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Leu Gly Ala Thr Cys Met Phe Val
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Val Phe Ala Gly Val Val Gly Val
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Leu Phe Asp Gly Asp Pro His Leu
1 5

[0002]

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Leu Ala Ala Leu Pro His Ser Cys Leu
1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Leu Ser Asn Leu Glu Val Thr Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Ile Leu Asp Gln Lys Ile Asn Glu Val
 1 5

[0003]

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Lys Leu Met Asp Leu Asp Val Glu Gln Leu
 1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala
 1 5 10

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu Arg Asn His
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

[0004] Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
 1 5

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe
 1 5 10

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Tyr Ile Ile Asp Pro Leu Asn Leu
1 5

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

[0005] <400> 25

Tyr Tyr Asn Ala Ala Gly Phe Asn Lys Leu
1 5 10

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Tyr Leu Val Tyr Thr Asp Arg Leu
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

His Tyr Lys Pro Thr Pro Leu Tyr Phe
1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Thr Phe
1 5 10

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0006]

<400> 31

Leu Thr Phe Gly Asp Val Val Ala Val
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Asn Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

[0007]

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Leu Trp His His Gln Thr Glu Val
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ala Leu Trp Ala Trp Pro Ser Glu Leu
1 5

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr
1 5 10 15

Gly

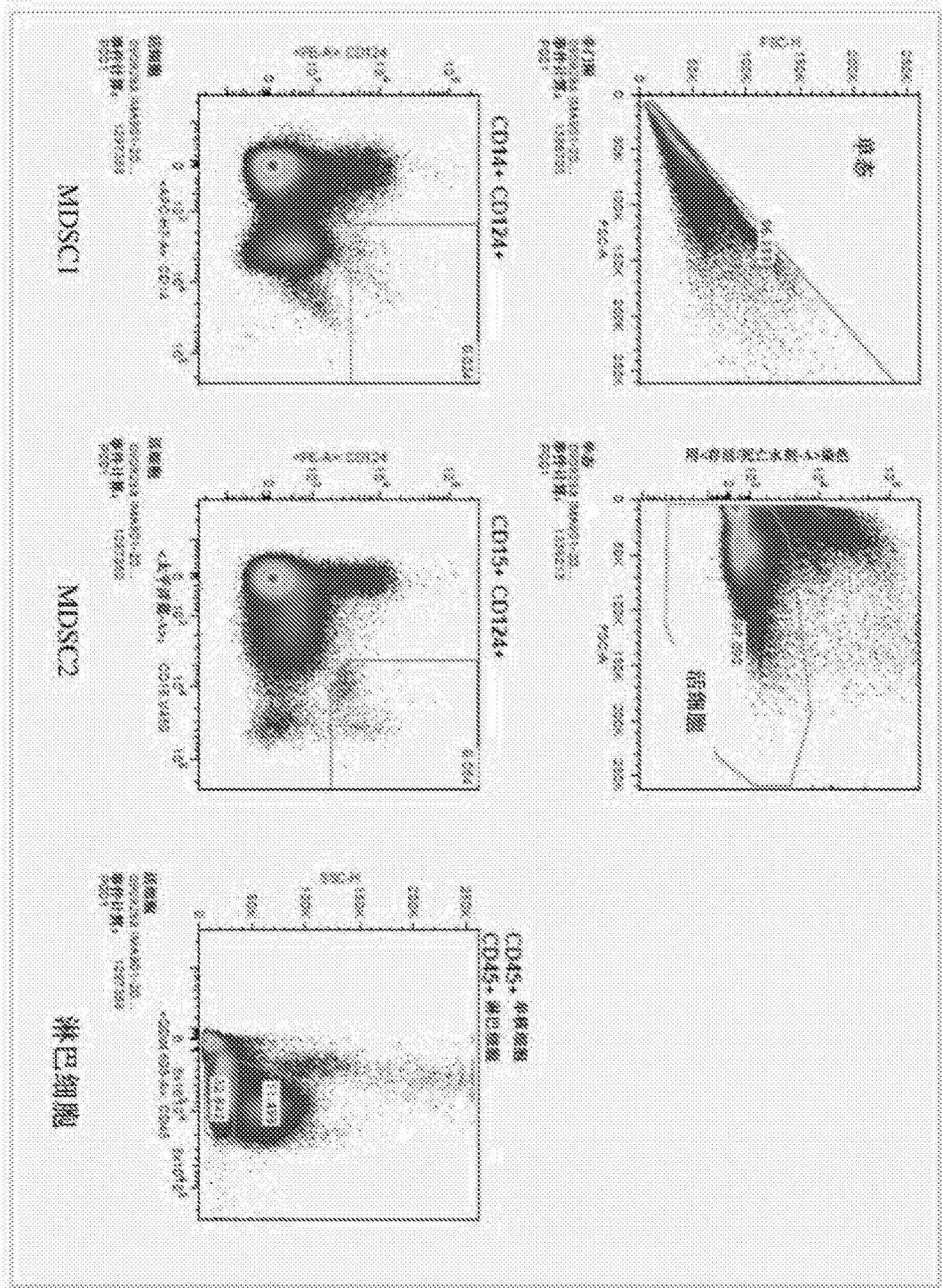


图1

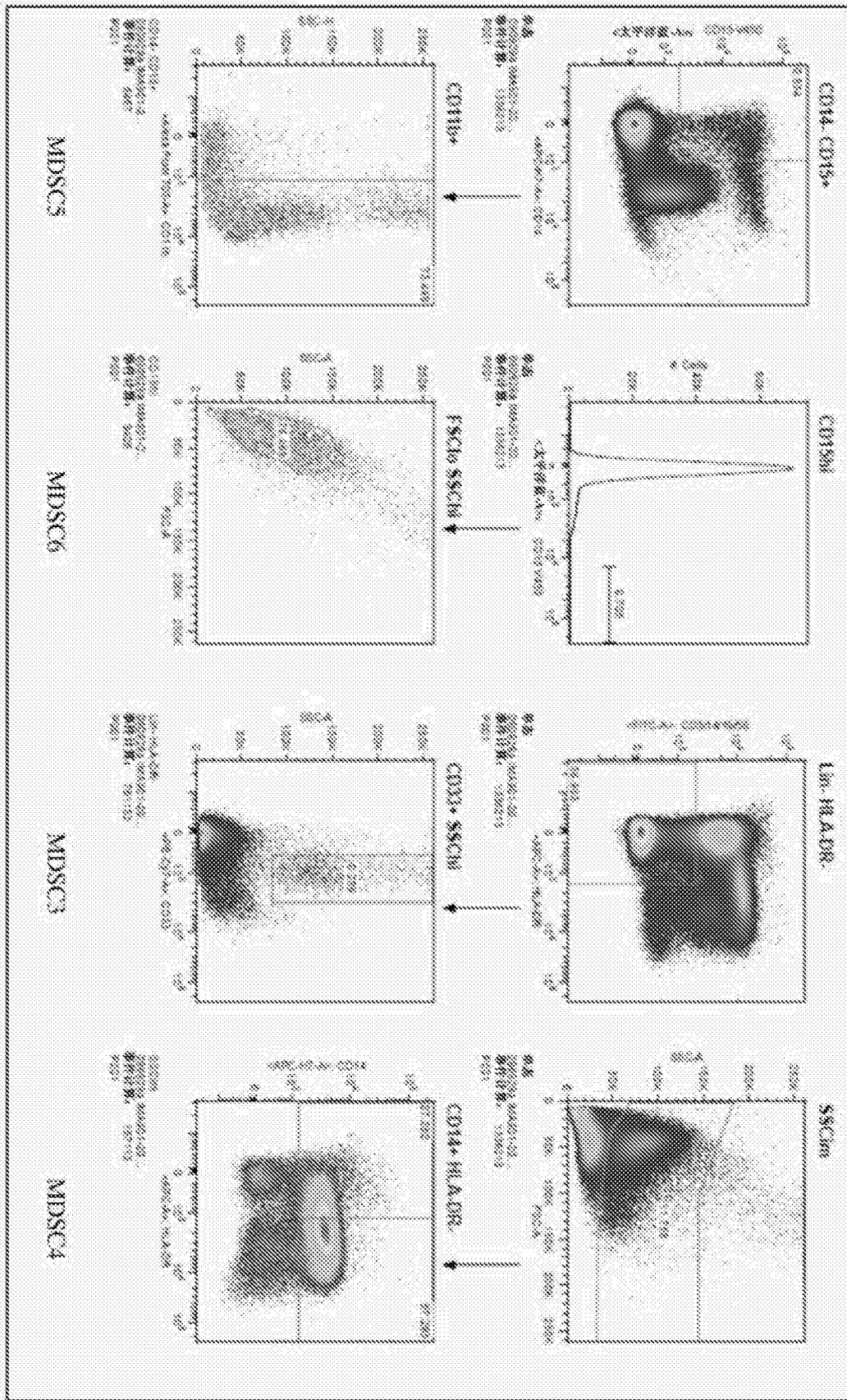


图1(接上页)

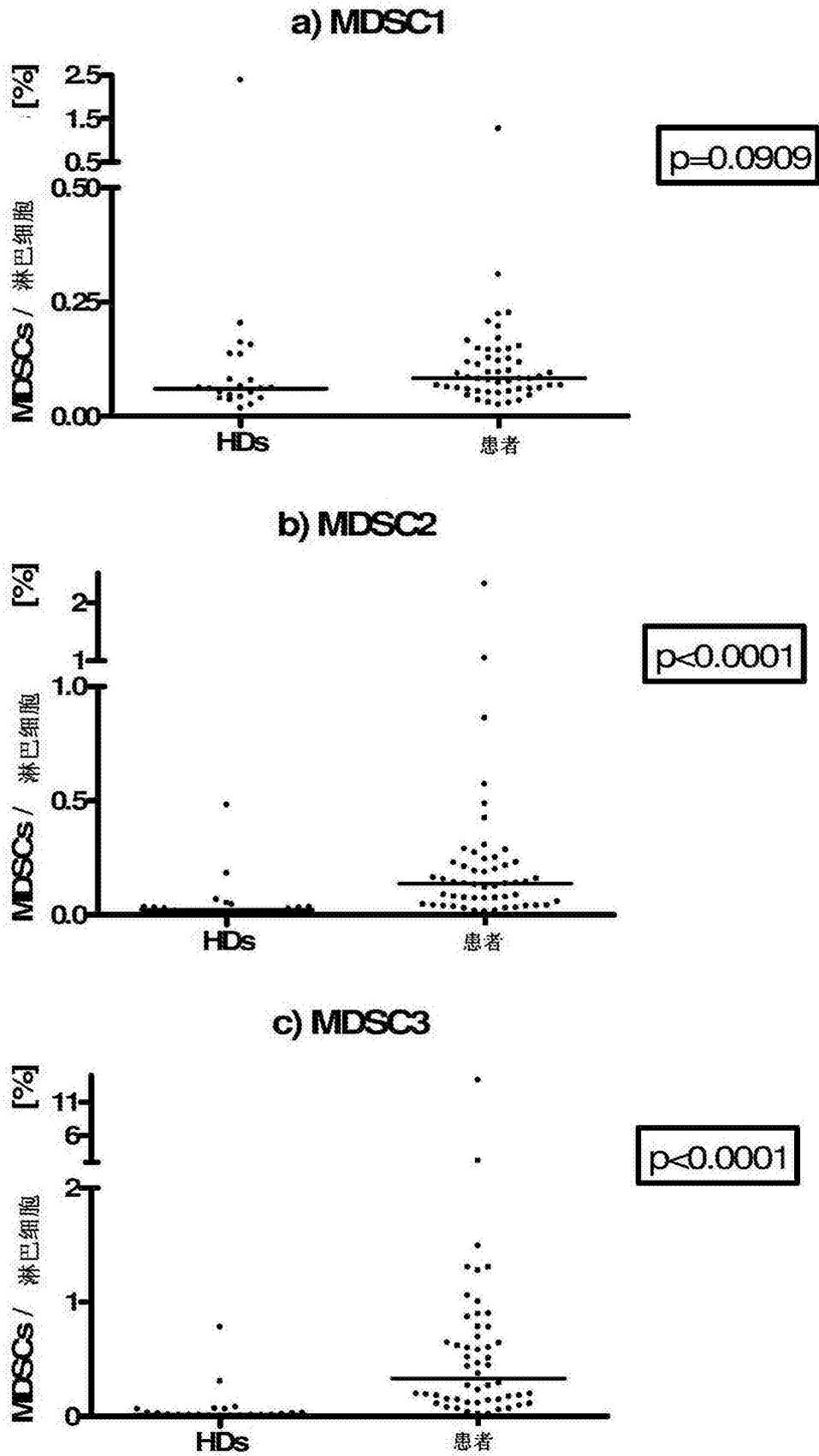


图2

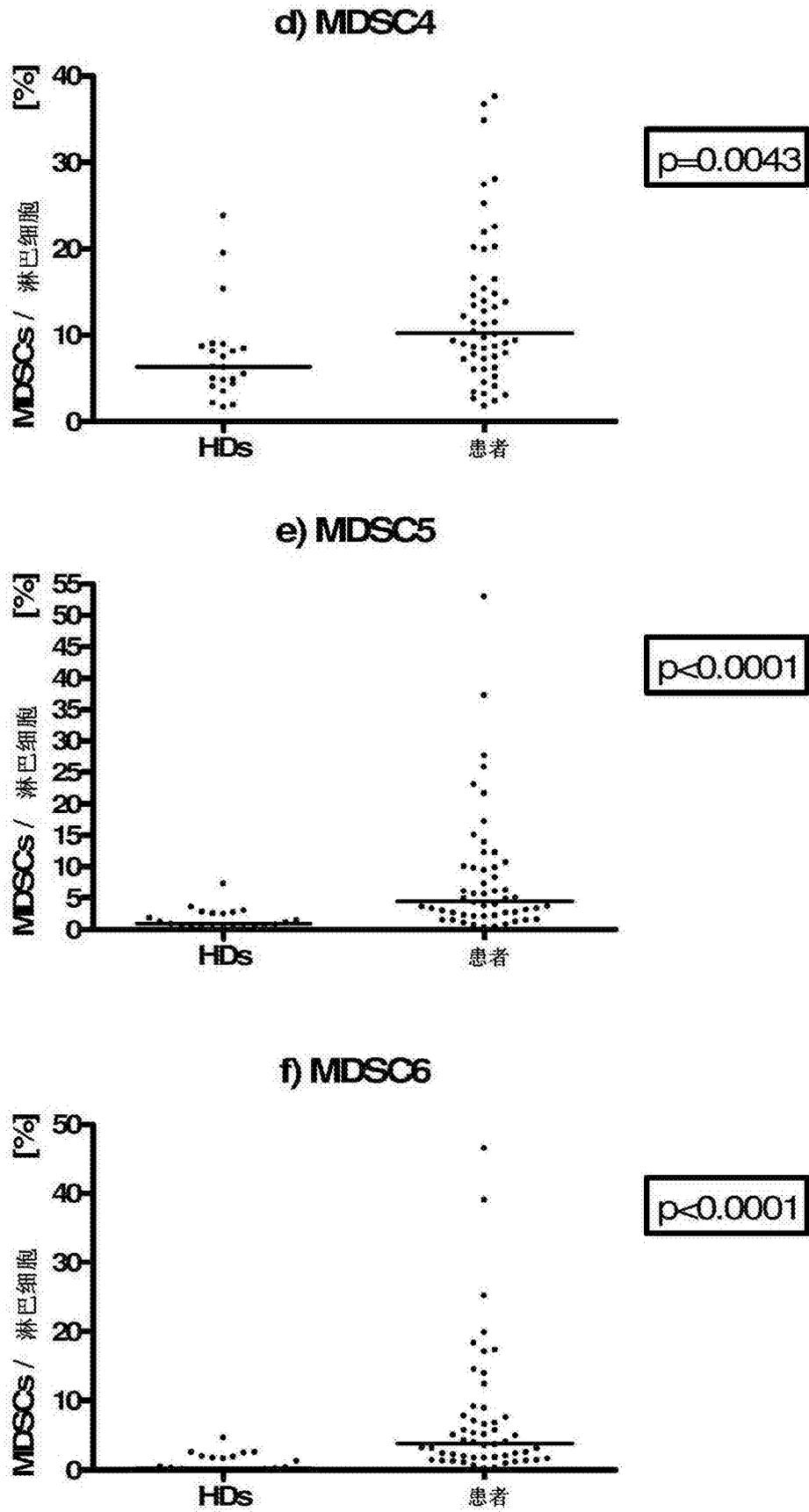


图2(接上页)