

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680020298.6

[51] Int. Cl.
C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年6月4日

[11] 公开号 CN 101194027A

[22] 申请日 2006.6.8

[21] 申请号 200680020298.6

[30] 优先权

[32] 2005.6.8 [33] US [31] 60/688,744

[32] 2005.11.11 [33] US [31] 60/735,508

[86] 国际申请 PCT/US2006/022427 2006.6.8

[87] 国际公布 WO2006/133399 英 2006.12.14

[85] 进入国家阶段日期 2007.12.7

[71] 申请人 日立化成研究中心公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 日立化成工业株式会社

[72] 发明人 三桥将人

[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

代理人 钟 晶

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 11 页

[54] 发明名称

用于基于瘤细胞及受刺激的白细胞内 mRNA 表达谱而预测对肿瘤疾病的免疫应答的方法

[57] 摘要

肿瘤坏死因子 (TNF) 能够通过与其癌细胞表面上的特异性 TNF 受体相互作用而诱导凋亡。因为 TNF 配体和受体的多种成员存在于每个超家族内, 故存在超过 300 种不同的配体 - 受体组合。活化的血液白细胞产生 TNF 作为抗癌免疫应答的部分, 并产生趋化因子以吸引其它白细胞至癌症部位。本发明公开了使全血暴露于热聚集性人 IgG 或抗 T - 细胞受体抗体而作为免疫系统相互作用的模型时, 检测血液白细胞内多种 TNF 超家族亚型和趋化因子 mRNA 的显著诱导作用的方法。观察到在诱导的 TNF 亚型和趋化因子方面个体之间的重大差异。因为外周血液白细胞是抗癌免疫细胞的来源, 定量血液内适宜 TNF 配体和趋化因子的离体诱导性将用于个体化癌症免疫治疗中。如果癌块小, 如早期不可

见的转移性损害, 适宜的 TNF 攻击可以足以防止复发。

1. 测定哺乳动物内肿瘤疾病预后的可能严重性的方法，该方法包括：
测定来自哺乳动物的全血第一样品内多种肿瘤坏死因子（TNF）超家族亚型的表达水平；
使哺乳动物的全血第二样品暴露于活化全血内 T-细胞的刺激物；
测定第二样品内的多种肿瘤坏死因子（TNF）超家族亚型的表达水平；
鉴定在所述的第一样品和第二样品之间显示在所述全血内表达水平显著改变的亚型；并且
当已鉴定的 TNF 超家族亚型与哺乳动物瘤细胞内表达的特定肿瘤坏死因子受体（TNF-R）超家族亚型相对应时，确定预后可能较低的严重性。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型选自由 TNF-R 超家族亚型 1A、3、12A 和 14 所组成的组中。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型得到鉴定。
4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中，瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型采用选自由下列所组成的组中的方法鉴定：免疫染色、原位杂交、原位聚合酶链式反应和体外聚合酶链式反应。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，暴露全血包括添加肝素。
6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述刺激物选自由热聚集性人 IgG 和抗人 α/β T-细胞受体单克隆 IgG 所组成的组中。
7. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，由发病细胞表达的肿瘤坏死因子受体超家族亚型选自由下列所组成的组中：TNF-R 超家族亚型 1A、1B、3、4、5、6、7、8、9、10A、10B、10C、10D、11A、11B、12A、14、17、18 和 25。
8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述表达于所述已被暴露的全血内的肿瘤坏死因子超家族 mRNA 亚型选自由下列所组成的组中：TNF 超家族亚型 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、13B、14、15 和 18。
9. 根据权利要求 1 所述的方法，该方法还包括：
测定来自哺乳动物的全血第三样品内多种趋化因子的表达水平；

使哺乳动物的全血第四样品暴露于活化全血内 T-细胞的刺激物;

测定第四样品内多种趋化因子的表达水平;

当鉴定在所述的第三样品和第四样品之间显示在所述全血内表达水平显著改变的趋化因子时, 确定预后可能较低的严重性。

10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述的趋化因子选自由下列所组成的组中: CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL16、IL1B、IL5、IL6、IL8、IL12A、IL12B、IL15 和 IL16。

11. 测定饮食成分用于治疗哺乳动物内肿瘤疾病的可能效用的方法, 该方法包括:

获得哺乳动物的全血第一样品;

使哺乳动物的全血第二样品暴露于饮食成分;

使哺乳动物的全血第一样品和第二样品暴露于活化全血内 T-细胞的刺激物;

测定来自哺乳动物的全血第一样品和第二样品内多种肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族亚型的表达水平;

鉴定在所述的第一样品和第二样品之间显示在所述全血内表达水平显著改变的亚型; 以及

当已鉴定的 TNF 超家族亚型对应于表达在哺乳动物瘤细胞内的特定 TNF-R 超家族亚型时, 确定所述饮食成分可能具有用于治疗肿瘤疾病的功用。

12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中, 使第一样品在暴露于活化全血内 T-细胞的刺激物之前暴露于对照刺激物。

13. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中, 瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型选自由 TNF-R 超家族亚型 1A、3、12A 和 14 所组成的组中。

14. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中, 瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型得到鉴定。

15. 根据权利要求 14 所述的方法, 其中, 瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型采用选自由下列所组成的组中的方法鉴定: 免疫染色、原位杂交、原位聚合酶链式反应和体外聚合酶链式反应。

用于基于瘤细胞及受刺激的白细胞内 mRNA 表达谱而预测对肿瘤疾病的免疫应答的方法

发明背景

相关申请

本申请要求美国临时申请号 60/688,744 (2005 年 7 月 8 日提交) 和 60/735,508 (2005 年 11 月 11 日提交) 的优先权。

发明领域

本发明涉及用于预测哺乳动物内对肿瘤疾病的免疫应答的方法, 其中该方法基于瘤组织内肿瘤坏死因子受体 (TNF-R) 超家族 mRNA 的表达谱 (profile) 和循环白细胞内肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族 mRNA 的表达谱。在该方法中, 获得瘤组织的样品并评估表达于这些组织内的 TNF-R 超家族亚型 mRNA。另外, 哺乳动物的全血接受活化血液内 T-细胞的刺激物处理并且鉴定应答该刺激物在表达水平上表现显著改变的 TNF 超家族亚型 mRNA。确定这样的个体对其疾病可能具有较低严重性的预后, 其中所述个体显示与表达于它们的肿瘤组织内的 TNF-R 超家族亚型相关的 TNF 超家族亚型的表达水平改变。

相关技术的描述

不同方式的癌症疗法可以比喻为社会中各种类型力量的用途。化疗类似于在城市大范围地使用军事力量; 相关武器极大的威力可附带造成平民损害。相反, 在循环外周血内作为人体内癌细胞主要杀手的白细胞类似于处理街头犯罪的城市街道巡逻警察。类似地, 当白细胞遭遇身体内癌细胞时, 这些细胞是对癌靶的最初应答者。基于形态学分析和细胞表面标记的表征, 使用流式细胞术或免疫组织化学染色技术, 白细胞分类为众多的类和亚类。这些类和亚类类似于通过制服和身份徽章 (budge) 确定警官。每 mm^3 外周血的白细胞数目对应于城市内警察的数目。

当警察遭遇街头罪犯时, 他首先必须用手头拥有的武器对付罪犯。但是警察不总是携带适宜的武器。类似地, 不总是给细胞毒性 T-细胞提供适用于对付

特定癌细胞的抗肿瘤因子。当癌细胞被 IgG 包被时, 细胞毒性 T-细胞经 IgG Fc 受体 (FcR γ) 识别癌细胞。该过程称为抗体依赖细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。实际上, 用抗人 IgG 染色而在癌边缘周围经常识别出 IgG (参见例如, Richman AV, Immunofluorescence studies of benign and malignant human mammary tissue, J. Natl. Cancer Inst. 1976;57:263-7 和 Koneval T 等, Demonstration of immunoglobulin in tumor and marginal tissues of squamous cell carcinomas of the head and neck, J. Natl. Cancer Inst. 1977;59:1089-97)。很多情况下也可以发现单核白细胞浸润至癌损害内。在细胞毒性 T-细胞表面上的 FcR γ 类似于警察携带的备有多种武器的口袋。不同类型的 FcR γ 如 CD16、CD32 和 CD64 对应于不同类型的口袋。棍棒 (cudgel) 是最初的武器并且待用于任何时候的攻击。在细胞毒性 T-细胞内, 棍棒对应于预先合成及贮藏在细胞毒性 T-细胞细胞液内并且一旦 FcR γ 活化则立即释放的穿孔素 (参见 Nakanishi 等, Perform expression in lymphocytes infiltrated to human colorectal cancer, Br. J. Cancer 1991;64:239-42)。其它即刻可用的预先合成“棍棒”包括颗粒酶、与消化酶胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶相关的蛋白酶, 可以起到在靶细胞内触发凋亡的作用。

警官还携带威力更大的枪支, 可以对应于细胞毒性 T-细胞内的肿瘤坏死因子 (TNF)。通常, “子弹”在细胞环境下 (TNF 亚型) 不装填在枪支内并且仅在 Fc 受体活化时才得到合成并从细胞毒性 T-细胞中释放。TNF 能够通过与靶细胞表面上存在的特定 TNF 受体相互作用而诱导凋亡。为了维持抗广谱靶细胞的杀伤活性, 存在不同类型的 TNF 配体 (作为 TNF 超家族的部分, 缩写成 TNFSF)。根据 GenBank 和 UniGene 信息 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 人 TNF 超家族包含总共 17 个人类成员的多达 18 个 TNF 超家族, 其中某些编号 (16 和 17) 缺失并且相同编号内具有多种序列 (13A 和 13B)。对于相应 TNF 受体 (TNF-R 超家族: 缩写成 TNFRSF), 人 TNF-R 超家族包含多达 21 个 TNF-R 超家族亚型。虽然 TNF/TNF-R 超家族亚型的相互作用不是严格特异性的, 然而每种配体通常与特定的受体反应, 如表 1 内所示, 并且存在超过 300 个不同的 TNF 超家族亚型 TNF-R 超家族组合。

表 1. TNFRSF mRNA 和 TNFSFmRNA 的 GenBank UniGene 条目列表

TNFRSF (UniGene #)	相应的 TNFSF (UniGene #)
1A (Hs.279594)	2 (Hs.241570)
1B (Hs.256278)	2 (Hs.241570)
3 (Hs.1116)	1 (Hs.36)
	3 (Hs.376208)
4 (Hs.129780)	4 (Hs.181097)
5 (Hs.472860)	5 (Hs.652)
6 (Hs.244139)	6 (Hs.2007)
7 (Hs.355307)	7 (Hs.501497)
8 (Hs.1314)	8 (Hs.494901)
9 (Hs.193418)	9 (Hs.1524)
10A (Hs.401745)	10 (Hs.478275)
10B (Hs.521456)	10 (Hs.478275)
10C (Hs.119684)	10 (Hs.478275)
10C (Hs.119684)	10 (Hs.478275)
10D (Hs.213467)	10 (Hs.478275)
11A (Hs.204044)	11 (Hs.333791)
11B (Hs.81791)	11 (Hs.333791)
12A (Hs.355899)	12 (NM003809)*
14 (Hs.512898)	14 (Hs.129708)
17 (Hs.2556)	13 (Hs.54673)
	13B (Hs.525157)
18 (Hs.212680)	18 (Hs.248197)
25 (Hs.462529)	15 (Hs.241382)

*:GeneBank 登录号 (未找到 UniGene 条目)。

当从浸润的细胞毒性 T-细胞中释放适宜的 TNF 超家族亚型时, 癌的彻底消灭可以发生。癌症奇迹幸存者的稀有病例可能是其中 TNF 超家族亚型 TNF-R 超家族亚型完美组合的那些病例。

抗体依赖细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 是涉及结合抗体的白细胞细胞毒功能的另一种机制 (见 Perussia 等, Assays for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and reverse ADCC (redirected cytotoxicity) in human natural killer cells. Methods Mol Biol. 2000;121:179-92)。一旦 IgG 的 Fab 部分与靶细胞结合, 则 IgG 的 Fc 部分活化在白细胞上的 Fc 受体, 则随即活化这些白细胞以攻击靶细胞。虽然已经研究 ADCC 多年, 但是在涉及 ADCC 的体外 (*in vitro*)

实验中的条件取决于纯细胞系统中混悬在人工溶液内的效应细胞毒性 T-细胞与靶细胞间的比率。此外，因为细胞溶解通常通过同位素（铬-51）从靶细胞内的释放进行定量，不知道所观察的细胞溶解是否因穿孔素或 TNF 发生。也不知道哪种 TNF 超家族亚型参与 ADCC。

最后，白细胞对付癌的又一个重要机制是释放趋化因子以召集更多白细胞至发病部位。已经发现此类众多细胞因子。虽然没有建立特定趋化因子与所召集的特定白细群体间的关系，然而趋化因子释放与白细胞召集现象在对付癌症中是重要的。这里可以类比为遭遇一伙罪犯的警察用无线电发回总部请求更多增援。

总之，虽然需要复杂的细胞机制以培育能够识别特定癌标记的适宜白细胞亚群，并且应当释放适宜的趋化因子以吸引这些成熟的白细胞至损害处，实际的癌杀伤以两种不同方式发生。立即癌杀伤因穿孔素从这些白细胞中的释放而发生，随后通过合成和释放 TNF 而缓慢及持续地诱导凋亡（见 Vujanovic, Role of TNF family ligands in antitumor activity of natural killer cells, *Int. Rev. Immunol.* 2001 Jun;20(3-4):415-37）。TNF 通过与靶细胞表面上的特定受体结合而诱导凋亡。这意味白细胞必须释放与存在于癌细胞上的受体相对应的特定 TNF 配体。虽然已经考虑利用 TNF/TNF 受体的比作为疾病结果的预测（参见 McDermott, TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell. Mol. Biol.(Noisy-le-grand)*. 2001 Jun;47(4):619-35），然而很少了解癌细胞内的 TNF 受体谱及白细胞内配体的诱导谱，也很少知道如何召集适宜的白细胞群体。

发明简述

若病理学标本显示 IgG 沉积在癌边缘，这意味患者至少能够产生识别癌的 IgG。若单核白细胞浸润出现在癌块边缘，这意味患者的白细胞某种程度上被吸引至癌损害处，可能原因是在结合癌的 IgG 活化补体期间释放了趋化因子（C3a、C5a、C567）（见 Becker, The relationship of the chemotactic behavior of the complement-derived factors, C3a, C5a, and C567, and a bacterial chemotactic factor to their ability to activate the proesterase 1 of rabbit polymorphonuclear leukocytes, *J. Exp. Med.* 1972;135:376-87）。在癌细胞表面上表达的 TNF-R 超家族亚型的类型可以通过例如免疫染色（若抗体可获得）、原位（*in situ*）杂交或

原位 PCR (可从 GenBank 获得序列) 进行鉴定。对表达于浸润性单核细胞内 TNF 超家族亚型的鉴定难以解释, 因为 FcR γ 可以未被活化。由于外周血内的白细胞类似于后备警察, 在外周血内供应适宜且充分装备的细胞毒性 T-细胞是抗癌战斗的首要关键步骤。因此, 本方法有可能通过定量外周血白细胞内适宜 TNF 超家族亚型的诱导性来预测每名患者内的抗癌免疫力。

因此, 本发明的实施方式提供测定哺乳动物内肿瘤疾病预后的可能严重性的方法, 该方法包括: 测定来自哺乳动物的全血第一样品内的多种肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族亚型的表达水平; 使哺乳动物的全血第二样品暴露于活化全血内 T-细胞的刺激物; 测定第二样品内的多种肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族亚型的表达水平; 鉴定在所述第一样品和第二样品之间显示在所述全血内表达水平显著改变的亚型; 并且当已鉴定的 TNF 超家族亚型与在哺乳动物瘤细胞内表达的特定肿瘤坏死因子受体 (TNF-R) 超家族亚型相对应时, 确定预后可能较低的严重性。

在另外方面, 瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型选自由 TNF-R 超家族亚型 1A、3、12A 和 14 所组成的组中。在另一方面, 瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型得到鉴定。在又一个方面, 瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型采用选自由下列所组成的组中的方法鉴定: 免疫染色、原位杂交、原位聚合酶链式反应和体外聚合酶链式反应。

在另外方面, 暴露全血包括添加肝素。在另一方面, 刺激物选自由热聚集性人 IgG 和抗人 α/β T-细胞受体单克隆 IgG 所组成的组中。在另外方面, 由发病细胞表达的肿瘤坏死因子受体超家族亚型选自由下列所组成的组中: TNF-R 超家族亚型 1A、1B、3、4、5、6、7、8、9、10A、10B、10C、10D、11A、11B、12A、14、17、18 和 25。在另一方面, 在所述已被暴露的全血内表达的肿瘤坏死因子超家族 mRNA 亚型选自由下列所组成的组中: TNF 超家族亚型 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、13B、14、15 和 18。

在另一方面, 本方法还包括测定来自哺乳动物的全血第三样品内多种趋化因子的表达水平; 使哺乳动物的全血第四样品暴露于活化全血内 T-细胞的刺激物; 测定第四样品内多种趋化因子的表达水平; 以及当鉴定在所述的第三样品和第四样品之间显示在全血内表达水平显著改变的趋化因子时, 确定预后可能

较低的严重性。在又一个方面，趋化因子选自由下列所组成的组中：CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL16、IL1B、IL5、IL6、IL8、IL12A、IL12B、IL15 和 IL16。

本发明的又一个实施例提供测定饮食成分用于治疗哺乳动物内肿瘤疾病的可能效用的方法，该方法包括：获得哺乳动物的全血第一样品；使哺乳动物的全血第二样品暴露于饮食成分；使哺乳动物的全血第一样品和第二样品暴露于活化全血内 T-细胞的刺激物；测定来自哺乳动物的全血第一样品和第二样品内的多种肿瘤坏死因子（TNF）超家族亚型的表达水平；鉴定在所述的第一样品和第二样品之间显示在所述全血内表达水平显著改变的亚型；以及当已鉴定的 TNF 超家族亚型对应于表达在哺乳动物瘤细胞内的特定 TNF-R 超家族亚型时，确定所述饮食成分可能具有用于治疗肿瘤疾病的功用。

在另外方面，使第一样品暴露于活化全血内 T-细胞的刺激物之前暴露于对照刺激物。在另一方面，瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型选自 TNF-R 超家族亚型 1A、3、12A 和 14。在另外方面，瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型得到鉴定。在另一个方面，瘤组织内表达的 TNF-R 超家族亚型采用选自由下列所组成的组中的方法鉴定：免疫染色、原位杂交、原位聚合酶链式反应和体外聚合酶链式反应。

附图简述

图 1A 显示在全血暴露于热聚集性 IgG (HAG) 后，外周血白细胞内所诱导的 TNF 超家族 mRNA 的分析结果；

图 1B 显示图 1A 重复分析的结果；

图 2 显示取自各种腺癌和鳞状细胞癌的组织样品内表达的 TNF-R 超家族 mRNA 的分析结果；

图 3 显示在全血暴露于抗人 T-细胞受体 (TCR) 单克隆抗体后，外周血白细胞内所诱导的 TNF 超家族 mRNA 的分析结果；

图 4A 显示当使外周血白细胞暴露于抗 TCR 抗体并定量 TNF 超家族亚型 2 mRNA 表达时, 剂量反应和动力学的分析结果;

图 4B 显示当使外周血白细胞暴露于抗 TCR 抗体并定量 TNF 超家族亚型 2 mRNA 表达时, 动力学的分析结果;

图 5A 显示当使外周血白细胞暴露于 HAG 并定量 TNF 超家族亚型 15 mRNA 表达时, 剂量反应和动力学的分析结果;

图 5B 显示当使外周血白细胞暴露于 HAG 并定量 TNF 超家族亚型 15 mRNA 表达时, 动力学的分析结果;

图 6 显示关于图 5 数种 TNF 超家族亚型 mRNA 及对照 mRNA 方面的重复分析结果;

图 7 显示在全血暴露于 HAG 后, 外周血白细胞内所诱导的 TNF 超家族 mRNA 的分析结果;

图 8 显示实施例 4 内所用的趋化因子引物序列;

图 9 显示在全血暴露于 HAG 后, 外周血白细胞内诱导的趋化因子 mRNA 的分析结果;

图 10 显示在事先用饮食补充物或对照刺激物刺激的全血等分试样暴露于 HAG 后, 外周血白细胞内诱导的 TNF 超家族亚型 3 mRNA 的分析结果。

优选实施方式的详述

mRNA 的定量

本发明的发明人开发了名为 Hem (A)⁺系统的能够定量全血白细胞内基因表达细微变化的独特技术。该技术在美专专利申请号 10/796,298 和国际专利申请系列号 PCT/US2004/036309 内详细描述, 两篇文献均在本文引用作为参考(还见 Mitsuhashi, Absolute quantitation of rnRNA in human blood leukocytes as a model for phenotypic gene expression-based diagnostics, Clin Chem, 52:4(2006))。

在定量技术中, 将全血施加至 96 孔滤板以捕获白细胞。将含有合成性外来对照 RNA 和特异性反向引物的裂解缓冲液添加到滤板, 并转移细胞裂解物至用于杂交的寡 (dT) 固定化微量培养板。随后在寡 (dT) 固定化微量培养板内从所述引物位点合成 cDNA。将含有特异性反向引物所引发的 cDNA 的溶

液用于实时 PCR。可以贮藏含有寡 (dT) 所引发的固定化 cDNA 的平板作为 cDNA 库 (bank)。

更详细地, 该测定方法由 3 个主要步骤组成: (a) 在滤板上分离并裂解白细胞; (b) 在寡 (dT) 固定化微量培养板内进行 mRNA 分离、反向引物杂交和 cDNA 合成; 以及 (c) 实时定量的 PCR。制造定制的 96 孔滤板, 可以通过装配白细胞还原膜 (leukocyte reduction membrane) (Leukosorb; Pall) 通过例如由 Whatman 或 Pall。这些滤板安放在收集平板上, 并施加 150 μL 的 5 mmol/L Tris (pH 7.4) 以润湿滤膜。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 于 120g 离心 1 分钟以从膜上移走 Tris 溶液后, 施加 50 μL 充分混合的全血样品至每个孔内并立即在 4 $^{\circ}\text{C}$ 于 120g 离心 2 分钟。孔随后用 300 μL 磷酸盐缓冲盐水洗涤一次。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 于 2000g 离心 5 分钟以除去盐溶液, 添加以 1 mL/L 2-巯基乙醇 (Bio-Rad)、0.5 g/L 蛋白酶 K (Pierce)、0.1 g/L 鲑精 DNA (5 Prime Eppendorf/Brinkman)、0.1 g/L 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) tRNA (Sigma)、5 nmol/L 每种特异性反向引物和 10^9 个分子/L 的合成 RNA34 (作为外来对照) 补充的 60 μL 贮藏裂解缓冲液 [5 g/L N-月桂酰基肌氨酸盐、4 \times 标准柠檬酸盐水、10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、1 mmol/L EDTA、1 mL/L IGEPAL CA-630 (NP-40 的替代物)、1.79 mol/L 异硫氰酸胍 (均来自 Sigma)] 至滤板的各孔内。随后该平板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 分钟, 安放在寡 (dT) 固定化微量培养板 (GenePlate; RNAture) 上并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 于 2000g 离心 5 分钟。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏过夜后, 微量培养板在 4 $^{\circ}\text{C}$ 用 100 μL 空白裂解缓冲液 (plain lysis buffer) 洗涤 3 次并随后用 150 μL 洗涤缓冲液 [0.5 mol/L NaCl、10 mmol/L Tris (pH 7.4) 1 mmol/L EDTA] 洗涤 3 次。

可以通过添加 30 μL 含有 1 \times 逆转录缓冲液 [50 mM KCl、10 mM Tris-HCL (pH 8.3)、5.5 mM MgCl_2 、1 mL/L Tween 20] 缓冲液、每种三磷酸脱氧核苷 1.25 mM、4 单位 rRNA 酶抑制剂 (rRNAsin) 和 80 U 的 MMLV 逆转录酶 (Promega; 无引物) 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 小时, 于每孔内直接合成 cDNA。将每 30 μL 反应物 (reaction)、4 μL cDNA 直接转移至 384 孔 PCR 平板内, 并添加 5 μL 的 TaqMan 通用主混合物 (universal master mixture) (Applied Biosystems) 和 1 μL 寡核苷酸混合物 (正向引物和反向引物每种 5 μM 和 1-2 μM TaqMan 探针)。PCR 可以在 PRISM 7900HT (Applied Biosystems) 内进行, 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 分钟 1 个循

环, 随后是 45 个循环: 95°C 下 30 秒; 55°C 下 30 秒和 60°C 下 1 分钟。每种基因在独立的孔内扩增。用分析软件 (SDS; Applied Biosystems) 测定循环阈值 (Ct), 即产生一定量 PCR 产物 (基于荧光) 的循环。

为构建用于定量的校正曲线, 合成用于每种靶的含有正向引物及反向引物以及 TaqMan 探针的序列的合成长 DNA 寡核苷酸。用于对照 RNA34 的 TaqMan 探针例如是 CCAAGGCCAGCCCTCACACA。可选地, 可以利用 SYBRGreen PCR。每种寡核苷酸可以通过 HPLC 纯化至 >95% 的纯度。每个 PCR 含有 $10\text{-}10^6$ 个分子/孔的这些模板核苷酸。可以使用对于由 DNA 寡核苷酸所产生的对照 RNA34 的校正曲线来将样品的 Ct 值转换成分子/PCR 孔 (4 μL 的 cDNA), 随后乘以 7.5 (30 除以 4) 以获得分子/样品 (30 μL 的 cDNA)。RNA34 的回收百分数通过将上述值除以 60 μL 原始裂解缓冲液内 RNA34 的量而获得 ($6 \times 10^5 = 10^7/\text{mL} \times 60 \mu\text{L}$)。对于天然 mRNA, 分子/PCR 孔如以上所述用相应校正曲线加以确定, 并且随后通过乘以 7.5 (30 除以 4), 除以每一个样品内的 RNA34 回收百分数并除以添加到滤板每孔内血液的体积 (通常 50 μL) 而将这些值转换成分子/每微升血液。平均数 (SD) 从全血的三份等分试样中计算并可以使用 Student t-检验来统计分析。

在实施方式中, 使用以上所述的 mRNA 定量系统 (Hem (A)⁺) 在各种癌标本中表征 TNF 受体超家族 (TNFRSF) mRNA 的表达谱。随后, TNF 超家族 (TNFSF) mRNA 的诱导性通过使用分别作为细胞毒性 T-细胞介导反应和抗体依赖细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的离体模型的小鼠抗人 T 细胞受体单克隆抗体或热聚集性 IgG 对肝素化全血刺激加以定量。使用本领域内众所周知的统计方法计算表达水平的显著诱导或减少; 使用 0.05 或更小的 p 值。所示重大的个体对个体变异表示可以使用本发明的实施方式铺垫个性化癌症免疫疗法的基础。

实施例 1

使用以上所述的 mRNA 定量方法来定量在施加或不施加由热聚集性 IgG (HAG) 所引起的离体刺激下的全部类型的 TNF 超家族 mRNA, 其中使用所述的热聚集性 IgG 作为免疫复合物刺激模型 (见 Ostreiko 等, Production and characterization of heat-aggregated IgG complexes with predetermined molecular

masses: light-scattering study, Immunol Lett. 1987;15:311-6)。当与靶细胞结合的 IgG 分子以高亲和力结合至白细胞上的 Fc 受体时,免疫复合物形成,导致 Fc 受体交联及白细胞活化信号产生。

三份等分试样的每份 50 μL 的肝素化全血与 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LHAG 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 小时。随后如上所述,将血液样品施加至 96 孔滤板以捕获白细胞,并转移细胞裂解物至 96 孔寡(dT)固定化的微量培养板以分离 poly(A)⁺mRNA。cDNA 在微量培养板上合成并通过监视 SYBR 绿色荧光而用于 384 孔平板内的实时聚合酶链式反应(PCR)(见 Morrison 等, Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, Biotechniques 1998;24:954-8, 960, 96)。简而言之,如此实施 SYBR Green PCR,即通过在水中稀释 cDNA 3-4 倍,并直接转移 4 μl cDNA 溶液至 384 孔 PCR 平板内,向 384 孔 PCR 平板内施加 5 μl 主混合物(BioRad, Hercules, CA)和 1 μl 寡核苷酸混合物(每种正向引物和反向引物 15 μM),并在 PRISM 7900HT (ABI) 内实施 PCR,在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 分钟 1 个循环,随后是 45 个循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 秒和、60 $^{\circ}\text{C}$ 下 1 分钟。每种基因在独立的孔内扩增。Ct 用分析软件(SDS, ABI)测定。仔细优化 PCR 条件,以至在解链曲线分析上检测到单个适宜的峰,无任何引物二聚体。为验证分析条件,合成 RNA34 添加至裂解缓冲液内,并且这种 RNA34 也通过实时 PCR 定量。引物的序列特异性通过 blast 分析证实(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。设定 Ct 等同于产生一定量 PCR 产物的 PCR 循环,并且 ΔCt (ΔCt) 还通过从受刺激样品的 Ct 值中扣除未刺激样品的 Ct 值加以计算。由于 Ct 是对数标度,1 ΔCt 意指 2 倍或 1.5 倍量,并且负 ΔCt 指示表达增加。

结果示于图 1A 和图 1B。在所述附图中,通过 SYBR Green 实时 PCR 定量 TNFSF mRNA (1-18) 和所添加的 RNA34 对照。 ΔCt 值 3、2、1、0、-1、-2 和 -3 分别表示 1/8、1/4、1/2、0、2、4、8 倍增加。在图 1A 中,每个符号是来自每一个体的平均值。○符号表示显著增加 ($p < 0.05$),而 Δ 符号表示显著减少 ($p < 0.05$) 并且 X 表示没有变化。图 1B 显示在连续 2 日内使用相同的个体,重复分析 2 次的结果。符号是来自每一个体的平均数 \pm 标准差。分别为 ●: TNFSF-2 (TNF α), ▲: TNFSF-8, ◆: TNFSF-15。实线是其中两个数据集相

同的线。虚线表示 $\pm 0.5 \Delta Ct$ 。

该技术能够检测在血液白细胞内 TNF 超家族 mRNA 的全部成员的基础水平。如图 1A 中所示, 鉴定当全血暴露于 HAG 时显著诱导 TNF 超家族 mRNA。虽然存在巨大的个体对个体变异, 优势的 TNF 超家族 mRNA 是 TNF 超家族亚型 2 (TNF α)、8 和 15。这些 mRNA 分别在 80% (12/15)、73% (11/15) 和 60% (9/15) 的受测试个体内表现 HAG 诱导性应答。TNF 超家族亚型 1、3、4、6 (即 FasL)、7、9、10 (即 TRAIL)、14 和 18 mRNA 在至少一个受测试个体内表现 HAG 诱导性应答。TNF 超家族亚型 5、11、12、13 和 13B mRNA 在任何受测试个体内均不表现 HAG 诱导性应答。TNF 超家族亚型 2、8 和 15 中的至少一种在每名受测试个体内因暴露于 HAG 而诱导。例如, 不表现 HAG 诱导性 TNF 超家族亚型 2 应答的 3 名个体均表现亚型 15 应答, 而不表现 HAG 诱导性 TNF 超家族亚型 15 应答的 6 名个体均表现亚型 2 应答。其中 TNF 超家族亚型 8 不表现 HAG 诱导性应答的 4 名个体的确表现亚型 2 应答或亚型 15 应答。如图 1A 中所示, 所添加 RNA34 对照的 ΔCt 完全在 ± 0.5 内。为了进一步验证这些实验, 血液样品在连续 2 日内从相同个体中采取两次。如图 1B 中所示, 对于 TNF 超家族亚型 2、8、15 和 RNA34 的值以 ± 0.5 标准差内可重复。三份全血等分试样内的变异也小于 $0.5 \Delta Ct$ (图 1B, 每种符号内的 X-Y 轴 (bar))。

本方法可以按如下方式在实施例内应用。分析从接受手术摘除或活组织检查的哺乳动物患者中所取出癌标本的 IgG 沉积、单核白细胞浸润和在癌细胞上表达的 TNF-R 超家族亚型的类型。随后从相同个体中获得血液样品并对其分析以确定哪种类型的 TNF 超家族 mRNA 由 HAG 刺激而诱导并到达何种程度。将个体分成其中诱导的 TNF 超家族和表达的 TNF-R 相匹配的组以及其中它们不相匹配的组。在这两组中临床结果的比较结果表明匹配的组表现预后的较低严重性。如果癌块小, 如早期的不可见转移性损害, 适宜的 TNF 超家族介导性免疫系统攻击可能足以防止癌复发。所比较的临床结果因此应当包括缓解的时间长度和复发 (转移) 的频率。

实施例 2

TNF-R 超家族 mRNA 和 TNF 超家族 mRNA 的 DNA 序列从 GenBank 下载, 如表 1 内所示, 并且在下文表 2 内所示的引物序列通过 Primer Express (Applied Biosystems) 和 HYBsimulator (RNAture) 设计。在多种转录物之间的共有区域内设计这些序列, 如果此类变体存在。在无 cDNA 下, 无扩增发生 (无引物二聚体) 并且在解链曲线分析中检测到单峰。

表 2: 所用的引物序列

靶 mRNA	正向	反向
TNFRSF-1A	CCTGCCAGGAGAAACAGAACA	GGAGACACACTCGTTTTCTCTTAGAA
TNFRSF-1B	CAAGCCAGCTCCACAATGG	TCACCGAAAGGCACATTCTCT
TNFRSF-3	CCTCCCGGGCTCTCTACAC	TCATGGGTGATAAATTTGGTTCTT
TNFRSF-4	ACGACGTGGTCAGCTCCAA	GCGGCAGACTGTGTCTCTGTGT
TNFRSF-5	GGCCAAGAAGCCAACCAATA	GAAGATCGTTCGGGAAAATTTGAT
TNFRSF-6	TGGCATCAACTTCATGGAAAGA	GCAAGAGTACAAAGATTGGCTTTTTT
TNFRSF-7	CTGCAGAGCCTTGTCGTTACAG	GCTCCGGTTTTTCGGTAATCC
TNFRSF-8	GGTTGAGGCAGCAAACAGATG	GCCTGGTGGTTAAGGTCTGTATG
TNFRSF-9	CGTCGACTGCGTTGCTCTT	TTCTGCCCCGTTTAAACAACAG
TNFRSF-10A	TGAGGACAATGCTCACAACGA	TTGCTGCTCAGAGACGAAAGTG
TNFRSF-10B	CTGAGACAGTGCTTCGATGACTTT	CCATGAGGCCCAACTTCTCT
TNFRSF-10C	GGAAAGTGTAGCAGGTGCCCTAGT	ACCAAATTTCTTCAACACACTGGATAT
TNFRSF-10D	ATGGACTTACGAGGGTTCGACTTAG	GGAAAAGAGATGTACAGCCTACAGTAGTAAGC
TNFRSF-11A	GGAAACAGTAACTCCACGTTTCATCT	GCGAGGTCTGGCTGACGTA
TNFRSF-11B	TGCAAACCCAGTGACCAGATC	AAGGTGTCTTGGTTCGCCATTT
TNFRSF-12A	CGCTGATCCAGTGACAATGTG	GCGTCTGGGAGGCAGAGA
TNFRSF-14	CAGGGAGCCTCGTCATCGT	CACCCCTTGGCTTTCTTCTTTT
TNFRSF-17	GGAGGAAGGCACAACCAT	GCAGCTGGCAGGCTCTTG
TNFRSF-18	AGTTTTGGCTTCCAGTGTATCGA	GCAGTCTGTCCAAGTTTTGCA
TNFRSF-25	CCTGCTCGCCCTATCG	TTCAACCCCTCTCGACATTC
TNFSF-1	CAGCTATCCACCCACACAGATG	CGAAGCCTCCAAAGAAGACACT
TNFSF-2	CGAAGGC'TCCAAAGAAGACAGT	CAGGGCAATGATCCCAAAGT
TNFSF-3	AGGGTGTACGTCAACATCAGTCA	CACGGCCCCAAAGAAGGT
TNFSF-4	GCCCC'TCTTCCAACCTGAAGAA	GGTATTGTCTAGTGGTTCACATTC AAG
TNFSF-5	CCACAGTTCGGCCAAACCT	CACCTGGTTGCAATTC AATACTC
TNFSF-6	TGGCAGCATCTTCACTTCTA AATG	GAAATGAGTCCCCAAAACAT CTCT
TNFSF-7	CACACTCTGCACCAACCTCACT	TGCACTCCAAAGAAGGTCTCATC
TNFSF-8	ACCACCATATCAGTCAATGTGGAT	GAAGATGGACAACACATTTCTCAAGA
TNFSF-9	AGCTACAAAGAGGACACGAAGGA	CGCAGCTCTAGTT'GAAAGAAGACA
TNFSF-10	GGGAATATTTGAGCTTAAGGAAAATG	AAAAGGCCCCGAAAAAACTG
TNFSF-12	TACTGTTCAGGTGCACTTTGATGAG	CGCAGTGGCTGAGAATTCCT
TNFSF-13	ATATGGTGTCCGAATCCAGGAT	CCTGACCCATGGTGAAAGTCA
TNFSF-13B	ATGCC'TGAAACACTACCC AATAATT	GCAAGTTGGAGTTCATCTCCTTCT
TNFSF-14	CGTCCGTGTGCTGGATGA	CATGAAAGCCCCGAAGTAAGAC
TNFSF-15	TGCGAAGTAGGTAGCAACTGGTT	CCATTAGCTTGTCCCTTCTTG
TNFSF-18	CGGCTGTATAAAAACAAAGACATGAT	TCCCCAACATGCAATTCATAAG
RNA34	AGCCCCCTCACTCCCAA	GGGTGCTGTGCTTCTGTGAAC

每种 mRNA 的量通过以上所述的方法在做如下调整时加以测定。简而言之, 大约 125 mg 冰冻的癌标本与以 1% 2-巯基乙醇 (Bio Rad)、0.5 mg/mL 蛋白酶 K (Pierce)、0.1 mg/mL 鲑精 DNA (5 Prime Eppendorf/Brinlonann)、0.1 mg/mL 大肠杆菌 tRNA (Sigma)、10 mM 每种 TNF-R 超家族亚型特异性反向

引物和作为外来对照的 10^7 个分子/mL 合成 RNA34 补充的 1 mL 裂解缓冲液混合, 并通过 Polytron (Brinlonann) 进行匀浆。施加 70 μ L 这些裂解物至用于 mRNA 纯化的寡 (dT) 固定化微量培养板 (GenePlate, RNAture)。在 4°C 温育过夜后, 微量培养板在 4°C 用 100 μ L 空白裂解缓冲液洗涤 3 次并随后用 150 μ L 洗涤缓冲液 (0.5 mol/L NaCl、10 mmol/L Tris、pH 7.4、1 mmol/L EDTA) 洗涤 3 次。通过添加 30 μ L 含有 1 \times RT-缓冲液 (50 mM KCl、10 mM Tris-HCL、pH 8.3、5.5 mmol/L MgCl₂, 无二硫苏糖醇) 缓冲液、每种三磷酸脱氧核苷 1.25 mM、4 单位 rRNA 酶抑制剂和 80 U 的 MMLV 逆转录酶 (Promega; 无引物) 并在 37°C 温育 2 小时直接在每孔内合成 cDNA。将 100 μ L 水添加至 30 μ L 这些 cDNA 内并将 4 μ L cDNA 转移至 384 孔 PCR 平板内, 其中向所述 PCR 平板施加 5 μ L Taq SYBR 主混合物 (BioRad) 和 1 μ L 引物的混合物 (每种正向引物和反向引物 10 μ mol/L), 并且在 PRISM 7900HT (Applied Biosystems) 内实施 PCR, 在 95°C 下 10 分钟 1 个循环, 随后是 45 个循环: 95°C 下 30 秒和 60°C 下 1 分钟。每种基因在独立孔内扩增。用分析软件 (SDS; Applied Biosystems) 测定循环阈值 (Ct), 即产生一定量的 PCR 产物 (荧光) 的循环。在无 cDNA 下, 证实无扩增 (无引物二聚体) 并且在解链曲线分析中检测到单峰。为了在 20 个不同 mRNA 间比较多个样品, 对每个 Ct 扣减来自相同样品的 TNFRSF1A 的 Ct (Δ Ct, Y-轴)。正 Ct 意指比 TNFRSF1A 更低的表达, 并且 1 Δ Ct 意指 1.5 倍表达。每种符号代表来自单个标本的平均值。图 2 中每一列的左侧 (o \blacklozenge) 显示来自包括结肠、肝脏、胃、子宫的腺癌样品及 3 个乳腺癌病例 (\blacklozenge) 样品以及黑素瘤样品的结果。右侧 (Δ) 显示来自鳞状细胞癌的结果, 包括肺癌、咽癌、舌癌和颈癌 (cervical cancer) 样品。

对于分析由抗人 T 细胞受体 (TCR) 单克隆抗体在肝素化全血内诱导的 TNF 超家族 mRNA, 分析结果示于图 3 内, 60 μ L 全血在 37°C 用 5 μ g/mL 抗 TCR α/β 或对照 IgG 仅刺激 2 小时, 重复三份。如上所述, 施加 50 μ L 血液样品至滤板内以捕获白细胞, 随后通过添加裂解缓冲液在膜内进行裂解。如上所述实施 poly (A)⁺mRNA 的纯化、cDNA 合成和实时 PCR。通过从抗 TCR α/β 的 Ct 中扣减对照 IgG 的 Ct 值计算 Δ Ct。每种符号代表来自单一个体三次重复的血液等分试样的平均 Δ Ct。还定量作为外来对照而添加至裂解缓冲液内的合

成 RNA34 以验证每个分析。

使用分析软件 (SDS, Applied Biosystems) 确定循环阈值 (Ct), 即产生一定量的 PCR 产物 (荧光) 的 PCR 循环。虽然 DNA 芯片技术 (见 Schena 等, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, Science 1995;270:467-70) 能够同时分析众多基因, 但是该技术缺少精确定量的能力, 并通常需要多于 3 倍的增加作为有意义的结果。相反, 以上所述的 DNA 定量技术通过考虑每一样品内的 RNA 回收效率和 cDNA 合成效率而提供更精确的定量, 并且可以检测到统计显著的微小如 150% (1.5 倍) 一样的变化。因此, 如上所述, 通过 SYBR Green 实时 PCR (见 Morrison 等, Quantification of low- copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, Biotechniques 1998;24:954-8, 960, 96) 分析由本方法所制备的每种 cDNA 中的每种 mRNA。

图 2 显示在各种癌 (结肠癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、子宫癌、黑素瘤、肺癌、咽癌、舌癌和子宫颈癌) 内 TNF-R 超家族 mRNA 表达的结果。为了在 20 个不同 mRNA 间比较多个样品, 从每个观察到的 Ct (Δ Ct, Y-轴) 中扣减来自相同样品 TNF-R 超家族亚型 1A 的 Ct。正 Ct 意指比 TNFR 超家族亚型 1A 更低的表达水平, 并且 1 Δ Ct 意指 1.5 倍表达水平。如图 2 中所示, 几乎全部癌组织表达高水平的 TNF-R 超家族亚型 1A、3、12A 和 14。

这表示如果癌浸润性白细胞能够在浸润部位产生 TNF 超家族亚型 1 (即淋巴毒素) (对应于 TNF-R 超家族亚型 3)、TNF 超家族亚型 2 (即 TNF α) (对应于 TNF-R 超家族亚型 1A 和 1B)、TNF 超家族亚型 12 (对应于 TNF-R 超家族亚型 12A)、TNF 超家族亚型 14 (对应于 TNF-R 超家族亚型 14) 或这些配体的组合, 则可能根除任意这些类型的癌。虽然在评估的样品内 TNF-R 超家族亚型 4、5、8、9、11A 和 11B 及 17 的表达水平非常低 (图 2), 不能排除其它样品可以表达这些受体亚型的可能性。因此, 白细胞内 TNF 超家族亚型 4 (对应于 TNF-R 超家族亚型 4)、TNF 超家族亚型 5 (即 CD40 配体) (对应于 TNF-R 超家族亚型 5)、TNF 超家族亚型 8 (即 CD30 配体) (用于 TNF-R 超家族亚型 8) 和 TNF 超家族亚型 13 和 13B (对应于 TNF-R 超家族亚型 17) 的诱导性也可能对癌症免疫疗法是重要的。虽然存在巨大的个体对个体变异, 白

细胞内 TNF 超家族亚型 6 (即 Fas 配体) (对应于 TNF-R 超家族亚型 6)、TNF 超家族亚型 7 (即 CD27 配体) (对应于 TNF-R 超家族亚型 7)、TNF 超家族亚型 11 (对应于 TNF-R 超家族亚型 11A 和 11B)、TNF 超家族亚型 18 (对应于 TNF-R 超家族亚型 18) 和 TNF 超家族亚型 15 (即 DR3 的配体) (对应于 TNF-R 超家族亚型 25) 的诱导性可能对其中相应受体表达水平高的癌是重要的。尽管在癌内的 TNF-R 超家族亚型 10A mRNA 表现高表达, 然而诱饵受体 TNF-R 超家族亚型 10B 的 mRNA 表达 (见 Sheridan 等, Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science 1997 Aug 8;277(5327):818-21 和 Pan 等, An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL, Science 1997 Aug 8;277(5327):815-8) 比 TNF-R 超家族亚型 10A 更高。然而, TNF-R 超家族亚型 10 (即 TRAIL) 仍可能是用于治疗某些癌的有用靶。在腺癌/黑素瘤 (示于图 2 内各列左侧) 和鳞状细胞癌 (示于图 2 内各列右侧) 之间不存在明显差异。

T-细胞受体 (TCR) 是识别特定外来的非己分子的细胞毒性 T 细胞的细胞表面分子。TCR 在抗原呈递的初始步骤以及癌杀伤中的作用是众所周知的 (见例如 Mami-Chouaib, Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen, Immunol Rev. 2002 Oct;188: 114-21)。虽然细胞免疫学中常见的实验采用纯细胞系统, 该系统利用混悬于人工溶液内的分离的细胞, 本发明实施例内所用的 mRNA 分析法允许鉴定在离体刺激全血后各种 mRNA 水平的变化。因所述的 mRNA 分析法比前面的纯细胞系统更接近生理状态, 故本实施例使用在全血内 TCR 与靶分子相互作用的刺激, 其中存在细胞对细胞以及细胞对血浆的相互作用。

由于全血含有细胞毒性 T 细胞和其它类型的白细胞, 故 TCR 特异性地由抗人 α/β TCR 小鼠单克隆 gG1 k (“抗 TCR” 可从 BioLegend 获得) 刺激。作为对照, 还使用相同浓度纯化的小鼠 IgG1 k (也从 BioLegend 获得)。60 μ L 全血在 37 $^{\circ}$ C 下用 5 μ g/mL 抗 TCR 或对照 IgG 仅刺激 2 小时, 重复三份。剂量和温育时间通过抗 TCR 对外周血白细胞内 TNFSF mRNA 表达影响的初步分析加以确定, 其中所述初步分析的结果示于图 4A 和 4B 内。就剂量反应和动力学而言, 如图 4A 中所示, 三份等分试样的每份 60 μ L 的肝素化全血与 PBS(\circ)、

10 $\mu\text{g/mL}$ (■) 或 1 (◆) $\mu\text{g/mL}$ 小鼠抗人 α/β TCR IgG1k 混合, 或与 10 (□) $\mu\text{g/mL}$ 或 1 (◇) $\mu\text{g/mL}$ 纯化的小鼠 IgG1k 混合, 并在 37°C 下温育 0-7 小时。随后如上所述定量 TNFSF-2 mRNA。就动力学而言, 如图 4B 中所示, TNFSF-2 (●)、TNFSF-5 (◇)、TNFSF-6 (Δ)、TNFSF-9 (□) 和 TNFSF-14 (\blacktriangle) 的 ΔCt 通过从各自的 Ct 值中扣减对照 IgG 的 Ct 值进行计算。每个数据是来自全血的三份等分试样的平均数 \pm 标准差。 ΔCt 通过从使用抗 TCR 所获得的 Ct 值中扣减使用对照 IgG 所获得的 Ct 值进行计算。

如图 3 中所示, 抗 TCR 刺激特异性地诱导 TNF 超家族亚型 2、5、6、9、10 和 14。TNF 超家族亚型 2 和 14 的结果是特别有意义的, 因为这些受体的 mRNA 表达水平在全部类型的癌中都高 (见图 2)。同时类似于联合化疗, 活化多重 TNF/TNF-R 超家族亚型相关的级联可以防止癌细胞的抵抗机制。用添加至裂解缓冲液内的合成 RNA34 对照获得的结果显示出极小变化, 小于 $\pm 0.3 \Delta\text{Ct}$ (图 3 中的 RNA34), 表明该测定系统是可靠的。更重要地, TCR 应答表现巨大的个体对个体变异, 并且分别地, 9 名个体中的 6 名 (66%) 没有显示 TNF 超家族亚型 2 的抗 TCR 介导性诱导, 以及 9 名个体中的 5 名 (56%) 没有显示 TNF 超家族亚型 14 的抗 TCR 介导性诱导。另外, 显示阴性 TNF 超家族亚型 2 应答的个体也显示阴性 TNF 超家族亚型 14 应答。然而, 这些个体的确显示其它的阳性 TNF 超家族配体。

实施例 3

在本实施例中, 如实施例 1 中那样, 利用作为 ADCC 内所发现的免疫复合物的模型而广泛使用的热聚集性人 IgG (HAG) 来刺激全血内白细胞的 Fc 受体。简而言之, 将人 IgG (Sigma) 以 20 mg/mL 混悬于 PBS 内并在 63°C 下加热 20 分钟。将重复三份的 $60 \mu\text{L}$ 全血在 37°C 下用 $200 \mu\text{g/mL}$ HAG 或对照磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 刺激仅 2-4 小时。HAG 的剂量和温育时间通过初步分析确定, 如图 5 和图 6 中所示。

图 5A 显示剂量反应分析的结果。三份等分试样的每份 $60 \mu\text{L}$ 的肝素化全血与各种浓度的人 IgG (○) 或 HAG (●) 混合并在 37°C 下温育 2 小时。图 5B 显示动力学的分析结果。三份等分试样的每份 $60 \mu\text{L}$ 的肝素化全血与 PBS (○) 或 200 mg/mL HAG (●) 混合并在 37°C 温育 0-12 小时。随后定量

TNFSF-15mRNA。每个数据是来自全血的三份等分试样的平均数 \pm 标准差。

图 6 显示重复性分析的结果。血液在 1-3 日内从相同个体中抽取并定量 HAG-诱导的 TNFSF mRNA 和对照 RNA34。符号分别表示： \circ ：RNA34， \bullet ：TNFSF-2， \blacklozenge ：TNFSF-8 和 \blacktriangle ：TNFSF-15。每个数据是来自全血的三份等分试样的平均数 \pm 标准差。实线是其中两个数据集合相同的线。虚线表示 $\pm 0.5 \Delta Ct$ 。

如图 7 中所示，HAG 主要诱导 TNF 超家族亚型 2、8、14、15 和 18 的表达。TNF 超家族亚型 15 的诱导比用抗 TCR 刺激所获得的 TNF 超家族亚型的诱导更高（图 3）。此外，HAG 应答表现重大的个体对个体变异。一些个体仅表达 TNF 超家族亚型 15，并且其它个体表达 TNF 超家族亚型 2 和 8 而无 TNF 超家族亚型 15 应答。有意义的是全部个体均显示至少 1 种 TNF 超家族应答。添加至裂解缓冲液的对照 RNA34 的结果显示小于 $\pm 0.6 \Delta Ct$ 的极小变化（图 3 中的 RNA34），表明该测定系统是可靠的。为了验证分析法的重复性，血液在 1-3 日内从相同个体中抽取二次。不过，结果非常相似， ΔCt 差异小于 0.5（图 6）。在使用 HAG 和抗 TCR 刺激独立地检验血液的 9 名个体中，由 HAG 刺激所诱导的 TNF 超家族亚型 15 表达应答与由抗 TCR 刺激所诱导的 TNF 超家族亚型 2 和 14 表达应答不相关。

实施例 4

在本实施例中，来自数名个体的全血接受 HAG 刺激，并且趋化因子组的 mRNA 水平的变化用如实施例 1 内所述的相同方式进行评估。使用 RNA34 和 CD4 mRNA 作为对照。用于待分析趋化因子 mRNA 的正向引物序列和反向引物序列示于图 8。

分析结果示于图 9 内。在该图中，圆圈表示其中特定趋化因子 mRNA 的水平由 HAG 刺激显著诱导的个体。三角形表示在刺激后 mRNA 水平显著减少，而 X 符号表示没有显著改变。如可以从图 9 中看出，应答在个体间不同，虽然存在共同点：例如，全部受测试个体均表现 CCL-3 和 CCL-20；CXCL-1、CCL-2 和 CCL-3；以及 IL-8 和 IL-1B 的显著诱导。

这些结果表明有可能确定癌症患者能够召集更多白细胞至发病部位的可能性，并且如果在特定趋化因子与特定白细胞群间建立联系，则可能使用图 9 内所示数据，基于所召集白细胞群体与肿瘤细胞之间的 TNF/TNF-R 匹配分析

来评估召集能够有效对付肿瘤的白细胞群体的可能性。

实施例 5

在本实施例中，评估各种饮食成分如补充物对 TNF 超家族亚型 3 mRNA 水平的 HAG-诱导性变化的影响。“饮食成分”指可由哺乳动物摄取的任何化合物或物质而“饮食补充物”表示用来补充哺乳动物饮食的那些有益饮食成分，如维生素和天然提取物以及其它化学化合物如药物。因此，“饮食成分”含义更广泛并包括“饮食补充物”。所用的饮食成分是：维生素 A (10 nM, 终浓度)、染料木黄酮(大豆(soy))(100 nM)、姜黄色素(香料姜黄(spice turmeric))(100 nM)和栎精(植物色素类黄酮)(100 nM)。据报道全部这些饮食成分对免疫系统或癌或同时对二者有影响。已知维生素 A 可以刺激免疫系统。在某些研究中发现染料木黄酮具有抗癌活性；其可能的作用机制包括上调凋亡、抑制血管发生、抑制 DNA 拓扑异构酶 II 并抑制蛋白酪氨酸激酶。姜黄色素在癌细胞内具有促凋亡效应 (proapoptotic effects) 并干扰在癌细胞内经常高度过量表达的转录因子 NF- κ B 的活性。已经证实栎精促进大鼠内天然杀伤细胞的活性并抑制肥大细胞、嗜碱性粒细胞和中性粒细胞的脱颗粒。在本实施例中，使用磷酸盐缓冲盐水作为对照。

肝素化全血与各种饮食补充物在 37°C 下预温育 1 小时 (在如上所述的血液浓度上)，随后用 1.2 μ L 的热聚集性 IgG 刺激 4 小时。血液随后在 37°C 温育 2 小时，随后使用实施例 1 内所述的方法评估 TNF 超家族亚型 3 mRNA 的水平。引物序列在上文表 2 内给出。TNF 超家族亚型 3 又称作淋巴毒素- α (LT α)、肿瘤坏死因子- β (TNF- β) 和淋巴毒素- β (LT β)。分泌的 LT α 组装成可溶性同三聚体 LT α 3。分泌的 LT α 还与膜结合的 LT β 复合以产生两个类型的异三聚体：LT α 1/ β 和 LT α 2/ β 1。亚型 3 由活化的天然 CD4 细胞、非极化的分泌 IL-2 的效应细胞和 Th1 效应细胞表达，并且亚型 3 特异性受体由某些肿瘤细胞表达。

结果示于图 10 内。在图 10 中，空心圆圈表用 PBS 对照所获得的 TNF 超家族亚型 3 值。而实心圆圈表示使用 HAG 刺激物时所获得的亚型 3 值。亚型 3 mRNA 的基础水平不因饮食补充物的预处理而变化 (空心圆圈)。然而，该结果显示 HAG 导致显著诱导暴露于栎精的血液内的 TNF 超家族亚型 3 表达

($p=0.03$)。如果该个体也具有表达适宜 TNF-R 亚型 (亚型 3) 的肿瘤细胞, 则该基因表达的增加可以增加肿瘤细胞凋亡, 因此, 栲精将是包含在具有抗癌特性的用于该个体的饮食内的优良候选者。图 10 内的 Y-轴值表示循环阈值 (Ct)。每个数据是来自 50 mL 肝素化的全血的三份等分试样的平均数 \pm 标准差。

本领域技术人员将认识到还有可能筛选药物和其它化学性化合物以类似地影响特定 TNF 超家族亚型或趋化因子的表达, 因此本实施例的系统可以广泛用于筛选用于在特定个体内发动抗癌免疫应答的物质。

通过病理学检验经常在手术切除的组织标本内观察到癌浸润性白细胞。然而, 这些发现对患者而言并不总是毫无疑问的良好征兆: 有时候癌症进展甚至在白细胞浸润存在时发生。当该现象发生时, 病理学家往往疑惑不解。本发明的实施方式还提供对此项技术的进一步改良: 在癌细胞内的 TNF-R 超家族亚型与在浸润性白细胞内的 TNF 超家族亚型的匹配可能是良好的预后征兆, 尤其当趋化因子诱导也得到证实时。

浸润性白细胞的病理学分析难以解释, 因为我们不知道每种白细胞是否遭遇癌细胞并且 TNF 超家族级联是否被活化。定量的基线 TNF 超家族 mRNA 水平也难以解释。相反, 本发明的实施方式使用在抗 TCR 或 HAG 刺激后, 对 TNF 超家族 mRNA 亚型表达的功能性变化的分析。由于浸润性白细胞来自血流, 本发明实施方式的离体功能性分析将成为有用工具用于在癌症患者及在患有如自身免疫疾病、炎症、移植等的其它疾病的患者内, 就诊断监视、治疗监视、预后标记和对有效免疫调节药物、基于单克隆抗体的药物、基因疗法及疫苗鉴定方面分析免疫功能。该分析法简单且接近生理条件 (2-4 小时温育不分离白细胞的全血)、有统计分析意义地精确 (全血的三份等分试样作为原材料) 和敏感 (60 μ L 全血足以用于全部 17 种 TNF 超家族亚型 mRNA 定量)。由于全血的三份等分试样之间的 mRNA 数据变异极小, 因此该分析法允许鉴定在很多情况下如 0.5-1.0 Δ Ct 那样小的基因表达的显著改变, 这远优于基于 DNA 芯片的方法学或常规的实时 PCR。NK 细胞或细胞毒性 T-细胞的数目可以通过流式细胞分析或免疫组织化学染色定量, 其中每一细胞群体通过特定的细胞表面标记鉴定。然而, 不清楚这些标记阳性细胞是否在分析时具有预期的

功能。虽然本实施例的方法不鉴定具有每种 TNF 超家族亚型 mRNA 的刺激应答的特定细胞群体，该方法显示整体的功能，这对理解单个的人有用。所获得的巨大个体变异可以导致发现个体的特定遗传构成。虽然 TNF 超家族应答在 1-3 日内显示良好的重复性（图 6），该应答也可以经过长时间并因施饮食补充物和锻炼而变化，这表明涉及到非遗传因素。因此本实施例的方法代表未来个性化癌症免疫疗法的前进方向。

这类个性化癌症免疫疗法将基于增加血液白细胞内适宜 TNF 超家族亚型的表达以及通过适宜的趋化因子信号作用召集亚型特异性白细胞。以上所述的实施例的系统和方法将用于药物筛选、验证和临床试验。此外，相同系统可以应用于自身免疫疾病，其中抑制适宜的 TNF 超家族是用药目的。

城市中大量提供适度装备的警察仅在这些警察派往犯罪现场时才有意义的。如果警官遭遇一伙罪犯，他或她的主要任务是呼唤帮助以引导更多同事至现场，而不是尽量只身逮捕罪犯。对于细胞毒性 T-细胞而言，这种行为可能相当于释放趋化因子如 CCL 和 CXCL 趋化因子和白细胞介素（IL）（序列可从 GenBank 和 UniGene 获得）。因此，监视外周血白细胞内 CCL、CXCL 和 IL 也是重要。类似于警察调度员，肿瘤学家能够通过监视外周血内每个患者自身免疫细胞的供应而组织患者自身的免疫细胞。

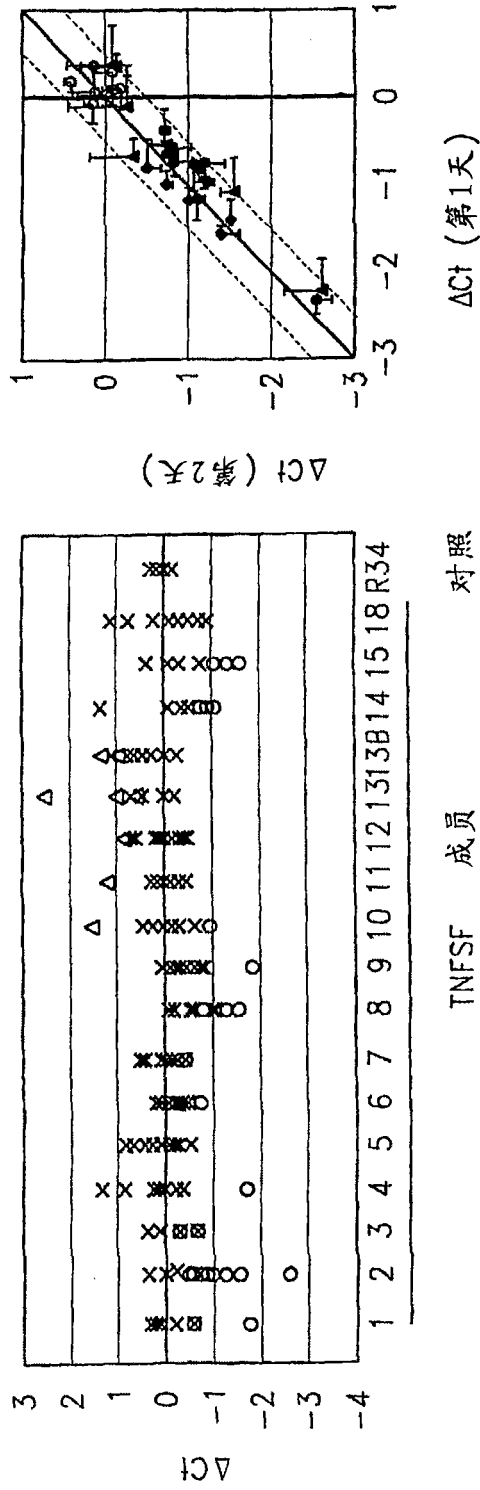


图 1A

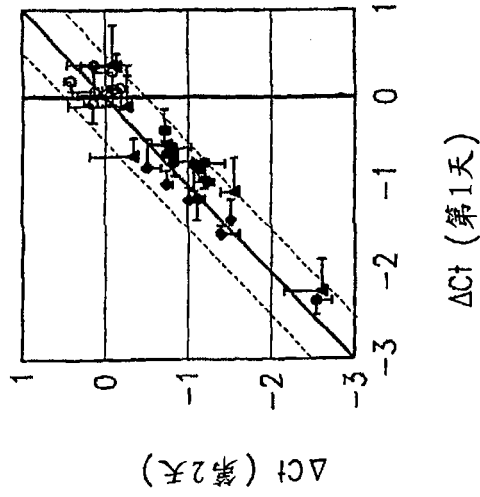


图 1B

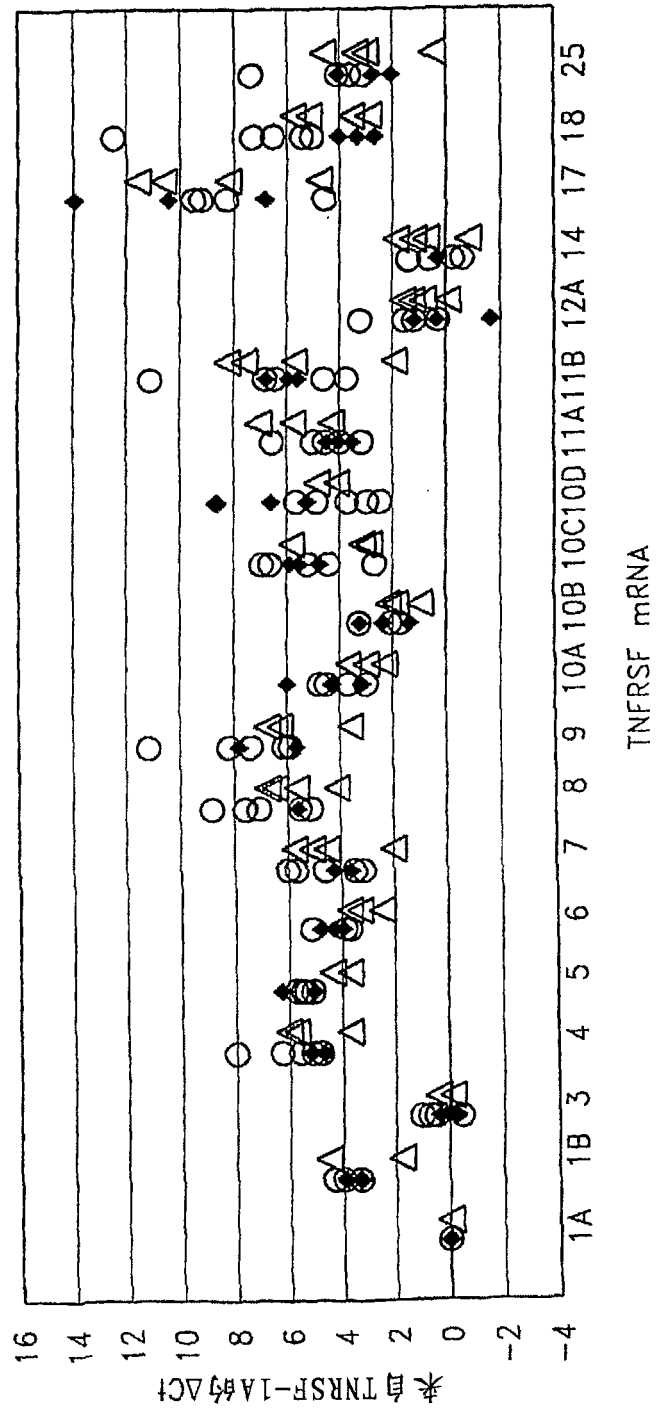


图 2

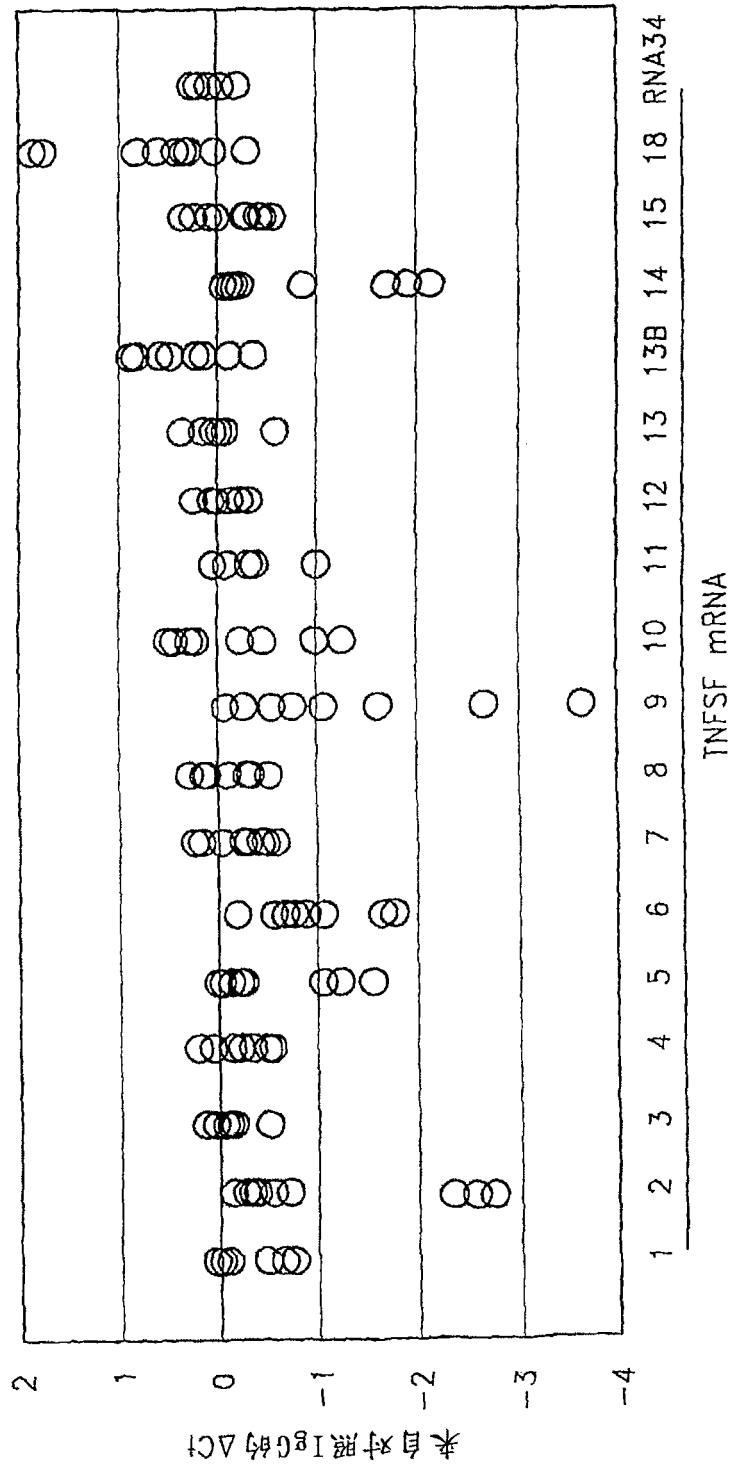


图 3

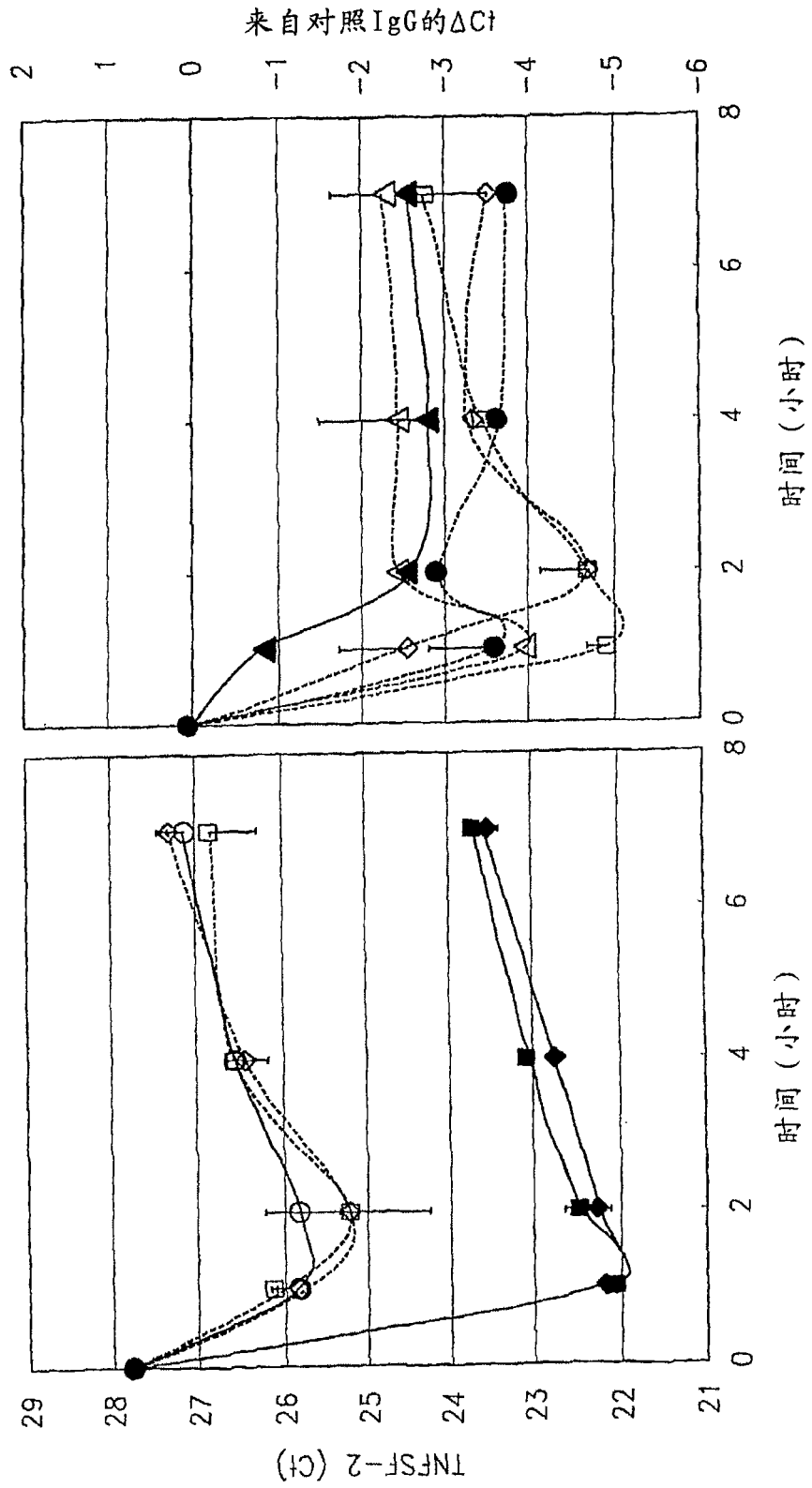


图 4B

图 4A

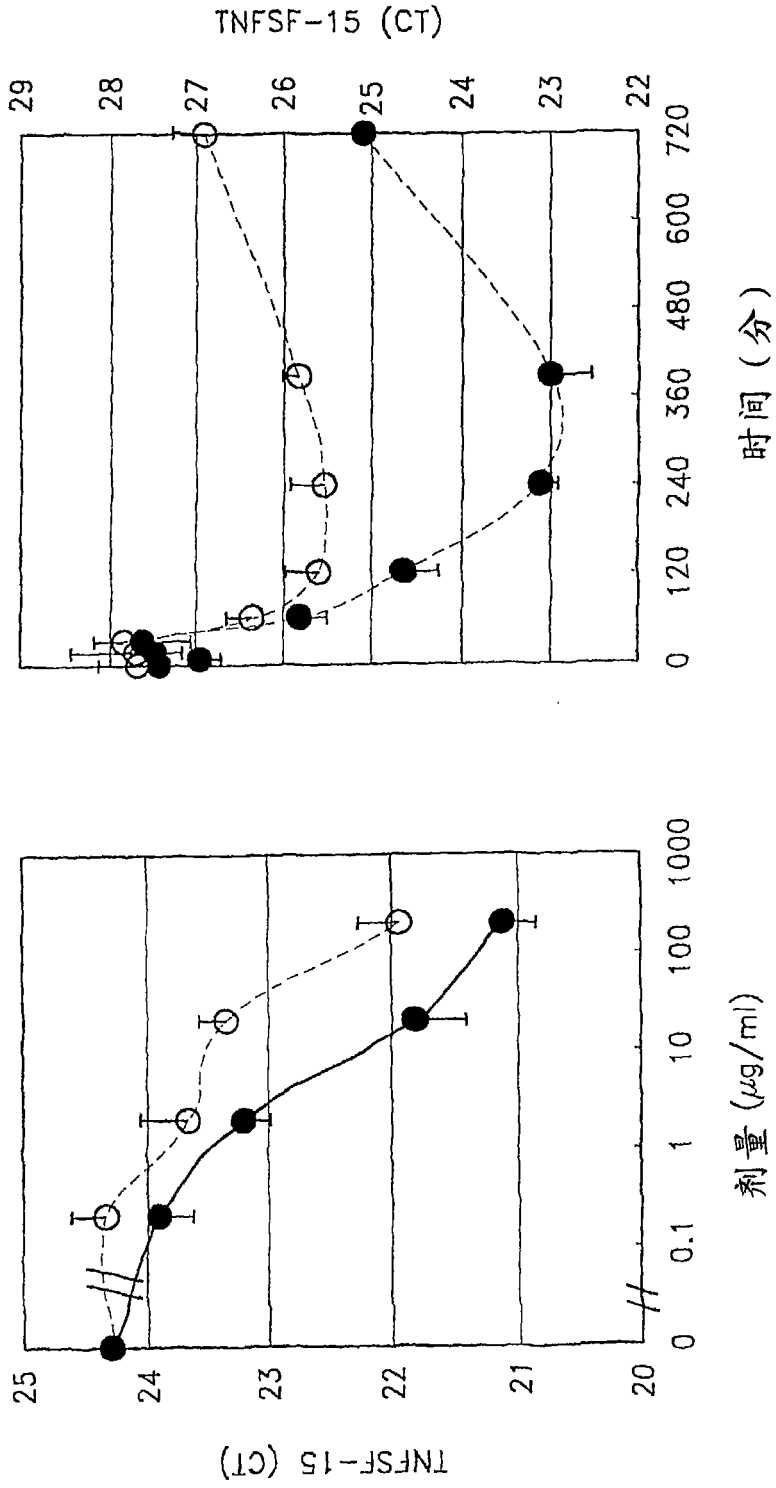


图 5B

图 5A

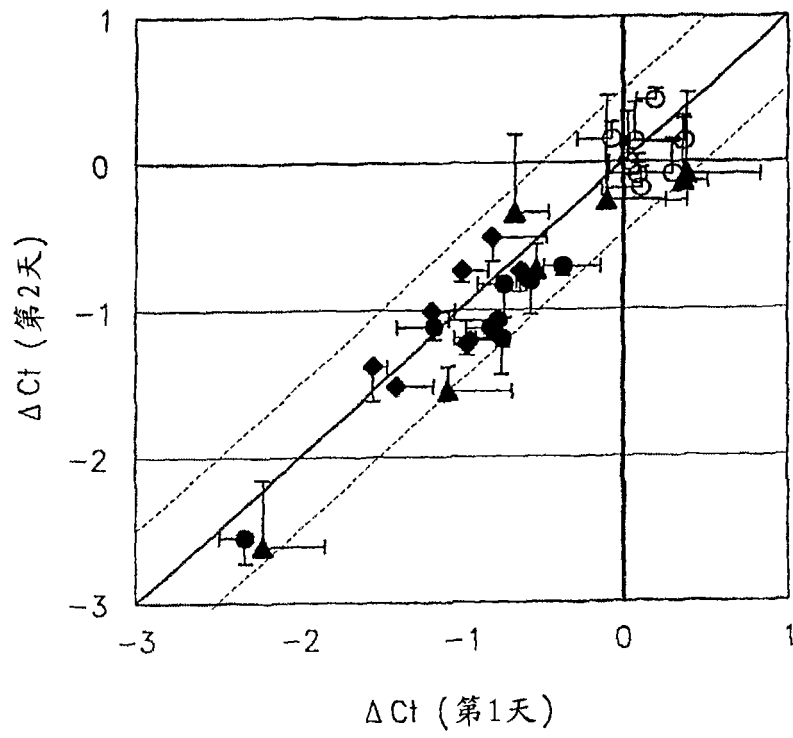


图 6

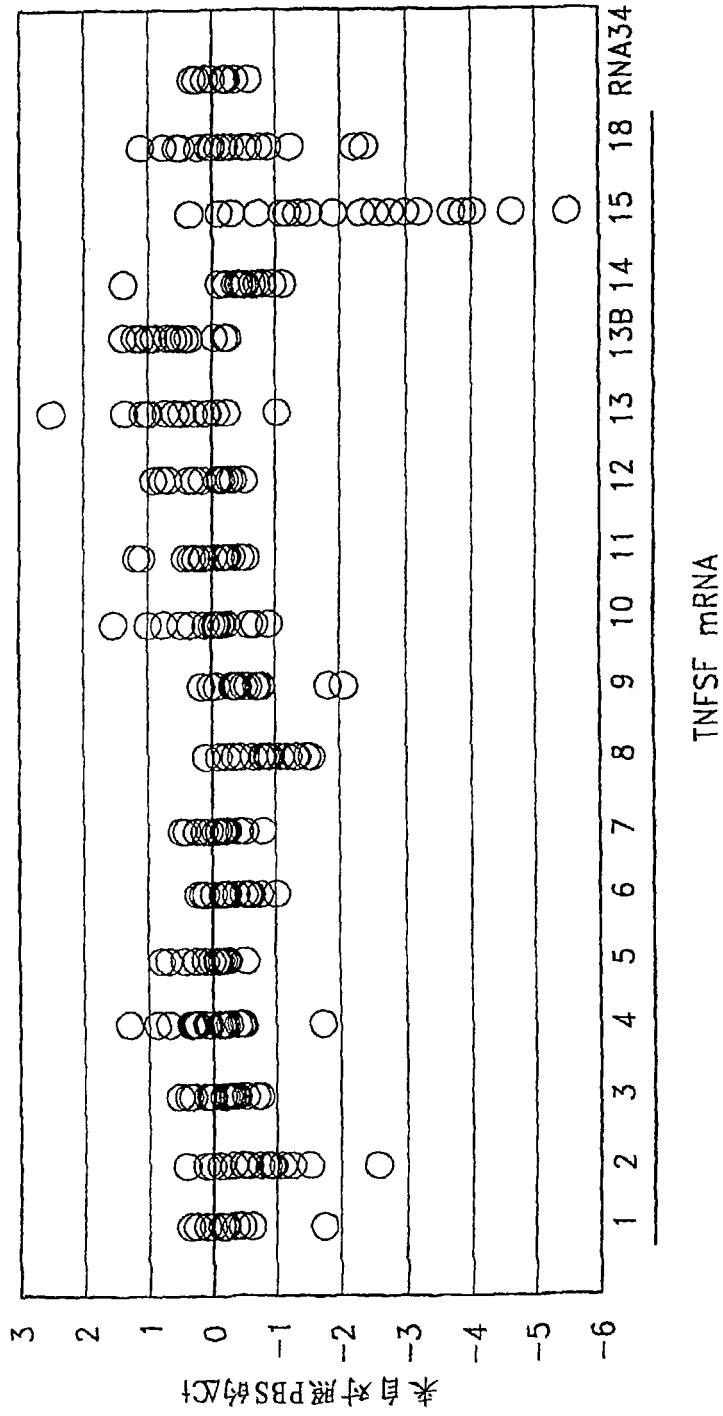


图 7

CCL-1	MM282:	GGCCTGCGCCTTGG A
	MM283:	GGGCAGTGCCTCAGCATT
CCL-2	MM284:	CCATTGTGGCCAAGGAGATC
	MM285:	TGTCCAGGTGGTCCATGGA
CCL-3	MM286:	CACAGAATTTCATAGCTGACTACTTTGA
	MM287:	TCGCTTGGTTAGGAAGATGACA
CCL-4	MM288:	GGTATTCCAAACCAAGAAGCA
	MM289:	G TTCAGTTC CAGGT C ATACACG TACT
CCL-5	MM290:	AGTCGTCTTTGT C ACCCGAAA
	MM291:	AGCTCATCTCAAAGAGTTGATGTAC
CCL-7	MM292:	TGTGCTGACCCACACAGA
	MM293:	GCTTTGGAGTTTGGGTTTTCTTG
CCL-8	MM294:	AGAGCTACACAAGAATCACCAACATC
	MM295:	AGACCTCCTTGCCCCGTTT
CCL-11	MM296:	CCCAGAAAGCTGTGATCTTCAA
	MM297:	TCCTGCACCCACTTCTTCTTG
CCL-13	MM298:	CCAAACTGGGCAAGGAGATCT
	MM299:	GGCCCAGGTGTTTCATATAATTCT
CCL-14	MM300:	TGCTTCACCTACACTACCTACAAGATC
	MM301:	GACAATTCGGGCTTGG A
CCL-15	MM302:	CCAAGCCAGGTGT CATATTCCT
	MM303:	TGAGTAGGGCTTCAGCTTTTTCA
CCL-16	MM304:	CAAGGATCCCAACCTACCTTG
	MM305:	GGTTGACCATTCTTTGCTGTAATAATT
CCL-17	MM306:	GGGCAGGGCCATCTGTTC
	MM307:	TCTCAAGGCTTTGCAGGTATTTAA
CCL-18	MM308:	CAGATTCACAAAAGTTCATAGTTGAC
	MM309:	CCGGCCTCTCTTGGTTAGG
CCL-19	MM310:	CTGCTGTAGTGTTCACCACACTGA
	MM311:	CAGTCTCTGGATGATGCGTTCT
CCL-20	MM312:	GATACACAGACCGTATTCTTCATCCTAA
	MM313:	TGAAAGATGATAGCATTGATGTCACA
CCL-21	MM314:	CGCTCTCAGGCAGAGCTATGT
	MM315:	CTTGTCAGATGCTGCATCAG
CCL-22	MM316:	GCGCGTGGTGAAACACTTC
	MM317:	ATCGGCACAGATCTCCTTATCC
CCL-23	MM318:	CGAAGCATCCCGTGTTCACT
	MM319:	GATGACACCCGGCTTGG A
CCL-24	MM320:	CAGGAGTGATCTTCACCACCAA
	MM321:	GGCGTCCAGGTCTTCATGT
CCL-25	MM322:	GCGCGCCTGGACTTACC
	MM323:	GTAGAATATCGCAGCAGGCAGAT
CCL-26	MM324:	CTGCTTCCAATACAGCCACAAG
	MM325:	GAGCAGCTGTTACTGGTGAATTCA
CCL-27	MM326:	CGTGCTTACCTGGCTCAA
	MM327:	GGTGCTCAAACCACTGTGACA
CCL-28	MM328:	GGAAATGTTTGCCACAGGAAGA
	MM329:	TGTTTCGTGTTTCCCCTGATG

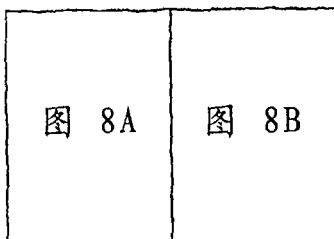


图 8A

CXCL-1	MM330:	CCACTGCGCCCAAACC
	MM331:	GCAGGATTGAGGCAAGCTTT
CXCL-2	MM332:	CCCCTGGCCACTGAACTG
	MM333:	TGGATGTTCTTGAGGTGAATTCC
CXCL-3	MM334:	GGAATTCACCTCAAGAACATCCA
	MM335:	GTGGCTATGACTTCGGTTTGG
CXCL-4	MM336:	CCGTCCCAGGCACATCAC
	MM337:	GCAAATTTTCCTTCCATTCTTCA
CXCL-5	MM338:	AGAGCTGCGTTGCGTTTGT
	MM339:	TGGCGAACACTTGCAGATTACT
CXCL-6	MM340:	CAGAGCTGCGTTGCACTTGT
	MM341:	ACACCTGCAGTTTACCAATCGTT
CXCL-7	MM342:	TCTGGAATTCATCCCAAAAACA
	MM343:	ACTTCGACTTGGTTGCAATGG
CXCL-9	MM344:	CCACCTACAATCCTTGAAAGACCTT
	MM345:	CAGTGTAGCAATGATTTCAATTTTCTC
CXCL-10	MM346:	TCCACGTGTTGAGATCATTGC
	MM347:	TCTTGATGGCCTTCGATTCTG
CXCL-11	MM348:	AGGACGCTGTCTTTGCATAGG
	MM349:	GCATCGTTGTCTTTATTTTCTTTC
CXCL-12	MM350:	TGCCAGAGCCAACGTCAAG
	MM351:	CAGCCGGGCTACAATCTGA
CXCL-13	MM352:	GACGCTTCATTGATCGAATTCA
	MM353:	TTCTTCCAGACTATGATTTCTTTTCTTG
CXCL-14	MM354:	AAGCTGAAATGAAGCCAAAGT
	MM355:	ACACGCTCTTGGTGGTGATG
CXCL-16	MM356:	CCCACAGCCAGGACATCAG
	MM357:	CTTGACAGCACATAGGAAAGG
IL-8	MM358:	TGCTAAAGAACTTAGATGTCAGTGCAT
	MM359:	TGGTCCACTCTCAATCACTCTCA
IL-5	MM360:	GCTCTTGGAGCTGCCTACGT
	MM361:	AAGGTCTCTTTCACCAATGCACTT
IL-6	MM362:	TCATCACTGGTCTTTTGGAGTTTG
	MM363:	TCTGCACAGCTCTGGCTTGT
IL-12A	MM364:	GCAGGCCCTGAATTTCAACA
	MM365:	GAAGTATGCAGAGCTTGATTTTAGTTTA
IL-12B	MM366:	CGGTCATCTGCCGCAA
	MM367:	CCCATTGCT CCAAGATGAG
IL-15	MM368:	TGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACA
	MM369:	CATTCCCATTAGAAGACAAACTGTTG
IL-16c	MM370:	AAAACCTCTTGGGAAGCATGAG
	MM371:	GGGACCCCGAGGACAGTACT
IL-1B	MM372:	GAAGATGGAAAAGCGATTTGTCTT
	MM373:	GGGCATGTTTTCTGCTTGAGA

图 8B

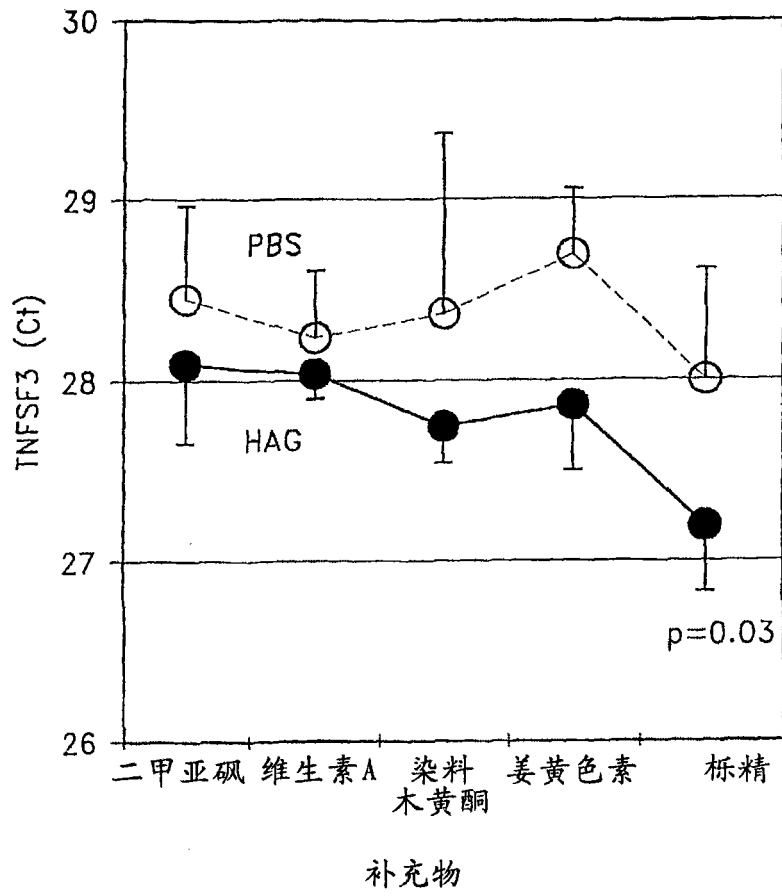


图 10

专利名称(译)	用于基于癌细胞及受刺激的白细胞内mRNA表达谱而预测对肿瘤疾病的免疫应答的方法		
公开(公告)号	CN101194027A	公开(公告)日	2008-06-04
申请号	CN200680020298.6	申请日	2006-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	日立化成研究中心公司 日立化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	日立化成研究中心公司 日立化成工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日立化成研究中心公司 日立化成工业株式会社		
[标]发明人	三桥将人		
发明人	三桥将人		
IPC分类号	C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/00		
CPC分类号	C12Q1/6806 G01N33/505 C12Q2600/158 C12Q1/6886 G01N33/574 C12Q2600/118		
代理人(译)	钟晶		
优先权	60/735508 2005-11-11 US 60/688744 2005-06-08 US		
其他公开文献	CN101194027B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

肿瘤坏死因子(TNF)能够通过与其癌细胞表面上的特异性TNF受体相互作用而诱导凋亡。因为TNF配体和受体的多种成员存在于每个超家族内，故存在超过300种不同的配体 - 受体组合。活化的血液白细胞产生TNF作为抗癌免疫应答的部分，并产生趋化因子以吸引其它白细胞至癌症部位。本发明公开了使全血暴露于热聚集性人IgG或抗T - 细胞受体抗体而作为免疫系统相互作用的模型时，检测血液白细胞内多种TNF超家族亚型和趋化因子mRNA的显著诱导作用的方法。观察到在诱导的TNF亚型和趋化因子方面个体之间的重大差异。因为外周血液白细胞是抗癌免疫细胞的来源，定量血液内适宜TNF配体和趋化因子的离体诱导性将用于个体化癌症免疫治疗中。如果癌块小，如早期不可见的转移性损害，适宜的TNF攻击可以足以防止复发。

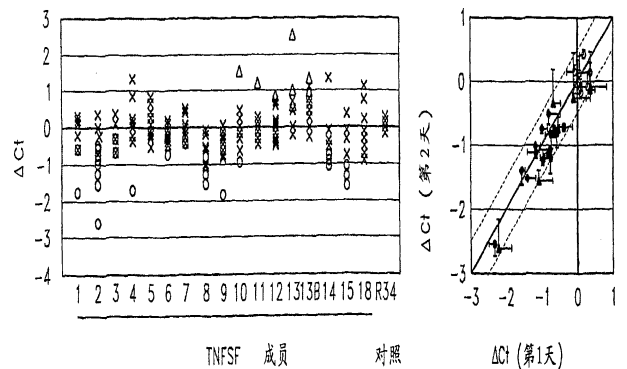


图 1A

图 1B