



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110412268 A

(43)申请公布日 2019.11.05

(21)申请号 201810394540.0

(22)申请日 2018.04.27

(71)申请人 刘晓健

地址 200232 上海市徐汇区上海市三江路
301弄44号301室

(72)发明人 刘晓健

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

诊断经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的标志物及其应用

(57)摘要

本发明涉及诊断经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的标志物及其应用。本发明揭示了组蛋白去乙酰化酶11(HDAC11)与经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯具有密切的相关性。同时,本发明还明确了HDAC11表达增高与无进展生存率(PFS)和总生存率(OS)呈负相关。本发明为经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的快速、早期诊断和监测提供了理论基础和更简易的检测方法。

1. 组蛋白去乙酰化酶11的用途,用于制备进行经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的诊断或预后评估的试剂和/或试剂盒。
2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的预后评估包括:以结外累犯的情况作为评估参数,评估受试者的无进展生存率和/或总生存率。
3. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的试剂选自:
免疫组化检测试剂;或
特异性识别组蛋白去乙酰化酶11的编码基因或其转录本的探针;或
特异性扩增组蛋白去乙酰化酶11的编码基因的引物。
4. 如权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的免疫组化检测试剂为特异性抗组蛋白去乙酰化酶11的抗体。
5. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述的经典霍奇金淋巴瘤是中国患者的经典霍奇金淋巴瘤。
6. 特异性识别和检测组蛋白去乙酰化酶11的试剂的用途,用于制备进行经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的诊断或预后评估的试剂盒。
7. 如权利要求6所述的用途,其特征在于,所述的特异性识别和检测组蛋白去乙酰化酶11的试剂选自:
免疫组化检测试剂;或
特异性识别组蛋白去乙酰化酶11的编码基因或其转录本的探针;或
特异性扩增组蛋白去乙酰化酶11的编码基因的引物。
8. 如权利要求7所述的用途,其特征在于,所述的免疫组化检测试剂为特异性抗组蛋白去乙酰化酶11的抗体。
9. 组蛋白去乙酰化酶11的用途,用于作为经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的诊断盒/或预后评估的标志物。
10. 一种鉴别经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的方法,其特征在于,所述方法包括:检测待测样品中组蛋白去乙酰化酶11的表达情况或表达量或活性;若表达量显著高于其在正常情况下的表达量,或活性显著升高,则表明受试者存在霍奇金淋巴瘤的结外累犯或为发生霍奇金淋巴瘤的结外累犯的高危者。

诊断经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的标志物及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于疾病诊断领域,更具体地,本发明涉及诊断经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的标志物及其应用。

背景技术

[0002] 经典型霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin Lymphoma,cHL)是起源于B淋巴细胞的恶性肿瘤,其肿瘤细胞称为霍奇金-李-斯(Hodgkin-Reed-Steinberg,HRS)细胞。

[0003] 放化疗一直是治疗cHL的主要方法,虽然患者五年生存率超过85%,但25%左右患者复发或根本不会对治疗产生反应,免疫检测点抑制剂Nivolumab(Opdivo[®])获FDA批准用于病情复发或进展的cHL患者,提高了cHL患者客观缓解率,但完全缓解率不高,其毒副作用、耐药形成等现象仍需进一步研究克服。

[0004] 早期经典霍奇金淋巴瘤定义为在横膈一侧的淋巴结区域受到累犯,而晚期的霍奇金淋巴瘤定义为横膈两侧淋巴结区域受到累犯,无论是早期或晚期,如果出现结外累犯(Extranodal Involvement)则提示预后不良。因此,结外累犯是一种指示肿瘤严重程度的病理指征。其表现为:患病的淋巴结区域以外的器官或组织发生肿瘤细胞的产生比如,肝脏、肺部、神经肌肉组织和骨骼等。霍奇金淋巴瘤常常发生在淋巴结内,往往在疾病的发展过程中出现结外累犯,如果出现结外累犯提示疾病恶性程度高,进展快,出现结外累犯的器官和组织越多,预后越差。为了临床工作的规范和方便,美国国家综合癌症中心(NCCN,national comprehensive cancer center)建议霍奇金淋巴瘤中大肿块、血沉高、>3个淋巴结区域、B症状和大于2个结外病变为预后不良指标。不过目前还没有生物学指标预测哪些病人在疾病的发展过程中容易发生结外病变。

[0005] 目前,组蛋白去乙酰化酶抑制(Histone Deacetylases Inhibitors,HDACIs)的药物开发和临床研究取得了很大进展,HDACIs不仅诱导HRS细胞凋亡,还可以帮助重新激活微环境的细胞免疫功能,为在免疫治疗的基础上进一步提高疗效、减少毒副作用带来了希望。

[0006] 目前HDACs共有4类18种,I类包括HDAC1、2、3和8,II类为HDAC4、5、6、7、9和10,III类为SIRT1-7以及IV类HDAC11,除III类为尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD,nicotinamide adenine dinucleotide)依赖型,其他HDACs为锌指依赖型。HDAC1、2、3、8和11多在核内检测到,HDAC6多在胞浆内表达,而HDAC4、5、7、9和10常穿梭于胞浆和胞核之间。在皮肤T细胞性淋巴瘤检测到肿瘤细胞HDAC1高表达,HDAC2、HDAC6呈中等强度表达,HDAC1和HDAC2与临床预后无明显相关性,而HDAC6和预后有明显相关性。锌指依赖型HDACs共11种,为HDAC1~11,对不同肿瘤如前列腺癌,胃癌,结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤和乳腺癌细胞的研究显示,HDACs亚型的表达及其与各自临床病理特征和预后相关性,但这些研究的结果不一致。瑞士研究人员研究了283例cHL中HDACs表达,发现cHL HDAC1、2和3表达特征性增高,HDAC1表达低和较差的预后相关;Anas Younes等对cHL组织标本进行HDAC1~11的研究,结果显示22例中,HDAC1、2、3、8和10阳性率为100%,仅对4例检测了HDAC11的表达,结果均为阴性,该研究没有涉及HDACs表达和预后的关系,且其针对的是美国患者。

[0007] 在中国对不同肿瘤研究各种HDACs的表达有利于开拓新的研究领域、寻找到新的治疗靶点和促进选择性HDACIs的进一步开发,这方面研究目前还不多,仅仅在实体瘤如前列腺癌,胃癌,结肠癌和乳腺癌的研究中有少量报道,而且HDACs的表达和临床病理特征和预后的关系各研究不尽一致。

[0008] 与欧美国家相比,国内HL的发病率低于欧美国家,1988-1992年间及1993-1997年间几大城市中HL的发病率为0.3-0.5/10万,约占全部恶性肿瘤的0.2%。男性发病率高于女性,各年龄组的发病率没有类似欧美的双峰现象,而是随着年龄的增加逐渐升高(40岁左右达高峰)。这种区别还没有遗传学上的系统研究。目前HDAC11和霍奇金淋巴瘤预后关系研究还没有进展,同时,尚没有针对中国患者的HDAC11表达的较大样本的研究。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供诊断经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的标志物及其应用。

[0010] 在本发明的第一方面,提供组蛋白去乙酰化酶11的用途,用于制备进行经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的诊断或预后评估的试剂和/或试剂盒。

[0011] 在一个优选例中,所述的预后评估包括:以结外累犯的情况作为评估参数,评估受试者的无进展生存率(PFS)和/或总生存率(OS)。

[0012] 在另一优选例中,所述的试剂选自:免疫组化检测试剂;或特异性识别组蛋白去乙酰化酶11的编码基因或其转录本的探针;或特异性扩增组蛋白去乙酰化酶11的编码基因的引物。

[0013] 在另一优选例中,所述的免疫组化检测试剂为特异性抗组蛋白去乙酰化酶11的抗体。

[0014] 在另一优选例中,所述的特异性抗组蛋白去乙酰化酶11的抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。

[0015] 在另一优选例中,所述的经典霍奇金淋巴瘤是中国患者的经典霍奇金淋巴瘤。

[0016] 在本发明的另一方面,提供特异性识别和检测组蛋白去乙酰化酶11的试剂的用途,用于制备进行经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的诊断或预后评估的试剂盒。

[0017] 在一个优选例中,所述的特异性识别和检测组蛋白去乙酰化酶11的试剂选自:免疫组化检测试剂;或特异性识别组蛋白去乙酰化酶11的编码基因或其转录本的探针;或特异性扩增组蛋白去乙酰化酶11的编码基因的引物。

[0018] 在另一优选例中,所述的免疫组化检测试剂为特异性抗组蛋白去乙酰化酶11的抗体。

[0019] 在本发明的另一方面,提供组蛋白去乙酰化酶11的用途,用于作为经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的诊断盒/或预后评估的标志物。

[0020] 在本发明的另一方面,提供一种鉴别经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的方法,所述方法包括:检测待测样品中组蛋白去乙酰化酶11的表达情况或表达量或活性;若表达量显著高于其在正常情况(如健康人体,癌旁其它组织)下的表达量,或活性显著升高,则表明受试者存在霍奇金淋巴瘤的结外累犯或为发生霍奇金淋巴瘤的结外累犯的高危者。

[0021] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0022] 图1、HDAC 11在cHL组织中的表达(SP×200)。

[0023] A:HDAC11在霍奇金-李-斯(Hodgkin-Reed-Steinberg,HRS)细胞中表达阴性(图A箭头所示);

[0024] B:HDAC11在cHL HRS细胞中低表达(图B箭头所示);

[0025] C:HDAC11在cHL HRS细胞中高表达(图C箭头所示)。

[0026] 图2、HDAC11在霍奇金-李-斯(Hodgkin-Reed-Steinberg,HRS)细胞中表达强度和经典霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma,cHL)预后的关系(HDAC11,PFS P=0.010;OS P=0.030)。

具体实施方式

[0027] 本发明人致力于观察及研究经典霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma,cHL)与组蛋白去乙酰化酶(HDACs)的表达及其临床病理特征和预后的关系。经过长期且广泛的研究,首次揭示组蛋白去乙酰化酶11(HDAC11)与经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯(Extranodal Involvement)具有密切的相关性;同时,本发明还明确了HDAC11表达增高与无进展生存率(PFS)和总生存率(OS)呈负相关。在此基础上提供了一种基于检测HDAC11进行临床诊断和/或预后的方法,其诊断试剂或试剂盒。

[0028] 如本文所用,所述的“预后评估”包括“易感性评估”或“风险性评估”,也即对暂时未产生症状(如结外累犯)但是后续发生该症状的可能性显著更高的人群的评估。

[0029] 如本文所用,术语“HDAC11”的氨基酸序列与GenBank ID:79885提供的蛋白序列基本上相同。

[0030] 基于本发明人的新发现,可以以HDAC11蛋白或其编码基因作为鉴定或评估经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯、无进展生存率和/或总生存率的标志物(标记物)。通过分析待测样品(样本)中HDAC11蛋白或其编码基因的表达情况,从而得知受试者的患病状况,为疾病的诊断或预后提供依据,是对目前霍奇金淋巴瘤预后评估的一些指标的重要的新补充和提升。所述的待测样品或待测样本是患者的疾病组织或体液。

[0031] 基于本发明的新发现,本发明还提供了特异性识别HDAC11蛋白或其编码基因的试剂。任何可识别HDAC11蛋白或其编码基因的试剂均包含在本发明中,用作检测经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯、无进展生存率和/或总生存率的标志物(标记物)、以及鉴别经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯、无进展生存率和/或总生存率的标志物。所述的特异性识别HDAC11蛋白或其编码基因的试剂例如是:特异性扩增HDAC11蛋白的编码基因的引物;或特异性识别HDAC11蛋白的编码基因或其转录本的探针;或特异性抗HDAC11蛋白的抗体。

[0032] 可采用各种技术来检测HDAC11的表达情况,这些技术均包含在本发明中。检测核酸可用的已有技术如(但不限于):基因芯片技术、探针杂交技术、聚合酶链反应(PCR)、Northern Blot等方法。检测蛋白可借助于质谱分析仪器等,或可通过免疫组化、Western Blot或ELISA等方法。

[0033] 所述的特异性识别和检测HDAC11的试剂可以是蛋白水平上的检测试剂,也可以是基因水平上的检测试剂,包括但不限于:免疫组化检测试剂,特异性识别组蛋白去乙酰化酶

11的编码基因或其转录本的探针,特异性扩增组蛋白去乙酰化酶11的编码基因的引物。

[0034] 作为本发明的优选方式,所述的特异性识别和检测HDAC11的试剂是抗HDAC11蛋白的抗体。制备抗体的技术是本领域中众所周知的。本发明的抗体可以是对HDAC11蛋白具有特异性的单克隆抗体。单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见Kohler等人,Nature 256:495,1975;Kohler等人,Eur. J. Immunol. 6:511,1976;Kohler等人,Eur. J. Immunol. 6:292,1976;Hammerling等人,In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981)。所述单克隆抗体可以利用HDAC11蛋白或蛋白片段或功能区,通过免疫技术获得。此外,还可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。

[0035] 本发明的抗体也可以是对HDAC11蛋白具有特异性的多克隆抗体。所述的多克隆抗体可通过常规的方法来制备,例如,可通过将所述的HDAC11蛋白导入动物中来获得,例如,将HDAC11蛋白与弗氏佐剂按照适当比例(如1:1)混合后免疫动物。免疫方法可使用动物皮下注射。所述动物可选自兔、羊、鼠等。

[0036] 在获得了特异性检测HDAC11蛋白表达水平的试剂后,可以方便地制备出用于特异性检测HDAC11蛋白的检测试剂盒。所述试剂盒中除了含有所述抗体以外,还可以包含:携带有可检测信号分子的检测抗体(如用于抗HDAC11抗体结合的第二抗体),以及免疫组化试剂。所述的免疫组化试剂包括但不限于:显色试剂,二甲苯,乙醇,H₂O₂甲醇液,抗原修复液,封闭液,PBS,中性树脂等。

[0037] 如本文所用,所述的“可检测信号分子”是指用于确定待检测样品中HDAC11蛋白的存在与否以及存在的量的标志物。在确定了本发明的试剂盒所采用的特异性抗体和检测抗体后,可以采用本领域常规用于与检测抗体结合来进行检测的各种可检测信号分子。例如,可检测信号分子可以选自:辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酯酶(AP)、葡萄糖氧化酶、β-D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶或葡萄糖淀粉酶。当采用如上所示的一些酶作为可检测信号分子时,还需要采用一些与相应的酶结合的底物,从而可通过显色等方式来报导可检测信号分子的存在情况或者存在量。所述的底物例如:用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)、ABTS;用于碱性磷酸酯酶的对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenyl phosphate, p-NPP);等等。本领域人员可根据所采用的可检测信号分子的种类和特性,选择适宜的底物。

[0038] 作为本发明的另一种选择方式,可通过定量或半定量的聚合酶链反应(PCR)法来分析样品中HDAC11基因的表达情况以及表达量,从而可做出判断。较佳地,通过实时定量Realtime-PCR实现检测。作为本发明的一种可实施方式,所述的试剂是特异性扩增HDAC11基因的引物,在得知了HDAC11的核苷酸序列后,人们易于基于此设计出引物。

[0039] 也可利用基因芯片技术来进行HDAC11的检测。在得知了HDAC11的核苷酸序列后,人们易于基于此设计出探针。例如,如果固相载体采用的是修饰玻片或硅片,探针的5'端含有氨基修饰的聚dT串,可将寡核苷酸探针配制成溶液,然后点样仪将其点在修饰玻片或硅片,排列成预定的序列或阵列,然后通过放置过夜来固定,就可得到本发明的基因芯片。如果寡核苷酸探针不含氨基修饰,则其制备方法也可参照现有公知技术。

[0040] 本发明还提供了用于评估经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯、无进展生存率和/或总生存率的试剂盒,该试剂盒包括:特异性识别HDAC11蛋白或其编码基因的试剂。所述的特异性识别HDAC11蛋白或其编码基因的试剂例如是:特异性扩增HDAC11蛋白的编码基因的引

物;或特异性识别HDAC11蛋白的编码基因或其转录本的探针;或特异性抗HDAC11蛋白的抗体(单克隆抗体或多克隆抗体)。

[0041] 所述的试剂盒中还可含有:核酸抽提试剂(如核酸抽提液);和/或聚合酶链反应试剂(如dNTP,Taq酶);和/或蛋白免疫印迹试剂;和/或酶链免疫反应试剂(如显色液或杂交液)。

[0042] 作为一种优选方式,所述的试剂盒中还可含有:用于免疫化学分析的试剂,所述的试剂例如:第二抗体、染色剂、显色剂等。此外,所述的试剂盒中还可包括使用说明书等。更具体地,所述的试剂盒可以是一种基于酶联免疫反应(ELISA)技术的试剂盒。ELISA技术以及基于该技术的检测试剂对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

[0043] 作为另一种优选方式,所述的试剂盒中还可含有:(A)各种PCR反应用试剂,例如但不限于:Taq酶,PCR缓冲液,dNTP,DNA聚合酶等;或(B)各种提取DNA或RNA(即制备PCR反应模板)所需的试剂,例如但不限于:酚、氯仿、异戊醇、NaCl等;或(C)提取DNA或RNA的试剂盒。

[0044] 所述的特异性识别HDAC11蛋白或其编码基因的试剂也可固定于试纸上,制备成免疫胶体金试纸或类似检测材料。

[0045] 此外,所述的试剂盒中还可含有本发明的试剂盒的使用说明书和/或标准操作程序。

[0046] 在获得了本发明提供的试剂或试剂盒后,可以利用多种免疫学相关方法来检测样品中HDAC11蛋白的表达量,这些方法均被包含在本发明中。

[0047] 作为一种优选方式,本发明提供了使用上述试剂盒用于体外检测HDAC11蛋白在cHL组织中和或患者体液(如血浆、外周血)中的表达量的方法,该方法包括以下步骤:

[0048] (1)应用所述的试剂或试剂盒检测受试者cHL组织、体液中HDAC11蛋白表达水平;

[0049] (2)分析蛋白表达水平,若HDAC11蛋白显著性高表达,则该受试者为经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的罹患者或高危者。

[0050] 在本发明的具体实施例中,应用免疫组织化学方法检测56例cHL患者肿瘤组织中HDAC11的表达情况,并研究其与临床病理特征和预后的关系。结果显示,全组HRS细胞中HDAC11的表达14例阴性、28例弱阳性和14例阳性,结节硬化型共28例,高表达率21.4%;混合细胞型共22例,高表达率27.2%。HDAC11在cHL的组织HRS细胞中的表达和性别、年龄、分期、大肿块和B症状的关系不明显,和是否有结外累犯有明显关联($\chi^2=8.185, p=0.011$)。56例cHL患者中位无进展生存率(Progression free survival,PFS)140月(95%CI 90.1-189.9)、总生存率(Overall survival,OS)为108月(95%CI96.0-119.9)。HDAC11阴性表达组的10年PFS大于HDAC11弱阳性组,也大于HDAC11阳性组(分别为86%,70%和15%),两两比较差异有统计学意义(Log-rank检验 $P=0.013$);HDAC11阴性组的10年OS大于HDAC11弱阳性组,也大于HDAC11阳性组(分别100%,78%和45%),两两比较差异有统计学意义。结论:HDAC11表达与cHL患者的结外累犯这一预后症状有关,与其他临床病理特征无关,HDAC11低表达是普遍现象,HDAC11表达增高和PFS和OS呈负相关。

[0051] 本发明首次提出将HDAC11蛋白作为经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的标志物,检测方法具有简易、灵敏、高效的优点,为经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的快速、早期诊断和监测提供了理论基础和更简易的检测方法,对基础研究和临床应用均有重要的意义。

[0052] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明

而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如J.萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0053] 材料与方法

[0054] 研究对象

[0055] 56例经典霍奇金淋巴瘤(cHL)标本来自2002.8~2010.3复旦大学附属肿瘤医院病理科存档的石蜡包埋标本。所有患者入院治疗签署知情同意书,有完整存档病历和随访资料,其中男30例,女26例,年龄9-77岁,中位年龄34.5岁,其中大于45岁22例,大肿块形成16例。56例均接受ABVD方案化疗,14例接受辅助放疗,此14例患者均为就诊时影像学判定为大肿块患者。

[0056] 主要实验试剂

[0057] 兔抗人HDAC11(Y-25)多克隆抗体为美国Santa Cruz Biotechnology, Inc.产品(克隆号sc-130776),工作浓度为1:100;二抗(抗兔Envision-AP)及DAB均购自丹麦DAKO公司。

[0058] 免疫组化

[0059] 采用EnVision两步法,标本蜡块连续切片4um厚,73℃烤片20min,62℃烤片2h,脱蜡水化,置于EDTA抗原修复液加热煮沸修复15分钟;3%H₂O₂10min封闭内源性过氧化氢酶,PBS洗3次,每次5min,滴加一抗,37度2h,PBS洗3次,每次5min,滴加二抗,37度30min,PBS洗3次;每次5min,DAB显色、苏木精复染,脱水干燥中性树脂封片。以TBS作空白对照,已知阳性切片作阳性对照。

[0060] 结果判断

[0061] 由2名病理科专家独立阅读免疫组化切片和HE切片,明确病理类型和诊断,病理类型按WHO2008淋巴造血肿瘤分类法进行分类。以被观察细胞核有棕黄色或棕褐色颗粒染色为阳性细胞,采用双盲法随机选取10个高倍视野(×400),每个高倍视野下计数10个肿瘤细胞。观察阳性细胞所占的百分数及染色强度。

[0062] 对阳性细胞所占的百分数计分:

[0063] <5%计0分;

[0064] >5%~25%计1分;

[0065] >25%~50%计2分;

[0066] >50%~75%计3分;

[0067] >75%计4分。

[0068] 细胞着色强度:

[0069] 不着色计0分;

[0070] 淡黄色计1分;

[0071] 棕黄色计2分;

[0072] 棕褐色计3分。

[0073] 上述两项(对阳性细胞所占的百分数计分、细胞着色强度)合计,累积0分为(-),1~2分为(+),3~4分为(++),5~7分为(+++)。将0-2分定义为阴性,3-4分定义为弱阳性,5-7分定义为阳性(高表达)。

[0074] 统计学方法

[0075] 参照美国国家癌症综合网 (NCCN) 评价标准, 疗效评价分为完全缓解 (CR)、未证实的CR (CRu)、部分缓解 (PR)、疾病稳定 (SD)、疾病进展 (PD) 或复发、死亡。采用电话及门诊复诊的方式对患者进行随访。随访截止时间为2016年2月17日, 平均随访时间为105.89 (65-158) 个月。

[0076] 无进展生存 (PFS) 时间定义为: 治疗结束至随访终点发生疾病进展等事件时间。

[0077] 总生存 (OS) 时间定义为: 开始治疗至随访终点或任何原因死亡的时间。

[0078] 统计学处理: 采用SPSS19.0软件进行统计学分析, 统计描述资料分析采用卡方检验或Fisher精确检验, 生存分析采用Kaplan-Meier法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0079] 实施例

[0080] 实施例1、组蛋白去乙酰化酶11 (HDAC11) 在cHL中的表达

[0081] cHL组织中HDAC11主要位于HRS细胞核, 呈黄色或棕褐色颗粒状阳性反应 (图1)。

[0082] 56例经典霍奇金淋巴瘤 (cHL) 标本的病理分型特征见表1。全组患者HDAC11的表达14例阴性、28例弱阳性和14例阳性, 高表达率仅为25%。其中结节硬化型共28例, 阴性6例、弱阳性16例和阳性6例, 高表达率仅21.4%; 混合细胞型共22例, 阴性4例、弱阳性12例和阳性6例, 高表达率仅为27.2%; 淋巴细胞消减型2例均为阳性; 富于淋巴细胞型4例均为阴性 (表1)。HDAC11的表达在结节硬化型cHL和混合细胞型cHL之间无差异 ($P = 0.21$), 富于淋巴细胞型和淋巴细胞消减型由于病例数很少没有进行统计分析。周围反应性增生的淋巴细胞均为阳性。

[0083] 表1、HDAC11在反应性增生淋巴结和经典型霍奇金淋巴瘤中的表达

[0084]

组织来源和 病理分型	HDAC11 的表达程度(n)				高表达率 (%)	χ^2	P
	病例数	阴性	弱阳性	阳性			
经典霍奇金淋巴瘤	56	14	28	14	25.0	13.004	0.014
结节硬化型	28	6	16	6	21.4		
混合细胞型	22	4	12	6	27.2		

[0085]

淋巴细胞消减型	2	0	0	2	100
富于淋巴细胞型	4	4	0	0	0

[0086] 实施例2、HDAC11的表达和cHL临床病理特征的关系

[0087] 统计学分析显示: HDAC11在cHL的组织HRS中的表达与是否有结外累犯有明显相关性 ($\chi^2 = 8.185, P = 0.011$), 而与性别、年龄、分期、大肿块和B症状的关系不明显, 和 (表2)。

[0088] 表2组蛋白去乙酰化酶11的表达和cHL临床病理特征的关系

特征	HDAC11的表达程度(n)				高表达率	χ^2	p
	病例数	阴性	弱阳性	阳性	(%)		
性别							
男	26	8	12	6	23	0.897	0.693
女	30	6	16	8	26		
年龄 (岁)							
<45	34	10	16	8	23	0.914	0.867
>=45	22	4	12	6	27		
分期							
I	20	6	12	2	10	8.10	0.20
II	20	4	10	6	30		
III	12	2	4	6	50		
IV	4	2	2	0	0		
大肿块							
是	16	6	6	4	25	2.127	0.324
否	40	8	22	10	25		
B 症状							
有	24	8	10	6	25	1.764	0.390
无	32	6	18	8	25		
结外累犯							
有	6	4	0	2	33	8.185	0.011*
无	50	10	28	12	24		

[0091] *P<0.05,为0.011,具有显著性差异。

[0092] 实施例3、HDAC11的表达与预后的关系

[0093] 56例cHL患者随访至2016年2月17日,12例死亡,其余44例均在随访中,平均随访时间为105.89 (65-158) 个月。全组中位PFS 140月(95%CI90.1-189.9)、OS为108月(95%CI 96.0-119.9)。HDAC11阴性表达组的10年PFS大于HDAC11弱阳性组,也大于HDAC11阳性组(分别为86%,70%和15%),两两比较差异有统计学意义(Log-rank检验P=0.013);HDAC11阴

性表达组的10年OS大于HDAC11弱阳性组,也大于HDAC11阳性组(分别为100%,78%和45%),两两比较差异有统计学意义(图2)。

[0094] 上述分析结果提示:HDAC11表达增高与cHL患者的PFS和OS呈负相关。

[0095] 实施例4、临床应用

[0096] 获得临床患者的肿瘤组织,如前述“免疫组化”的方法制备免疫组化样本(组织芯片),并对免疫组化样品结果进行分析。

[0097] 分析HDAC11表达水平,去预测患者的预后。结果,从多为临床患者中确定到部分患者HDAC11高表达(具有统计学意义的高表达),预后为可能发生经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯或属于将来发生结外累犯的高危人群,PFS和OS相对低于普通患者;建议后续进行积极检查和治疗。

[0098] 讨论

[0099] 瑞士研究人员研究了283例cHL中HDACs表达,发现cHL HDAC1、2和3表达特征性增高,HDAC1表达低和较差的预后相关(ADAMS H,FRITZSCHE F R,DIRNHOFER S,et al.Class I histone deacetylases 1,2and 3are highly expressed in classical Hodgkin's lymphoma[J].Expert opinion on therapeutic targets,2010,14(6):577-584),这和本发明前期研究结果相一致;Anas Younes等对cHL组织标本系统地进行HDAC1~11的研究,结果显示22例中,HDAC1、2、3、8和10阳性率为100%,4例中HDAC11均为阴性,该研究没有涉及HDACs表达和预后的关系(GLOGHINI A,BUGLIO D,KHASKHELY N M,et al.Expression of histone deacetylases in lymphoma:implication for the development of selective inhibitors[J].Br J Haematol,2009,147(4):515-525)。本发明人经过深入研究后,认为有必要对HDAC11表达的较大样本的研究,从而明确了HDAC11在cHL中的表达特征。为进一步探讨HDAC11在cHL恶性表型维持的机制和研究新的选择性HDACs抑制剂打下基础。本发明通过免疫组化检测HDAC11在cHL组织中的表达,并分析其临床病理意义及其与预后可能存在的关系。

[0100] 本发明人的研究显示,HDAC11高表达率为25%,弱阳性为50%,阴性表达为25%,其表达和性别、年龄、分期、大肿块和B症状的关系不明显,和是否有结外累犯有明显关联($\chi^2=8.185,P=0.011$);HDAC11的表达在结节硬化型cHL和混合细胞型cHL之间无差异($P=0.21$),富于淋巴细胞型和淋巴细胞消减型由于病例数很少没有进行统计分析。HDAC11表达高和PFS和OS相关,这和其他I类HDACs对生存的影响是一致的。

[0101] 在复发难治的cHL患者进行的II期临床研究也说明选择性HDAC11,2,3和11抑制剂MGCD0103获得25%的客观有效率,中位PFS达到9个月,毒副作用相对轻微。目前还没有超选择性针对HDAC11的抑制剂,进一步研究HDAC11在cHL中的功能机制将是一个有价值的研究方向。最近研究显示,HDAC11在cHL中能调控OX40配体的表达,促进HRS细胞凋亡,同时用小RNA干扰技术沉默HDAC11可促进微环境中干扰素gamma的分泌有助于打破HRS细胞对周围效应性CD4+T细胞的免疫耐受,说明HDAC11的功能具有一定的复杂性。

[0102] 在临床上,本发明人的研究显示测定HDAC11有助于疾病的诊断及预后,有利于进行个体化治疗,值得进一步研究。和HDAC1-3一样,HDAC11的表达场所为细胞核,其表达增高有助于DNA及组蛋白去乙酰化,不利于有关基因表达。从肿瘤治疗的角度,组蛋白去乙酰化酶抑制剂有利于DNA展开,有利于复制、转录以及化疗药物发挥作用。ABVD是cHL标准一线诱

导治疗方案,其中阿霉素可以和DNA结合,破坏DNA的转录复制所需的正常结构,研究表明加入组蛋白去乙酰化酶抑制剂可大大提高阿霉素的疗效,研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂和化疗的联合用药也是今后临床研究的热点之一,和HDAC1-3相比,HDAC11表达强度比较低,HDAC11高表达的患者更适合在化疗的基础上联合使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂的治疗。本发明人目前的研究病例数还比较少,目前需要扩大检测样本量,同时HDAC11的表达调控机制的研究是本发明人进一步研究的课题之一。

[0103] cHL肿瘤组织微环境中HRS细胞数量很少,而周围反应性增生的淋巴细胞占绝大多数,形成cHL特殊的病理形态学特征,要做到精准杀灭肿瘤细胞而降低毒副作用,需要研究HRS的HDACs表达特征,才能进一步研究各种HDACs在cHL中的作用和其分子生物学机制,有利于进一步最佳的联合用药策略的制定和高效地进行临床试验的设计,为根本解决霍奇金淋巴瘤的治疗问题奠定基础。

[0104] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

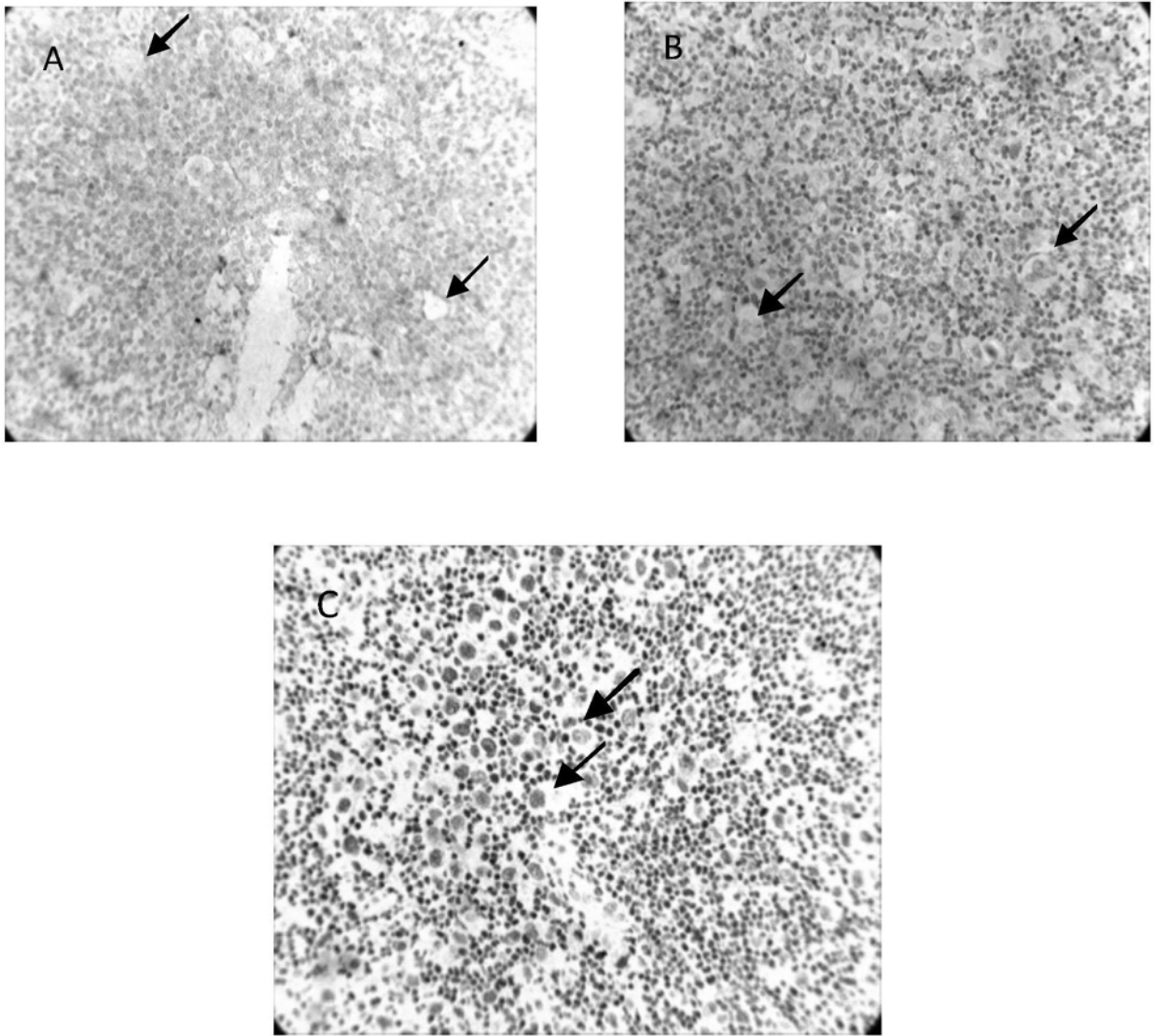


图1

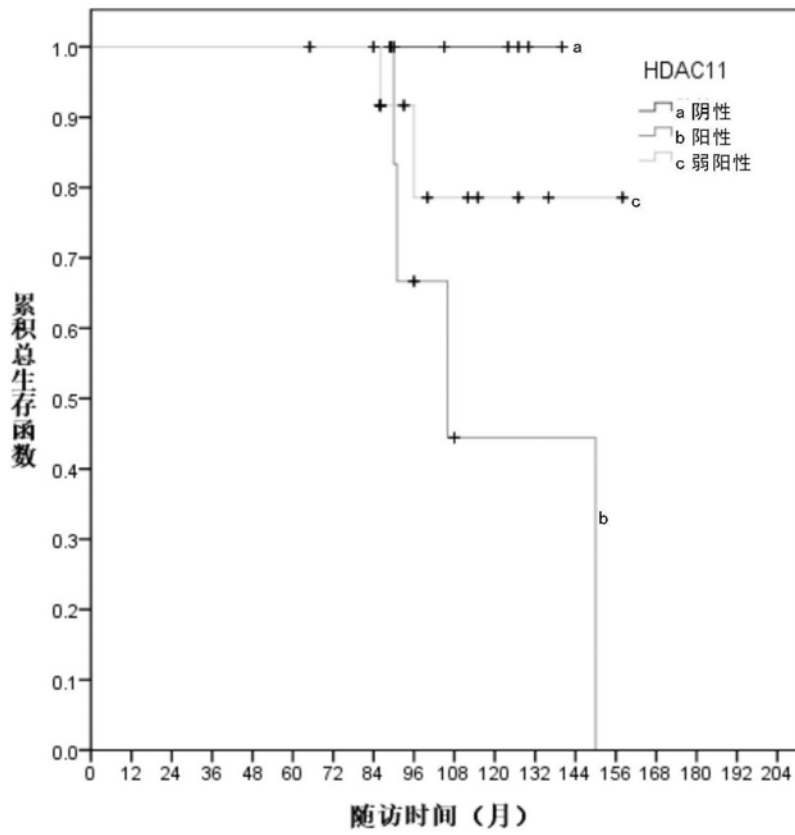
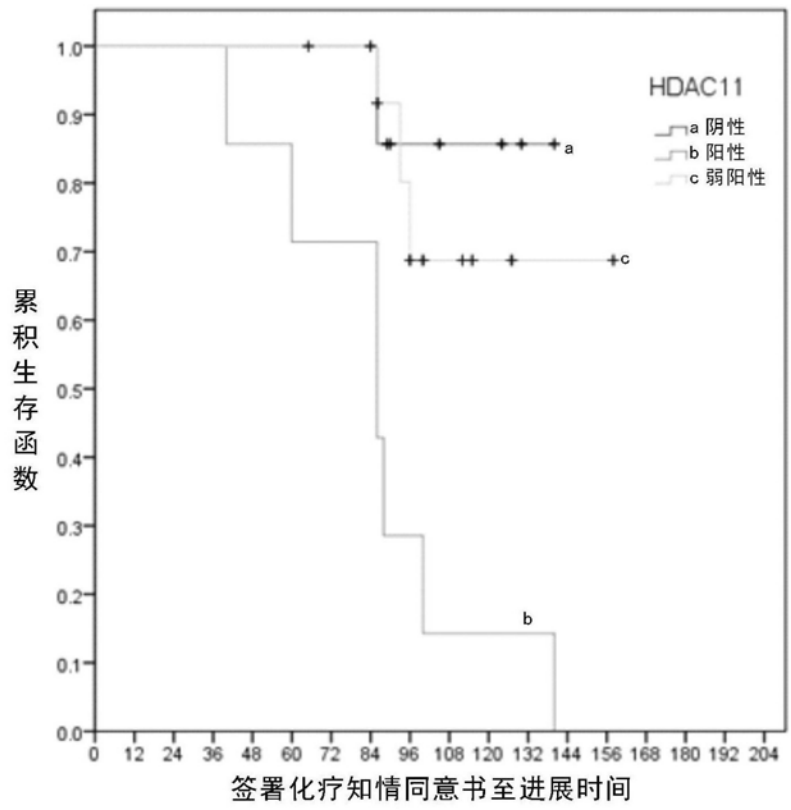


图2

专利名称(译)	诊断经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的标志物及其应用		
公开(公告)号	CN110412268A	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201810394540.0	申请日	2018-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	刘晓健		
申请(专利权)人(译)	刘晓健		
当前申请(专利权)人(译)	刘晓健		
[标]发明人	刘晓健		
发明人	刘晓健		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/57484		
代理人(译)	陈静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及诊断经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的标志物及其应用。本发明揭示了组蛋白去乙酰化酶11(HDAC11)与经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯具有密切的相关性。同时,本发明还明确了HDAC11表达增高与无进展生存率(PFS)和总生存率(OS)呈负相关。本发明为经典霍奇金淋巴瘤的结外累犯的快速、早期诊断和监测提供了理论基础和更简易的检测方法。



The image shows the logo for Opdivo, which consists of the word "Opdivo" in a stylized, serif font, enclosed in large parentheses. A registered trademark symbol (®) is positioned to the upper right of the word "Opdivo".