

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710173601.2

[43] 公开日 2009年7月1日

[11] 公开号 CN 101470112A

[22] 申请日 2007.12.28

[21] 申请号 200710173601.2

[71] 申请人 上海交通大学医学院附属瑞金医院

地址 200025 上海市瑞金二路197号

共同申请人 上海生物芯片有限公司

[72] 发明人 李军民 张庆华 徐子真 赵维莅
沈志祥

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 张宜红

权利要求书2页 说明书12页 附图2页

[54] 发明名称

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤治疗指导和预后判断的分子标志物

[57] 摘要

本发明涉及用于弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后评估的分子标志物(具体为 p - Akt 和/或 YB - 1) 及其应用, 还涉及弥漫大 B 细胞淋巴瘤治疗方案选择和/或预后评估的方法。采用本发明的分子标志物 p - Akt 和/或 YB - 1, 可对弥漫大 B 细胞淋巴瘤的预后简便而正确地作出判断, 以有助于对患者采取有针对性的治疗方案, 从而提高治疗方案的预后效果并节省医疗费用。

1. 一种试剂盒，其用于弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后评估，所述试剂盒包含：

- i)检测生物样品中 p-Akt 表达的一种或多种试剂；和/或
- ii)检测生物样品中 YB-1 表达的一种或多种试剂。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒中的试剂 i)、ii) 是分别用于对生物样品中 p-Akt 和/或 YB-1 的表达进行免疫组织化学检测的试剂。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述生物样品获自经或未经临床治疗的弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的新鲜组织、福尔马林固定或石蜡包埋组织。

4. 如权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于，所述临床治疗选自：联合化疗、或联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包含选自下组的一种或多种：使用说明书、阳性对照物、阴性对照物、缓冲剂、或免疫助剂。

6. 如权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于，所述使用说明书中写明：当检测结果为 p-Akt 和/或 YB-1 表达呈阳性时，提示该患者对联合化疗的预后将不佳，但联用利妥昔单抗将改善预后，对其治疗宜选用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗；当检测结果为 p-Akt 和 YB-1 表达均呈阴性时，提示对该患者只需采用联合化疗即可获得良好的治疗效果和预后。

7. p-Akt 表达和/或 YB-1 表达检测试剂或试剂组在制备用于弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后评估的试剂盒中的用途。

8. p-Akt 和/或 YB-1 作为弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后评估的标志物的用途。

9. 一种评估弥漫大 B 细胞淋巴瘤预后效果的方法，所述方法包括：

a) 检测获自弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的生物样品中 p-Akt 和/或 YB-1 的表达情况；

b) 分析由步骤 a) 所得的检测结果；

其中，当 p-Akt 和 YB-1 表达均呈阴性时，提示该患者对联合化疗的预后效果将良好；当 p-Akt 和/或 YB-1 表达呈阳性时，提示单用联合化疗的预后效

果不佳，但联用利妥昔单抗将改善预后。

10. 一种选择弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案的方法，所述方法包括：

a) 检测获自弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的生物样品中 p-Akt 和/或 YB-1 的表达情况；

b) 分析由步骤 a) 所得的检测结果；

其中，当 p-Akt 和 YB-1 表达均呈阴性时，提示对该患者宜采用联合化疗；当 p-Akt 和/或 YB-1 表达呈阳性时，提示宜对该患者采用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗。

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤治疗指导和预后判断的分子标志物

技术领域

本发明涉及血液肿瘤学和医学领域。更具体地，涉及弥漫性大 B 细胞淋巴瘤治疗方案选择和/或预后评价的分子靶点及包含用来检测靶点的试剂盒。

背景技术

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)是最常见的非霍奇金淋巴瘤，约占成人非霍奇金淋巴瘤的 30-40%。我国目前非霍奇金淋巴瘤的发病率约为 3-4/10 万，并以每年 2-3%的速度增长，其中弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)最为常见，约占每年所有淋巴瘤的 50%，因此，每年全国新发病例约为 2-3 万。

DLBCL 具有显著的生物学异质性，对治疗的反应可完全不同。病人对治疗的反应差异显著，常规的 CHOP 联合化疗方案(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和泼尼松)只能使约 40%的患者获得长期缓解。

近年来，人-鼠嵌合性抗 CD20 单克隆抗体利妥昔(IDEC-C2B8, Rituximab, Rituxan)的应用又进一步提高 DLBCL 的临床疗效。但是利妥昔单抗每个疗程治疗费用为 10-15 万人民币，对于大部分患者而言是沉重经济负担。

因此选择合理的治疗方案，有助于需使用利妥昔单抗的患者获得及时而对症的治疗，也有利于节约只需 CHOP 治疗即可获得良好治疗和预后效果的患者的医疗支出。

国际预后指数(International Prognostic Index, IPI)以临床指标为基础，根据以下因素对患者的预后进行分析：年龄、体力状态、临床 Ann Arbor 分期、节外病灶数目、乳酸脱氢酶水平。IPI 虽然为患者进行预后分析及制定治疗方案提供了方便，但这种评价只是临床参数的组合，其与 DLBCL 的生物学特征相脱节，并不能非常准确地评估患者的预后。一些被分在低危、低中危组的病人 5 年生存率仍仅有 32%。

淋巴瘤的发生源于获得性基因异常，但除了肿瘤遗传学事件的发生，B 淋巴细胞淋巴瘤的形成、增殖和存活需要来自微环境的各种生物信号。信号传导

通路的活化主要由各种蛋白激酶的磷酸化介导。各种信号传导通路的异常活化对细胞的生长、增殖、代谢、凋亡活动起着重要作用，并导致淋巴瘤的形成。

最近大量研究显示 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的异常激活在各种淋巴瘤，包括弥漫大 B 细胞淋巴瘤的形成及发展中起着重要作用。磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 通过磷脂酰肌醇依赖性激酶 (phosphoinositide-dependent kinase, PDK) 使 Akt(蛋白激酶 B, PKB) 第 308 位上的苏氨酸位点(Thr308)和第 473 位上的丝氨酸位点(Ser473)磷酸化，从而激活 Akt。

活化的 Akt 是该信号通路上一个重要介导分子，可调控多个与细胞增殖和凋亡有关的基因家族。哺乳动物雷帕霉素受体(Mammalian target of rapamycin, mTOR)是 Akt 最主要的下游分子，被激活后磷酸化其下游两个影响蛋白质合成的重要分子：核糖体蛋白 S6 激酶(ribosomal S6 kinase, p70S6K)和真核细胞翻译抑制分子结合蛋白 1(eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1, 4E-BP1)。

另有研究发现 Y-Box 结合蛋白-1(YB-1)是一个新的 Akt 下游分子。YB-1 是一种多功能蛋白，参与转录调节、翻译调控、细胞增殖、DNA 修复等作用。YB-1 蛋白在 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路中起重要作用，通过结合在其 RNA 结合域和 C 末端结合域来特异性的抑制翻译。YB-1 的抑制活性在被 Akt 磷酸化后下降，从而增加了致癌基因的翻译和转录。

淋巴细胞增殖的调控失常和正常凋亡过程的阻断共同导致了淋巴瘤的形成。有研究显示由 Akt 调节的磷酸化会影响 Bcl-2 家族、NF-kB 以及其它控制细胞凋亡途径的转录因子的活性。粒细胞白血病-1 蛋白(Mcl-1)是 Bcl-2 家族成员。PI3K/Akt/mTOR 抑制剂诱导的凋亡与抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2 的下调密切相关。PI3K/Akt 可在转录水平上调 Mcl-1，其过度表达能够抑制多种淋巴瘤细胞株的外源性和药物诱导性凋亡作用。

然而，现有技术中并未提供可有力地揭示与 DLBCL 组织学异质性和预后有关的分子标志物。因此，DLBCL 临床治疗仍然迫切需要可简便而有效地用作 DLBCL 治疗方案选择和/或预后指标的分子标志物。

发明内容

本发明的目的在于提供一种在临床研究和诊断时，能够对弥漫大 B 细胞淋巴瘤 AKT 信号传导通路靶分子 p-Akt 和/或 YB-1 进行检测的诊断试剂盒。

本发明的另一目的在于提供一种弥漫大 B 细胞淋巴瘤 AKT 信号传导通路靶分子 p-Akt 和/或 YB-1 的检测方法，并将其作为检测指标。

本发明的另一目的在于提供一种弥漫大 B 细胞淋巴瘤的预后评价模式。

本发明的另一目的在于为弥漫大 B 细胞淋巴瘤临床治疗方案的选择提供指导。

在本发明的第一方面提供了一种试剂盒，其用于弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后评估，所述试剂盒包含：

- i)检测生物样品中 p-Akt 表达的一种或多种试剂；和/或
- ii)检测生物样品中 YB-1 表达的一种或多种试剂。

在本发明的一个实施方式中，所述试剂盒中的试剂 i)、ii)是分别用于对生物样品中 p-Akt 和/或 YB-1 的表达进行免疫组织化学检测的试剂。

在本发明的另一个实施方式中，所述生物样品获自经或未经临床治疗的弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的新鲜组织、福尔马林固定或石蜡包埋组织。

在一个优选例中，所述患者未经临床治疗。

在本发明的另一个实施方式中，所述临床治疗选自：联合化疗、或联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗。

在一个优选例中，所述联合化疗为 CHOP 联合化疗，即环磷酰胺-阿霉素-长春新碱-泼尼松联合化疗。

在本发明的另一个实施方式中，所述试剂盒还包含选自下组的一种或多种：使用说明书、阳性对照物、阴性对照物、缓冲剂、或免疫助剂。

在本发明的另一个实施方式中，所述使用说明书中写明：当检测结果为 p-Akt 和/或 YB-1 表达呈阳性时，提示该患者对联合化疗的预后将不佳，但联用利妥昔单抗将改善预后，对其治疗宜选用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗；当检测结果为 p-Akt 和 YB-1 表达均呈阴性时，提示对该患者只需采用联合化疗即可获得良好的治疗效果和预后。

在一个优选例中，所述联合化疗为 CHOP 联合化疗。

本发明的第二方面提供了 p-Akt 表达和/或 YB-1 表达检测试剂或试剂组在制备用于弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后评估的试剂盒中的用途。

本发明的第三方面提供了 p-Akt 和/或 YB-1 作为弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后评估的标志物的用途。

本发明的第四方面提供了一种评估弥漫大 B 细胞淋巴瘤预后效果的方法，所述方法包括：

a) 检测获自弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的生物样品中 p-Akt 和/或 YB-1 的表达情况；

b) 分析由步骤 a)所得的检测结果；

其中，当 p-Akt 和 YB-1 表达均呈阴性时，提示该患者对联合化疗的预后效果将良好；当 p-Akt 和/或 YB-1 表达呈阳性时，提示单用联合化疗的预后效果不佳，但联用利妥昔单抗将改善预后。

在一个优选例中，所述方法还包括对国际预后指数进行评估。

在另一优选例中，所述联合化疗为 CHOP 联合化疗。

在另一个优选例中，所述患者未经临床治疗。

在本发明的第五方面，提供了一种选择弥漫大 B 细胞淋巴瘤的治疗方案的方法，所述方法包括：

a) 检测获自弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的生物样品中 p-Akt 和/或 YB-1 的表达情况；

b) 分析由步骤 a)所得的检测结果；

其中，当 p-Akt 和 YB-1 表达均呈阴性时，提示对该患者宜采用联合化疗；当 p-Akt 和/或 YB-1 表达呈阳性时，提示宜对该患者采用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗。

在另一优选例中，提供了一种筛选改善弥漫大 B 细胞淋巴瘤预后效果的药物或治疗方案的方法，所述方法包括：

(a)对弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者、模型动物或细胞施用待筛选的药物或治疗方案；和

(b)检测所述患者、模型动物或动物中 p-Akt 和 YB-1 的表达情况，

其中，p-Akt 和 YB-1 均呈阴性提示该待筛选的药物或治疗方案的预后效果好。

在另一优选例中，所述药物是化疗药物、对弥漫大 B 细胞淋巴瘤具有特异性的单克隆抗体、或它们的组合。

附图说明

图 1: DLBCL 样品石蜡切片(HE 染色)照片。

图 2: AKT 信号传导通路靶点 p-Akt 表达阳性样品的石蜡切片(HE 染色)照片。

图 3: AKT 信号传导通路靶点 YB-1 表达阳性样品的石蜡切片(HE 染色)照片。

图 4: 60 例随访患者的 p-Akt 表达与 OS 的关系, 图中分别显示了 p-Akt⁻患者和 p-Akt⁺患者的生存曲线。

图 5: 采用 CHOP 方案治疗的患者中 p-Akt 表达与 OS 的关系, 图中分别显示了 p-Akt⁻患者和 p-Akt⁺患者的生存曲线。

图 6: 采用 R-CHOP 方案治疗的患者中 p-Akt 表达与 OS 的关系, 图中分别显示了 p-Akt⁻患者和 p-Akt⁺患者的生存曲线。

具体实施方式

本发明人对弥漫大 B 细胞淋巴瘤组织 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路所涉及多种分子(例如 p-Akt、YB-1、Bcl-2、p-p70S6K、p-4E-BP1 等)的表达情况与该疾病的治疗和预后进行了长期而深入的研究, 从分子生物学角度更好地理解弥漫大 B 细胞淋巴瘤的组织学异质性, 同时将考察患者的分子病理学表达特征与临床治疗反应和预后情况间的联系寻找该信号通路上能够作为生物学治疗靶点和临床预后指标的分子标志物。

本发明人出乎意料地发现 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路中的分子 p-Akt 和 YB-1 对弥漫大 B 细胞淋巴瘤的预后具有指示意义且具有良好的敏感性, 可作为良好的临床治疗方案选择和预后效果的分子标志物。在此基础上, 本发明人完成了本发明。

治疗方案选择及预后评估

目前国内外常用于 DLBCL 治疗的方案联合化疗(主要为 CHOP 联合化疗方案, 即环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和泼尼松)、或结合人-鼠嵌合性抗 CD20 单克隆抗体利妥昔和 CHOP 联合化疗(R-CHOP)。

CHOP 联合化疗方案只能使约 40% 的患者获得长期缓解, 但其治疗费用相对低廉。而利妥昔单抗与 CHOP 的联合治疗方案可进一步提高 DLBCL 的临床疗效, 改善患者的预后, 然而该方案每个疗程治疗费用为 10-15 万人民币, 对于大部分患者而言是沉重经济负担。

因此区分适用不同治疗方案的患者，尤其是仅采用 CHOP 联合化疗方案就可获得良好预后的患者和必须采用联合利妥昔单抗治疗方案的患者，对于提高 DLBCL 的临床治疗的效果、改善预后、减轻医患负担均有重要的意义。

本发明人意外地发现 p-Akt 和/或 YB-1 可作为弥漫大 B 细胞淋巴瘤良好的临床治疗方案选择和预后效果的分子标志物。

在本发明中可采用 p-Akt 和/或 YB-1，仅对治疗方案进行选择或仅对预后进行评估，也可同时将两者结合在一起综合考虑对患者的总体治疗。

本发明的治疗方案选择及预后评估还可结合国际预后指数(IPI)等其它生理病理指标进行，以进一步提高其准确性。

分子标志物

在本发明中，“分子标志物”、“DLBCL 治疗方案选择和/或预后指标的分子标志物”可互换使用，均表示本发明中可用于指示 DLBCL 预后效果并对其临床治疗方案选择具有指导意义的分子。本发明的分子标志物具体为 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路中的 p-Akt 和 YB-1 分子。

本发明中，术语“p-Akt”是指 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中的一个重要介导分子，磷酸化为其活性形式，可调控多个与细胞增殖和凋亡有关的基因家族。术语“YB-1”是指 Y-Box 结合蛋白-1，它是 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路中新发现的一种 Akt 下游分子。

p-Akt 位于该信号转导通路的上游，而 YB-1 则位于该通路的下游。p-Akt 可对其下游多条通路中的众多信号分子进行调控，从而进一步调节肿瘤细胞的增殖和存活，并影响细胞迁移、黏附和胞外基质降解等。

p-Akt 的下游信号分子涉及 DNA 损伤修复与细胞周期调控(例如 MDM2)、蛋白质合成与细胞生长(例如 mTOR)、葡萄糖代谢(例如 GSK3 β)、细胞凋亡(例如 BAD、FKHR)等众多重要生理和生化过程。

本发明人的实践证明并不是所有的 p-Akt 下游信号分子都对 DLBCL 预后及治疗方案的选择具有指导意义，例如通过研究发现同样是 p-Akt 下游信号分子的 p-p70S6K、p-4E-BP1 就未见指导意义。而本发明人正是从纷繁芜杂的信号途径中，从众多的信号分子中筛选出了对 DLBCL 预后效果及其临床治疗方案选择具有指导意义的敏感性分子 p-Akt 和 YB-1 分子。

在本发明的一个优选实施方式中，当检测到获自 DLBCL 患者的样品中

p-Akt 和/或 YB-1 表达呈阳性时，提示该患者对联合化疗的预后将不佳，但联用利妥昔单抗将改善预后，对其治疗宜选用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗；当检测结果为 p-Akt 和 YB-1 表达均呈阴性时，提示对该患者只需采用联合化疗即可获得良好的治疗效果和预后。

在本发明中，术语“阴性”是指检测结果显示标志物分子在样品中不表达或与阴性对照相比无统计学或组织学上的差异。反之，术语“阳性”是指检测结果显示标志物分子在样品中表达或与阴性对照相比表达增加或存在统计学或组织学上的明显差异。

在本发明的一个具体实施方式中，采用了免疫组织化学检测方法，p-Akt、YB-1 阳性定义为 >10% 的肿瘤细胞出现定位清晰的颗粒状棕褐色或棕黄着色，而阴性则定义为视野里面 <10% 的细胞着色。

可单独检测 p-Akt 或 YB-1 的表达，并将结果用于预后评估和治疗方案选择。也可结合这两种信号分子表达的检测结果，以更为准确地进行预后评估和治疗方案选择。

试剂盒

本发明中还提供了用于弥漫大 B 细胞淋巴瘤治疗方案选择和/或预后评估的试剂盒，该试剂盒中含有：i) 检测生物样品中 p-Akt 表达的一种或多种试剂；和/或 ii) 检测生物样品中 YB-1 表达的一种或多种试剂。

生物样品可以是获自弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的新鲜组织、福尔马林固定或石蜡包埋组织、体液、血液、或细胞等，优选为新鲜组织、福尔马林固定或石蜡包埋组织。这些样品可为切片、涂片、悬液、溶液等适于检测的各种形式存在，例如在结合免疫组织化学的检测中，优选采用石蜡切片标本。优选在采集样品前，所述患者未经临床治疗。

用于本发明中的检测方法优选免疫组织化学检测法，该方法可极为简便而有效地检测并确定样品中 p-Akt 和/或 YB-1 表达的状况，非常适用于临床应用。当然，本发明也不排除本领域技术人员可采用的其它检测方法，诸如蛋白质印迹法、ELISA 法、流式细胞法、生物芯片法等，但其操作过程可能较本发明中优选的免疫组化方法繁琐，本领域技术人员可根据需要进行选择。

可根据多种检测原理和方法，按照需要在试剂盒中配备检测 p-Akt 和/或 YB-1 表达的试剂或试剂组。在本发明中，“试剂组”是指包含了检测所需的多

种试剂的试剂组合。

在本发明的一个具体实施方式中，所采用的检测方法是免疫组织化学检测方法，因此在试剂盒中所包含的检测 p-Akt 的试剂包括：抗 p-Akt 的一抗、二抗、免疫组化所需的其它试剂(诸如稀释剂)等。

此外，本发明的试剂盒还可根据需要包括：容器、对照物(包括阳性或阴性对照)、使用说明书、缓冲剂、免疫助剂等，本领域技术人员可根据具体情况对其进行选择。

本发明的优点

1. 本研究分析了 AKT 信号传导通路靶点 p-Akt, YB-1 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤组织中表达情况。

2. 本研究证实了 AKT 信号传导通路靶点 p-Akt, YB-1 的表达阳性患者对治疗反应效果差，无进展生存期和总体生存期短，临床预后不佳，提示该通路的持续活化是 DLBCL 的不良分子生物学预后因素。

3. 利妥昔单抗联合化疗(R-CHOP)消除了该通路表达对预后的负面影响，Akt、YB-1 分子可作为新的 DLBCL 生物学治疗靶点和临床预后指标。

实施例

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于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

实施例 1. 标本收集

入选本研究的病例为 73 例初治 DLBCL 患者，其中男 42 例，女 31 例，年龄 22-80 岁，中位年龄 53 岁。收集患者如下临床资料：性别、年龄，行为状态、Ann Arbor 临床分期、LDH 水平和节外病变数、肿瘤大小，并根据国际预后指数(International Prognostic Index, IPI)进行评分。患者按照院所要求签定知情同

意。患者接受 6 个疗程标准剂量的 CHOP 或 R-CHOP 方案治疗，根据病情加或不加用放疗。

CHOP 方案具体组成如下：环磷酰胺 750 mg/m²，静推，第 1 天；阿霉素 50 mg/m²，静推，第 1 天；长春新碱 1.4 mg/m² (最大剂量，2.0 mg)，静推，第 1 天；和泼尼松 60 mg，口服，第 1-5 天。

R-CHOP 方案具体组成如下：利妥昔单抗 375 mg/m²，缓慢静滴，第 1 天；环磷酰胺 750 mg/m²，静推，第 2 天；阿霉素 50 mg/m²，静推，第 2 天；长春新碱 1.4 mg/m² (最大剂量，2.0 mg)，静推，第 2 天；和泼尼松 60 mg，口服，第 2-6 天。

疗效评估在 6 个疗程治疗后 1 个月进行。所有患者必须进行颈、胸、腹部 CT 扫描的检查，不论发病时这些部位是否受累。根据国际工作组标准 (International Workshop criteria)，将治疗反应分为完全缓解(CR)、临床完全缓解(Cru)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展(PD)。总有效率定义为 CR，Cru 和 PR 之和。

73 例病例中可随访病例为 60 例，随访截止时间为 2007 年 8 月 30 日。本研究的主要研究终点是无进展生存期(Progression-free survival, PFS)和总体生存期(Overall survival, OS)。PFS 定义为：治疗有效开始至淋巴瘤进展、复发、死亡或末次随访时间。OS 则定义为初次确诊至死亡或末次随访时间。

实施例 2. 免疫组化检测与结果判定

1. 组织样品处理

73 例 DLBCL 样本均为甲醛固定，经组织学和免疫组织化学分析，由两位高年资病理医师按照 2001 年版 WHO 淋巴瘤分类标准确定组织类型。

切取 3 微米切片，常规脱蜡，脱水，微波抗原修复后自然冷却 30 分钟，1.5%过氧化氢清除内源性过氧化物酶，1%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 20 分钟，加入以下一抗：抗 p-Akt(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)，抗 YB-1(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)，4℃孵育过夜，Dako Envision HRP(Dako Cytomation)标记二抗，DAB 显色，梯度酒精脱水，二甲苯透亮后苏木素复染细胞核。

高倍镜下选取 10 个具有代表性视野，计算 1000 个肿瘤细胞中阳性细胞数换算成百分比。p-Akt, YB-1 阳性定义为>10%的肿瘤细胞出现定位清晰的颗粒

状棕褐色或棕黄着色。阳性对照为乳腺癌或结肠癌组织，TBS 代替一抗作为阴性对照。所有染色切片由两位血液病理学家在同一天判定结果，若出现争议，重新评价直到达成共识。

2. 结果判定与分析

石蜡切片和细胞的免疫组化结果运用 Leica CTR MIC 显微镜观测系统 (Leica Microsystem, Wetzlar, 德国)进行观察, 3CCD 照相系统(HV-C20AMP, Hitachi Kokusai Electric Inc., Tokyo, 日本)进行拍照, 图像捕捉软件为 Matrox Intellicam Version 2.06(Matrox Electronic Systems Ltd., Dorval, Quebec, 加拿大), 图像后期处理软件为 Adobe Photoshop CS2 9.0(Adobe Systems, San Jose, CA)。

所有数据的统计分析应用 SPSS 13.0 软件进行。频数比较资料使用 χ^2 检验和 Fisher 确切 P 检验。PFS、OS 的计算均采用 Kaplan-Meier 方法, 并描绘生存曲线。单因素对生存的影响分析(生存资料的比较)均采用 Log rank t 检验。

实施例 3. p-Akt、YB-1 检测结果与疗效分析

1. 免疫组织化学检测结果

DLBCL 石蜡组织 p-Akt, YB-1 的阳性率分别为 54.8% (40/73)、65.8% (48/73)。p-Akt, YB-1 阳性均定位于胞浆, 呈棕黄色均匀片状染色。YB-1 强阳性可表现为胞膜、核周以及胞核棕褐色颗粒状染色。如图 1~图 3 所示。

2. p-Akt 和 YB-1 的表达与不同治疗方案下预后效果的关系

在入选的 73 例患者中, 单因素 χ^2 检验显示 p-Akt⁻患者的治疗总体有效率为 91.0%, p-Akt⁺患者的治疗总体有效率为 60.0%, 两者之间存在统计学差异 (P=0.003)。同样 YB-1 表达阳性者对化疗的总反应率低, P 值为 0.002。p-p70S6K⁻总体反应率为 82.1%, p-p70S6K⁺总体反应率为 64.7%, 两者无统计学差异 (P=0.113); p-4E-BP1⁻总体反应率为 77.5%, p-4E-BP1⁺总体反应率为 69.7, 两者无统计学差异 (P=0.593)。

根据治疗反应分组, 单因素分析显示, CHOP 组中 p-Akt⁻患者的总体有效率为 85.7%, p-Akt⁺患者的总体有效率为 37.5%, 两者之间存在统计学差异 (P=0.011)。R-CHOP 组中 p-Akt⁻患者的总体有效率为 94.7%, p-Akt⁺患者的总体

有效率为 75.0%，两者之间无统计学差异 ($P=0.112$)。与 p-Akt 类似，CHOP 组中 YB-1 表达者的总体有效率低， P 值为 0.018，在 R-CHOP 组中则无统计学差异。

对本研究中的 60 例弥漫大 B 患者进行随访，中位随访时间 14 个月(3-61 月)，2 年估计无进展生存期(PFS)和总体生存期(OS)分别为 $75\pm 7\%$ 和 $80\pm 5\%$ 。单因素分析各分子标记与 PFS 和 OS 的关系。p-Akt⁻者 PFS、OS 均优于 p-Akt⁺者(PFS, 89% vs 62%, $P=0.008$; 而 OS, 97% vs 65%, $P=0.034$)(生存曲线如图 4 示)。同样 YB-1 表达阳性与不良预后有关(PFS, $P=0.011$; OS, $P=0.030$)。相反，p-p70S6K-者 PFS、OS 与 p-p70S6K+者无统计学差异($P=0.158$; 0.306); p-4E-BP1-者 PFS、OS 与 p-4E-BP1+者无统计学差异($P=0.903$; 0.972)。

按照治疗方案分组，CHOP 组中 p-Akt⁻者 PFS、OS 均优于 p-Akt⁺者((PFS, 100% vs 56%, $P=0.017$; OS, 100% vs 58%, $P=0.018$)(生存曲线如图 5 所示)。在 R-CHOP 组中，p-Akt⁻患者与 p-Akt⁺患者在 PFS($P=0.156$)和 OS($P=0.270$)上的差异无统计学意义(生存曲线如图 6 所示)。同样在 CHOP 组中，YB-1 和 Bcl-2 阳性表达者预后差，在 R-CHOP 组中差异无统计学意义。IPI 指数在 CHOP 组和 R-CHOP 组都存在预后意义。

上述结果均表明：可采用 p-Akt 与 YB-1 作为分子标志物来选择适于不同 DLBCL 患者的优选治疗方案，并可对预后效果作出评估。p-Akt 和/或 YB-1 表达呈阳性时，提示该患者对联合化疗的预后将不佳，但联用利妥昔单抗将改善预后，对其治疗宜选用联合化疗与利妥昔单抗的联合治疗。当检测结果为 p-Akt 和 YB-1 表达均呈阴性时，提示对该患者只需采用联合化疗即可获得良好的治疗效果和预后，宜选用联合化疗。

实施例 4. 检测试剂盒的制备

按如下组成制备本实施例中的试剂盒(以下温度为适宜的储藏温度):

试剂A: 修复液粉剂(Unmasking Buffer) 5.1g, 2-8℃;

试剂B: 封闭液即用型(Blocking Buffer) 5ml, 2-8℃;

试剂C1: 抗p-Akt单克隆抗体 50 μl, -20℃;

C2: 抗YB-1单克隆抗体 50 μl, -20℃;

试剂D: 一抗稀释缓冲液 18ml, 2-8℃;

试剂E: 二抗(HRP 标记)即用型 5ml, 2-8℃;

试剂F: DAB 工作液 F1—浓缩缓冲液 100 μ l(20 \times), 2-8 $^{\circ}$ C(避光);

F2—DAB 溶液 100 μ l(20 \times) 2-8 $^{\circ}$ C(避光);

F3—浓缩H₂O₂ 100 μ l(20 \times), 2-8 $^{\circ}$ C(避光);

试剂G: 3% H₂O₂-甲醇溶液即用型 1.5ml, 2-8 $^{\circ}$ C(避光);

试剂H: 苏木精(Hematoxylin)即用型 1.5ml, 2-8 $^{\circ}$ C。

采用该试剂盒对分离自DLBCL患者的组织样品进行检测, p-Akt阳性定位于胞浆, 呈棕黄色均匀片状染色。YB-1强阳性可表现为胞膜、核周以及胞核棕褐色颗粒状染色。阳性定义为>10%的肿瘤细胞出现定位清晰的颗粒状棕褐色或棕黄着色。采用本发明的方法根据所得结果对患者的预后做出评估, 评估结果与临床实践相吻合。

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。

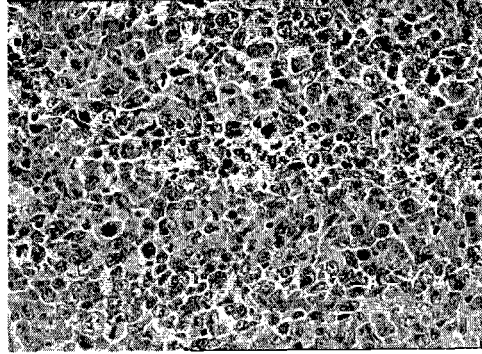


图 1

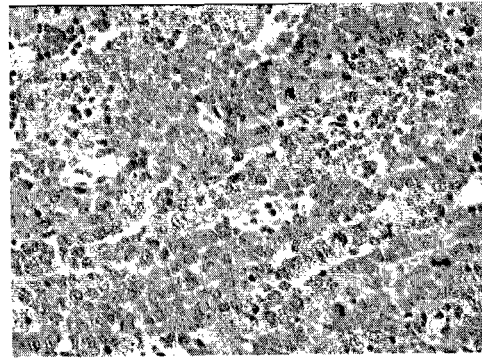


图 2

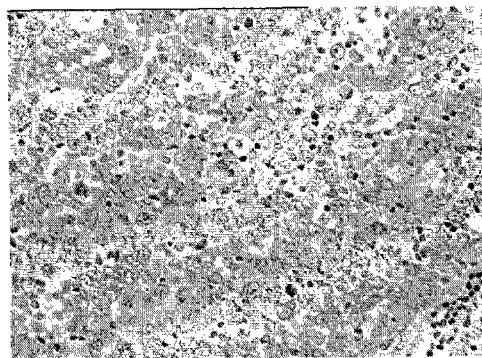


图 3

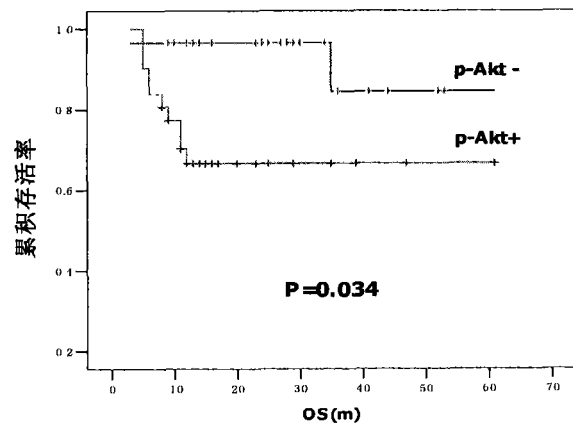


图 4

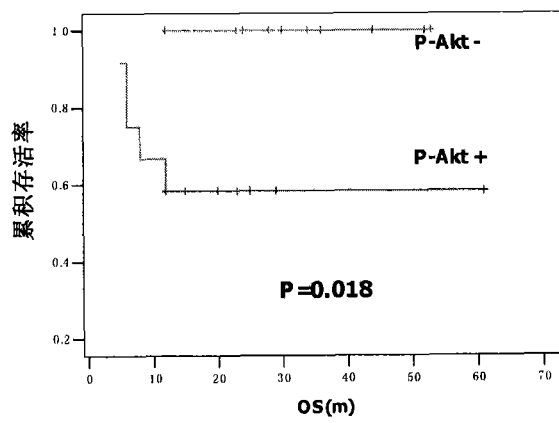


图 5

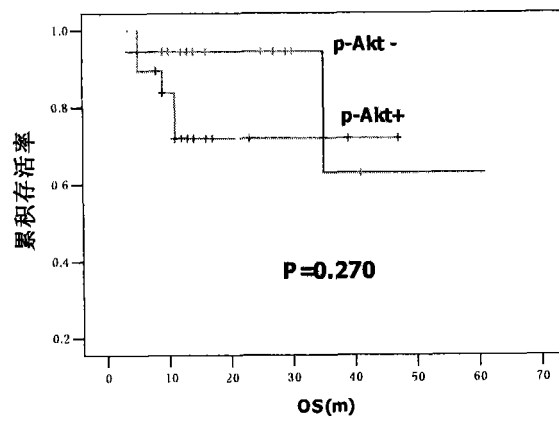


图 6

专利名称(译)	弥漫性大B细胞淋巴瘤治疗指导和预后判断的分子标志物		
公开(公告)号	CN101470112A	公开(公告)日	2009-07-01
申请号	CN200710173601.2	申请日	2007-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海生物芯片有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海生物芯片有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海生物芯片有限公司		
[标]发明人	李军民 张庆华 徐子真 赵维莅 沈志祥		
发明人	李军民 张庆华 徐子真 赵维莅 沈志祥		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于弥漫大B细胞淋巴瘤的治疗方案选择和/或预后评估的分子标志物(具体为p - Akt和/或YB - 1)及其应用, 还涉及弥漫大B细胞淋巴瘤治疗方案选择和/或预后评估的方法。采用本发明的分子标志物p - Akt和/或YB - 1, 可对弥漫大B细胞淋巴瘤的预后简便而正确地作出判断, 以有助于对患者采取有针对性的治疗方案, 从而提高治疗方案的预后效果并节省医疗费用。

