



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101084438 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 25

(21) 申请号 200580041568. 7

WO 2003/039653 A1, 2003. 02. 27, 全文.

(22) 申请日 2005. 10. 06

IWAI YOSHIKO et. al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. 《PNAS》. 2002, 第 99 卷 (第 19 期), 第 12293 - 12297 页.

(30) 优先权数据

60/616, 590 2004. 10. 06 US

60/642, 794 2005. 01. 11 US

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2007. 06. 04

CURIEL T J et. al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. 《NATURE MEDICINE》. 2003, 第 9 卷 (第 5 期), 第 562-567 页.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2005/036431 2005. 10. 06

STROME SCOTT et. al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. 《CANCER RESEARCH》. 2003, 第 63 卷 (第 19 期), 第 6501 - 6505 页.

(87) PCT 申请的公布数据

W02006/042237 EN 2006. 04. 20

(73) 专利权人 梅约医学教育与研究基金会

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 L·程 S·E·斯壮姆 E·D·权

审查员 劳芳

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陶家蓉

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/566 (2006. 01)

G01N 33/567 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 02/00730 A2, 2002. 01. 03, 全文.

权利要求书1页 说明书19页
序列表3页 附图4页

(54) 发明名称

B7-H1 和癌症的诊断、预后和治疗方法

(57) 摘要

本发明公开了一种通过在有或怀疑有癌症的个体组织中评估 B7-H1 表达的诊断方法, 施用能干扰 B7-H1- 受体相互作用的药物的治疗方法, 选择能从癌症免疫疗法中获益的候选个体的方法, 和抑制 B7-H1 表达的方法。

1. 与 B7-H1 多肽结合的抗体的用途,其特征在于,用于制备一种用于确定肾细胞癌患者预后的方法的试剂,该方法包括:(a) 提供患有肾细胞癌的个体的肾组织样本,所述肾组织样本包括测试细胞,所述测试细胞为癌细胞或肿瘤浸润白细胞;和

(b) 评估组织样本中表达 B7-H1 的测试细胞的比例,当表达 B7-H1 的测试细胞的所述比例高于预兆水平,所述个体比测试细胞表达 B7-H1 水平低于预兆水平的个体更有可能死于肾细胞癌,

其中预兆水平是:

(i) hB7-H1 表达的肿瘤细胞 $\geq 10\%$, 和 / 或

(ii) 以淋巴浸润程度调整后的白细胞 hB7-H1 表达分数 ≥ 100 , 其中所述调整后的表达分数由 hB7-H1 阳性染色的白细胞百分数乘以淋巴浸润程度计算得到;和

对 hB7-H1 多肽阳性染色的肿瘤细胞和 / 或淋巴浸润白细胞定量为 5-10% 的增加, 所述淋巴浸润程度定义为 0= 不存在, 1= 病状, 2= 中等的, 3= 显著的。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其中使用与 B7-H1 多肽结合的抗体。

3. 如权利要求 1 所述的用途,所述个体是哺乳动物。

4. 如权利要求 3 所述的用途,所述哺乳动物是人类。

5. 与 B7-H1mRNA 杂交的核酸探针的用途,其特征在于,用于制备一种用于确定肾细胞癌患者预后的方法的试剂,该方法包括:

(a) 提供患有肾细胞癌的个体的肾组织样本,所述肾组织样本包括测试细胞,所述测试细胞为肿瘤细胞或肿瘤浸润白细胞;和

(b) 评估组织样本中表达 B7-H1 的测试细胞的比例,当表达 B7-H1 的测试细胞水平高于预兆水平,所述个体比测试细胞表达 B7-H1 水平低于预兆水平的个体更有可能死于肾细胞癌,

其中预兆水平是:

(i) hB7-H1 表达的肿瘤细胞 $\geq 10\%$, 和 / 或

(ii) 以淋巴浸润程度调整后的白细胞 hB7-H1 表达分数 ≥ 100 ;和

其中对 hB7-H1 多肽阳性染色的肿瘤细胞和 / 或淋巴浸润白细胞的百分数定量为 5-10% 的增加。

6. 如权利要求 5 所述的用途,其中使用与 B7-H1mRNA 杂交的核酸探针。

7. 如权利要求 5 所述的用途,其中所述核酸探针用于反转录聚合酶链反应。

8. 如权利要求 5 所述的用途,所述个体是哺乳动物。

9. 如权利要求 8 所述的用途,所述哺乳动物是人类。

B7-H1 和癌症的诊断、预后和治疗方法

[0001] 本发明要求美国临时申请号 :60/616, 590(申请日 2004 年 10 月 6 日), 和美国临时申请 :60/642, 794(申请日 2005 年 1 月 11 日) 的优先权。美国临时申请号 60/616, 590 和美国临时申请 60/642, 794 的公开内容在此完整引入以供参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及表达于癌组织的免疫分子, 尤其是涉及一种对所述免疫分子在肿瘤细胞和肿瘤浸润白细胞内表达的评估。

背景技术

[0003] 癌症开始和发展的重要决定因素是癌细胞具有逃避宿主免疫系统的能力。例如, 存在于癌症组织中的不足、不适当或抑制性的免疫分子能限制宿主对癌症产生免疫应答的能力。

[0004] 美国专利号 6, 803, 192 和待审美国申请序列号 09/649, 108、10/127, 282 和 10/719, 477 和国际申请号 US/02/32364 在此完整引入以供参考。

发明内容

[0005] 本发明部分基于在肾细胞癌 (RCC) 病人中发现的死亡风险与表达共刺激人糖蛋白 B7-H1 的肿瘤细胞和 / 或肿瘤中白细胞的数量成正比。这里采用的术语“B7-H1”指来自任何哺乳动物种的 B7-H1, 术语“hB7-H1”指人 B7-H1。美国专利号 6, 803, 192 和待审美国申请序列号 09/649, 108 进一步详细描述了 B7-H1 多肽和核酸, 其公开内容在此完整引入以供参考。

[0006] 本发明提供一种基于癌症组织细胞的 B7-H1 表达来诊断带有或可能患某种组织癌症的方法, 预测免疫疗法成功的方法, 预后的方法, 及治疗方法。肿瘤中的白细胞有时候在这里指“肿瘤浸润白细胞”或“浸润肿瘤的白细胞”。

[0007] 更特别地, 本发明提供一种在个体中诊断癌症的方法。本方法包括 : (a) 提供被怀疑有或可能会发生此种组织癌症的个体的组织样本, 所述样本包括测试细胞, 所述测试细胞为组织细胞或浸润组织的白细胞 ; 和 (b) 评估所述测试细胞是否表达 B7-H1, 当一些或所有测试细胞表达 B7-H1 时说明个体患癌。

[0008] B7-H1 表达的评估能通过检测 B7-H1 多肽或 mRNA 来进行。B7-H1 多肽能通过, 例如用与 B7-H1 多肽结合的抗体接触组织样本或组织样本中所含的测试细胞来检测。合适的检测 B7-H1 多肽的方法可以包含不限于, 荧光流式细胞分析技术 (FFC) 或免疫组织学。B7-H1mRNA 能通过例如采用能与 B7-H1 mRNA 杂交 (如通过原位杂交) 的核酸探针与组织样本接触或通过反转录酶 - 聚合酶链反应来检测。所述组织可以是任何器官或解剖学系统的组织, 并且可以包括但不限于 : 肺、表皮、结缔、血管、肌肉、神经、骨骼、淋巴、前列腺、子宫颈、乳房、脾、胃、肠、口腔、食道、子宫、卵巢或睾丸组织。所述组织也可以是肾脏组织。个体可以是人等哺乳动物。

[0009] 本发明的其它方面是一种鉴定免疫疗法的候选者的方法。本方法包括：(a) 提供带有此种组织癌症的个体的组织样本，其中组织样本含有测试细胞，所述测试细胞为癌细胞或肿瘤浸润白细胞；和 (b) 评估组织样本中测试细胞表达 B7-H1 的水平，当在测试细胞中检测不到 B7-H1 表达或测试细胞表达的 B7-H1 低于测试细胞表达 B7-H1 的免疫-抑制阈值水平时，个体很有可能从免疫疗法中获益。

[0010] B7-H1 水平能通过采用，例如，任何所述诊断方法检测 B7-H1 多肽或 mRNA 来评估。所述组织可以是任何器官或解剖系统的组织，并且可以包括但不限于：肺、上皮、关节、血管、肌肉、神经、骨骼、淋巴、前列腺、子宫颈、乳房、脾、胃、肠、口腔、食道、子宫、卵巢或睾丸组织。所述组织也可以是肾脏组织。个体可以是像，如，人这样的哺乳动物。所述癌症可以是任何癌症，并且包括，如，肾细胞癌。

[0011] 在另一个实施例中，本发明提供了一种决定癌症患者预后的方法。本方法包括：(a) 提供带有此种组织癌症的个体的组织样本，所述组织样本包括测试细胞，所述测试细胞为组织细胞或肿瘤浸润白细胞；和 (b) 评估组织样本中表达 B7-H1 的测试细胞的水平，其中如果在测试细胞表达 B7-H1 的水平是预兆水平，或超过预兆水平，相比测试细胞表达 B7-H1 水平低于预兆水平的个体更有可能死于癌症。所述预兆水平是根据本领域公知的统计学临床分析（如，本文描述的）获得的预确定值。对 B7-H1 的评估可以通过采用任何一种本领域公知方法，包括例如上述诊断方法和免疫疗法来检测 B7-H1 多肽或 B7-H1 mRNA 来得到。组织样本可是任何组织，并且可以包括例如任何上述的组织。组织的提供者能够是如人这样的哺乳动物。

[0012] 本发明的另一个方面是治疗方法。本方法包括：(a) 鉴定患癌的个体，其中一些或所有癌细胞或一些或所有癌细胞的肿瘤浸润白细胞表达 B7-H1；和 (b) 给个体递送能干扰 B7-H1 与其受体发生相互作用的药剂。所述药剂能与 B7-H1 或 B7-H1 的一类受体，例如，PD-1 受体结合。所述药剂可以是与 B7-H1 或 B7-H1 受体结合的抗体抗体片段（如，Fab'，F(ab')₂，或单链 Fv(scFv) 片段）；可溶性 B7-H1 或 B7-H1 的可溶性功能片段；可溶性 B7-H1 受体或其可溶性功能片段。只要有需要，药剂能够在施用一种或多种免疫调节因子、生长因子、或抗血管生成因子之前，同时，或之后施用。此类免疫调节因子、生长因子、和抗血管生成因子包括但不限于：白介素 (IL)-1 到 25、干扰素- γ (IFN- γ)、干扰素- α (IFN- α)、干扰素- β (IFN- β)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (G-CSF)、血管内皮抑制素 (endostatin)、血管生成抑制素 (angiostatin)、和血小板反应蛋白 (thrombospondin)。施用所述药剂和 / 或一种或多种免疫调节细胞因子、生长因子、或抗血管生成因子可以是全身的（如静脉内）或局部的，如在外科手术过程中直接注射或灌输入含有癌细胞和 / 或肿瘤浸润白细胞的组织内。所述癌症可以是不限于，血癌、神经癌、黑素瘤、乳癌、肺癌、头颈癌、胃肠癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、泌尿生殖器癌、骨癌、或血管癌。

[0013] 本发明的另一方面是一种抑制 B7-H1 在肿瘤细胞或肿瘤浸润白细胞中表达的方法。本方法包括：(a) 鉴定一个癌症患者，所述癌症包括表达 B7-H1 的靶细胞，所述靶细胞为肿瘤细胞或肿瘤浸润白细胞；和 (b) 在靶细胞中引入：(i) 与 B7-H1 转录子杂交的反义寡核苷酸，所述反义寡核苷酸抑制 B7-H1 在细胞中的表达；或 (ii) B7-H1 干扰 RNA (RNAi)。所述引入步骤可以包括对个体施用反义寡核苷酸或 RNAi 并由靶细胞摄取所述寡核苷酸或

RNAi。可选地,所述引入步骤可以包括对个体施用并由细胞摄取核酸,该核酸包含和反义寡核苷酸互补的核苷酸序列可操作性相连的转录调节元件(TRE)的核酸,在细胞内该核苷酸序列的转录产生反义寡核苷酸。而且,所述引入步骤可以包括对个体施用并由细胞摄取核苷酸:(a)从该核苷酸能在多个TRE的指导下转录RNAi的有义链和反义链;或(b)根据所述核苷酸,在单个TRE的指导下能转录RNAi的有义链和反义链。

[0014] 所述组织样本可以是肺、上皮、结缔、血管、肌肉、神经、骨骼、淋巴、前列腺、宫颈、乳房、脾、胃、肠、口腔、食道、皮肤、肝脏、膀胱、甲状腺、胸腺、肾上腺、脑、胆囊、胰腺、子宫、卵巢或睾丸组织。所述组织也可以是肾脏组织。所述组织癌症可以是任何癌症,并且包括如肾细胞癌。

[0015] 所述个体可以是哺乳动物并包括例如人、非人类灵长类动物(如猴)、马、奶牛(或公牛)、猪、绵羊、山羊、猫、兔子、豚鼠、仓鼠、大鼠、或沙鼠。

[0016] 这里采用的“干扰B7-H1与B7-H1受体之间的相互作用”指(a)完全阻断B7-H1与B7-H1受体之间的物理相互作用,使B7-H1分子与其受体之间基本上没有物理相互作用,或(b)改变B7-H1分子与其受体之间的相互作用,使得物理相互作用不能递送信号到含有B7-H1和/或B7-H1受体的细胞,或递送实质上不影响细胞抗癌活性的信号。

[0017] “多肽”和“蛋白质”交替使用,并指代任何氨基酸的肽键连接链,不论其长度或翻译后修饰。对本发明有益的多肽包括各种与野生型多肽相同但最多有50(如不超过:45;40;35;30;25;20;19;18;17;16;15;14;13;12;11;10;9;8;7;6;5;4;3;2;或1)个保守取代的差别的变体多肽序列。所有必需的是变体多肽有至少20%(如,至少:25;30%;35%;40%;45%;50%;60%;70%;80%;85%;90%;93%;95%;96%;97%;98%;99%;99.5%;99.8%;99.9%;或100%或更多)的野生型多肽的活性。保守取代典型包括在如下组内的取代:甘氨酸和丙氨酸;缬氨酸,异亮氨酸,和亮氨酸;天(门)冬氨酸和谷氨酸;天(门)冬酰胺,谷酰胺,丝氨酸,和苏氨酸;赖氨酸,组氨酸,和精氨酸;以及苯丙氨酸和酪氨酸。

[0018] 这里使用的“肿瘤浸润白细胞”可以是T-淋巴细胞(如CD8⁺T淋巴细胞和/或CD4⁺T淋巴细胞),B淋巴细胞,或其它骨髓品系细胞(包括粒性白细胞(嗜中性粒细胞,嗜曙红细胞,嗜碱性细胞)、单核细胞、巨噬细胞、树状细胞(dendritic cells)(如,交错树状细胞)、组织细胞,和自然杀伤细胞)。

[0019] 除非有其它定义,这里使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员的通常理解相一致。如发生冲突,以本说明书包括定义为准。尽管与这里描述的相似或雷同的方法和材料可以在实践或验证本发明时采用,下文描述了优选方法和材料。所有出版物、专利申请、专利和其它这里提到的参考文献都完整引入以供参考。这里公开的材料,方法,和实施例均仅为说明性的而非用于限定。

[0020] 本发明的其它特征和优点将在后面通过附图和权利要求来描述。

附图说明

[0021] 图1是一系列免疫染色(使用hB7-H1特异抗体)的显微照片(400X放大倍率):有高肿瘤细胞hB7-H1表达的RCC样本(图1A);有高白细胞hB7-H1表达的RCC样本(图1B);在肿瘤细胞或白细胞中均未检测到hB7-H1表达的RCC样本(图1C);和在近端小管中

未检测到 hB7-H1 表达的正常肾脏样本 (图 1D)。

[0022] 图 2 是一系列线图,显示从 196 个个体中采集透明细胞 RCC 样本用于分析,得到的 hB7-H1 表达与 RCC 死亡之间的关联性。

[0023] 图 2A 显示肿瘤或 hB7-H1 表达与 RCC 死亡 (风险率 2.91 ;95 % CI [置信区间] 1.39-6.13 ;p = 0.005) 之间的关联性。肾切除术后 1、2、和 3 年的癌症特异性生存率 (带有标准误差 [SE], 括号内表示仍在危险中的人数) 为 :对带有 $\geq 10\%$ 肿瘤 hB7-H1 表达的样本的个体而言,分别为 87.8% (4.1%, 53), 72.3% (6.0%, 30), 和 63.2% (7.2%, 11) ;而带有 $<10\%$ 肿瘤 hB7-H1 表达的样本的个体,分别为 93.6% (2.3%, 95), 88.4% (3.4%, 48), 和 88.4% (3.4%, 19) ;

[0024] 图 2B 显示调整过评分的白细胞 hB7-H1 表达与死于 RCC (风险率 3.58 ;95 % CI 1.74-7.37 ;p<0.001) 之间的关联性。癌症特异性 1, 2, 和 3 年生存率 (SE, 仍在危险中的人数) 为 :对具有白细胞 hB7-H1 表达分数 ≥ 100 的样本的个体而言,分别为 83.5% (6.2%, 26), 63.9% (9.2%, 13), 和 53.6% (10.2%, 5) ;而带有白细胞 hB7-H1 表达分数 <100 的样本的个体,分别为 93.5% (2.1%, 122), 86.2% (3.3%, 65), 和 84.8% (3.5%, 25)。

[0025] 图 2C 显示高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达与死于 RCC 的关联性 (风险率 4.53 ;95 % CI 1.94-10.56 ;p<0.001)。癌症特异性 1, 2, 和 3 年生存率 (SE, 仍在危险中的人数) 为 :对于带有高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达的样本的个体而言,分别为 87.0% (3.8%, 61), 70.0% (5.8%, 32), 和 61.9% (6.8%, 13) ;而对同时具有 $<10\%$ 肿瘤和 <100 白细胞 (低聚集肿瘤内表达) hB7-H1 表达的样本的个体而言,分别为 94.9% (2.2%, 87), 91.9% (3.1%, 46), 和 91.9% (3.1%, 17)。

[0026] 图 3 是对全长未成熟 hB7-H1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) 的描述,即 hB7-H1 包含大约 22 氨基酸的前导肽 ;

[0027] 图 4 是对编码全长未成熟 B7-H1 的 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :2) 的描述 ;

[0028] 图 5 是对全长未成熟鼠 B7-H1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :3) 的描述 ;

[0029] 图 6 是对编码全长未成熟鼠 B7-H1 的 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :4) 的描述。

具体实施方式

[0030] 本发明公开了具有表达共刺激糖蛋白 hB7-H1 水平升高的肿瘤细胞和 / 或肿瘤浸润白细胞的肾细胞癌 (RCC) 病人中,死于 RCC 的风险增加。而且,肿瘤细胞和 / 或肿瘤浸润白细胞 hB7-H1 表达水平增高与更具侵略性的肿瘤相关,并且这种关联性甚至持续到控制 RCC 进程的常规预测因子之后,包括例如 :肿瘤、结、转移 (TNM) 阶段 ;原始肿瘤尺寸 ;核分级 (nuclear grade) ;和组织学的肿瘤坏死。

[0031] B7-H1 在正常未激活哺乳动物细胞中的表达主要 (如果不是独有的) 限制于巨噬细胞品系的细胞,并且提供可能的调节 T 细胞活性的共刺激信号源。相反,肿瘤细胞内 B7-H1 的异常表达有可能损害 T 细胞的功能和生存,导致宿主抗癌免疫力缺陷。

[0032] 发明人发现人 RCC 肿瘤表达 hB7-H1。特别是发现肾细胞癌 (RCC) 肿瘤和白细胞 RCC 肿瘤均表达 hB7-H1。相反地,肾皮层近端小管,也就是被认为是透明细胞肿瘤的发源地,不表达 hB7-H1。

[0033] 采集来自 196 位 2000 和 2002 年间在获得 Mayo 临床肾切除术登记处 (Mayo

ClinicNephrectomy Registry) 用放射肾摘除术或单侧的保留肾单位手术治疗透明细胞 RCC 病人的临床样本。免疫组织学检测和定量检测样本中的 hB7-H1 表达揭示肿瘤样本显示肿瘤内 hB7-H1 高表达的病人 (由肿瘤细胞单独, 白细胞单独, 或肿瘤和 / 或白细胞合并获得) 有更具侵略性的肿瘤, 并且处于明显增加的死于 RRC 的风险中。

[0034] 增加的肿瘤细胞 hB7-H1 和肿瘤浸润白细胞 hB7-H1 (高聚集肿瘤内 hB7-H1) 的组合比表达 hB7-H1 的肿瘤细胞单独或肿瘤浸润白细胞单独更强烈预示病人的结果。高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达水平也与区域性淋巴结牵连、远距离转移、进级核分级、和组织性肿瘤坏死的存在显著相关。

[0035] 由于能削弱激活的肿瘤特异性 T 细胞的功能和存活率, 肿瘤细胞 (如, RCC 细胞) 或浸润白细胞表达的 B7-H1 与癌症 (如 RCC) 患者体内普遍观察到的免疫抑制相关, 并能作为宿主对用于治疗晚期癌症的免疫疗法的反应的关键决定因素 (如, IL-2, IL-12, IFN- α , 接种疫苗或 T 细胞过继性疗法)。这增加了对癌症患者施用能干扰 B7-H1 与其受体 (如, PD-1) 之间的相互作用的药剂作为一种免疫疗法的可能性, 尤其对先前由于肿瘤内高水平表达 B7-H1, 从而对其它免疫治疗模式没有反应或几乎没有反应的那些病人。

[0036] 这些发现为下面描述的本发明的方法提供了支持。

[0037] 诊断方法

[0038] 本发明提供一种在个体中诊断癌症的方法。所述方法包括: (a) 提供被怀疑有, 或可能将来会有此种组织癌症的个体的组织样本, 所述样本包括测试细胞, 所述测试细胞为组织细胞或浸润组织的白细胞; 和 (b) 评估所述测试细胞是否表达 B7-H1。一些或所有测试细胞表达说明个体患有癌。由于大量癌细胞都在表面上表达 B7-H1, 本发明的方法对诊断任何此类癌症都特别有效。测试细胞可以是, 例如, 乳腺细胞、肺细胞、结肠细胞、胰腺细胞、肾细胞、胃细胞、肝细胞、骨骼细胞、血细胞 (如淋巴样细胞、粒细胞、单核细胞或巨噬细胞)、神经组织细胞、黑素细胞、卵巢细胞、睾丸细胞、前列腺细胞、子宫颈细胞、阴道细胞、膀胱细胞、或其它任何这里列出的细胞。而且, 测试细胞可以是含有任何上面列出的细胞的相关组织中出现的白细胞。组织浸润的淋巴细胞可以是 T 细胞 (CD4⁺T 细胞和 / 或 CD8⁺T 细胞) 或 B 淋巴细胞。此类白细胞也可以是嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞、嗜碱细胞、单核细胞、巨噬细胞、组织细胞、或自然杀伤细胞。个体可以是哺乳动物并且包括, 例如, 人类、非人类灵长类 (如, 猴子、狒狒、或大猩猩)、马、母牛 (或公牛)、猪、绵羊、山羊、猫、家兔、豚鼠、仓鼠、大鼠、沙鼠、或小鼠。

[0039] 如这里描述的, 本发明提供许多诊断优点和用途。本发明的方法中, 可评估 B7-H1 多肽和 / 或 mRNA 水平。评估组织样本中的 B7-H1 水平来诊断, 或来确定获得样本的个体中癌的存在。

[0040] 在组织样本中检测多肽的方法是本领域公知的。例如, 与 B7-H1 特异性表位结合的抗体 (或其片段) 能用来评估组织样本来源的测试细胞是否表达 B7-H1。此类抗体可是是单克隆或多克隆抗体。这类实验中, 抗体本身或与之结合的二抗能被可检测标记。或者抗体能与生物素偶联, 并且可用可检测标记的亲合素 (一种与生物素结合的多肽) 检测生物素化抗体的存在。这些本领域技术人员熟知的方法 (包括“多层夹心实验”) 的组合能用于提高方法的灵敏度。这类蛋白检测实验 (如, ELISA 或 Western 印迹) 中的一些能应用于细胞裂解物, 其它 (如免疫组织学方法或荧光流式细胞分析技术) 能应用于组织学切片或

未裂解的细胞悬液。所述组织样本可以是,如、肺、上皮、关节、血管、肌肉、神经、骨骼、淋巴、前列腺、子宫颈、乳房、脾、胃、肠、口腔、食道、皮肤、肝脏、膀胱、甲状腺、胸腺、肾上腺、脑、胆囊、胰腺、子宫、卵巢或睾丸组织。

[0041] 检测组织样本中 mRNA 的方法是本领域已知的。例如,可裂解细胞并可用各种方法检测裂解物中或来自裂解物的纯化或半纯化的 RNA 中的 mRNA,这些方法包括而限于采用可检测标记的基因特异性 DNA 或 RNA 探针(如,Northern 印迹实验)的杂交实验和使用适当的基因特异性寡核苷酸引物的定量或半定量 RT-PCR 方法。可选地,定量或半定量的原位杂交实验能通过,例如,组织切片或未裂解细胞悬液,和可检测(如,荧光或酶)标记的 DNA 或 RNA 探针来实现。另外的定量 mRNA 的方法包括 RNA 保护实验(RPA)和 SAGE。

[0042] 评估 B7-H1 表达(RNA 和 / 或多肽)的方法可以是定量的,半定量的,或定性的。因此,如,B7-H1 表达水平可以定为一离散值。例如,采用定量 RT-PCR 手段时,B7-H1 mRNA 的表达水平可以通过将从定量实验得到的检测信号与已知浓度的下列检测信号关联而数值化。检测信号为(a) B7-H1 核酸序列(如,B7-H1 cDNA 或 B7-H1 转录子);或(b) 含有编码 B7-H1 的核酸序列的 RNA 或 DNA 的混合物。可选地,B7-H1 表达水平可以采用任何一种本领域公知的半定量 / 定量系统来估计。因此,B7-H1 在细胞或组织样本中的表达水平可以被表述成例如,(a) “极好的”,“好的”,“令人满意的”,“不令人满意的”,和 / 或“少的”中的一个或多个;(b) “非常高”,“高”,“平均”,“低”,和 / 或“非常低”的一个或多个;或(c) “++++”,“+++”,“++”,“+”,“+/-”,和 / 或“-”中的一个或多个。当需要时,B7-H1 在来自个体的组织中的表达水平可以被表述成与来自下列组织的 B7-H1 的表达相关:(a) 已知未患癌的个体组织(如,对侧肾或肺,或未牵连的淋巴结);或(b) 来自一个或多个已知未患感兴趣的癌的个体的对应组织,优选已知未患任何癌。

[0043] 评估标记量的方法依赖于标记的属性并且是本领域公知的。适当的标记包括但不限于,放射性核素(如, ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H ,或 ^{32}P),酶(如,碱性磷酸酶,辣根过氧化物酶,荧光素酶,或 β -半乳糖苷酶),荧光团或蛋白质(如,荧光素,若丹明,藻红蛋白,绿色荧光蛋白(GFP),或蓝色荧光蛋白(BFP)),或发光团(如,Quantum Dot 公司, Palo Alto, CA 提供的 Qdot™ 微粒)。其它可用实验包括定量免疫沉淀反应或补体结合实验。

[0044] 本发明的诊断实验中,当来自个体的表达 B7-H1 的测试细胞的比例高于对照值,诊断个体患有癌。所述对照值可以是如:(a) 在已知未患癌的个体对应组织中表达 B7-H1 的细胞的比例(如,对侧肾或肺,或无关的淋巴结);或(b) 来自一个或多个其它已知未患感兴趣的癌,优选已知未患任何癌的个体的对应组织中表达 B7-H1 细胞的比例。

[0045] 本发明的方法可以单独使用或与其它诊断癌症的方法一同使用。例如,需要或优选的情况下,可以在评估其它有用的诊断癌症标记的分子水平之前、当时、或之后测量癌症或被怀疑是癌症组织的样本的测试细胞中表达 B7-H1 的水平。此类诊断标记可以是不限于肿瘤相关抗原(TAA)。有关的 TAA 包括而限于:癌胚抗原(CEA)、MAGE(黑素瘤抗原)1-4、6 和 12、MUC(粘液素)(如,MUC-1, MUC-2, 等)、酪氨酸酶、MART(黑素瘤抗原)、Pmel17(gp100)、GnT-V 内含子序列(N-乙酰葡萄糖胺转移酶 V 内含子 V 序列)、PSA(前列腺特异性抗原)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、PRAME(黑素瘤抗原)、 β -连环蛋白、MUM-1-B(黑素瘤遍在变异基因产物)、GAGE(黑素瘤抗原)1、BAGE(黑素瘤抗原)2-10、c-ERB2(HER2/neu)、EBNA(EB 病毒核抗原)1-6、gp75, 人乳头瘤病毒(HPV)E6 和 E7、p53m 肺抗性蛋白

(LRP)、Bcl-2、Ki-67、和 VHL(vonHippel-Lindau) 基因。

[0046] 鉴定有可能从免疫疗法中获益的癌症患者的方法

[0047] 本发明的另一方面是一种鉴定免疫疗法的候选者的方法。本方法包括提供来自患所述组织癌症的个体的组织样本。所述组织样本包含测试细胞,所述测试细胞为癌细胞或肿瘤浸润白细胞。评估表达 B7-H1 的组织样本中的测试细胞的水平,由此当 B7-H1 表达在测试细胞中检测不到,或少于测试细胞表达 B7-H1 的免疫抑制阈值水平时,个体更可能从免疫疗法中获益。

[0048] 所述免疫抑制阈值水平是相关表达 B7-H1 的测试细胞的预定水平。当来自感兴趣的癌症患者体内的测试细胞含有的表达 B7-H1 的细胞水平少于表达 B7-H1 细胞的免疫抑制阈值水平时(针对相应癌症预先决定),个体相较患同种癌症但相应测试细胞含有的表达 B7-H1 的细胞水平等于、或大于所述免疫抑制阈值水平的个体更可能从免疫疗法中获益。所述免疫抑制阈值水平可以由进行本领域公知的,如本文所述的统计学诊断分析而得到。

[0049] 评估测试细胞是否表达 B7-H1 的方法与上面在描述诊断方法时提到的一样。此类方法,也如上面描述的,可以是定量、半定量、或定性方法。

[0050] “免疫疗法”可以是主动免疫疗法或被动免疫疗法。对于主动免疫疗法而言,治疗依赖通过施用免疫应答调节剂,在体内刺激内源宿主免疫系统对肿瘤的应答。这类免疫应答调节剂将在下面描述。

[0051] 对被动免疫疗法而言,治疗包括递送带有确定肿瘤免疫反应性的药剂(如免疫效应细胞或抗体),它们能直接或间接介导抗肿瘤效应,而不必需依赖完整的宿主免疫系统。免疫效应细胞的例子包括白细胞,如前面讨论过的肿瘤浸润白细胞、T 淋巴细胞(如 CD8⁺ 细胞杀伤性 T 淋巴细胞和 / 或 CD4⁺T 辅助淋巴细胞)、杀伤细胞(如自然杀伤细胞和淋巴因子活化杀伤细胞)、B 细胞和抗原递呈细胞(如树枝状细胞和巨噬细胞)。

[0052] 免疫疗法也可以是一种或多种下面描述的方法(在“治疗方法”和“抑制 B7-H1 表达的方法”中)。

[0053] 预后方法

[0054] 在另一个实施例中,本发明要求确定癌症患者预后的方法。本方法包括:(a) 提供患有此种组织癌症的个体的组织样本,所述组织样本包括测试细胞,所述测试细胞为癌细胞或肿瘤浸润白细胞;和 (b) 评估组织样本中表达 B7-H1 的测试细胞的水平。当测试细胞的预兆水平,或超过预兆水平表达 B7-H1,此个体比测试细胞表达 B7-H1 水平低于预兆水平的个体更有可能死于此种癌症。所述预兆水平是由本领域公知的统计学临床分析得到的预定值,如本文描述的那些。

[0055] 因此例如,当癌症个体的测试细胞含有显著水平的 B7-H1 表达细胞,但却少于表达 B7-H1 的细胞的预兆水平(针对相应的癌症预先决定)时,癌症患者相较患有同种癌症但它对应测试细胞不含有可检测的表达 B7-H1 细胞的患者更有可能死于这种癌症。另一方面,当癌症患者的测试细胞含有超过预兆水平的表达 B7-H1 的细胞时,癌症患者相较患有同种癌症但对测试细胞不含有可检测到的表达 B7-H1 的细胞或表达 B7-H1 的细胞水平低于表达 B7-H1 的细胞的预兆水平的患者,更有可能死于此种癌症。而且,对于那些在适当的测试细胞群中表达 B7-H1 的细胞水平高于预兆水平的癌症患者,死于这种癌症的机会可能与测试细胞群中表达 B7-H1 的细胞的水平成正比。

[0056] 这里使用的“评估测试细胞是否表达 B7-H1”或“评估组织样本中测试细胞表达 B7-H1 的水平”能通过任何上述方法来决定。预后方法通常是定量的或半定量的。

[0057] 个体可以是任何在“诊断方法”中所列出的并且癌症可以是如下任何一种：肾癌、血癌（如、白血病或淋巴瘤）、神经癌、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、头和颈癌、胃肠癌、肝癌、胰腺癌、泌尿生殖器癌、骨癌、或血管癌。

[0058] 治疗方法

[0059] 本发明也包括一种治疗方法。本方法可以包括：(a) 确定患癌的个体，其中一些或所有癌细胞或一些或所有癌的肿瘤浸润白细胞表达 B7-H1；和 (b) 给个体递送能干扰 B7-H1 与其一类受体发生相互作用的药剂。这些方法可以在任何上述方法之后或单独进行。所述药剂可以是抗体或抗体片段，如与 B7-H1 结合的 Fab', F(ab')₂, 或 scFv 片段。所述药剂也可以是可溶性 B7-H1 或可溶性 B7-H1 的功能片段；B7-H1 的可溶性受体或其可溶性功能片段；与 B7-H1 受体（如 PD-1 受体）结合的抗体或抗体片段。所述 PD-1 受体在美国专利号 6, 808, 710 中有更具体的描述。其公开内容在此完整引入以供参考。

[0060] 在一个实施例中，药剂本身被施用于个体。通常药剂会被悬浮于药物学上可接受的载体（如，生理盐水）中，口腔给药或通过静脉（i. v.）滴注，或皮下、肌肉内、膜内、腹膜内、直肠内、阴道内、鼻内、胃内、气管内、或肺内注射。药剂可以，例如，直接递送到免疫应答位置，如受侵袭组织或器官或脾脏区域内的淋巴结。所需剂量根据选择的给药途径；配方的性质；病人疾病的情况；病人体型、体重、表面积、年龄和性别；施用的其它药物；和主治医生的判断来确定。合适的剂量范围是 0.0001-100.0mg/kg。根据可得的各种不同化合物和不同给药途径的不同效率就能预见所需剂量差异很大。例如，口腔给药预期比通过 i. v. 注射需要更高剂量。这些剂量水平的差异能通过用于优化的标准经验途径进行调整，这对本领域技术人员而言很容易理解。给药可以是单次或多次（如，2-, 3-, 4-, 6-, 8-, 10-, 20-, 50-, 100-, 150-, 或更多次）。将所述化合物封装在合适的递送载体（如，聚合物微颗粒或可植入装置）能增加递送效率，尤其是对口腔递送。

[0061] 可选地，当药剂是多肽时，含有编码多肽的核酸序列的多核苷酸能被递送到哺乳动物的合适细胞中。编码序列的表达可被指向个体体内任何细胞。然而，表达优选被指向在接近排放受感染组织或器官的淋巴组织的细胞内或附近。编码序列的表达可被指向例如包含癌症组织的细胞（如，肿瘤浸润白细胞和肿瘤细胞）或免疫相关细胞，如 B 细胞，巨噬细胞 / 单核细胞，或交错树状细胞内。这可以通过例如使用本领域公知的聚合的生物可降解的微粒或微胶囊递送装置和 / 或组织或细胞特异性抗体来实现。

[0062] 另一种实现核酸摄取的方法是采用能通过标准方法制备的脂质体。所述载体能单独掺入所述递送载体或与组织特异性抗体一同掺入。可选地，可以制备一种由质粒或其他与多-L-赖氨酸通过静电或共价力结合的载体组成的分子。多-L-赖氨酸与能与靶细胞上受体结合的配体结合 [Cristiano 等 (1995), J. Mol. Med. 73:479]。可选地，组织特异性寻靶可以通过采用本领域公知的组织特异性转录调节因子 (TRE) 来实现。递送“裸 DNA”（如，不含递送载体）到肌肉内、皮层内或皮下部位是另外一种实现体内表达的方法。

[0063] 在对应的多核苷酸（如，表达载体）内，编码感兴趣的多肽并带有起始甲硫氨酸和任选的靶向序列的核苷酸与启动子或增强子-启动子组合可操作性连接。短氨基酸序列能作为信号指导蛋白质到达特异性细胞内区室。此类信号序列在美国专利号 5, 827, 516 中具

体描述,其公开内容在此完整引入以供参考。

[0064] 增强子提供在时间,位置,和水平方面的特异性表达。与启动子不同,在有启动子的情况下,当离转录起始位点距离不同时,增强子也能起作用。增强子也可以位于转录起始位点的下游。为了使编码序列位于启动子控制下,必须将肽或多肽的翻译阅读框的转录起始位点置于启动子下游(3')的1-50个核苷酸之间。表达载体的编码序列与转录终止区可操作性连接。

[0065] 合适的表达载体包括质粒和病毒载体,如疱疹病毒、逆转录病毒、痘苗病毒、减毒痘苗病毒、金丝雀痘病毒,腺病毒和腺伴随病毒等。

[0066] 多核苷酸可以药物学上可接受的载体给药。药物学上可接受的载体是生物相容载体,适用于对人类施用,如生理盐水或脂质体。治疗有效量是所述多核苷酸能在接受治疗的个体内产生药学有益结果的量(如减少癌细胞增殖)。如医学领域公知的,任何一位病人的剂量都由许多因素所决定,包括病人的体型、身体表面积、年龄、要施用的特定化合物、性别、给药时间和途径、综合健康、和同时施用的其它药物。剂量会变,但施用多核苷酸的优选剂量是大约 10^6 到 10^{12} 个所述多核苷酸分子的拷贝。该剂量如需要能重复施用。给药途径可以是任何上述列出的途径。

[0067] 此外,所述方法可以是体外过程,包括提供一种重组细胞,或细胞子代,它来自个体并在体外被一个或多个核酸转染或转化,该核酸编码一个或多个能干扰B7-H1和B7-H1受体相互作用的因子,从而使细胞表达该因子;并且对个体施用细胞。所述细胞可以从癌组织中获得(如,肿瘤细胞和/或肿瘤浸润白细胞)或优选来自待施用细胞的个体内或另一个个体的非癌组织。所述细胞的供体和受体可以拥有同样的主要组织相容性复合物(MHC;人体内的HLA)单元型。最优选所述供体和受体是纯合基因型双胞胎或是同样的个体(如,是自体同源的)。所述重组细胞也可以施用于与重组细胞没有或仅有一个、两个、三个、或四个共有MHC分子的受体,如在当受体是严重免疫受损的情况下,在仅可得错配细胞,和/或仅要求或需要短期存活的重组细胞的情况下。

[0068] 药剂的功效可以通过体外和体内试验来评估。简单地,可以测试药剂的如下能力,例如,(a)抑制B7-H1和B7-H1受体之间的相互作用,(b)抑制癌细胞的生长,(c)诱导癌细胞凋亡,或(d)致使癌细胞对白细胞(如,淋巴细胞和/或巨噬细胞)产生的细胞介导的免疫应答更敏感。对体内研究而言,药剂可以例如被注射进动物体内(如小鼠癌症模型)然后评估它对癌症的效果。基于所述结果,可以确定合适的剂量范围和给药途径。

[0069] 如贯穿本申请使用的,术语“抗体”指通过各种本领域公知的方法中的任一种产生的完整抗体(如IgM、IgG、IgA、IgD或IgE)分子。所述抗体可以是多克隆或单克隆抗体。对本发明也有益的是由非-人源(如,小鼠、大鼠、沙鼠或仓鼠)抗体制得的嵌合抗体和人源化抗体。这里采用的术语“抗体片段”指抗原结合性片段,如Fab、F(ab')₂、Fv和单链Fv(scFv)片段。scFv片段是单个多肽链,它同时包括衍生出scFv的抗体的重链和轻链可变区。

[0070] 含有分子的结合域的抗体片段可通过现有技术产生。例如:F(ab')₂片段可以通过胃蛋白酶消化抗体分子制成;Fab片段可以通过还原F(ab')₂片段的二硫键或通过对抗体分子进行木瓜蛋白酶和还原剂处理来制备。见例如,National Institutes of Health, I Current Protocols In Immunology, Coligan 等编 2.8,2.10(Wiley Interscience,

1991)。scFv 片段可以通过,例如在美国专利号 4,642,334 中描述的方法制得,所述美国专利在此完整引入以供参考。

[0071] 嵌合和人源化单克隆抗体可以通过本领域公知的重组 DNA 技术来制成,例如,采用在 Robinson 等,国际专利出版物 PCT/US86/02269;Akira 等,欧洲专利申请 184,187;Taniguchi,欧洲专利申请 171,496;Morrison 等,欧洲专利申请 173,494;Neuberger 等,PCT 申请 W086/01533;Cabilly 等,美国专利号 4,816,567;Cabilly 等,欧洲专利申请 125,023;Better 等,(1988)Science240,1041-43;Liu 等(1987)J. Immunol. 139,3521-26;Sun 等(1987)PNAS84,214-18;Nishimura 等(1987)Canc. Res. 47,999-1005;Wood 等(1985)Nature314,446-49;Shaw 等(1988)J. Natl. Cancer Inst. 80,1553-59;Morrison,(1985)Science229,1202-07;Oi 等(1986)BioTechniques4,214;Winter,美国专利号 5,225,539;Jones 等(1986)Nature321,552-25;Veroeyan 等(1988)Science239,1534;和 Beidler 等(1988)J. Immunol. 141,4053-60 种描述的方法。

[0072] 这里使用的,B7-H1 受体的“功能片段”指 B7-H1 受体的片段,所述片段比野生型成熟 B7-H1 受体小,并且有至少 10% (如至少 10%,至少 20%,至少 30%,至少 40%,至少 50%,至少 60%,至少 70%,至少 80%,至少 90%,至少 95%,至少 98%,至少 99%,或至少 100%或更多)的 B7-H1 的野生型成熟受体与 B7-H1 结合的能力。这里采用的,B7-H1 的“功能片段”指野生型成熟 B7-H1 多肽片段,所述片段比野生型成熟 B7-H1 多肽更小,并且有至少 10% (如,至少 10%,至少 20%,至少 30%,至少 40%,至少 50%,至少 60%,至少 70%,至少 80%,至少 90%,至少 95%,至少 98%,至少 99%,或至少 100%或更多)的野生型成熟 B7-H1 与 B7-H1 受体结合的能力。测试和比较分子间相互结合的能力的方法是本领域公知的。

[0073] 这里采用的,术语“可溶性”将本发明使用的受体与其结合于细胞膜的对应物区分开来。可溶性受体或受体的可溶性功能片段可能包含例如,胞外(配体结合)结构域,但缺乏使受体保持在细胞表面的跨膜区域。制备可溶性受体或其片段的方法是本领域公知的,并且包括例如,在合适的宿主细胞/表达载体系统中表达编码受体胞外域的 DNA 片段。

[0074] 这里使用的术语“治疗”,指对患癌(或怀疑患癌)个体施用药剂,目的是治疗,减轻,缓解,补救,预防,或改善疾病、疾病的症状、疾病继发的疾病阶段、或疾病的易患病体质。治疗剂(或组合物)的“有效量”是能在治疗个体内产生药学上有益结果的药剂(或组合物)的量。本发明的方法可以单独作用或与其它药物或疗法同时作用。

[0075] 这里使用的,“预防”可以指完全预防疾病的症状,延迟疾病症状的出现,或减轻后来发展的疾病症状的严重性。这里采用的“治疗”可以指完全消除疾病的症状或减轻疾病症状的严重性。

[0076] 抑制 B7-H1 表达的方法

[0077] 本发明的另一个方面是抑制 B7-H1 在肿瘤细胞或肿瘤浸润白细胞中的表达。本方法包括:(a) 鉴定一个癌症患者,所述癌症包括表达 B7-H1 的靶细胞,所述靶细胞为肿瘤细胞或肿瘤浸润白细胞;和(b) 在靶细胞中引入:(i) 与 B7-H1 转录子杂交的反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸在细胞中抑制 B7-H1 的表达;或(ii) B7-H1 干扰 RNA(RNAi)。这些方法可以在任何上面描述的方法后使用,或不与任何上述方法一起作用。

[0078] 因此,如上所述,异常 B7-H1 表达损伤肿瘤-特异性 T 细胞的功能和存活,有可能

通过抑制 B7-H1 的细胞内表达,以及通过干扰 B7-H1 与其受体的相互作用,来恢复抗-肿瘤免疫应答。因此,所述方法可能对治疗和 / 或预防任何这里所述的癌症有益。本方法可以用于,例如治疗 RCC。

[0079] 反义化合物通常用来通过例如直接干扰靶 mRNA 分子的翻译,或通过 RNase-H 介导降解靶 mRNA,通过干扰 mRNA 的 5' 加帽,通过由封闭 5' 帽来防止翻译因子与靶 mRNA 结合,或通过抑制 mRNA 聚腺苷酸化而干扰蛋白质表达。干扰蛋白质表达由反义化合物与它的靶 mRNA 杂交开始。选择用来与反义化合物相互作用的感兴趣的靶 mRNA 的特异性靶位点。从而,例如为了调节多聚腺苷酸化,优选的位于 mRNA 靶上的靶位点是聚腺苷酸化信号或聚腺苷酸化位点。为了降低 mRNA 的稳定性或降解,不稳定化序列为优选的靶位点。一旦确定一个或更多靶位点,选择与靶位点充分互补(如,在生理学条件下并具有充分特异性的充分杂交)的寡核苷酸来获得期待效果。

[0080] 与本发明有关的术语“寡核苷酸”指 RNA、DNA、或两者的拟物的寡聚物或多聚物。所述术语包括由天然存在的核碱基、糖和核苷间共价(骨架)键组成的寡核苷酸。RNA 和 DNA 的正常联接或骨架是 3' 到 5' 的磷酸二酯键。所述术语还指完全由(或含有部分)非天然存在的组分的寡核苷酸,它和仅含天然存在组分的寡核苷酸的功能相似。此类修饰取代的寡核苷酸通常因为所期待的性质,例如,增强的细胞摄取量 (cellular uptake)、增强的靶序列亲和力、和增加的核酶存在下的稳定性而优于天然存在的寡核苷酸。对于拟物,核碱基(嘧啶或嘌呤)结构通常被保存,但(1)糖或被修饰或被其它组分取代,和 / 或(2)核碱基间连接键被修改。一类证明为非常有益的核酸拟物称作蛋白质核酸(PNA)。在 PNA 分子内,糖骨架被含有酰胺的骨架,特别是氨基乙基甘氨酸骨架所替换。碱基被保留并与骨架的酰胺部分的氮杂(aza)氮原子直接相连。PNA 和其它本发明中有用的拟物在美国专利号 6,210,289 中详细描述,所述公开在此完整引入以供参考。

[0081] 本发明中使用的反义寡聚物通常由大约 8 到大约 100(如,大约 14 到大约 80 或大约 14 到大约 35)核碱基(或该处为天然存在的核碱基的核苷)组成。

[0082] 反义寡核苷酸本身能被引入含有编码能被引入细胞的反义寡核苷酸的核序列(可以与 TRE 连接)的细胞或表达载体。在后面的例子中,由表达载体产生的寡核苷酸是 RNA 寡核苷酸并且所述 RNA 寡核苷酸完全由天然存在的组分所组成。

[0083] 当施用反义寡核苷酸时,它们可悬浮在药物学上可接受的运载体(如,生理盐水)内,并在与干扰 B7-H1 与 B7-H1 受体之间相互作用的药剂的上述相同条件下施用。

[0084] 当对个体施用含有编码反义寡核苷酸的核序列(可以与 TRE 连接)的表达载体时,编码序列的表达可被靶向个体体内肿瘤浸润白细胞的肿瘤细胞,这是通过任何一种如上描述的针对表达能干扰 B7-H1 与 B7-H1 受体相互作用的多肽的载体的细胞-或组织-靶定技术而实现的。

[0085] 与 B7-H1 DNA 同源的双链干扰 RNA (RNAi) 也可以用来减少 B7-H1 在肿瘤细胞和 / 或肿瘤浸润白细胞的表达。见,如,Fire 等 (1998) Nature 391 :806-811 ;Romano 和 Masino (1992) Mol. Microbiol. 6 :3343-3353 ;Cogoni 等 (1996) EMBO J. 15 :3153-3163 ;Cogoni 和 Masino (1999) Nature 399 :166-169 ;Misquitta 和 Paterson (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96 :1451-1456 ;和 Kennerdell 和 Carthew (1998) Cell 95 :1017-1026。所有这些文章的公开内容都在此完整引入以供参考。

[0086] 能通过采用本领域公知方法的化学合成和酶连接反应分别构建 RNAi 的有义和反义 RNA 链。例如, 每条链可以采用天然存在的核苷酸或各种修饰的核苷酸来化学合成, 这些核苷酸设计用于增加分子的生物稳定性或增加有义和反义链形成的二倍体的物理稳定性, 例如, 硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸。有义或反义链也可用表达载体生物学产生, 其中在表达载体中目标 B7-H1 序列 (全 - 长或片段) 已经以有义或反义方向亚克隆。有义和反义 RNA 链可以在递送 dsRNA 到细胞之前进行体外退火。可选地, 退火可以在有义和反义链相继递送到肿瘤细胞和 / 或肿瘤浸润白细胞之后在体内发生。

[0087] 双链 RNAi 干扰也可以通过将多核苷酸引入肿瘤细胞和 / 或肿瘤浸润白细胞而实现, 有义和反义 RNA 可以在单独启动子的指导下从该多核苷酸转录出来, 或从该多核苷酸能在单个启动子的指导下转录出同时含有有义和反义序列的单个 RNA 分子。

[0088] 应该理解某些药物和小分子也可以用来抑制 B7-H1 在肿瘤细胞和 / 或肿瘤浸润白细胞中的表达。

[0089] 本领域的技术人员能够认识到就上面描述的反义方法而言, RNAi、药物和小分子方法可以是体外或体内的。而且, 递送的方法和条件与针对反义寡核苷酸的那些一样。

[0090] 在上述任何一种抑制 B7-H1 与 B7-H1 受体相互作用以及抑制 B7-H1 表达的方法中, 可使用一种或多种药剂 (如, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 或更多) 包括例如, 抑制化合物、反义寡核苷酸、RNAi、药物或小分子 (或编码它们的载体)。

[0091] 而且, 此类药剂可以与一种或多种 (如, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 或更多) 辅助药剂共同作用, 包括免疫调节细胞因子、生长因子、抗血管生成因子、免疫原性刺激因子、和 / 或对任何这些具有特异性的抗体。此类辅助药物能在递送任何上述列出的药剂之前, 同时, 或之后施用。

[0092] 免疫调节细胞因子、生长因子和抗血管生成因子的例子包括但不限于: 白介素 (IL)-1 到 25 (如, IL-2, IL-12, 或 IL-15), 干扰素 - γ (IFN- γ), 干扰素 - α (IFN- α), 干扰素 - β (IFN- β), 肿瘤坏死因子 - α (TNF- α), 粒细胞巨噬细胞克隆刺激因子 (GM-CSF), 粒细胞巨噬细胞克隆刺激因子 (G-CSF), 内皮抑制素, 血管生成抑制素, 和血小板反应蛋白 (thrombospondin)。免疫调节细胞因子、生长因子、抗血管生成因子包括帮助, 如抑制感染 (如, 标准抗微生物抗生素), 抑制 T 细胞活化, 或抑制 T 细胞活化后果的物质。例如, 当希望减少 Th1- 型免疫应答 (如, 在 DTH 反应中) 时, 可使用细胞因子, 像白介素 (IL)-4、IL-10、或 IL-13 或对 IL-12 或干扰素 - γ (IFN- γ) 等细胞因子特异性的抗体。可选地, 当希望抑制 Th2- 型免疫应答 (如, 在即发型超敏反应) 时, 可使用 IL-12 或干扰素 - γ 这样的细胞因子或对 IL-4、IL-10 或 IL-13 特异性的抗体作为辅助药剂。同样感兴趣的是针对前炎性细胞因子和趋化因子, 如 IL-1、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α), 巨噬细胞炎性蛋白 (MIP)-1、MIP-3 α 、单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1)、上皮中性粒细胞活化肽 -78 (ENA-78)、可诱导干扰素 - γ 蛋白 -10 (IP10)、Rantes 以及任何其它在这里描述的合适的细胞因子或趋化因子有特异性的抗体 (或任何上述抗体片段或衍生物)。

[0093] 在一些实施例中, 可能希望通过施用一种或多种免疫应答调节剂来提高个体的免疫应答。此类免疫应答调节剂除了上述的任何免疫调节细胞因子、生长因子、和血管生长因子以外, 还包括能通过表达于 T 细胞表面的抗原特异性 T 细胞受体 (TCR) 递送的免疫原性

刺激因子。更普遍地,但非必须,此类刺激因子以 TCR 特异性抗原的形式提供。虽然此类抗原通常是蛋白质,它们也可以是碳水化合物、脂类、核酸或组分为 2 种或更多这些分子类型的杂交分子,如糖蛋白或脂蛋白。然而,免疫原性刺激因子也可以由其他激动性 TCR 配体,如 TCR 组分特异性的抗体(如,TCR α -链或 β -链可变区)或对 TCR 结合的 CD3 复合物特异性的抗体提供。用作免疫原性刺激因子的抗原包括位于例如,抗原递呈细胞(APC)(如,树状细胞(DC)、巨噬细胞、单核细胞或 B 细胞)上的同种抗原(如,MHC 同种抗原)。感兴趣的 DC 是交错 DC 而非滤泡状(follicular)DC;滤泡状 DC 递呈抗原到 B 细胞。方便起见,交错 DC 在这被称为 DC。从组织如血液、骨髓、脾或淋巴结中分离 DC 的方法是本领域公知的,正如从此类组织中的前体细胞中体外产生它们的方法一样。

[0094] 也可以作为免疫原性刺激因子的是衍生自它们(见下面)的多肽抗原和肽表位。未加工的多肽被 APC 加工成肽表位并以与 APC 表面的 MHC 分子形成分子复合物的形式被递送到反应性 T 细胞。有用的免疫原性刺激因子还包括一类抗原,如,肿瘤细胞或受所感兴趣的感染性微生物感染的细胞的裂解物。还可用预先接触(如,通过共培养)抗原多肽,此类多肽的肽表位或肿瘤(或感染细胞)的裂解物的 APC(如 DC)作为免疫原性刺激因子。此类 APC 也可以通过与癌细胞或所感兴趣的感染细胞一起培养来用抗原“引发”;所述癌症或感染细胞可选地在引发培养之前进行辐射或加热(如煮沸)。而且,APC(特别是 DC)可以用总 RNA, mRNA, 或单独编码 TAA 的 RNA 来“引发”。

[0095] 可选地,免疫原性刺激因子以细胞形式提供(如,肿瘤细胞或产生所感兴趣抗原的被感染细胞)。而且,免疫原性刺激因子可以通过融合 APC(如,DC)与肿瘤细胞或感兴趣的感染性细胞得到的杂合细胞的形态来提供[Gong 等(2000)Proc. Natl. Acad. Sci. 97(6):2716-2718;Gong 等(1997)自然医药 3(5):558-561;Gong 等(2000)J. Immunol. 165(3):1705-1711]。

[0096] 同样可以用作免疫原性刺激因子的是与衍生自抗原(如肿瘤-相关抗原或由感染微生物产生的抗原)的抗原性肽表位的热休克蛋白[Srivastava(2000)Nature Immunology 1(5):363-366]。感兴趣的热休克蛋白包括但不限于:糖蛋白 96(gp96)、热休克蛋白(hsp)90、hsp70、hsp110、葡萄糖调节的蛋白 170(grp170)和钙网蛋白。免疫原性刺激因子可以包括一种或多种(如,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,更多)分离自肿瘤细胞的热休克蛋白。此类肿瘤优选但非必需来自同样的个体,其中(i)对个体递送干扰 B7-H1 与 B7-H1 受体相互作用的药剂(ii)体内肿瘤细胞或肿瘤浸润白细胞内 B7-H1 的表达受抑制。肿瘤细胞也可以来自例如另外一个患有同样或相关肿瘤类型的个体。可选地,热休克蛋白可以分离自表达由感兴趣的肿瘤细胞得到的转录体的哺乳动物细胞。

[0097] 如上面指出的,本发明中用到的免疫原性刺激因子可以是种类广泛的肿瘤细胞,被肿瘤细胞、杂合细胞“引发”的 APC、或 TAA(见上)、此类 TAA 的肽表位、和被 TAA 或其肽表位“引发”的 APC 中的任何一种。这里使用的,“TAA”是一种肿瘤细胞表达的并且(a)质量上与在正常细胞内表达的对应有差别,或(b)在肿瘤细胞中表达水平高于在正常细胞中的分子(如蛋白质分子)。因此,TAA 可能区别于(如,当分子是蛋白时,为一个或更多氨基酸残基),或可能同于正常细胞中表达的对应有物。优选地是不被正常细胞所表达的。可选地,它在肿瘤细胞中的表达水平至少为在肿瘤细胞中的正常部位的 2-倍更高(如,2-倍,3-倍,5-倍,10-倍,20-倍,40-倍,100-倍,500-倍,1,000-倍,5,000-倍,或 15,000-倍更

高)。相应的 TAA 包括但不限于任何上面列出地 TAA。

[0098] 施用药剂和 / 或一种或多种辅助药剂可以是全身性的 (如, 静脉内) 或局部, 如在外科手术时给药注射或灌注到含有癌细胞和 / 或肿瘤浸润白细胞的组织。施用也可以采用这里引用的任何路径, 剂量, 和时间表。

[0099] 而且, 应该理解上面描述的方法可用于和与本领域公知的各种其他治疗形态中任何一个结合使用, 例如但不限于化学疗法、免疫疗法、放射疗法, 或基因治疗。

[0100] 在抑制 B7-H1 与 B7-H1 受体的方法, 以及抑制 B7-H1 的方法中, 癌症可以是任何这里列出的癌症并且包括, 如, 肾细胞癌。个体可以是哺乳动物并包括, 例如, 人类, 非人类灵长类 (如, 猴子, 狒狒, 或黑猩猩), 马, 母牛 (或公牛), 猪, 绵羊, 山羊, 猫, 兔, 豚鼠, 仓鼠, 大鼠, 沙鼠, 或小鼠。

[0101] 如下实施例是用来举例说明, 非限制本发明。

[0102] 实施例

[0103] 实施例 1. 材料和方法

[0104] 选择患者

[0105] 获得梅奥医学中心公共评估管理委员会 (Mayo Clinic Institutional Review Board) 认可后, 从 Mayo 临床肾切除术登记处确定 429 位 2000 和 2002 年间用放射肾摘除术或单侧的保留肾单位手术治疗的 429 个偶发的透明细胞 RCC 病人。由于 RCC 亚类的病理特征和病人结果差异, 所有分析都仅限定到仅患透明细胞 RCC 病人, 这是最普通的 RCC 亚类 [Cheville 等 (2003) Am. J. Surg. Pathol. 27 :612-624]。由于 hB7-H1- 特异性单克隆抗体 5H1 (如下) 能重复染色新鲜冰冻的但未石蜡固定的组织 [Dong 等 (2002) Nature Med. 8 :793-800], 根据新鲜 - 冷冻组织的可得性选择病人。

[0106] 病理特征

[0107] 检测的病理特征包括组织学亚型, 肿瘤尺寸, 原始肿瘤阶段, 区域性淋巴结牵连, 和肾切除的远距离转移 (2002TNM), 核分级, 和组织学肿瘤坏死。由没有预先知道病人结果的泌尿科病理学家仔细研究样本的显微切片。根据国际抗癌联盟, 美国癌症联合会, 和海德尔堡指导方针对组织学亚型进行分类 [Storkel 等 (1997) Cancer 80 :987-989 ; Kovacs 等 (1997) J. Pathol. 183 :131-133]。采用标准化标准分配核级 [Lohse 等 (2002) Am. J. Clin. Pathol. 118 :877-886]。组织学肿瘤坏死定义为出现任何显微可见的凝固的肿瘤坏死。像透明化、出血和纤维化这样的退行性改变不认为是坏死。

[0108] 免疫组织化学染色肿瘤标本

[0109] 来自 RCC 肿瘤和正常肾皮层样本的冷冻切片 (5 μ m 厚) 安放于 Superfrost Plus 载玻片上, 风干, 并用冰冷的丙酮固定。切片用 Dako 自动染色器 (Autostainer) 和 Dako Cytomation 标记聚合物 (EnVision+) HRP 检测试剂盒™ (Dako ; Carpinteria, 加利福尼亚) 染色。载玻片用 H₂O₂ 封闭 10 分钟, 接下来与初级抗 -B7-H1 抗体在室温下保温 30 分钟。然后在室温下在载玻片上加入偶联有辣根过氧化物酶的二级试剂 (山羊抗 - 小鼠免疫球蛋白), 15 分钟后与显色剂 - 底物共保温 10 分钟。最后, 切片用改良的 Schmidt 氏苏木精反染色 3 分钟。本实验中采用的初级抗体是 5H1, 一种小鼠抗 -hB7-H1 单克隆抗体 [Dong 等 (2002) Nature Med. 8 :793-800]。本实验中良性肾肿瘤和外周 T 细胞没有被染色。hB7-H1 染色的阳性组织对照是人扁桃体组织。无关的同种型匹配的抗体用来作为非特异性染色的

对照。

[0110] hB7-H1 表达的量化

[0111] 没有预先知道病人结果的泌尿科病理学家得出结论,对 hB7-H1 阳性染色的肿瘤细胞和白细胞的百分数定量为 5-10% 的增加。评估白细胞浸润程度并记录为不存在、, 病灶 (离散状淋巴聚集)、中等的, 或显著的。代表白细胞 hB7-H1 表达的调整后的评分由 hB7-H1 阳性染色的白细胞百分数乘以淋巴浸润程度 (0 = 不存在, 1 = 病灶, 2 = 中等的, 3 = 显著的) 计算得到。

[0112] 统计方法

[0113] 采用卡方 (Chi-square)、Fisher 精确和 Wilcoxon 级别和实验 (rank sum test) 来评估病理特征和 hB7-H1 表达之间的比较。癌症特异性存活用 Kaplan-Meier 方法来估计。随访调查的持续时间算成自肾切除手术日起, 至死亡或最后一次随访之日。死亡原因由死亡证明书或医生信件决定。用 hB7-H1 的阳性染色细胞百分比对观察到的存活和由 Cox 比例风险回归模型 (正式名称为 Martingale 残数) 预期的存活之间的差异的散布图 (scatter plots) 确定 hB7-H1 表达的可能分离点 [Therneau 等 (2000) Modeling Survival Data : Extending the Cox Model, 第 1 版 (Springer-Verlag, Ann Arbor), 页 87-92]。采用一元 Cox 比例风险回归模型和每次调整原始肿瘤阶段、区域淋巴结牵连、远距离转移、肿瘤尺寸、核分级和组织学肿瘤坏死这些特征之一之后, 估计这些分离点与死于 RCC 之间的联系。还对 hB7-H1 表达与死于 RCC 之间的关系调节了梅奥医学中心 SSIGN (阶段, 尺寸, 分级和坏死) 分数, 这是特别针对透明细胞 RCC 病人得到预兆复合分数 [Frank 等 (2002) J. Urol. 168 : 2395-2400]。统计学分析采用 SAS 软件包 (SAS 研究院, 卡里, 北卡罗莱纳州) 来进行并且 P 值 < 0.05 被认为统计上显著。

[0114] 实施例 2. 提供新鲜冷冻组织样本的 RCC 病人的存活

[0115] 在符合本实验的 429 位病人中, 196 (46%) 能提供用于实验室研究的新鲜 - 冷冻组织。有新鲜 - 冷冻组织的病人比没有的病人具有更大的肿瘤 (平均肿瘤尺寸 6.0cm 对 5.0cm ; p = 0.008)。然而, 没有其它研究的特征在这两组间有显著差异。进一步, 癌症 - 特异性存活在有和没有新鲜 - 冰冻组织的病人之间没有统计学上显著的差异 (p = 0.314)。

[0116] 最后一轮随访时, 196 位研究病人中 39 位死了, 包括 30 位在肾切除后平均 1.1 年 (范围 0-2.5) 死于透明细胞 RCC 的病人。在这 157 位在最后一轮随访时仍然存活的病人中, 平均随访持续时间为 2.0 年 (范围 0-4.1)。估计的癌症 - 特异性生存率 (标准误差, 仍然存在风险的个数) 在肾切除后第 1, 2, 和 3 年时分别为 91.4% (2.1%, 148), 81.8% (3.3%, 78), 和 77.9% (3.8%, 30)。

[0117] 实施例 3. hB7-H1 在 RCC 肿瘤细胞中的表达与病人结果的相关性

[0118] 对 196 个透明细胞 RCC 样本的免疫组织学染色揭示, 要么 RCC 肿瘤细胞不表达 hB7-H1, 要么 RCC 肿瘤细胞和 / 或 RCC 肿瘤浸润白细胞表达不同程度的 hB7-H1 (表 1 和 2, 以及图 1)。而且, 肾皮层中近端小管被认为是 RCC 肿瘤的发源地, 在所研究的 20 个正常肾皮层样本中都不表达 hB7-H1 (图 1)。

[0119] 研究的 196 个样本中针对 hB7-H1 阳性染色的肿瘤细胞的比例如表 1 所示。肿瘤 hB7-H1 表达对每个病人的预期死亡风险的散布图说明 10% 的分离点对这些数据而言是合适的。有 73 (37.2%) 位病人的样本具有 $\geq 10\%$ 的肿瘤细胞 hB7-H1 表达。

[0120] 表 1. 196 个透明细胞 RCC 样本中肿瘤 hB7-H1 表达的百分数

[0121]	% hB7-H1 表达草药	N(%)
[0122]	0	66 (33.7)
[0123]	5	57 (29.1)
[0124]	10	27 (13.8)
[0125]	15	4 (2.0)
[0126]	20	15 (7.7)
[0127]	25	3 (1.5)
[0128]	30	6 (3.1)
[0129]	40	2 (1.0)
[0130]	50	4 (2.0)
[0131]	60	3 (1.5)
[0132]	70	3 (1.5)
[0133]	80	2 (1.0)
[0134]	90	3 (1.5)
[0135]	100	1 (0.5)

[0136] 表 2. 在 196 个透明细胞 RCC 样本中白细胞 hB7-H1 表达的调整后的分数

[0137]	白细胞渗透 *	% hB7-H1 表达	调整后分数	N(%)
[0138]	0	0	0	81 (41.3)
[0139]	1	5	5	4 (2.0)
[0140]	1	10	10	1 (0.5)
[0141]	1	30	30	2 (1.0)
[0142]	1	50	50	4 (2.0)
[0143]	1	60	60	3 (1.5)
[0144]	1	70	70	22 (11.2)
[0145]	1	80	80	12 (6.1)
[0146]	1	90	90	10 (5.1)
[0147]	2	5	10	3 (1.5)
[0148]	2	10	20	4 (2.0)
[0149]	2	20	40	2 (1.0)
[0150]	2	30	60	2 (1.0)
[0151]	2	50	100	6 (3.1)
[0152]	2	60	120	1 (0.5)
[0153]	2	70	140	9 (4.6)
[0154]	2	80	160	7 (3.6)
[0155]	2	90	180	8 (4.1)
[0156]	3	5	15	1 (0.5)
[0157]	3	20	60	1 (0.5)
[0158]	3	30	90	4 (2.0)

[0159]	3	70	210	2(1.0)
[0160]	3	80	240	4(2.0)
[0161]	3	90	270	2(1.0)
[0162]	3	100	300	1(0.5)

[0163] * 白细胞浸润程度记为 0 = 不存在, 1 = 以病灶存在, 2 = 中等存在, 或者 3 = 显著存在。

[0164] 用单变量, 并且调节 TNM 阶段、肿瘤尺寸、核级和组织学肿瘤坏死之后的肿瘤 hB7-H1 表达与死于 RCC 的关联如表 3 所示。使用单变量, 有 $\geq 10\%$ 肿瘤 hB7-H1 表达样本的病人死于 RCC 的概率接近 3 倍于有 $<10\%$ 表达的样本的病人 (风险率 2.91 ;95% CI 1.39-6.13 ;p = 0.005 ;图 2A)。在多变量分析中, 即使在调整了原始肿瘤阶段、远距离转移或原始肿瘤尺寸之后, 有 $\geq 10\%$ 肿瘤 hB7-H1 表达样本的病人仍然更显著可能死于 RCC。

[0165] 表 3. 在 196 个透明细胞 RCC 样本中 hB7-H1 表达与死于 RCC 之间的关联

[0166]	肿瘤 hB7-H1 表达 $\geq 10\%$	风险率 (95% CI)*	P- 值
[0167]	单变量模型	2.91 (1.39-6.13)	0.005
[0168]	调整为 :		
[0169]	2002 原始肿瘤阶段 (T)	2.83 (1.34-5.96)	0.006
[0170]	区域淋巴结牵连 (N)	1.97 (0.87-4.45)	0.103
[0171]	远端转移 (M)	2.24 (1.06-4.73)	0.035
[0172]	原始肿瘤尺寸	2.88 (1.37-6.06)	0.005
[0173]	核分级	1.96 (0.90-4.30)	0.092
[0174]	组织学肿瘤坏死	1.69 (0.78-3.65)	0.183
[0175]	白细胞 hB7-H1 表达 ≥ 100		
[0176]	单变量模型	3.58 (1.74-7.37)	<0.001
[0177]	调整为 :		
[0178]	2002 原始肿瘤阶段 (T)	3.34 (1.62-6.90)	0.001
[0179]	区域淋巴牵连 (N)	3.59 (1.74-7.41)	<0.001
[0180]	远端转移 (M)	2.16 (1.03-4.53)	0.042
[0181]	原始肿瘤尺寸	2.64 (1.27-5.46)	0.009
[0182]	核分级	3.03 (1.46-6.29)	0.003
[0183]	组织学肿瘤坏死	2.87 (1.39-5.95)	0.004
[0184]	高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达		
[0185]	单变量模型	4.53 (1.94-10.56)	<0.001
[0186]	调整为 :		
[0187]	2002 原始肿瘤阶段 (T)	4.07 (1.74-9.51)	0.001
[0188]	区域淋巴结牵连 (N)	3.36 (1.39-8.16)	0.007
[0189]	远端转移 (M)	3.12 (1.32-7.38)	0.009
[0190]	原始肿瘤尺寸	4.25 (1.82-9.91)	<0.001
[0191]	核级	3.09 (1.28-7.50)	0.012
[0192]	组织学肿瘤坏死	2.68 (1.12-6.42)	0.027

[0193] * 风险率表示单变量地或经过多变量调整后,在列出的特征情况下死于透明细胞 RCC 的风险。

[0194] 例如,即使在调整原始肿瘤尺寸 ($p = 0.005$) 之后,有 $\geq 10\%$ 肿瘤 hB7-H1 表达样本的病人死于 RCC 的概率是有 $<10\%$ 表达的样本的病病人的 2.9 倍。

[0195] 白细胞 hB7-H1 表达调整后的分数如表 2 所示。有 40 (20.4%) 个样本调整后的白细胞 hB7-H1 分数为 100 或更高 (本质上中等或显著白细胞浸润,具有至少 50% 白细胞 hB7-H1 染色阳性),这看起来是检测并说明该特征与病人结果之间关联的合理分离点。白细胞 hB7-H1 表达与死于 RCC 的关联如表 3 所示。使用单变量,具有调整后的白细胞 hB7-H1 分数 ≥ 100 的样本的病人死于 RCC 的概率为具有分数 <100 的样本的病病人的 3.6 倍 (风险率 3.58 ;95% CI1.74-7.37 ; $p < 0.001$;图 2B)。即使在对于 TNM 阶段、原始肿瘤尺寸核分级或组织学肿瘤坏死调节之后,具有显示白细胞 hB7-H1 表达高水平的样本的病人显著地更可能死于 RCC。

[0196] 由于用单变量和随后多变量调节,得到肿瘤和白细胞 hB7-H1 表达都与病人结果显著相关,将这两个特征组合起来进行评估。有 87 (44.4%) 个样本有 $\geq 10\%$ 的肿瘤 hB7-H1 表达或者有调整后的白细胞 hB7-H1 表达分数 ≥ 100 (如,高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达)。样本中 26 (13.3%) 个同时具有两种特征。相反地,109 (55.6%) 个样本的肿瘤 hB7-H1 表达 $<10\%$,并且白细胞 hB7-H1 表达 <100 (即,低聚集肿瘤内 hB7-H1 表达)。这种组合特征与死于 RCC 的关联如表 3 所示。使用单变量,带有高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达的样本的病人死于 RCC 的概率为同时带有 $<10\%$ 肿瘤表达和 <100 白细胞表达的样本的病病人的 4.5 倍 (风险率 4.53 ;95% CI1.94-10.56 ; $p < 0.001$)。在调整梅奥医学中心 SSIGN 分数之后,带有高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达的样本的病人死于 RCC 的概率仍然是带有低聚集肿瘤内 hB7-H1 的病病人的超过 2 倍,尽管差异并不统计学上显著 (风险率 2.19 ;95% CI0.91-5.24 ; $p = 0.079$)。然而,在一次对 TNM 阶段、原始肿瘤尺寸、核级和组织学肿瘤坏死中一个特征调整之后,带有高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达的样本的病人显著的更可能死于 RCC。我们也研究了肿瘤和白细胞 hB7-H1 表达的组合与研究的病理学特征之间的关联。高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达水平与区域淋巴结牵连,远距离转移、高核分级和组织学肿瘤坏死的存在显著相关 (表 4)。

[0197] 表 4. 在 196 个透明细胞 RCC 样本中肿瘤和白细胞 hB7-H1 表达与病理特征的关联

[0198]	高聚集肿瘤内 hB7-H1 表达		P- 值
	[0199] 否	是	
[0200]	N = 109	N = 87	
[0201]	N (%)		
[0202] 2002 原始肿瘤阶段			
[0203] pT1 和 pT2	88 (80.7)	62 (71.3)	0.120
[0204] pT3 和 pT4	21 (19.3)	25 (28.7)	
[0205] 区域淋巴结牵连			
[0206] pNx 和 pN0	108 (99.1)	76 (87.4)	<0.001
[0207] pN1 和 pN2	1 (0.9)	11 (12.6)	
[0208] 远端转移			
[0209] pM0	99 (90.8)	69 (79.3)	0.022

[0210]	pM1	10 (9.2)	18 (20.7)	
[0211]	原始肿瘤尺寸			
[0212]	<5cm	46 (42.2)	25 (28.7)	0.051
[0213]	≥ 5cm	63 (57.8)	62 (71.3)	
[0214]	核分级			
[0215]	1 和 2	69 (63.3)	23 (26.4)	<0.001
[0216]	3	36 (33.0)	50 (57.5)	
[0217]	4	4 (3.7)	14 (16.1)	
[0218]	组织学肿瘤坏死			
[0219]	无	94 (86.2)	55 (63.2)	<0.001
[0220]	有	15 (13.8)	32 (36.8)	

[0221] 已经描述了本发明的数个实施例。然而,应该理解可以在不背离本发明精神和范围的前提下进行各种修改。由此,其他的实施方式也属于权利要求的范围内。

[0001]

序列表

<110> 梅约医学教育与研究基金会 (Mayo Foundation for Medical Education and Research)

<120> B7-H1 和癌症的诊断、预后和治疗方法

<130> 07039-562W01

<140> PCT/US2005/036431

<141> 2005-10-06

<150> US 60/616,590

<151> 2004-10-06

<150> US 60/642,794

<151> 2005-01-11

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 290

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1           5           10           15
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
           20           25           30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
           35           40           45
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
           50           55           60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
           65           70           75           80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
           85           90           95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
           100          105          110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
           115          120          125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
           130          135          140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
           145          150          155          160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
           165          170          175
Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
           180          185          190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
           195          200          205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
           210          215          220

```


Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp
 130 135 140
 Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
 145 150 155 160
 Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly
 165 170 175
 Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val
 180 185 190
 Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys
 195 200 205
 Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile
 210 215 220
 Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp
 225 230 235 240
 Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val
 245 250 255
 Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys
 260 265 270
 Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290

<210> 4

<211> 870

<212> DNA

<213> 小鼠 (*Mus musculus*)

<400> 4

atgaggatat ttgctggcat tatattcaca gcttctgtc acttgctacg ggcgtttact 60
 atcacggctc caaaggactt gtacgtgggt gagtatggca gcaacgtcac gatggagtgc 120
 agattccctg tagaacggga gctggacctg cttgcgtag tgggtgtactg ggaaaaggaa 180
 gatgagcaag tgattcagtt tgtggcagga gaggaggacc ttaagcctca gcacagcaac 240
 ttcaggggga gagcctcgt gccaaaggac cagcttttga agggaaatgc tgccttcag 300
 atcacagacg tcaagctgca ggacgcaggc gtttactgct gcataatcag ctacggtggt 360
 gcggactaca agcgaatcac gctgaaagtc aatgccccat accgaaaat caaccagaga 420
 atttccgtgg atccagccac ttctgagcat gaactaatat gtcaggccga gggttatcca 480
 gaagctgagg taatctggac aaacagtac caccaacccg tgagtgggaa gagaagtgtc 540
 accacttccc ggacagaggg gatgcttctc aatgtgacca gcagtctgag ggtcaacgcc 600
 acagcgaatg atgttttcta ctgtacgttt tggagatcac agccagggca aaaccacaca 660
 gcggagctga tcateccaga actgcctgca acacatctc cacagaacag gactcactgg 720
 gtgcttctgg gatccatcct gttgttctc attgtagtgt ccacggtcct cctcttcttg 780
 agaaaacaag tgagaatgct agatgtggag aatgtggcg ttgaagatac aagctcaaaa 840
 aaccgaaatg atacacaatt cgaggagacg 870

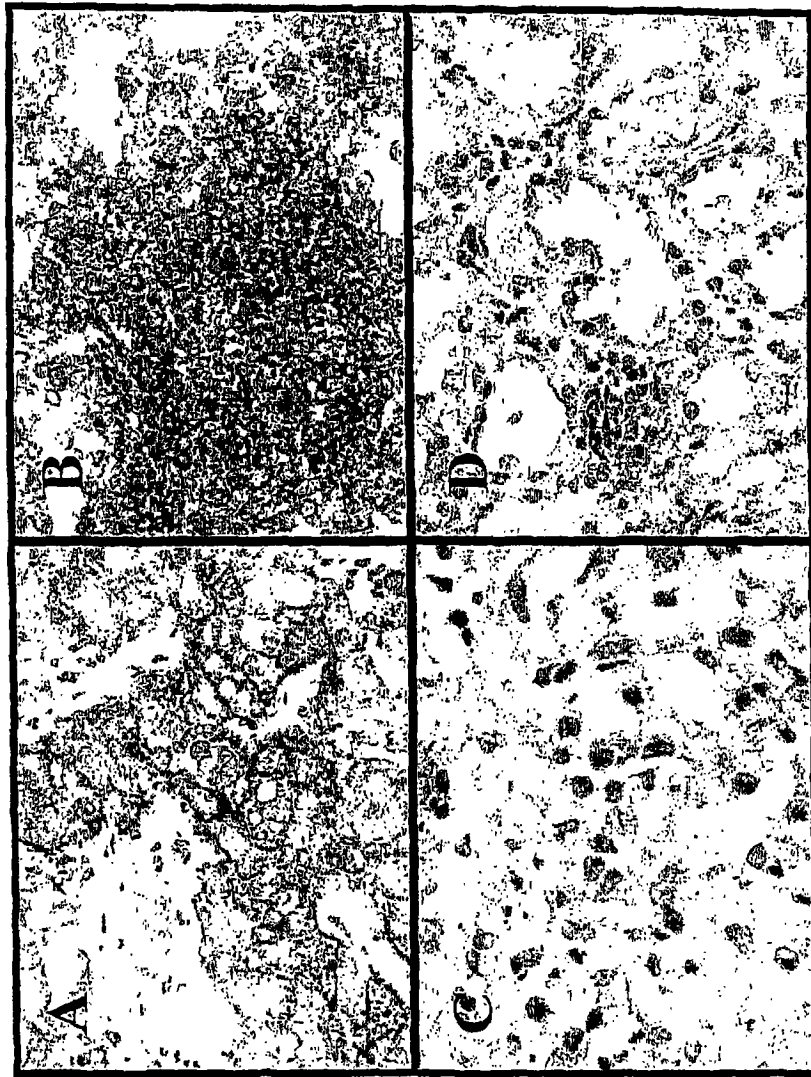


图 1

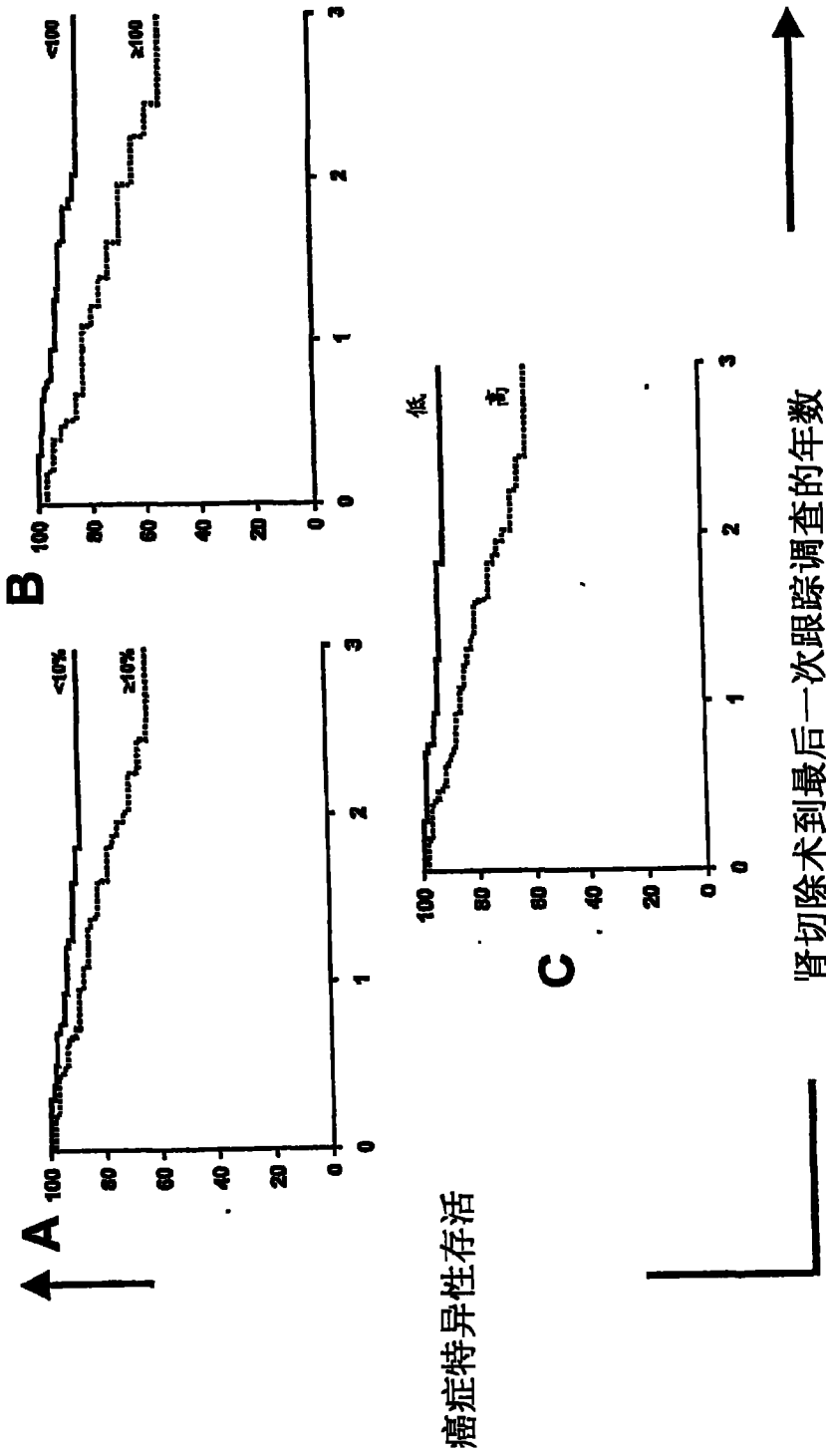


图 2

MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIV
 YWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQD
 AGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPK
 AEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEE
 NHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGI
 QDTNSKKQSDTHLEET

图 3

ATGAGGATATTTGCTGTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGCTGAACGC
 ATTTACTGTCACGGTTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATA
 TGACAATTGAATGCAAATCCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCACT
 AATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATTCAATTTGTGCATGGA
 GAGGAAGACCTGAAGGTTGAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTG
 TTGAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGA
 AATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGCCGA
 CTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCATACAACAAAATCAACCAA
 AGAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGC
 TGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAGTGACCATCAAGTC
 CTGAGTGGTAAGACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAGCTTTTCA
 ATGTGACCAGCACACTGAGAATCAACACAACAACTAATGAGATTTTCTACTG
 CACTTTTAGGAGATTAGATCCTGAGGAAAACCATACAGCTGAATTGGTCATC
 CCAGAACTACCTCTGGCACATCCTCAAATGAAAGGACTCACTTGGTAATTCT
 GGGAGCCATCTTATTATGCCTTGGTGTAGCACTGACATTCATCTCCGTTTAA
 GAAAAGGGAGAATGATGGATGTGAAAAAATGTGGCATCCAAGATACAAACT
 CAAAGAAGCAAAGTGATACACATTTGGAGGAGACG

图 4

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVV
 YWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDA
 GUYCCIISYGGADYKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVI
 WTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQN
 HTAELIPELPAHPNQNRTHWVLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGV
 EDTSSKNRNDTQFEET

图 5

ATGAGGATATTTGCTGGCATTATATTCACAGCCTGCTGTCACTTGCTACGGGC
GTTTACTATCACGGCTCCAAAGGACTTGTACGTGGTGGAGTATGGCAGCAAC
GTCACGATGGAGTGCAGATTCCCTGTAGAACGGGAGCTGGACCTGCTTGCCT
TAGTGGTGTACTGGGAAAAGGAAGATGAGCAAGTGATTTCAGTTTGTGGCAGG
AGAGGAGGACCTTAAGCCTCAGCACAGCAACTTCAGGGGGAGAGCCTCGCT
GCCAAAGGACCAGCTTTTGAAGGGAAATGCTGCCCTTCAGATCACAGACGTC
AAGCTGCAGGACGCAGGCGTTTACTGCTGCATAATCAGCTACGGTGGTGCGG
ACTACAAGCGAATCACGCTGAAAGTCAATGCCCCATACCGCAAAATCAACCA
GAGAATTTCCGTGGATCCAGCCACTTCTGAGCATGAACTAATATGTCAGGCC
GAGGGTTATCCAGAAGCTGAGGTAATCTGGACAAACAGTGACCACCAACCCG
TGAGTGGGAAGAGAAGTGTCAACCACTTCCCGGACAGAGGGGATGCTTCTCAA
TGTGACCAGCAGTCTGAGGGTCAACGCCACAGCGAATGATGTTTTCTACTGT
ACGTTTTGGAGATCACAGCCAGGGCAAACACACAGCGGAGCTGATCATCC
CAGAACTGCCTGCAACACATCCTCCACAGAACAGGACTCACTGGGTGCTTCT
GGGATCCATCCTGTTGTTTCTCATTGTAGTGTCCACGGTCCTCCTCTTCTIGAG
AAAACAAGTGAGAATGCTAGATGTGGAGAAATGTGGCGTTGAAGATACAAG
CTCAAAAACCGAAATGATACACAATTCGAGGAGACG

图 6

专利名称(译)	B7-H1和癌症的诊断、预后和治疗方法		
公开(公告)号	CN101084438B	公开(公告)日	2013-12-25
申请号	CN200580041568.7	申请日	2005-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	梅约医学教育与研究基金会		
申请(专利权)人(译)	梅约医学教育与研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	梅约医学教育与研究基金会		
[标]发明人	L程 SE斯壮姆 ED权		
发明人	L·程 S·E·斯壮姆 E·D·权		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566 G01N33/567 A61K39/395		
优先权	60/642794 2005-01-11 US 60/616590 2004-10-06 US		
其他公开文献	CN101084438A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种通过在有或怀疑有癌症的个体组织中评估B7-H1表达的
诊断方法，施用能干扰B7-H1-受体相互作用的药物的治疗方法，选择
能从癌症免疫疗法中获益的候选个体的方法，和抑制B7-H1表达的方
法。

序列表

```

-110> 梅约医学教育与研究基金会 (Mayo Foundation for Medical Education and Research)
-120> B7-H1 和癌症的诊断、预后和治疗方法
-130> 07039-562M01
-140> ECT/US2005/036431
-141> 2005-10-06
-150> US 60/616,590
-151> 2004-10-06
-150> US 60/642,794
-151> 2005-01-11
-160> 4
-170> FastSEQ for Windows Version 4.0
-210> 1
-211> 290
-212> DWT
-213> 智人 (Homo sapiens)
-400> 1
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 15
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

```