



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111148518 A

(43)申请公布日 2020.05.12

(21)申请号 201880033988.8

S·S·麦卡利斯特

(22)申请日 2018.03.28

(72)发明人 S·古伊尔 J·赵 H-J·金

(30)优先权数据

M·德科里斯托

62/478,909 2017.03.30 US

S·S·麦卡利斯特

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

2019.11.22

11517

(86)PCT国际申请的申请数据

代理人 吴瑜 黄遵玲

PCT/US2018/024818 2018.03.28

(51)Int.Cl.

(87)PCT国际申请的公布数据

A61K 31/7088(2006.01)

W02018/183479 EN 2018.10.04

A61K 38/16(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

(71)申请人 丹娜法伯癌症研究院

地址 美国马萨诸塞州

申请人 布列根和妇女医院有限公司

S·古伊尔 J·赵 H-J·金

M·德科里斯托

权利要求书6页 说明书103页 附图40页

(54)发明名称

使用CDK4/6抑制剂调控调节性T细胞和免疫应答的方法

(57)摘要

本发明部分地基于使用CDK4/6抑制剂调控调节性T细胞和免疫应答的方法。

1. 一种选择性地减少受试者中的循环调节性T细胞(Treg)的数量的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的至少一种选择性地抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的剂,使得所述受试者中的Treg的数量选择性地减少。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述Treg包括CD4+CD25+、CD4+FOXP3+和/或CD4+CD25+FOXP3+Treg。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述至少一种剂显著减少所述受试者的脾脏中的所述Treg的数量。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂显著减少所述受试者的淋巴结中的所述Treg的数量。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著影响所述受试者中的初始CD4+T细胞向Treg的分化。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著影响所述受试者中的Treg细胞凋亡。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著改变选自B淋巴细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞和单核细胞的至少一种细胞类型的细胞数量。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂降低所述受试者中的Treg与CD3+T细胞的比率和/或Treg与CD8+T细胞的比率。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著调控CD8+T细胞和/或CD4+CD25-T细胞的数量。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂降低选自PD-1、TIM-3、CTLA-4和LAG3中的至少一种标志物在CD4+和/或CD8+T细胞表面上的表达。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的抗原呈递。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的MHC I类表达。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的T细胞介导的细胞毒性。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的干扰素产生、信号传导和/或分泌。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的III型干扰素产生。

16. 如权利要求14所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的选自STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2和MDA5的至少一种基因的表达。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂抑制所述受试者中的至少一种DNA甲基转移酶(DNMT)。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述至少一种剂抑制所述受试者中的DNMT1表达。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著增强所述受试

者中的衰老相关分泌表型 (SASP)。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂选自:小分子CDK4拮抗剂、结合CDK4的阻断性胞内抗体或抗体、CDK4的非活化形式、CDK4天然结合配偶体的可溶形式、CDK4融合蛋白、阻断CDK4转录或翻译的核酸分子、小分子CDK6拮抗剂、识别CDK6的阻断性胞内抗体或抗体、CDK6的非活化形式、CDK6天然结合配偶体的可溶形式、CDK6融合蛋白,以及阻断CDK6转录或翻译的核酸分子。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的小分子。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述小分子选自玻玛西尼、帕博西尼和瑞博西尼。

23. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的RNA干扰剂。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述RNA干扰剂是小干扰RNA (siRNA)、小发夹RNA (shRNA)、微小RNA (miRNA) 或piwiRNA (piRNA)。

25. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括与CDK4和/或CDK6互补的反义寡核苷酸。

26. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的肽或肽模拟物。

27. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的适体。

28. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂是特异性地结合CDK4和/或CDK6的胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段是鼠的、嵌合的、人源化的或人的。

30. 如权利要求28或29所述的方法,其中所述胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段被可检测地标记,包含效应子结构域,包含Fc结构域,和/或选自Fv、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双链抗体片段。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂以药学上可接受的制剂施用。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的方法,其中所述受试者具有将受益于免疫应答的上调的疾患。

33. 如权利要求32所述的方法,其中所述受试者具有选自癌症、病毒感染、细菌感染、原生动感染、蠕虫感染、与气道耐受性受损相关联的哮喘和免疫抑制性疾病的疾患。

34. 如权利要求33所述的方法,其中所述疾患是癌症。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌和/或结肠直肠癌。

36. 如权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述受试者的免疫细胞、Treg或癌细胞中的至少一些表达Rb和/或具有功能性Rb信号传导。

37. 如权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述受试者的免疫细胞、Treg或癌细胞中的至少一些具有有缺陷的Rb表达和/或有缺陷的Rb信号传导。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述受试者的Treg或癌细胞中的至少一些具有引

起有缺陷的Rb表达和/或有缺陷的Rb信号传导的基因组突变。

39. 如权利要求33-38中任一项所述的方法,其中所述疾患对免疫检查点阻断具有抗性。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的所述受试者的细胞、免疫细胞、Treg或癌细胞对免疫检查点阻断的敏感性。

41. 如权利要求33-40中任一项所述的方法,其中至少一种剂:

- a) 增加所述受试者中的癌症浸润CD3+T细胞的数量;
- b) 增加所述受试者中的癌细胞的抗原呈递;
- c) 增加所述受试者中的癌细胞的MHC I类表达;
- d) 增加所述受试者中的癌细胞的干扰素产生、信号传导和/或分泌;
- e) 增加所述受试者中的癌细胞的III型干扰素产生、信号传导和/或分泌;
- f) 增加所述受试者中的癌细胞对选自STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2和MDA5的至少一种基因的表达;
- g) 抑制所述受试者中的癌细胞对至少一种DNA甲基转移酶(DNMT)的表达;和/或
- h) 抑制所述受试者中的癌细胞对DNMT1表达的表达。

42. 如权利要求1-41中任一项所述的方法,所述方法还包括施用一种或多种上调免疫应答的附加的剂或疗法。

43. 如权利要求42所述的方法,其中所述一种或多种附加的剂或疗法选自免疫疗法、疫苗、化学疗法、辐射、表观遗传修饰剂和靶向疗法。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述免疫疗法选自免疫检查点抑制剂疗法、致敏抗原呈递细胞、溶瘤病毒、包含抗癌基因的表达载体,以及癌症抗原或疾病抗原的抑制剂。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂疗法包括减少或抑制所述受试者中的选自CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPα(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR的免疫检查点分子的表达和/或功能。

46. 如权利要求45所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂疗法靶向选自PD-1、CTLA-4、PD-L1、PD-L2以及它们的组合的免疫检查点。

47. 如权利要求42-46中任一项所述的方法,其中在施用所述一种或多种上调所述免疫应答的附加的剂或疗法之前施用所述至少一种剂,任选地其中预先施用所述至少一种剂,随后接着施用所述至少一种剂和所述一种或多种上调所述免疫应答的附加的剂或疗法的组合。

48. 如权利要求1-47中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述哺乳动物是所述疾患的动物模型。

50. 如权利要求48所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

51. 一种上调有需要的受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用以下的组合:i) 治疗有效量的至少一种选择性地抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的剂,和ii) 免疫疗法,使得所述受试者中的免疫应答上调。

52. 如权利要求51所述的方法,其中所述受试者具有选自癌症、病毒感染、细菌感染、原生动植物感染、蠕虫感染、与气道耐受性受损相关联的哮喘和免疫抑制性疾病的疾患。

53. 如权利要求52所述的方法,其中所述疾患是癌症。

54. 如权利要求53所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌和/或结肠直肠癌。

55. 如权利要求51-54中任一项所述的方法,其中所述受试者的免疫细胞、Treg或癌细胞中的至少一些表达Rb和/或具有功能性Rb信号传导。

56. 如权利要求51-54中任一项所述的方法,其中所述受试者的免疫细胞、Treg或癌细胞中的至少一些具有有缺陷的Rb表达和/或有缺陷的Rb信号传导。

57. 如权利要求56所述的方法,其中所述受试者的Treg或癌细胞中的至少一些具有引起有缺陷的Rb表达和/或有缺陷的Rb信号传导的基因组突变。

58. 如权利要求52-57中任一项所述的方法,其中所述疾患对免疫检查点阻断具有抗性。

59. 如权利要求58所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的所述受试者的细胞、免疫细胞、Treg或癌细胞对免疫检查点阻断的敏感性。

60. 如权利要求51-59中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂:

a) 增加所述受试者中的癌症浸润CD3+T细胞的数量;

b) 增加所述受试者中的癌细胞的抗原呈递;

c) 增加所述受试者中的癌细胞的MHC I类表达;

d) 增加所述受试者中的癌细胞的干扰素产生、信号传导和/或分泌;

e) 增加所述受试者中的癌细胞的III型干扰素产生、信号传导和/或分泌;

f) 增加所述受试者中的癌细胞对选自STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2和MDA5的至少一种基因的表达;

g) 抑制所述受试者中的癌细胞对至少一种DNA甲基转移酶(DNMT)的表达;和/或

h) 抑制所述受试者中的癌细胞对DNMT1表达的表达。

61. 如权利要求51-60中任一项所述的方法,其中在施用所述免疫疗法之前施用所述至少一种剂,任选地其中预先施用所述至少一种剂,随后接着施用所述至少一种剂和所述免疫疗法的组合。

62. 如权利要求51-61中任一项所述的方法,其还包括施用一种或多种上调免疫应答的附加的剂或疗法。

63. 如权利要求62所述的方法,其中所述一种或多种附加的剂或疗法选自疫苗、化学疗法、辐射、表观遗传修饰剂和靶向疗法。

64. 如权利要求51所述的方法,其中所述免疫疗法选自免疫检查点抑制剂疗法、致敏抗原呈递细胞、溶瘤病毒、包含抗癌基因的表达载体,以及癌症抗原或疾病抗原的抑制剂。

65. 如权利要求64所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂疗法包括减少或抑制所述受试者中的选自CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR的免疫检查点分子的表达和/或功能。

66. 如权利要求65所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂疗法靶向选自PD-1、CTLA-4、PD-L1、PD-L2以及它们的组合的免疫检查点。

67. 如权利要求51-66中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂显著减少所述受试者的脾脏中的Treg的数量。

68. 如权利要求51-67中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂显著减少所述受试者的淋巴结中的Treg的数量。

69. 如权利要求51-68中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著影响所述受试者中的初始CD4+T细胞向Treg的分化。

70. 如权利要求51-69中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著影响所述受试者中的Treg细胞凋亡。

71. 如权利要求51-70中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著改变选自B淋巴细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞和单核细胞的至少一种细胞类型的细胞数量。

72. 如权利要求51-71中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂降低所述受试者中的Treg与CD3+T细胞的比率和/或Treg与CD8+T细胞的比率。

73. 如权利要求67-72中任一项所述的方法,其中所述Treg包括CD4+CD25+、CD4+FOXP3+和/或CD4+CD25+FOXP3+Treg。

74. 如权利要求51-73中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著调控CD8+T细胞和/或CD4+CD25-T细胞的数量。

75. 如权利要求51-74中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂降低选自PD-1、TIM-3、CTLA-4和LAG3中的至少一种标志物在CD4+和/或CD8+T细胞表面上的表达。

76. 如权利要求51-75中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的抗原呈递。

77. 如权利要求51-76中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的MHC I类表达。

78. 如权利要求51-77中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的T细胞介导的细胞毒性。

79. 如权利要求51-78中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的干扰素产生、信号传导和/或分泌。

80. 如权利要求79所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的III型干扰素产生。

81. 如权利要求80所述的方法,其中所述至少一种剂增加所述受试者中的选自STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2和MDA5的至少一种基因的表达。

82. 如权利要求51-81中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂抑制所述受试者中的至少一种DNA甲基转移酶(DNMT)。

83. 如权利要求82所述的方法,其中所述至少一种剂抑制所述受试者中的DNMT1表达。

84. 如权利要求51-83中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂不显著增强所述受试者中的衰老相关分泌表型(SASP)。

85. 如权利要求51-84中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂选自:小分子CDK4拮抗剂、结合CDK4的阻断性胞内抗体或抗体、CDK4的非活化形式、CDK4天然结合配偶体的可溶形式、CDK4融合蛋白、阻断CDK4转录或翻译的核酸分子、小分子CDK6拮抗剂、识别CDK6的阻断性胞内抗体或抗体、CDK6的非活化形式、CDK6天然结合配偶体的可溶形式、CDK6融合蛋白,以及阻断CDK6转录或翻译的核酸分子。

86. 如权利要求51-85中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的小分子。

87. 如权利要求86所述的方法,其中所述小分子选自玻玛西尼、帕博西尼和瑞博西尼。

88. 如权利要求51-85中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的RNA干扰剂。

89. 如权利要求88所述的方法,其中所述RNA干扰剂是小干扰RNA (siRNA)、小发夹RNA (shRNA)、微小RNA (miRNA) 或piwiRNA (piRNA)。

90. 如权利要求51-85中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括与CDK4和/或CDK6互补的反义寡核苷酸。

91. 如权利要求51-85中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的肽或肽模拟物。

92. 如权利要求51-85中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的适体。

93. 如权利要求51-85中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂是特异性地结合CDK4和/或CDK6的胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段。

94. 如权利要求93所述的方法,其中所述胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段是鼠的、嵌合的、人源化的或人的。

95. 如权利要求93或94所述的方法,其中所述胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段被可检测地标记,包含效应子结构域,包含Fc结构域,和/或选自Fv、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双链抗体片段。

96. 如权利要求51-95中任一项所述的方法,其中所述至少一种剂以药学上可接受的制剂施用。

97. 如权利要求51-96中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

98. 如权利要求97所述的方法,其中所述哺乳动物是所述疾患的动物模型。

99. 如权利要求99所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

使用CDK4/6抑制剂调控调节性T细胞和免疫应答的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年3月30日提交的美国临时申请号62/478,909的权益;所述申请的全部内容通过该引用整体并入本文。

[0003] 权利声明

[0004] 本发明根据美国国立卫生研究院(The National Institutes of Health)授予的资助P50 CA168504、CA187918-02、CA210057-01、CA172461-04和R01 CA166284在政府支持下完成。政府拥有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 细胞周期蛋白依赖性激酶CDK4和CDK6是细胞周期进程1的基本调节因子。CDK4和CDK6在与D型细胞周期蛋白结合后,使视网膜母细胞瘤肿瘤抑制因子(Rb)磷酸化。因此,E2F转录因子从Rb介导的失活中释放,从而使促进细胞周期进展通过G1期到达S期的基因能够表达(Sherr和Roberts(2004) *Genes Dev* 18:2699-2711;Narasimha等人(2014) *Elife* 3:e02872)。临床前研究证实,CDK4和CDK6是启动和维持包括乳腺癌在内的实体肿瘤生长所必需的(Yu等人(2006) *Cancer Cell* 9:23-32;Choi等人(2012) *Cancer Cell* 22:438-451;Sherr等人(2016) *Cancer Discov* 6:353-367)。最近,已经开发出CDK4/6的选择性药理学抑制剂(Finn等人(2015) *Lancet Oncol* 16:25-35;Patnaik等人(2016) *Cancer Discov* 6:740-753;Hortobagyi等人(2016) *N Engl J Med* 375:1738-1748)。正如预期的,这些化合物在许多表达Rb的乳腺癌细胞系中诱导G1细胞周期停滞(Finn等人(2009) *Breast Cancer Res* 11:R77;Vora等人(2014) *Cancer Cell* 26:136-149;Goel等人(2016) *Cancer Cell* 29:255-269)。一种这样的抑制剂帕博西尼(palbociclib)已经获得美国FDA批准用于治疗雌激素受体阳性乳腺癌,另外两种抑制剂(玻玛西尼(abemaciclib)和瑞博西尼(ribociclib))在该同一患者群体中已经显示出前景看好的结果(Patnaik等人(2016),出处同上;Hortobagyi等人(2016),出处同上)。

[0006] 在临床试验中,CDK4/6抑制剂单一疗法已经引起几例转移性乳腺癌患者的客观肿瘤应答(肿瘤大小减小了超过30%)。使用玻玛西尼(连续给药)时的应答率最高,不过使用帕博西尼(间歇给药)的疗法也引起了肿瘤消退(Patnaik等人(2016),出处同上;DeMichele等人(2015) *Clin Cancer Res* 21:995-1001)。CDK4/6抑制之后肿瘤消退的原因尚不清楚。最近的临床前研究已经证实,CDK4/6抑制剂的作用可能超出引起G1生长停滞。作为一个实例,CDK4/6抑制引起肿瘤细胞中的衰老样状态(Choi等人(2012),出处同上;Goel等人(2016),出处同上;Anders等人(2011) *Cancer Cell* 20:620-634)。然而,用这些剂尚未令人信服地证实实体肿瘤细胞凋亡(Choi等人(2012),出处同上;Vora等人(2014),出处同上;Goel等人(2016),出处同上;Puyol等人(2010) *Cancer Cell* 18:63-73;Witkiewicz等人(2014) *Genes Cancer* 5:261-272),并且单独的白细胞郁滞不能解释肿瘤缩小的原因。另外,关于CDK4/6抑制剂对肿瘤微环境内细胞的作用,我们所知还甚少。有人担忧由于T细胞周期抑制,CDK4/6抑制可能使得免疫检查点疗法的效果降低(Sherr(2016) *N Engl J Med*

375:1920-1923)。因此,本领域迫切需要鉴定和更好地理解免疫调节剂及其使用方法。

发明内容

[0007] 本发明至少部分地基于这一发现,即CDK4/6抑制剂选择性地减少受试者中的循环调节性T细胞(Treg)的数量。例如,CDK4/6抑制剂显著减少了受试者的脾脏和/或淋巴结中的Treg,却并未显著减少胸腺中的Treg。与之相反,其他类型的T细胞保持不变。循环Treg的这种减少有助于T细胞介导的细胞毒性。Treg数量特异性降低背后的原因至少部分地与Treg中DNA甲基转移酶1水平受到阻抑有关,这继而又进一步增强了它们的细胞周期停滞。在癌症的背景下,CDK4/6抑制剂还通过增加3型干扰素产生和干扰素敏感性基因(ISG)的表达来增加肿瘤细胞抗原呈递。因此,本文提供的结果证实,CDK4/6抑制剂可以用于通过促进抗肿瘤免疫(例如,通过增强的肿瘤细胞抗原呈递和抗肿瘤T细胞应答)来治疗癌症。CDK4/6抑制剂可以单独使用或与免疫检查点疗法组合使用以治疗癌症。因此,本发明部分涉及上调免疫应答的方法,诸如有益于用至少一种CDK4/6抑制剂单独地或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制剂疗法)组合来治疗受试者中的癌症(例如,通过选择性地减少循环Treg的数量)的方法。

[0008] 在一个方面,提供了选择性地减少受试者中的循环调节性T细胞(Treg)的数量的方法,包括向受试者施用治疗有效量的至少一种选择性地抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的剂,使得受试者中的Treg的数量选择性地减少。

[0009] 还提供了许多实施方案,它们可以应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合。例如,在一个实施方案中,所述Treg包括CD4+CD25+、CD4+FOXP3+和/或CD4+CD25+FOXP3+Treg。在另一个实施方案中,所述至少一种剂显著减少受试者的脾脏和/或淋巴结中的Treg的数量。在又一个实施方案中,所述至少一种剂不显著减少受试者的胸腺中的Treg的数量。在再一个实施方案中,所述至少一种剂不显著影响受试者中的初始CD4+T细胞向Treg的分化。在另一个实施方案中,所述至少一种剂不显著影响受试者中的Treg凋亡。在又一个实施方案中,所述至少一种剂不显著改变选自B淋巴细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞和单核细胞的至少一种细胞类型的细胞数量。在再一个实施方案中,所述至少一种剂降低受试者中的Treg与CD3+T细胞的比率和/或Treg与CD8+T细胞的比率。在另一个实施方案中,所述至少一种剂不显著调控CD8+T细胞和/或CD4+CD25-T细胞的数量。在又一个实施方案中,所述至少一种剂降低选自PD-1、TIM-3、CTLA-4和LAG3中的至少一种标志物在CD4+和/或CD8+T细胞表面上的表达。在再一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的抗原呈递。在另一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的MHC I类表达。在又一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的T细胞介导的细胞毒性。在再一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的干扰素(例如,III型干扰素)产生、信号传导和/或分泌。在另一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的选自STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2和MDA5的至少一种基因、或本文所述的任何ISG(诸如表2中列出的那些)的表达。在又一个实施方案中,所述至少一种剂抑制受试者中的至少一种DNA甲基转移酶(DNMT,诸如DNMT1)。在再一个实施方案中,所述至少一种剂不显著增强受试者中的衰老相关分泌表型(SASP)。在

另一个实施方案中,所述至少一种剂选自:小分子CDK4拮抗剂、结合CDK4的阻断性胞内抗体或抗体、CDK4的非活化形式、CDK4天然结合配偶体的可溶形式、CDK4融合蛋白、阻断CDK4转录或翻译的核酸分子、小分子CDK6拮抗剂、识别CDK6的阻断性胞内抗体或抗体、CDK6的非活化形式、CDK6天然结合配偶体的可溶形式、CDK6融合蛋白,以及阻断CDK6转录或翻译的核酸分子。在又一个实施方案中,所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的小分子(例如,玻玛西尼、帕博西尼和瑞博西尼)。在再一个实施方案中,所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的RNA干扰剂(例如,小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)或piwiRNA(piRNA))。在另一个实施方案中,所述至少一种剂包括与CDK4和/或CDK6互补的反义寡核苷酸。在又一个实施方案中,所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的肽或肽模拟物。在再一个实施方案中,所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的适体。在另一个实施方案中,所述至少一种剂是特异性地结合CDK4和/或CDK6的胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段。在又一个实施方案中,所述胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段是鼠的、嵌合的、人源化的或人的。在再一个实施方案中,所述胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段被可检测地标记,包含效应子结构域,包含Fc结构域,和/或选自Fv、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双链抗体片段。在另一个实施方案中,所述至少一种剂以药学上可接受的制剂施用。

[0010] 在又一个实施方案中,该受试者具有将受益于免疫应答的上调的疾患。在又一个实施方案中,该受试者具有选自癌症、病毒感染、细菌感染、原生动物感染、蠕虫感染、与气道耐受性受损相关联的哮喘和免疫抑制性疾病的疾患。在再一个实施方案中,该疾患是癌症(例如,乳腺癌、结肠直肠癌等)。在另一个实施方案中,该受试者的免疫细胞、Treg或癌细胞中的至少一些表达Rb和/或具有功能性Rb信号传导。在又一个实施方案中,该受试者的免疫细胞、Treg或癌细胞中的至少一些具有有缺陷的Rb表达和/或有缺陷的Rb信号传导。在再一个实施方案中,该受试者的Treg或癌细胞中的至少一些具有引起有缺陷的Rb表达和/或有缺陷的Rb信号传导的基因组突变。在另一个实施方案中,该疾患对免疫检查点阻断具有抗性。在又一个实施方案中,所述至少一种剂增加该受试者中的该受试者的细胞、免疫细胞、Treg或癌细胞对免疫检查点阻断的敏感性。在再一个实施方案中,所述至少一种剂:a)增加该受试者中的癌症浸润CD3⁺T细胞的数量;b)增加该受试者中的癌细胞的抗原呈递;c)增加该受试者中的癌细胞的MHC I类表达;d)增加该受试者中的癌细胞的干扰素产生、信号传导和/或分泌;e)增加该受试者中的癌细胞的III型干扰素产生、信号传导和/或分泌;f)增加该受试者中的癌细胞对选自STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2和MDA5的至少一种基因的表达;g)抑制该受试者中的癌细胞对至少一种DNA甲基转移酶(DNMT)的表达;和/或h)抑制该受试者中的癌细胞对DNMT1表达的表达。

[0011] 在一个实施方案中,该方法还包括施用一种或多种上调免疫应答的附加的剂或疗法。在另一个实施方案中,所述一种或多种附加的剂或疗法选自免疫疗法、疫苗、化学疗法、辐射、表观遗传修饰剂和靶向疗法。这种免疫疗法可以例如选自免疫检查点抑制剂疗法、致敏抗原呈递细胞、溶瘤病毒、包含抗癌基因的表达载体,以及癌症抗原或疾病抗原的抑制剂。这种免疫检查点抑制剂疗法可以包括例如,减少或抑制受试者中的选自CTLA-4、PD-1、

VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR 家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR的免疫检查点分子的表达和/或功能。在一个实施方案中,该免疫检查点抑制剂疗法靶向选自PD-1、CTLA-4、PD-L1、PD-L2以及它们的组合的免疫检查点。在另一个实施方案中,在施用一种或多种上调免疫应答的附加的剂或疗法之前施用本文所述的至少一种剂,任选地其中预先施用所述至少一种剂,随后接着施用所述至少一种剂和一种或多种上调免疫应答的附加的剂或疗法的组合。在一个实施方案中,本文描述的受试者是哺乳动物。例如,哺乳动物可以是该疾患的动物模型,或人。

[0012] 在另一个方面,提供了上调有需要的受试者中的免疫应答的方法,包括向该受试者施用以下的组合:i) 治疗有效量的至少一种选择性地抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的剂,和ii) 免疫疗法,使得该受试者中的免疫应答上调。

[0013] 如上所述,还提供了许多实施方案,它们可以应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合。例如,在一个实施方案中,该受试者具有选自癌症、病毒感染、细菌感染、原生动物感染、蠕虫感染、与气道耐受性受损相关联的哮喘和免疫抑制性疾病的疾患。在另一个实施方案中,该疾患是癌症(例如,乳腺癌、结肠直肠癌等)。在又一个实施方案中,该受试者的免疫细胞、Treg或癌细胞中的至少一些表达Rb和/或具有功能性Rb信号传导。在再一个实施方案中,该受试者的免疫细胞、Treg或癌细胞中的至少一些具有有缺陷的Rb表达和/或有缺陷的Rb信号传导。在一个实施方案中,该受试者的Treg或癌细胞中的至少一些具有引起有缺陷的Rb表达和/或有缺陷的Rb信号传导的基因组突变。本文所述的疾患可以例如对免疫检查点阻断具有抗性。在一个实施方案中,所述至少一种剂增加该受试者中的该受试者的细胞、免疫细胞、Treg或癌细胞对免疫检查点阻断的敏感性。在另一个实施方案中,所述至少一种剂:a) 增加该受试者中的癌症浸润CD3+T细胞的数量;b) 增加该受试者中的癌细胞的抗原呈递;c) 增加该受试者中的癌细胞的MHC I类表达;d) 增加该受试者中的癌细胞的干扰素产生、信号传导和/或分泌;e) 增加该受试者中的癌细胞的III型干扰素产生、信号传导和/或分泌;f) 增加该受试者中的癌细胞对选自STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2和MDA5的至少一种基因的表达;g) 抑制该受试者中的癌细胞对至少一种DNA甲基转移酶(DNMT)的表达;和/或h) 抑制该受试者中的癌细胞对DNMT1表达的表达。在又一个实施方案中,在施用免疫疗法之前施用所述至少一种剂,任选地其中预先施用所述至少一种剂,随后接着施用所述至少一种剂和免疫疗法的组合。

[0014] 在一个实施方案中,该方法还包括施用一种或多种上调免疫应答的附加的剂或疗法。这样的一种或多种附加的剂或疗法可以例如选自疫苗、化学疗法、辐射、表观遗传修饰剂和靶向疗法。这种免疫疗法可以例如选自免疫检查点抑制剂疗法、致敏抗原呈递细胞、溶瘤病毒、包含抗癌基因的表达载体,以及癌症抗原或疾病抗原的抑制剂。这种免疫检查点抑制剂疗法可以包括例如,减少或抑制受试者中的选自CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR的免疫检查点分子的表达和/或功能。在一个实施方案中,该免疫检查点抑制

剂疗法靶向选自PD-1、CTLA-4、PD-L1、PD-L2以及它们的组合的免疫检查点。在另一个实施方案中,所述至少一种剂显著减少受试者的脾脏和/或淋巴结中的Treg的数量。在又一个实施方案中,所述至少一种剂不显著减少受试者的胸腺中的Treg的数量。在再一个实施方案中,所述至少一种剂不显著影响受试者中的初始CD4+T细胞向Treg的分化。在一个实施方案中,所述至少一种剂不显著影响受试者中的Treg凋亡。在另一个实施方案中,所述至少一种剂不显著改变选自B淋巴细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞和单核细胞的至少一种细胞类型的细胞数量。在又一个实施方案中,所述至少一种剂降低受试者中的Treg与CD3+T细胞的比率和/或Treg与CD8+T细胞的比率。在再一个实施方案中,所述Treg包括CD4+CD25+、CD4+FOXP3+和/或CD4+CD25+FOXP3+Treg。在一个实施方案中,所述至少一种剂不显著调控CD8+T细胞和/或CD4+CD25-T细胞的数量。在另一个实施方案中,所述至少一种剂降低选自PD-1、TIM-3、CTLA-4和LAG3中的至少一种标志物在CD4+和/或CD8+T细胞表面上的表达。在又一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的抗原呈递。在再一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的MHC I类表达。在一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的T细胞介导的细胞毒性。在另一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的干扰素产生、信号传导和/或分泌。在又一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的III型干扰素产生。在再一个实施方案中,所述至少一种剂增加受试者中的选自STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2和MDA5的至少一种基因、或本文所述的任何ISG(诸如表2中列出的那些)的表达。

[0015] 在一个实施方案中,所述至少一种剂抑制受试者中的至少一种DNA甲基转移酶(DNMT),诸如DNMT1。在另一个实施方案中,所述至少一种剂不显著增强受试者中的衰老相关分泌表型(SASP)。在又一个实施方案中,所述至少一种剂选自:小分子CDK4拮抗剂、结合CDK4的阻断性胞内抗体或抗体、CDK4的非活化形式、CDK4天然结合配偶体的可溶形式、CDK4融合蛋白、阻断CDK4转录或翻译的核酸分子、小分子CDK6拮抗剂、识别CDK6的阻断性胞内抗体或抗体、CDK6的非活化形式、CDK6天然结合配偶体的可溶形式、CDK6融合蛋白,以及阻断CDK6转录或翻译的核酸分子。在又一个实施方案中,所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的小分子(例如,玻玛西尼、帕博西尼和瑞博西尼。在再一个实施方案中,所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的RNA干扰剂(例如,小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)或piwiRNA(piRNA))。在一个实施方案中,所述至少一种剂包括与CDK4和/或CDK6互补的反义寡核苷酸。在另一个实施方案中,所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的肽或肽模拟物。在又一个实施方案中,所述至少一种剂包括抑制或阻断CDK4和/或CDK6的表达或活性的适体。在再一个实施方案中,所述至少一种剂是特异性地结合CDK4和/或CDK6的胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段。在一个实施方案中,所述胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段是鼠的、嵌合的、人源化的或人的。在另一个实施方案中,所述胞内抗体或抗体、或其抗原结合片段被可检测地标记,包含效应子结构域,包含Fc结构域,和/或选自Fv、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双链抗体片段。在又一个实施方案中,本文描述的所述至少一种剂以药学上可接受的制剂施用。在再一个实施方案中,本文描述的受试者是哺乳动物。这种哺乳动物可以是例如该疾患的动物模型,或人。

附图说明

[0016] 图1包括9个小图,被标识为小图A、B、C、D、E、F、G、H和I,它们示出了CDK4/6抑制诱导肿瘤消退并增加抗原呈递。小图A示出了用指示的剂治疗后MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤的平均生长($n=17$ 至22个肿瘤)。小图B示出了肿瘤基因表达分析的实验方案($n=11$ 至12个肿瘤)。小图C示出了基因本体论条目,其中经调整的 p 值 <0.05 。小图D示出了MHC I类基因的相对表达,这些基因在用CDK4/6抑制剂玻玛西尼治疗之后增加。小图E示出了抗原加工基因的qPCR结果(每组 $n=12$,Erap1除外, $n=6$ 至8),这些基因在用玻玛西尼治疗之后增加。小图F示出了在治疗7天之后,两种癌细胞系中由玻玛西尼上调的基因表达($n=3$)。小图G示出了细胞系中的B2M/MHC I流式细胞术。每个细胞计数结果(代表两个实验)中的灰色的左侧峰代表FMO对照。小图H示出了经预处理的原发性MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤细胞的离体CD8+T细胞裂解。小图I示出了TCGA样品中的各种基因的表达(CCND1二倍体 $n=503$;扩增的CCND1 $n=153$)。* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$ (单向ANOVA(小图A)和未配对的双尾t检验(小图H),经调整用于多重比较(小图D至F和I))。

[0017] 图2包括4个小图,被标识为小图A、B、C和D,它们示出了CDK4/6抑制之后的肿瘤细胞增殖和细胞周期相关基因的表达。小图A示出了用玻玛西尼或媒介物治疗12天的MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤中的Ki-67的免疫组织化学结果。代表性图像(比例尺=100 μ m),以及Ki-67+细胞百分比的定量($n=7$ 个肿瘤/组)。小图B至D通过转录组学分析,示出了相比于媒介物治疗用玻玛西尼治疗12天的MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤中的E2F转录因子(小图B)、S期基因(小图C)和G2/M基因(小图D)的相对表达($n=11$ 至12个肿瘤/组)。* $p<0.05$,** $p<0.01$ (未配对的双尾t检验,适当时经调整用于多重比较)。

[0018] 图3包括3个小图,被标识为小图A、B和C,它们示出了CDK4/6抑制增强抗原呈递。小图A至B示出了用媒介物或玻玛西尼治疗12天的MMTV-rtTA/tetO-HER2小鼠的肿瘤中的基因表达变化的分析($n=11$ 至12个肿瘤),分析方案如图2的小图B中所示。具体地讲,小图A示出了基因表达变化的火山图。红点(例如, p 值高于约 $1.41\log_{10}$ 的点)代表与媒介物相比显著改变的基因。小图B示出了与媒介物相比,由玻玛西尼显著下调的GSEA条目。小图C示出了在用DMSO或帕博西尼处理7天的细胞系中,由qPCR测得的相对基因表达(未配对的双尾t检验,经调整用于多重比较)。* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$ 。

[0019] 图4包括4个小图,被标识为小图A、B、C和D,它们示出了CDK4/6抑制对乳腺癌细胞的体外增殖和凋亡的作用。小图A示出了在250nM(MDA-MB-453)或500nM(MDA-MB-361, BT474)玻玛西尼中培养11天、然后停药的乳腺癌细胞的相对数量。小图B示出了用DMSO或玻玛西尼(MDA-MB-453,250nM;BT474,500nM)处理0、4和7天的MDA-MB-453细胞(左)和BT474细胞(右)的代表性SA- β -半乳糖苷酶染色。小图C示出了使用指示抗体对用DMSO、拉帕替尼(lapatinib)或玻玛西尼处理48小时的SKBR3、BT474、MDA-MB-453和MDA-MB-361细胞的细胞裂解物进行蛋白质印迹检测的结果。小图D示出了使用指示抗体对用DMSO或玻玛西尼(500nM)预处理0、1或7天,之后暴露于星形孢菌素(500nM)4小时的MDA-MB-453细胞的细胞裂解物进行蛋白质印迹检测的结果。

[0020] 图5包括6个小图,被标识为小图A、B、C、D、E和F,它们示出了CDK4/6抑制刺激干扰素信号传导。小图A至C示出了用DMSO或玻玛西尼(500nM)处理7天的细胞系的全基因组转录组学分析。具体地讲,小图A示出了该分析中排在前列的GO条目。小图B示出了两种癌细胞系

中的多种干扰素应答性转录因子的表达。小图C示出了两种细胞系中的各种干扰素敏感性基因的表达 ($n=3$)。小图D示出了用玻玛西尼处理0、1或7天后两种细胞系中的磷酸-STAT1蛋白水平和总STAT1蛋白水平,如通过蛋白质印迹所检测的(每条泳道使用相同数量的细胞)。小图E示出了按照图1的小图B测定的MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤中的干扰素应答性转录因子的相对表达 ($n=11$ 至12个肿瘤)。小图F示出了按照图1的小图A进行的肿瘤免疫荧光染色(比例尺=100 μ m),以及核STAT1的定量。 $*p<0.01$, $***p<0.001$ (针对小图F,未配对的双尾t检验;针对小图B、C和E,经调整用于多重比较)。

[0021] 图6包括6个小图,被标识为小图A、B、C、D、E和F,它们示出了CDK4/6抑制增加干扰素信号传导。小图A示出了在用DMSO或玻玛西尼处理(500nM,7天)的MDA-MB-453细胞中的NLRC5的相对表达(未配对的双尾t检验)。小图B示出了证实MDA-MB-453和BT474细胞中的p16-FLAG过表达(左)和通过qPCR检测到的这些细胞系中的基因表达(右);(未配对的双尾t检验)。小图C至E示出了来自用媒介物或玻玛西尼治疗12天的小鼠的MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤中的基因表达的分析,分析方案如图1的小图B中所示。具体地讲,小图C示出了与媒介物相比,由玻玛西尼上调的GSEA条目。小图D示出了干扰素应答性T细胞化学引诱物的相对表达。小图E示出了多种干扰素敏感性基因(ISG)的相对表达。小图F示出了Stat1和Nlrc5的相对表达与参与MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤中的抗原加工和呈递的基因的相关性。蓝点代表用媒介物治疗的肿瘤;红点代表用玻玛西尼治疗的肿瘤。(r是皮尔逊(Pearson)乘积矩相关系数)。 $*p<0.05$, $***p<0.001$ 。

[0022] 图7包括6个小图,被标识为小图A、B、C、D、E和F,它们示出了CDK4/6抑制剂诱导病毒拟态和III型干扰素表达。小图A示出了通过qPCR检测到的中和IFN- γ 或IFN- α 对MDA-MB-453细胞中的相对STAT1 mRNA表达的作用(未配对的双尾t检验,经调整用于多重比较)。小图B示出了中和IFN- α 对指示细胞系中的磷酸-STAT1蛋白和总STAT1蛋白的影响。每条泳道都使用来自相同数量细胞的蛋白质。小图C示出了中和IFN- γ 对指示细胞系中的磷酸-STAT1蛋白和总STAT1蛋白的作用。每条泳道都使用来自相同数量细胞的蛋白质。小图D示出了与用DMSO处理相比,用玻玛西尼(500nM)处理7天的MDA-MB-453细胞中的III型干扰素基因的相对表达(未配对的双尾t检验)。小图E示出了通过对用玻玛西尼(500nM)处理0小时、24小时、48小时或7天的MDA-MB-453细胞和MDA-MB-361细胞进行转录组分析而得到的相对DNMT3A表达。小图F示出了在用玻玛西尼处理(500nM,7天)的指示细胞中的ERV的相对mRNA表达(未配对的双尾t检验)。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$ 。

[0023] 图8包括6个小图,被标识为小图A、B、C、D、E和F,它们示出了CDK4/6抑制剂阻抑DNMT1表达以诱导病毒拟态。小图A至B示出了在用DMSO或玻玛西尼处理(500nM,7天)之后,指示细胞系在条件培养基中表达III型干扰素。示出了两个独立实验的代表性数据。小图C示出了用玻玛西尼+/-鲁索替尼(ruxolitinib)处理7天的MDA-MB-453细胞中的磷酸-STAT1蛋白水平和总STAT1蛋白水平。每条泳道都使用来自相同数量细胞的蛋白质。小图D示出了用玻玛西尼处理之后,指示细胞系中的相对DNMT1表达 ($n=3$)。小图E示出了按照图1的小图B测定的MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤中的Dnmt1的相对表达, $p=0.05$,并且 $n=11$ 至12个肿瘤。小图F示出了在处理7天之后,指示细胞系中的细胞溶质模式识别受体的相对表达 ($n=3$)。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$ (未配对的双尾t检验(针对小图A、B和E),经调整用于多重比较(针对小图D和F))。

[0024] 图9包括4个小图,被标识为小图A、B、C和D,它们示出了玻玛西尼诱导“衰老样”表型,而没有衰老相关分泌表型(SASP)的证据。小图A示出了用媒介物或玻玛西尼治疗12天的MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤的代表性SA- β -半乳糖苷酶染色(左)(比例尺=500 μ m)。还示出了相对SA- β -半乳糖苷酶阳性面积的定量(右)。小图B示出了按照图1的小图A治疗的MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤中的SASP因子的相对mRNA表达。通过qPCR测定了相对IL6表达,并且通过转录组测定了I11a和I11b。小图C比较了用DMSO或玻玛西尼(500nM)处理7天的MDA-MB-453细胞和BT474细胞中的IL6表达(通过qPCR检测)。小图D示出了在多柔比星(doxorubicin)诱导的衰老后IL6的相对mRNA表达。用多柔比星(200nM)处理MDA-MB-453细胞和BT474细胞24小时,并在3天后提取mRNA进行qPCR(未配对的双尾t检验)。** $p < 0.01$ 。

[0025] 图10包括9个小图,被标识为小图A、B、C、D、E、F、G、H和I,它们示出了CDK4/6抑制对免疫细胞群和Treg生物学的影响。小图A示出了用媒介物或玻玛西尼处理12天的MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤中的免疫群体的流式细胞术分析($n = 15$ 至17个肿瘤/组)。小图B示出了用媒介物或玻玛西尼处理12天的无肿瘤小鼠和荷瘤小鼠中的血浆自身抗体($n = 6$ 至8只小鼠/组)。对于小图C至G,用媒介物或玻玛西尼处理无肿瘤的FVB小鼠12天。小图C比较了进行过或未进行玻玛西尼/帕博西尼处理的胸腺肿块。通过流式细胞术定量胸腺细胞群。小图D比较了进行过或未进行玻玛西尼/帕博西尼处理的CD4+CD8+双阳性(DP)胸腺细胞的百分比。小图E比较了进行过或未进行玻玛西尼/帕博西尼处理的CD4+单阳性(SP)胸腺细胞的百分比。小图F比较了进行过或未进行玻玛西尼/帕博西尼处理的CD8+单阳性(SP)胸腺细胞的百分比。小图G比较了进行过或未进行玻玛西尼//帕博西尼处理的CD4+FoxP3+调节性T细胞的百分比(单向ANOVA, $n = 4$ 至5只小鼠/组)。小图H示出了DMSO或玻玛西尼在TGF- β 存在下,在72小时内对CD4+CD25-T细胞离体分化成Treg的作用。小图I示出了通过膜联蛋白V染色测量的用DMSO或玻玛西尼处理72小时对Treg凋亡的作用。* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ 。

[0026] 图11包括18个小图,被标识为小图A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q和R,它们示出了CDK4/6抑制增加CD3+T细胞,同时抑制Treg增殖。小图A至B示出了通过用流式细胞术定量如所指示处理12天的MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤而得到的T细胞百分比(小图A)和Treg(CD4+FoxP3+)百分比(小图B)(曼-惠特尼(Mann-Whitney)检验, $n = 15$ 至17个肿瘤)。小图C示出了按照图1的小图A进行的肿瘤中Treg:CD3比率的定量(曼-惠特尼检验)。小图D示出了用指示的剂处理的MMTV-rtTA/tet0-HER2小鼠的外周血中Treg的水平(未配对的双尾t检验, $n = 4$ 只小鼠/组)。小图E至F示出了进行过或未进行抑制剂治疗的无肿瘤FVB小鼠的脾脏(小图E)和淋巴结(LN)(小图F)中的Treg水平(经校正用于多重比较的单向ANOVA, $n = 7$ 至8只小鼠/组)。小图G比较了在使用玻玛西尼处理的情况下,CD4+CD25-细胞、CD8+细胞和CD4+CD25+T细胞在体外的增殖。示出了代表两个独立实验的数据(经校正用于多重比较的双向ANOVA)。小图H至I示出了用指示的剂处理12天的无肿瘤FVB小鼠的脾脏(小图H)和淋巴结(小图I)中的Ki-67+T细胞群的百分比(经校正用于多重比较的双向ANOVA, $n = 7$ 至8只小鼠/组)。小图J示出了按照图1的小图A完成的肿瘤免疫荧光图像(比例尺=100 μ m)和定量(未配对的双尾t检验; $n = 7$ 个肿瘤/组)。小图K比较了携带CT-26结肠直肠癌的小鼠的肿瘤(左)和血液(右)中的Treg数量。小图L比较了在进行过或未进行抑制剂处理的MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤中的增殖中的CD8+T细胞。肿瘤的双重染色示出,在用玻玛西尼处理12天之后,Ki67+CD8+T细胞的数量没有显著减少,这表明CD8+T细胞增殖并未被CDK4/6抑制剂显著阻

抑。小图M比较了在进行过或未进行抑制剂处理的MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤中的Treg数量与CD8+T细胞数量的比率。小图N示出了在进行过或未进行治疗的携带CT-26肿瘤的小鼠的血液、淋巴结(LN)和脾脏(spl)中的Treg:CD8+T比率的比较。小图O示出,小图N中的Treg:CD8+T细胞减少是肿瘤非依赖性的。具体地讲,比较了在用CDK4/6抑制剂处理12天之后,无肿瘤FVB小鼠的脾脏(spl,左)和淋巴结(LN)中的这种比率。小图P示出了CDK4/6抑制选择性地阻抑Treg中的Dnmt1表达。用玻玛西尼或媒介物处理无肿瘤小鼠12天。从脾脏和淋巴结分选T细胞亚群,进行qPCR以分析Dnmt1。小图Q示出了Treg中的DNMT1阻抑与CDKN1A的表达增加相关联。用玻玛西尼或媒介物处理无肿瘤小鼠12天。从脾脏和淋巴结分选T细胞亚群,进行qPCR以分析Cdkn1a。小图R示出了通过CDK4/6抑制剂阻抑Treg增殖的示例性机制。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

[0027] 图12包括2个小图,被标识为小图A和B,它们示出了玻玛西尼在裸鼠中引起肿瘤生长延迟,但未引起肿瘤消退。小图A示出了被植入到用媒介物或玻玛西尼处理的无胸腺小鼠中的MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤的平均生长(单向ANOVA, $n = 10$ 个肿瘤/组)。小图B示出了小图A中的肿瘤的Ki-67免疫组织化学结果。示出了代表性的图像(左)。通过未配对的双尾t检验分析了Ki-67+细胞的百分比的定量(右)(比例尺=100 μ m) *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

[0028] 图13包括7个小图,被标识为小图A、B、C、D、E、F和G,它们示出了CDK4/6抑制介导CD8+T细胞依赖性肿瘤消退并增强对检查点阻断的应答。小图A示出了在使用或未使用CD8中和抗体的情况下,用玻玛西尼处理之后肿瘤体积的最大倍数变化(未配对的双尾t检验)。小图B至C示出了在处理6天的MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤中的CD8+T细胞上的抑制性共受体表达(经校正用于多重比较的双向ANOVA, $n = 5$ 至6个肿瘤/组)。小图D示出了按照图1的小图A,通过qPCR测得的肿瘤中的相对Ifng表达(未配对的双尾t检验, $n = 10$ 个肿瘤/组)。小图E示出了用媒介物或玻玛西尼,以及对照IgG或抗PD-L1抗体处理负荷MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤的小鼠的实验方案。小图F比较了小图E中的治疗之后的平均肿瘤生长(单向ANOVA, $n = 18$ 至19个肿瘤/组)。小图G示出了CDK4/6抑制通过对肿瘤细胞和免疫环境的直接作用而促进肿瘤免疫原性和抗肿瘤免疫应答。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

[0029] 图14包括11个小图,被标识为小图A、B、C、D、E、F、G、H、I、J和K,它们示出了玻玛西尼对T细胞耗竭的作用。小图A示出了确认在开始用玻玛西尼治疗前CD8+T细胞耗竭。在用CD8中和抗体开始治疗后48小时,通过流式细胞术(未配对的双尾t检验)测定外周血中的CD8+T细胞的绝对数量(左)和百分比(右)。小图B至E比较了用玻玛西尼或媒介物处理6天后MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤中的肿瘤内CD8+T细胞上的抑制性共受体的表达。小图B示出了通过代表性流式细胞术图(左)和采用经校正用于多重比较的双向ANOVA进行分析的定量(右)来表现的PD-1细胞表面表达。小图C至D比较了CTLA-4(小图C)和LAG3(小图D)的代表性流式细胞术图。小图E示出了如通过经校正用于多重比较的双向ANOVA分析的小图C至D的量化。小图F至K比较了小图B至E中所述的肿瘤中的肿瘤内CD4+T细胞上的抑制性共受体的表达。示出了PD-1(小图F)、Tim-3(小图G)、CTLA-4(小图H)和LAG3(小图I)的代表性流式细胞术图。小图J示出了通过经校正用于多重比较的双向ANOVA进行的小图F至I的量化。小图K示出了每个细胞中的抑制性受体数量的定量。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。

[0030] 图15包括4个小图,被标识为小图A、B、C和D,它们汇总了实施例1至8中描述的数据。

[0031] 应当注意,对于包含直方图的每个附图,每次谨慎测量的从左到右的条对应于如所指示的附图图例中从上到下的附图框。

具体实施方式

[0032] 肿瘤通过包括抗原呈递受损在内的几种机制避开免疫系统。实际上,干扰素信号传导通路和下游转录因子中的缺陷促进免疫逃避和对免疫检查点阻断的抗性。本文已经确定CDK4/6抑制剂(以前被认为诱导癌细胞周期停滞)通过两种现象的组合诱导抗肿瘤免疫应答:肿瘤细胞引起的抗原呈递增强,以及免疫阻抑性微环境的重新编程。令人惊讶的是,CDK4/6抑制剂特异性地减少受试者中的循环调节性T细胞(Treg)的数量。例如,CDK4/6抑制剂可以显著减少脾脏和/或淋巴结中的Treg,却不可以显著减少胸腺中的Treg。此外,其他类型的T细胞保持不变。循环Treg的这种减少是由于Treg中的DNA甲基转移酶(DNMT)水平(诸如DNMT1)受到阻抑而引起的,这进一步增强了它们的细胞周期停滞。因此,先前的担忧是CDK抑制剂可能使免疫检查点疗法由于T细胞周期抑制而变得不那么有效(Sherr (2016) *N Engl J Med* 375:1920-1923),直接针对该担忧,本文提供的结果证实,CDK4/6抑制剂促进抗肿瘤免疫,并且可以单独使用或与免疫检查点疗法组合使用以治疗癌症。

[0033] 因此,本发明部分涉及单独地使用或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制剂疗法)组合使用至少一种CDK4/6抑制剂来选择性地减少受试者中的循环调节性T细胞(Treg)的数量。在另一个方面,本发明提供了用至少一种CDK4/6抑制剂和免疫疗法(诸如免疫检查点抑制剂疗法)的组合上调受试者中的免疫应答的方法。

[0034] I. 定义

[0035] 冠词“一个”和“一种”在本文中用来指代该冠词的一个或多个(即,至少一个)语法对象。举例来说,“一个要素”意味着一个要素或多个要素。

[0036] 术语“施用”,旨在包括允许某种剂执行其预期功能的施用途径。可以使用的用于治疗身体的施用途径的实例包括注射(皮下、静脉内、肠胃外、腹膜内、鞘内等)途径、口服途径、吸入途径和透皮途径。注射可以是弹丸式注射,或者可以是连续输注。取决于施用途径,该剂可以用选择的材料包衣或设置在选择的材料上,以保护其免受可能不利地影响其执行其预期功能的能力的自然条件影响。该剂可以单独施用,或连同药学上可接受的载剂一起施用。该剂还可以作为前药施用,该前药在体内转化为其活性形式。

[0037] 术语“改变的量”或“改变的水平”是指生物标志物核酸的增加或减少的拷贝数(例如,生殖系细胞和/或体细胞),例如,与对照样品中的生物标志物核酸的表达水平或拷贝数相比,癌症样品中的增加或降低的表达水平。生物标志物的术语“改变的量”还包括与正常的对照样品中的对应蛋白水平相比,样品(例如癌症样品)中的生物标志物蛋白的增加或降低的蛋白水平。另外,可以通过检测翻译后修饰(诸如标志物的甲基化状态)来确定生物标志物蛋白的改变的量,其中翻译后修饰可以影响该生物标志物蛋白的表达或活性。

[0038] 如果受试者中的生物标志物的量分别比正常水平或对照水平大或小的量大于用于评定量的测定法的标准误差,优选地比该量大或小至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或,则该生物标志物的量“显著”高于或低于该生物标志物的正常水平和/或量。作为替代,如果受试者中的生物标志物的量分别比该生物标志物的正常量和/或对照量

高或低至少约两倍,并且优选地高或低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、155%、160%、165%、170%、175%、180%、185%、190%、195%、2倍、3倍、4倍、5倍或更多倍,或者介于其间的任何范围(诸如5%至100%),则可以认为该量“显著”高于或低于正常量和/或对照量。这种显著调控值可以应用于本文所述的任何度量,诸如改变的表达水平、改变的活性、癌细胞过度增殖生长的变化、癌细胞死亡的变化、生物标志物抑制的变化、测试剂结合的变化,等等。

[0039] 生物标志物的术语“改变的表达水平”是指测试样品(例如,来源于患有癌症的患者的样品)中的该生物标志物的表达水平或拷贝数大于或小于用于评定表达或拷贝数的测定法的标准误差,并且优选地为对照样品(例如,来自未患有相关联疾病的健康受试者的样品)中的该生物标志物的表达水平或拷贝数(优选地,几个对照样品中的该生物标志物的平均表达水平或拷贝数)的至少两倍,更优选地三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。改变的表达水平大于或小于用于评定表达或拷贝数的测定法的标准误差,并且优选地为对照样品(例如,来自未患有相关联疾病的健康受试者的样品)中的该生物标志物的表达水平或拷贝数(优选地,几个对照样品中的该生物标志物的平均表达水平或拷贝数)的至少两倍,更优选地三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。

[0040] 生物标志物的术语“改变的活性”是指与正常的对照样品中的该生物标志物的活性相比,该生物标志物的活性在疾病状态下(例如,在癌症样品中)增大或减小。该生物标志物的改变的活性可以是例如以下的结果:该生物标志物的改变的表达、该生物标志物的改变的蛋白水平、该生物标志物的改变的结构,或者例如,与和该生物标志物相同或不同的通路中所涉及的其他蛋白质的改变的相互作用,或者与转录激活剂或抑制剂的改变的相互作用。

[0041] 生物标志物的术语“改变的结构”是指生物标志物核酸或蛋白质内存在突变或等位基因变体,例如,与正常或野生型的基因或蛋白质相比,影响该生物标志物核酸或蛋白质的表达或活性的突变。例如,突变包括但不限于置换突变、缺失突变或添加突变。突变可以存在于该生物标志物核酸的编码区或非编码区中。

[0042] 除非此处另外指明,否则术语“抗体”广泛地涵盖天然存在的抗体形式(例如IgG、IgA、IgM、IgE)和重组抗体,诸如单链抗体、嵌合抗体和人源化抗体、多特异性抗体,以及所有前述抗体的片段和衍生物,这些片段和衍生物至少具有抗原性结合位点。抗体衍生物可以包含与抗体缀合的蛋白质或化学部分。

[0043] 此外,胞内抗体是熟知的抗原结合分子,其具有抗体特征,但能够在细胞内表达以便结合和/或抑制感兴趣的细胞内靶标(Chen等人(1994) *Human Gene Ther.* 5:595-601)。用于使抗体适应于靶向(例如,抑制)细胞内部分的方法是本领域熟知的,诸如使用单链抗体(scFv)、修饰免疫球蛋白VL结构域以获得超稳定性、修饰抗体以抵抗还原性细胞内环境、产生增大细胞内稳定性和/或调控细胞内定位的融合蛋白,等等。细胞内抗体也可以在多细胞生物体的一个或多个细胞、组织或器官中引入和表达,例如用于预防目的和/或治疗目的(例如,作为基因疗法)(参见,至少PCT公布WO 08/020079、WO 94/02610、WO 95/22618和WO 03/014960;美国专利号7,004,940;Cattaneo和Biocca(1997) *Intracellular Antibodies: Development and Applications* (Landes和Springer-Verlag出版);Kontermann(2004)

Methods 34:163-170;Cohen等人(1998)Oncogene 17:2445-2456;Auf der Maur等人(2001)FEBS Lett.508:407-412;Shaki-Loewenstein等人(2005)J.Immunol.Meth.303:19-39)。

[0044] 如本文所用的术语“抗体”，还包括抗体的“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”)。如本文所用，术语“抗原结合部分”是指抗体的保留特异性结合抗原的能力的一个或多个片段(例如，生物标志物多肽或其片段)。已经证实，抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来完成。涵盖在抗体的术语“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段，这是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')₂片段，这是包含两个通过铰链区处的二硫键连接的Fab片段的二价片段；(iii) 由VH结构域和CH1结构域组成的Fd片段；(iv) 由抗体单臂的VL结构域和VH结构域组成的Fv片段，(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人，(1989)Nature 341:544-546)；以及(vi) 分离的互补决定区(CDR)。另外，尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由分离的基因编码，但它们可以使用重组方法，通过使得它们能够作为单条蛋白质链制备的合成接头连接，在该单条蛋白质链中，VL区和VH区配对形成单价多肽(称为单链Fv(scFv)；参见例如Bird等人(1988)Science 242:423-426;Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883；以及Osborn等人1998,Nature Biotechnology 16:778)。此类单链抗体也旨在涵盖于抗体的术语“抗原结合部分”内。特异性scFv的任何VH序列和VL序列都可以与人免疫球蛋白恒定区cDNA或基因组序列连接，以便产生编码完整的IgG多肽或其他同种型的表达载体。VH和VL也可以使用蛋白质化学技术或重组DNA技术用于产生Fab、Fv或免疫球蛋白的其他片段。还涵盖其他形式的单链抗体，诸如双抗体。双抗体是二价的双特异性抗体，其中VH结构域和VL结构域在单条多肽链上表达，但使用的接头太短而不允许在同一条链上的两个结构域之间配对，从而迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448;Poljak等人(1994)Structure 2:1121-1123)。

[0045] 更进一步，抗体或其抗原结合部分可以通过抗体或抗体部分与一种或多种其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合而形成的较大免疫粘附多肽的一部分。此类免疫粘附多肽的实例包括使用链霉亲和素核心区来制备四聚体scFv多肽(Kipriyanov等人(1995)Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101)，以及使用半胱氨酸残基、生物标志物肽和C-末端多组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv多肽(Kipriyanov等人(1994)Mol.Immunol.31:1047-1058)。抗体部分，诸如Fab片段和F(ab')₂片段，可以分别使用完整抗体的常规技术(诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化)由完整抗体制备。另外，可以使用如本文所述的标准重组DNA技术获得抗体、抗体部分和免疫粘附多肽。

[0046] 抗体可以是多克隆的或单克隆的；异种的、同种异体的或同基因的；或其经修饰的形式(例如人源化的、嵌合的，等等)。抗体还可以是全人的。优选地，本发明的抗体特异性地或基本上特异性地与生物标志物多肽或其片段结合。如本文所用的术语“单克隆抗体”和“单克隆抗体组合物”是指仅包含一种能够与特定抗原表位免疫反应的抗原结合位点的抗体多肽群体，而术语“多克隆抗体”和“多克隆抗体组合物”是指包含多种能够与特定抗原反应的抗原结合位点的抗体多肽群体。单克隆抗体组合物典型地显示出对于与其免疫反应的特定抗原的单一结合亲和力。

[0047] 抗体还可以是“人源化的”，其旨在包括通过非人细胞制得的具有已经改变的可变

区和恒定区以更加类似于将由人细胞制得的抗体的抗体。例如,通过改变非人抗体氨基酸序列以掺入在人生殖系免疫球蛋白序列中发现的氨基酸。本发明的人源化抗体可以包括不由人生殖系免疫球蛋白序列所编码的氨基酸残基(例如,通过体外的随机或位点特异性诱变,或者通过体内的体细胞突变所引入的突变),例如在CDR中。如本文所用的术语“人源化抗体”还包括其中来源于另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的生殖系的CDR序列已经被接枝到人框架序列上的抗体。

[0048] 术语“指定分数”是指当在患者样品中进行测量之后为每一种生物标志物指定的数值。指定分数与样品中生物标志物的缺失、存在或推测的量相关。指定分数可以人工生成(例如,通过目测),或借助用于图像采集和分析的测量仪器生成。在某些实施方案中,指定分数是通过定性评定(例如,在分级量表上检测荧光读数)或定量评定来确定的。在一个实施方案中,测定“累积分数”,它是指来自多个经测量生物标志物的指定分数的组合。在一个实施方案中,累积分数是指定分数的总和。在另一个实施方案中,指定分数的组合包括在将指定分数组合到累积分数中之前对其进行数学运算。在某些实施方案中,累积分数在本文中还称为“预测分数”。

[0049] 术语“生物标志物”包括已经被确定为可对癌症对一种或多种CDK4或CDK6抑制剂(单独使用或与免疫疗法组合使用)的应答进行预测(单独使用或组合使用)的本发明的可测量实体。生物标志物可以包括但不限于核酸和蛋白质,包括表1、实施例和附图中所示的那些。生物标志物包括本文列出的可用于诊断癌症和/或对癌症的抗癌治疗的敏感性(例如,在疗法之前、期间或之后肿瘤的过度活性或活性不足、出现、表达、生长、缓解、复发或抗性)的标志物。该标志物的预测功能可以通过例如以下来证实:(1)例如在超过约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%或更多的人癌症类型或癌症样品中,增加或减少的拷贝数(例如,通过FISH、FISH+SKY、单分子测序(例如,如本领域至少在J.Biotechnol.,86:289-301中所述)或qPCR)、过表达或表达不足(例如,通过ISH、RNA印迹或qPCR)、增加或减少的蛋白水平(例如,通过IHC),或者增加或降低的活性(通过例如其中涉及该标志物的通路的调控来测定);(2)该标志物在生物样品中的存在或缺失,生物样品例如来自罹患癌症的受试者(例如,人)的包含组织、全血、血清、血浆、口腔刮擦物、唾液、脑脊液、尿液、粪便或骨髓的样品;(3)该标志物在患有癌症的受试者的临床亚群(例如,那些对特定的疗法有应答的受试者或那些产生抗性的受试者)中的存在或缺失。生物标志物还包括“替代标志物”,例如,作为癌症进程的间接标志物的标志物。术语“生物标志物”还包括本文列出的可用于分析抗癌治疗的效果(诸如肿瘤的大小、癌细胞的增殖率和/或转移率、癌细胞的数目、患有癌症的受试者的寿命,等等)的标志物。生物标志物还包括细胞信号传导通路中的本文列出的标志物,诸如Treg和/或其他T细胞的数量、各种T细胞或其他免疫细胞的分化率和/或细胞凋亡/细胞毒性率、在T细胞或其他免疫细胞的细胞表面上表达的各种蛋白质的表达、抗原呈递功效、各种信号蛋白(例如,干扰素)及其应答基因的产生、DNA甲基化和转录功效、衰老/增殖状态,等等。

[0050] 术语“CDK4”是指细胞周期蛋白依赖性激酶4,它是Ser/Thr蛋白激酶家族的成员。这种蛋白质与酿酒酵母(*S.cerevisiae*)cdc28和裂殖酵母(*S.pombe*)cdc2两者的基因产物高度相似。它是蛋白激酶复合物的催化亚基,对细胞周期G1期的进展很重要。CDK4的活性限于G1-S期,受到调节亚基D型细胞周期蛋白和CDK抑制剂p16INK4a的控制。CDK4还负责视网

膜母细胞瘤基因产物(Rb)的磷酸化(Hanks等人(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:388-392;Mitchell等人(1995)Chrom.Res.3:261-262;Medema等人(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:8871-8875;Hall等人(1995)Oncogene 11:1581-1588)。细胞周期蛋白D-CDK4(DC)复合物磷酸化并抑制视网膜母细胞瘤(Rb)蛋白家族的成员(包括Rb1),然后在G1/S转换期间调节细胞周期。Rb1的磷酸化允许转录因子E2F从RB/E2F复合物解离,以及负责该进程通过G1期的E2F靶基因的后续转录。细胞周期蛋白D-CDK4复合物是各种促有丝分裂信号和抗促有丝分裂信号的主要整合子。CKD4还以细胞周期依赖性方式使SMAD3磷酸化并阻遏其转录活性(Matsuura等人(2004)Nature 430:226-231)。CDK4也是三元复合物细胞周期蛋白D/CDK4/CDKN1B的组分,是核转位和细胞周期蛋白D-CDK4复合物的活性所必需的。

[0051] 术语“CDK4”旨在包括片段、变体(例如,等位基因变体),以及它们的衍生物。代表性的人CDK4 cDNA序列和人CDK4蛋白序列是本领域熟知的,并且可从美国国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得。例如,人CDK4转录物序列可作为NM_000075.3获得,并且人CDK4氨基酸序列可作为NP_000066.1获得。人CDK4蛋白具有303个氨基酸和约33,730Da的分子量。人CDK4具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域(S/T Kc)(SEQ ID NO:2的第6至295号氨基酸残基),该结构域包括用于结合D型细胞周期蛋白所必需的区域(SEQ ID NO:2的第50至56号氨基酸残基)。除人以外的生物体中的CDK4直系同源物的核酸序列和多肽序列是熟知的,包括例如黑猩猩CDK4(XM_509173.5、XP_509173.2、XM_009425031.1和XP_009423306.1)、猴CDK4(XM_001116422.2和XP_001116422.1)、狗CDK4(XM_844780.3和XP_849873.1)、奶牛CDK4(NM_001037594.2和NP_001032683.1)、小鼠CDK4(NM_009870.3和NP_034000.1)、大鼠CDK4(NM_053593.2和NP_446045.1)、蛙CDK4(NM_001016742.1和NP_001016742.1),以及斑马鱼CDK4(NM_001077777.1和NP_001071245.1)。应当注意,该术语还可以用于指代本文所述的关于CDK4分子的特征的任何组合。例如,序列组成、百分比同一性、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合可以用于描述在本发明中使用的CDK4分子。

[0052] 如本文所用,“CDK4/6抑制剂”、“CDK4抑制剂”和“CDK6抑制剂”通常是指具有选择性地抑制一种或多种所列举的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)(诸如CDK4和CDK6)的能力的一大组化合物。这些抑制剂选择性地结合熟知的CDK4和CDK6细胞周期蛋白依赖性激酶,并且阻止视网膜母细胞瘤(Rb)蛋白的磷酸化,从而通过诱导细胞周期保持在G1期来阻止细胞周期进展。这些抑制剂不需要对给定的CDK成员具有特异性,只要它们选择性地抑制期望的CDK蛋白、且对非CDK蛋白具有相对轻微的脱靶效应即可。其他抑制剂可以选择性地结合CDK4和/或CDK6的熟知的一种或多种底物(例如,Rb、SMAD3等)和/或一种或多种其他结合配偶体(例如,细胞周期蛋白D、CDKN1B等),从而抑制CDK4/6功能。具有多种化学结构的此类抑制剂的许多代表性实例是本领域熟知的。例如,CDK4抑制剂和CDK6抑制剂包括玻玛西尼(以前称为LY2835219,由Eli Lilly研制,用于乳腺癌)、瑞博西尼(以前称为LEE 011,是细胞周期蛋白D1/CDK4和CDK6的抑制剂,由Novartis和Astex Pharmaceuticals研制,经FDA批准与芳香酶抑制剂结合用于治疗转移性乳腺癌)、帕博西尼(以前称为PD-0332991,高度特异性的CDK4/6抑制剂,由Pfizer研制用于治疗ER阳性和HER2阴性乳腺癌);P-276-00(CDK4-细胞周期蛋白D1的选择性抑制剂,由Nicholas Piramal研制用于治疗癌症);GW-491619(CDK4抑制剂,由GlaxoSmithKline研制用于治疗癌症);NU-6027(由AstraZeneca调研的用于治疗癌

症的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂);AG-12275(由Pfizer调研的用于治疗癌症的选择性CDK4抑制剂);AG-12286(由Pfizer调研的用于治疗癌症的广谱CDK4抑制剂);PD-0166285(由Pfizer调研的用于治疗癌症的细胞周期蛋白A介导的CDK4抑制剂);以及阿伏昔地(Alvocidib)(夫拉平度(flavopiridol));HMR-1275,由Sanofi-Aventis作为抗癌剂研制的Cdk4抑制剂)。其他CDK4/6抑制剂描述于例如W0 03/062236中,代表性实例包括8-环戊基-2-(吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮;6-溴-8-环戊基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮盐酸盐;8-环戊基-6-乙基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮盐酸盐;等等。此外,CDK4抑制剂可以基于在下列专利中找到的描述制备:美国专利号6,689,864、PCT专利公布号W008/007123、PCT专利公布号W007/140222、PCT专利公布号W006/106046、PCT专利公布号W003/062236、PCT专利公布号W005/005426、PCT专利公布号W099/21845、PCT专利公布号W006/097449、PCT专利公布号W006/097460、PCT专利公布号W099/02162和PCT专利公布号W099/50251。可商购获得的CDK4抑制剂还包括Arcyriaflavin A(目录号2457)、NSC 625987(目录号2152)、Ryuvidine(目录号2609),以及来自Tocris Bioscience(Bristol,UK)的其他抑制剂。用于分析CDK4和CDK6抑制和活性的标准测定法是本领域熟知的(参见例如Fry等人(2001)J.Biol.Chem.276:16617-16623)。抗CDK4抗体也是本领域熟知的,至少包括来自OriGene(Rockville,MD)的AM05224PU-N和其他抗体、来自R&D Systems(Minneapolis,MN)的目录号AF5254、来自Cell Signaling Technology(Danvers,MA)的目录号12790和42749、来自Santa Cruz Biotechnology(Dallas,Texas)的目录号sc-23896和其他抗体,等等。CDK4的miRNA/siRNA/shRNA产品在本领域中也是熟知的,至少包括来自Santa Cruz Biotechnology的目录号sc-29261、sc-29262和其他产品。CDK4的CRISPR敲除产物也是本领域熟知的,至少包括来自OriGene的目录号KN303041。

[0053] 术语“CDK6”是指细胞周期蛋白依赖性激酶6,它是细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)家族的成员。该激酶是蛋白激酶复合物的催化亚基,对细胞周期G1期的进展和G1/S转换很重要。该激酶的活性首先出现在G1期中期,受到包括D型细胞周期蛋白和CDK抑制剂的INK4家族成员在内的调节亚基的控制。已经证实,该激酶以及CDK4发生磷酸化,从而调节肿瘤阻抑蛋白Rb的活性。该基因的表达在某些类型的癌症中上调。CDK6基因在真核生物中是保守的,所述真核生物包括芽殖酵母和线虫类中的秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)。CDK6基因位于人的7号染色体上。该基因跨231,706个碱基对,并且编码含326个氨基酸的蛋白质。该基因在淋巴瘤、白血病、髓母细胞瘤和与染色体重排相关联的黑素瘤那样的癌症中过表达。CDK6蛋白含有由丝氨酸/苏氨酸结构域构成的催化核心(Reinhardt和Yaffe(2013)Nature Reviews Molecular Cell Biology 14:563-580)。该蛋白还含有ATP结合口袋、抑制性磷酸化位点和活化磷酸化位点、PSTAIRES样细胞周期蛋白结合结构域和活化T环基序(Lim和Kaldis(2013)Development 140:3079-3093)。在结合PSTAIRES螺旋中的细胞周期蛋白之后,该蛋白改变其构象结构以暴露磷酸化基序。该蛋白可以在细胞质和细胞核中找到,然而大多数活性复合物存在于增殖细胞的细胞核中。

[0054] 术语“CDK6”旨在包括片段、变体(例如,等位基因变体),以及它们的衍生物。代表性的人CDK6 cDNA序列和人CDK6蛋白序列是本领域熟知的,并且可从美国国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得。例如,人CDK6转录物序列可作为NM_001259.6(较长的转录物)和

NM_001145306.1 (编码相同蛋白质的较短的转录物,与较长的转录物相比在5' UTR中不同)获得,并且人CDK6氨基酸序列可作为NP_001250.1获得。人CDK6蛋白具有326个氨基酸和约36,938Da的分子量。人CDK6具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域(S/T Kc) (SEQ ID NO:7的第11至300号氨基酸残基),该结构域包括在SEQ ID NO:7的第13、24、49、70、177和325号氨基酸残基处的多个磷酸化位点、在SEQ ID NO:7的第264号氨基酸残基处的乙酰化位点,以及活化环(A环)区(SEQ ID NO:7的第162至184号氨基酸残基)。除人以外的生物体中的CDK6直系同源物的核酸序列和多肽序列是熟知的,包括例如黑猩猩CDK6 (XM_003318579.3和XP_003318627.1, XM_001167181.3和XP_001167181.1, XM_009453611.2和XP_009451886.1,以及XM_016957767.1和XP_016813256.1)、恒河猴CDK6 (NM_001261307.1和NP_001248236.1)、狗CDK6 (XM_014118897.1和XP_013974372.1)、牛CDK4 (NM_001192301.1和NP_001179230.1)、小鼠CDK6 (NM_009873.3和NP_034003.1)、大鼠CDK6 (NM_001191861.1和NP_001178790.1)、鸡CDK6 (NM_001007892.2和NP_001007893.1)、蛙CDK4 (XM_002934591.4和XP_002934637.2,以及XM_012965611.2和XP_012821065.1),以及斑马鱼CDK6 (NM_001144053.1和NP_001137525.1)。应当注意,该术语还可以用于指代本文所述的关于CDK6分子的特征的任何组合。例如,序列组成、百分比同一性、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合可以用于描述在本发明中使用的CDK6分子。

[0055] 如本文所用,“CDK4/6抑制剂”、“CDK4抑制剂”和“CDK6抑制剂”通常是指具有选择性地抑制一种或多种所列举的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK) (诸如CDK4和CDK6)的能力的一大组化合物。这些抑制剂选择性地结合熟知的CDK4和CDK6细胞周期蛋白依赖性激酶,并且阻止视网膜母细胞瘤(Rb)蛋白的磷酸化,从而通过诱导细胞周期保持在G1期来阻止细胞周期进展。这些抑制剂不需要对给定的CDK成员具有特异性,只要它们选择性地抑制期望的CDK蛋白、且对非CDK蛋白具有相对轻微的脱靶效应即可。其他抑制剂可以选择性地结合CDK4和/或CDK6的熟知的一种或多种底物(例如,Rb、SMAD3等)和/或一种或多种其他结合配偶体(例如,细胞周期蛋白D、CDKN1B等),从而抑制CDK4/6功能。具有多种化学结构的此类抑制剂的许多代表性实例是本领域熟知的。例如,CDK6抑制剂包括玻玛西尼(以前称为LY2835219,由Eli Lilly研制,用于乳腺癌)、瑞博西尼(以前称为LEE 011,是细胞周期蛋白D1/CDK4和CDK6的抑制剂,由Novartis和Astex Pharmaceuticals研制,经FDA批准与芳香酶抑制剂结合用于治疗转移性乳腺癌)、帕博西尼(以前称为PD-0332991,高度特异性的CDK4/6抑制剂,由Pfizer研制用于治疗ER阳性和HER2阴性乳腺癌)、来自Tocris Bioscience (Bristol,UK)的非瑟酮,以及上文公开的其他物质,诸如,CDK4/6抑制剂描述于例如WO 03/062236中,代表性实例包括8-环戊基-2-(吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮; 6-溴-8-环戊基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮盐酸盐; 8-环戊基-6-乙基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮盐酸盐;等等。此外,CDK4抑制剂可以基于在下列专利中找到的描述制备:美国专利号6,689,864、PCT专利公布号W008/007123、PCT专利公布号W007/140222、PCT专利公布号W006/106046、PCT专利公布号W003/062236、PCT专利公布号W005/005426、PCT专利公布号W099/21845、PCT专利公布号W006/097449、PCT专利公布号W006/097460、PCT专利公布号W099/02162和PCT专利公布号W099/50251。用于分析CDK4和CDK6抑制和活性的标准测定法是本领域熟知的(参见例如Fry等人(2001) J. Biol. Chem. 276:16617-16623)。抗CDK4抗体也是本领域

域熟知的,至少包括来自OriGene (Rockville, MD) 的AM05226PU-N和其他抗体、来自Novus Biologicals (Littleton, CO) 的目录号H00001021-M01和其他抗体、来自Cell Signaling Technology (Danvers, MA) 的目录号13331和3136、来自abcam (Cambridge, MA) 的目录号ab124821和其他抗体、来自Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas) 的目录号sc-7961和其他抗体,等等。CDK4的miRNA/siRNA/shRNA产品在本领域中也是熟知的,至少包括来自Santa Cruz Biotechnology的目录号sc-29264、sc-35048和其他产品。CDK4的CRISPR敲除产物也是本领域熟知的,至少包括来自Santa Cruz Biotechnology的目录号sc-400309和sc-419605,以及来自GenScript (Piscataway, NJ) 的CDK6的CRISPR向导RNA产物。

[0056] 术语“T细胞”包括例如CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞。术语T细胞还包括T辅助细胞1型T细胞和T辅助细胞2型T细胞两者。术语“抗原呈递细胞”包括专职性抗原呈递细胞(例如,B淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞、朗格汉斯细胞(Langerhans cell)),以及其他抗原呈递细胞(例如,角质细胞、内皮细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞和少突细胞)。

[0057] 如本文所用,“一种或多种Treg”是指调节性T细胞,其是包含约5%至10%的循环CD4⁺T细胞群的天然存在的CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T淋巴细胞,作用于支配性地阻抑自身反应性淋巴细胞,并且控制先天性和适应性免疫应答(Piccirillo和Shevach (2004) *Semin. Immunol.* 16:81-88; Fehervari和Sakaguchi (2004) *Curr. Opin. Immunol.* 16:203-208; Azuma等人 (2003) *Cancer Res.* 63:4516-4520; Cederbom等人 (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:1538-1543; Maloy等人 (2003) *J. Exp. Med.* 197:111-119; Serra等人 (2003) *Immunity* 19:877-889; Thornton和Shevach (1998) *J. Exp. Med.* 188:287-296; Janssens等人 (2003) *J. Immunol.* 171:4604-4612; Gasteiger等人 (2013) *J. Exp. Med.* 210:1167-1178; Sitrin等人 (2013) *J. Exp. Med.* 210:1153-1165)。Treg至少部分地通过抑制常规T细胞(Tcon)的增殖、扩增和效应子活性来实现这种阻抑。它们还通过借助抑制T细胞的帮助和活化而实现的细胞-细胞接触,或者通过释放免疫阻抑性细胞因子(诸如IL-10或TGF- β)来阻抑效应T细胞破坏它们的(自身的)靶标。Treg细胞的耗竭被证实增强IL-2诱导的抗肿瘤免疫(Imai等人 (2007) *Cancer Sci.* 98:416-23)。

[0058] 常规T细胞(也称为Tconv或Teff)具有效应子功能(例如,细胞因子分泌、细胞毒性活性,等等),以凭借它们表达一种或多种T细胞受体来增加免疫应答。Tcon被定义为不是Treg的任何T细胞群,并且包括例如初始T细胞、活化的T细胞、记忆T细胞、静息Tcon,或已经朝例如Th1或Th2谱系分化的Tcon。因此,增加Treg数量、增加Treg活性和/或减少Treg细胞死亡(例如,细胞凋亡)可用于阻抑与一系列免疫病症(例如,cGVHD)相关联的不需要的免疫反应。例如,在鼠模型中,添加到供体骨髓干细胞中的CD4⁺CD25⁺Treg和CD25⁻效应T细胞的1:1混合物阻抑同种免疫活化和GVHD,又不会增加移植后的恶性复发(Edinger等人 (2003) *Nat. Med.* 9:1144-1150)。在人中,HSCT接受者中的Treg重建受损与活跃的cGVHD一起发生(Zorn等人 (2005) *Blood* 106:2903-2911)。在患有活跃的cGVHD的参与者中,据信受损的Treg重建、低水平的端粒酶和缩短的端粒有助于降低Treg的存活率(Zorn等人 (2005) *Blood* 106:2903-2911; Matsuoka等人 (2010) *J. Clin. Invest.* 120:1479-1493; Kawano等人 (2011) *Blood* 118:5021-5030)。据信,IL-2在Treg稳态和功能中的作用说明了其作为抗免疫病症疗法的功效有限的原因,并且部分地解释了在MHC不匹配的鼠转基因干细胞移植(allo-SCT)之后体内施用IL-2加上同基因的T细胞耗竭供体骨髓防止GVHD且不影响GVL应答这一

发现 (Sykes 等人 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:5633-5647; Sykes 等人 (1990) J. Exp. Med. 171:645-658)。在鼠异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 模型中, 共同输注与 IL-2 一起离体扩增的 Treg 还导致对 GVHD 的阻抑, 同时免疫重建改善且 GVL 应答得以保留 (Taylor 等人 (2002) Blood 99:3493-3499; Trenado 等人 (2003) J. Clin. Invest. 112:1688-1696)。Treg 在阻抑炎症方面也很重要。在持续炎症的背景下, 至关重要的是治疗优先增强 Treg, 而不活化常规 T 细胞 (Tcon) 和可能使 GVHD 恶化的其他效应子。Treg 在体内的有效增加还与其他外周耐受性受损的病症 (例如, 自身免疫性疾病, 如 SLE、T1D、MS、银屑病、RA、IBD、血管炎) 直接相关, 其中 Treg 功能失调越来越多地牵涉其中 (Grinberg-Bleyer 等人 (2010) J. Exp. Med. 207:1871-1878; Buckner (2010) Nat. Rev. Immunol. 10:849-859; Humrich 等人 (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:204-209; Carbone 等人 (2014) Nat. Med. 20:69-74)。

[0059] 因此, 减少 Treg 数量、降低 Treg 活性和/或增加 Treg 细胞死亡 (例如, 细胞凋亡) 通常可用于增加与一系列免疫病症 (例如, 癌症、感染等) 相关联的免疫反应。相反的描述也适用于通过上调 Treg 来减少免疫反应。例如, Treg 在体内的有效增加还与其他外周耐受性受损的病症 (例如, 自身免疫性疾病, 如 SLE、T1D、MS、银屑病、RA、IBD、血管炎) 直接相关, 其中越来越多地牵涉 Treg 功能失调 (Grinberg-Bleyer 等人 (2010) J. Exp. Med. 207:1871-1878; Buckner (2010) Nat. Rev. Immunol. 10:849-859; Humrich 等人 (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:204-209; Carbone 等人 (2014) Nat. Med. 20:69-74)。

[0060] 对 Treg 活性、Teff 活性和 Treg:Teff 相互作用的调控可以根据本领域熟知的方法和如实施例 1 中举例说明的那样来确定。例如, 可以分析 Treg 和/或 Teff 的增殖、活性、凋亡、细胞因子产生库、Treg 活性、Treg 凋亡、CD25 表达、磷酸化 STAT5 (pSTAT5) 表达、FOXP3 表达, 等等。另外, 可以如本文进一步描述的, 分析淋巴细胞亚群的表型分析、导致免疫应答降低的免疫调控的功能测定、血浆细胞因子, 等等。

[0061] 此类熟知的免疫细胞特征也可以用于纯化、富集和/或分离 Treg, 或者作为替代, 减少 Treg 或确定 Treg 的减少。例如, 术语“富集的 Treg”是指除了其他 T 细胞之外还以一定比例包含 Treg 的组合物, 其中该组合物中的 Treg 与 Tcon/Teff、与 CD3⁺ 细胞或与其他基准的比率至少为 1:2、1:1.9、1:1.8、1:1.7、1:1.6、1:1.5、1:1.4、1:1.3、1:1.2、1:1.1、1:1、1:0.9、1:0.8、1:0.7、1:0.6、1:0.5、1:0.4、1:0.3、1:0.2、1:0.1 或更多, 或者这些值之间的任何范围, 或者这些值之间的任何值。这样的比率可以通过用各种方法纯化包含 T 细胞的组合物来实现, 所述方法诸如 CD8⁺ 和 CD19⁺ 共耗竭与对 CD25⁺ 细胞的阳性选择的组合。此类富集的 Treg 可以进一步根据细胞标志物和/或细胞活力来定义。例如, 富集的 Treg 细胞组合物可以具有大于 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或更多、或者这些值之间的任何范围、或者这些值之间的任何值的总细胞活力。该组合物可以包含大于 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或更多、或者这些值之间的任何范围、或者这些值之间的任何值的 CD4⁺CD25⁺ 细胞。该组合物可以包含大于 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 或更多、或者这些值之间的任何范围、或者这些值之间的任何值的 FoxP3⁺ 细胞。类似地, 术语“减少的 Treg”是指 Treg 的减少, 并且可以根据反转上文针对富集的 Treg 所提供的描述来量化和限定。

[0062] “阻断”抗体或抗体“拮抗剂”是抑制或降低该抗体所结合的一种或多种抗原的至少一种生物活性的抗体。在某些实施方案中，本文所述的阻断抗体或拮抗剂抗体或它们的片段基本上或完全抑制所述一种或多种抗原的给定生物活性。

[0063] 术语“体液”是指从体内排出或分泌的流体，以及通常不从体内排出或分泌的流体（例如羊水、房水、胆汁、血液和血浆、脑脊液、盯聆和耳垢、考珀液 (cowper's fluid) 或射精前液、乳糜、食糜、粪便、女性射精、间质液、细胞内液、淋巴液、月经、母乳、粘液、胸膜液、脓液、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、泪液、尿液、阴道润滑、玻璃体液和呕吐物）。

[0064] 术语“癌症”或“肿瘤”或“过度增殖”是指存在具有致癌细胞典型特征的细胞，所述特征诸如不受控制的增殖、永生、转移潜能、快速的生长和增殖速率，以及某些特征性形态特征。在一些实施方案中，由于致癌基因的表达和活性或者肿瘤阻抑基因（诸如视网膜母细胞瘤蛋白 (Rb)）的有缺陷的表达和/或活性，此类细胞部分或全部地表现出这些特征。癌细胞通常是肿瘤形式，但是此类细胞可以单独存在于动物体内，或者可以是非致瘤性癌细胞，诸如白血病细胞。如本文所用，术语“癌症”包括恶变前癌症以及恶性癌症。癌症包括但不限于B细胞癌，例如，多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症 (Waldenström's macroglobulinemia)、重链疾病（诸如 α 链疾病、 γ 链疾病和 μ 链疾病）、良性单克隆丙种球蛋白病和免疫细胞淀粉样变性、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑癌或中枢神经系统癌、外周神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫癌或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆道癌、小肠癌或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、血液组织癌，等等。适合于本发明所涵盖的方法的癌症类型的其他非限制性实例包括人肉瘤和癌，例如，纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索癌、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肿瘤 (Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、肝癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维耳姆斯肿瘤 (Wilms' tumor)、宫颈癌、骨癌、脑肿瘤、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤；白血病，例如急性淋巴细胞性白血病和急性髓细胞性白血病（成髓细胞性、早幼粒细胞性、髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病）；慢性白血病（慢性髓细胞性（粒细胞性）白血病和慢性淋巴细胞性白血病）；以及真性红细胞增多症、淋巴瘤（霍奇金氏病 (Hodgkin's disease) 和非霍奇金氏病）、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和重链疾病。在一些实施方案中，癌症本质上是上皮癌，包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、妇科癌症、肾癌、喉癌、肺癌、口腔癌、头颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或皮肤癌。在其他实施方案中，癌症是乳腺癌、前列腺癌、肺癌或结肠癌。在还有其他实施方案中，上皮癌是非小细胞肺癌、非乳头状肾细胞癌、宫颈癌、卵巢癌（例如浆液性卵巢癌）或乳腺癌。上皮癌可以按各种其他方式表征，包括但不限于浆液性、子宫内膜样、粘液性、透明细胞、布伦内罗氏 (Brenner) 或未分化。

[0065] 在某些实施方案中，癌症是乳腺癌。乳腺癌是从乳房组织发展而来的癌症。乳腺癌可能由许多因素诱发。在不到5%的病例中，遗传学通过引起遗传性乳腺-卵巢癌综合征而

起到更重要的作用(Boris Pasche (2010) Cancer Genetics (Cancer Treatment and Research) .Berlin:Springer,第19至20页)。这包括携带BRCA1和BRCA2基因突变的那些。这些突变占总遗传影响的高达90%，且在受影响的人群中患乳腺癌的风险为60%至80%。其他重要突变包括p53(利弗劳梅尼综合征(Li-Fraumeni syndrome))、PTEN(考登综合征(Cowden syndrome))和STK11(珀茨-杰格斯综合征(Peutz-Jeghers syndrome))、CHEK2、ATM、BRIP1和PALB2(Gage等人(2012) Journal of surgical oncology 105:444-451)。

[0066] 在一些实施方案中,癌症表达视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)。RB通路在乳腺癌治疗应答或预后中的关键作用已经为人所熟知。对于综述和报告,至少参见Witkiewicz和Knudsen (2014) Breast Cancer Res.16:207;Ertel等人(2010) Cell Cycle 9:4153-4163;以及 Scambia等人(2006) Oncogene 25:5302-5308。在其他实施方案中,癌症具有降低的Rb表达和/或有缺陷的Rb表达(例如,由于遗传突变、缺失、修饰,或其他缺陷)。

[0067] 在一些实施方案中,癌症是“雌激素阳性乳腺癌”或“(ER+) 乳腺癌”,它是指雌激素受体(ER)为阳性的乳腺癌。乳腺癌是影响女性的最常见癌症,占新诊断出的癌症的26%(Cecchini等人(2015) Cureus 7(10):e364)。在这些癌症中,超过80%将表达雌激素或孕酮受体,因而适合接受激素疗法(Howlader等人(2014) J Natl Cancer Inst.106)。使用芳香酶抑制剂、抗雌激素、他莫昔芬(tamoxifen)或氟维司群(fulvestrant)与乳腺癌复发的显著减少和总存活的改善相关联(Davies等人(2011) Lancet 378:771-784)。然而,大多数晚期疾病患者最终会对这些疗法产生抗性。乳房保留手术已经证实在与辐射疗法组合时具有与乳房切除术相同的结果,并且已经成为乳腺癌患者的主要治疗方法(Clarke等人(2005) Lancet 366:2087-2106)。因此,有相当多的女性接受放射和激素疗法。

[0068] 雌二醇通过c-Myc和细胞周期蛋白D的转录激活来激活增殖,这允许下游激活从细胞周期的G1期进展到S期所必需的细胞周期蛋白依赖性激酶(Schmidberger等人(2003) Endocr Relat Cancer 10:375-388)。这种雌激素活性是癌细胞增殖所必需的;他莫昔芬或芳香酶抑制剂用于阻断该通路(Schmidberger等人(2003) Endocr Relat Cancer 10:375-388)。用他莫昔芬或芳香酶抑制剂处理细胞导致细胞聚积在细胞周期的G1期。辐射敏感性取决于细胞周期的阶段,处于G2/M的细胞对辐射的变化最为敏感(Sinclair等人(1966) Radiat Res.29:450-474)。因此,可能的是,激素疗法可以通过使细胞停滞在细胞周期中的对DNA损伤有更强的抗性的阶段,来降低辐射的功效。

[0069] 如本文所用,“内分泌疗法”是雌激素受体阳性(ER+)乳腺癌的一线治疗,诸如使用他莫昔芬或抗雌激素的的选择性ER调控、芳香酶抑制剂、非类固醇药物(例如,来曲唑(letrozol)、阿那曲唑(anastrozol)和沃斯曲唑)、类固醇药物(例如,依西美坦(exemestane))、卵巢切除手术、卵巢切除放射疗法、LHRH类似物疗法、抗HER-2抗体、抗ER抗体、抗PR抗体,等等。代表性的内分泌疗法在下文进一步描述(参见US2007/0192880)。尽管各种信号传导通路的互补与集合最终负责乳房组织的生理机能和病理生理进展,但很明显,雌激素是通过刺激和维持恶性细胞增殖而使大多数乳腺癌发展的主要因素。因此,通过阻断雌激素的合成或通过防止雌激素作用而扰乱肿瘤细胞的雌激素环境的措施是当前用于赘生物的治疗性干预的策略。早期乳腺癌的管理主要基于在不进行或进行放射疗法的情况下通过乳房切除术或乳房肿块切除术手术切除肿瘤,之后根据ER状态进行辅助性全身疗法。

[0070] 术语“编码区”是指核苷酸序列的包含被翻译成氨基酸残基的密码子的区域,而术语“非编码区”是指核苷酸序列的不被翻译成氨基酸的区域(例如,5'和3'非翻译区)。

[0071] 术语“互补”是指两条核酸链的区域之间或同一条核酸链的两个区域之间的序列互补性的广义概念。已知的是,第一核酸区域的腺嘌呤残基能够与反平行于第一区域的第二核酸区域的残基(如果该残基是胸腺嘧啶或尿嘧啶)形成特定氢键(“碱基配对”)。类似地,已知第一核酸链的胞嘧啶残基能够与反平行于第一链的第二核酸链的残基(如果该残基是鸟嘌呤)碱基配对。如果当两个区域以反平行方式排列时,核酸的第一区域与相同或不同核酸的第二区域互补,则该第一区域的至少一个核苷酸残基能够与第二区域的残基碱基配对。优选地,第一区域包含第一部分而第二区域包含第二部分,由此,当第一部分和第二部分以反平行方式排列时,第一部分的至少约50%,优选地至少约75%、至少约90%或至少约95%的核苷酸残基能够与第二部分中的核苷酸残基碱基配对。更优选地,第一部分的所有核苷酸残基都能够与第二部分中的核苷酸残基碱基配对。

[0072] 术语“对照”是指适合于提供与测试样品中的表达产物做比较的任何参考标准。在一个实施方案中,对照包括获得“对照样品”,从该对照样品中检测表达产物水平并且与来自测试样品的表达产物水平进行比较。这样的对照样品可以包括任何合适的样品,包括但不限于来自对照癌症患者的具有已知结果的样品(可以是储存样品或先前的样品测量值);从受试者(诸如正常患者或癌症患者)分离的正常组织或细胞、从受试者(诸如正常受试者或癌症患者)分离的经培养的原代细胞/组织、从癌症患者的相同器官或身体位置获得的邻近正常细胞/组织、从正常受试者分离的组织或细胞样品,或者从保藏机构获得的原代细胞/组织。在另一个优选的实施方案中,对照可以包括来自任何合适来源(包括但不限于管家基因)的参考标准表达产物水平、来自正常组织(或其他先前分析的对照样品)的表达产物水平范围、来自具有某种结果(例如,存活一年、两年、三年、四年等)或接受某种治疗(例如,护理标准癌症疗法)的一组患者或一组患者的测试样品内的先前测定的表达产物水平范围。本领域的技术人员将理解,此类对照样品和参考标准表达产物水平可以组合用作本发明方法中的对照。在一个实施方案中,对照可以包括正常的或非癌性的细胞/组织样品。在另一个优选的实施方案中,对照可以包括一组患者的表达水平,所述一组患者诸如一组癌症患者、或一组接受某种治疗的癌症患者、或一组具有一种结果与另一种结果进行比较的患者。在前一种情况下,每个患者的具体表达产物水平可以被指定为百分位表达水平,或者表示为高于或低于参考标准表达水平的平均数或平均值。在另一个优选的实施方案中,对照可以包括正常细胞、来自用组合化学疗法治疗的患者的细胞,以及来自患有良性癌症的患者的细胞。在另一个实施方案中,对照还可以包括测量值,例如,某一群体中的特定基因与同一群体中的管家基因的表达水平相比的平均表达水平。这样的群体可以包括正常受试者、尚未经历任何治疗(即,未经治疗)的癌症患者、正在经历护理标准疗法的癌症患者,或者患有良性癌症的患者。在另一个优选的实施方案中,对照包括表达产物水平的比率变换,包括但不限于确定测试样品中的两个基因的表达产物水平的比率,并将其与参考标准中相同的两个基因的任何合适比率进行比较;确定测试样品中的两个或更多个基因的表达产物水平,并确定任何合适对照中的表达产物水平的差异;以及确定测试样品中的两个或更多个基因的表达产物水平,将其表达相对于测试样品中的管家基因的表达标准化,并与任何合适的对照进行比较。在特别优选的实施方案中,对照包括对照样品,该对照样品与

测试样品具有相同的谱系和/或类型。在另一个实施方案中,对照可以包括表达产物水平,所述表达产物水平被分组为一组患者样品(诸如所有患有癌症的患者的样品)内的百分位数或基于一组患者样品(诸如所有患有癌症的患者的样品)的百分位数。在一个实施方案中,建立了对照表达产物水平,其中使用相对于例如特定百分位数更高或更低的表达产物水平作为基础来预测结果。在另一个优选的实施方案中,使用来自具有已知结果的癌症对照患者的表达产物水平来建立对照表达产物水平,并将来自测试样品的表达产物水平与对照表达产物水平进行比较,作为预测结果的基础。如下面的数据所证明,本发明的方法不限于使用特定的切割点来对测试样品中的表达产物水平与对照进行比较。

[0073] 生物标志物核酸的“拷贝数”是指编码特定基因产物的细胞(例如,生殖系细胞和/或体细胞)中的DNA序列的数目。一般来讲,对于给定的基因,哺乳动物具有每个基因的两个拷贝。然而,可以通过基因扩增或复制增加拷贝数,或通过缺失减少拷贝数。例如,生殖细胞拷贝数变化包括在一个或多个基因组基因座处的变化,其中所述一个或多个基因组基因座不算入对照中的生殖系细胞拷贝的正常互补拷贝数(例如,由其确定特定生殖系细胞DNA和对应拷贝数的相同物种的生殖系细胞DNA中的正常拷贝数)中。体细胞拷贝数变化包括在一个或多个基因组基因座处的变化,其中所述一个或多个基因组基因座不算入对照的生殖系细胞DNA中的拷贝数(例如,由其确定体细胞DNA和对应拷贝数的相同受试者的生殖系细胞DNA中的拷贝数)中。

[0074] 生物标志物核酸的“正常”拷贝数(例如,生殖系细胞和/或体细胞)或者生物标志物核酸或蛋白质的“正常”表达水平是生物样品中的表达活性/水平或拷贝数,所述生物样品例如来自未罹患癌症的受试者(例如人)或来自患有癌症的相同受试者的对应非癌性组织的含有组织、全血、血清、血浆、口腔刮擦物、唾液、脑脊液、尿液、粪便和骨髓的样品。

[0075] 术语“确定针对受试者的合适治疗方案”被认为是指确定针对受试者的基于或基本上基于或至少部分地基于根据本发明的分析结果而开始、修改和/或结束的治疗方案(即,单一疗法或用于预防和/或治疗受试者中的癌症的不同疗法的组合)。一个实例是确定是否提供针对癌症的靶向疗法来提供抗癌疗法(例如,CDK4/6抑制剂疗法)。另一个实例是在手术(其目的是降低复发的风险)之后开始辅助疗法,另一个实例是修改特定化学疗法的剂量。除了根据本发明的分析结果之外,该确定可以基于待治疗受试者的个人特征。在大多数情况下,主治医师或医生将实际确定针对受试者的合适的治疗方案。

[0076] 术语“表达特征(signature)”或“特征”是指一组两个或更多个协调表达的生物标志物。例如,构成该特征的基因、蛋白质等可以在特定的细胞谱系、分化阶段或特定的生物应答期间表达。这些生物标志物可以反映它们在其中表达的肿瘤的生物方面,诸如癌症的起源细胞、活组织检查中的非恶性细胞的性质,以及导致癌症的致癌机制。表达数据和基因表达水平可以存储在计算机可读介质(例如,连同微阵列或芯片读取装置一起使用的计算机可读介质)上。可以操纵这样的表达数据以生成表达特征。

[0077] 如果分子与基质共价或非共价缔合,则分子“固定”或“附连”到基质,使得可以用流体(例如标准盐水柠檬酸盐,pH 7.4)冲洗基质,而不会使该分子的很大一部分从基质解离。

[0078] 术语“同源”是指同一核酸链的两个区域之间或两条不同核酸链的区域之间的核苷酸序列相似性。当两个区域中的核苷酸残基位置被相同的核苷酸残基占据时,则这些区

域在该位置处是同源的。如果每个区域的至少一个核苷酸残基位置被相同的残基占据,则第一区域与第二区域是同源的。两个区域之间的同源性以相同核苷酸残基占据的两个区域的核苷酸残基位置的比例来表示。举例来说,具有核苷酸序列5'-ATTGCC-3'的区域与具有核苷酸序列5'-TATGGC-3'的区域共有50%的同源性。优选地,第一区域包含第一部分而第二区域包含第二部分,由此,这些部分中每一者的核苷酸残基位置的至少约50%,优选地至少约75%、至少约90%或至少约95%被相同的核苷酸残基占据。更优选地,这些部分中每一者的全部核苷酸残基位置都被相同的核苷酸残基占据。

[0079] 术语“免疫细胞”是指在免疫应答中起作用的细胞。免疫细胞源自造血系统,包括淋巴细胞,诸如B细胞和T细胞;自然杀伤细胞;骨髓细胞,诸如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0080] 免疫疗法是靶向疗法的一种形式,可以包括例如使用癌症疫苗和/或致敏抗原呈递细胞。例如,溶瘤病毒是能够感染和裂解癌细胞同时使正常细胞不受伤害的病毒,这使得它们可能在癌症疗法中 useful。溶瘤病毒的复制既促进肿瘤细胞的破坏,又在肿瘤部位处产生剂量扩增。它们还可以充当抗癌基因的载体,允许这些基因被特异性地递送到肿瘤部位。免疫疗法可以涉及用于短期保护宿主的被动免疫,该被动免疫通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预先形成的抗体(例如,向肿瘤抗原施用任选地与化学治疗剂或毒素连接的单克隆抗体)来实现。免疫疗法还可以集中于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别的表位。作为替代,可以使用反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三螺旋多核苷酸等来选择性地调控与肿瘤或癌症的起始、进展和/或病理学相关的生物分子。如上所述,针对免疫检查点靶标(诸如PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4等)的免疫疗法是有用的。

[0081] 术语“免疫检查点”是指CD4+T细胞和/或CD8+T细胞的细胞表面上的一群分子,它们通过下调或抑制抗肿瘤免疫应答来微调免疫应答。免疫检查点蛋白是本领域熟知的,包括但不限于CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR(参见例如WO 2012/177624)。该术语还涵盖生物活性蛋白片段,以及编码全长免疫检查点蛋白的核酸及其生物活性蛋白片段。在一些实施方案中,该术语还涵盖根据本文所提供的同源性描述的任何片段。

[0082] 免疫检查点及其序列在本领域中是熟知的,代表性实施方案在下文进行描述。例如,术语“PD-1”是指免疫球蛋白基因超家族的成员,它作为具有已知配体PD-L1和PD-L2的共抑制性受体起作用。先前使用基于减法克隆的方法以选择在TCR诱导激活T细胞死亡期间上调的基因,鉴定出了PD-1。PD-1基于其结合PD-L1的能力,是CD28/CTLA-4分子家族的成员。与CTLA-4一样,PD-1响应于抗CD3,在T细胞表面上被快速诱导(Agata等人25 (1996) *Int. Immunol.* 8:765)。然而,与CTLA-4不同,PD-1也在B细胞表面上被诱导(响应于抗IgM)。PD-1也在胸腺细胞和骨髓细胞的子集上表达(Agata等人(1996),出处同上;Nishimura等人(1996) *Int. Immunol.* 8:773)。

[0083] “抗免疫检查点”或“免疫检查点抑制剂”或“免疫检查点阻断”疗法是指使用抑制免疫检查点核酸和/或蛋白质的剂。免疫检查点具有提供阻抑免疫应答的抑制性信号的共同功能,并且抑制一个或多个免疫检查点可以阻断或以其他方式中和抑制性信号传导,从而上调免疫应答以便更有效地治疗癌症。可用于抑制免疫检查点的示例性剂包括可以结合

和/或灭活或抑制免疫检查点蛋白或其片段的抗体、小分子、肽、肽模拟物、天然配体和天然配体的衍生物;以及可以下调免疫检查点核酸或其片段的表达和/或活性的RNA干扰、反义、核酸适体,等等。用于上调免疫应答的示例性剂包括:针对一种或多种免疫检查点蛋白的抗体,这些抗体阻断蛋白质与其一种或多种天然受体之间的相互作用;非活化形式的一种或多种免疫检查点蛋白(例如,显性负性多肽);阻断一种或多种免疫检查点蛋白与其一种或多种天然受体之间的相互作用的小分子或肽;与其一种或多种天然受体结合的融合蛋白(例如,免疫检查点抑制蛋白的与抗体或免疫球蛋白的Fc部分融合的细胞外部分);阻断免疫检查点核酸转录或翻译的核酸分子;等等。此类剂可以直接阻断一种或多种免疫检查点与其一种或多种天然受体(例如抗体)之间的相互作用,以防止抑制性信号传导并上调免疫应答。作为替代,剂可以间接阻断一种或多种免疫检查点蛋白与其一种或多种天然受体之间的相互作用,以防止抑制性信号传导并上调免疫应答。例如,免疫检查点蛋白配体的可溶形式(诸如稳定的细胞外结构域)可以与其受体结合,以间接降低与适当配体结合的受体的有效浓度。在一个实施方案中,单独使用或组合使用抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和/或抗PD-L2抗体来抑制免疫检查点。这些实施方案还适用于针对特定免疫检查点(诸如PD-1通路)的特定疗法(例如,抗PD-1通路疗法,也称为PD-1通路抑制剂疗法)。许多免疫检查点抑制剂是已知的并且可公开获得,包括例如**Keytruda®**(派姆单抗(pembrolizumab);抗PD-1抗体)、**Opdivo®**(纳武单抗(nivolumab);抗PD-1抗体)、**Tecentriq®**(阿特珠单抗(atezolizumab);抗PD-L1抗体)、德瓦鲁单抗(durvalumab)(抗PD-L1抗体),等等。

[0084] 术语“免疫病症”是指以不需要的免疫应答为特征的疾患。在一些实施方案中,免疫病症是这样的:其使得期望的抗免疫病症应答阻抑免疫应答。期望在其中下调免疫应答的此类状态是本领域熟知的,包括但不限于在移植物抗宿主病(GVHD)、炎症或自身免疫性疾病,诸如系统性红斑狼疮、多发性硬化症、变态反应、超敏性应答和需要增加调节性T细胞的产生或功能的病症(如本文进一步所述)中组织、皮肤和器官移植的情况。在其他实施方案中,免疫病症是这样的:其使得期望的应答是增加的免疫应答。期望在其中上调免疫应答的此类状态是本领域熟知的,包括但不限于需要增加CD4+效应T细胞的产生或功能(诸如对抗癌症、感染(例如,寄生生物感染、细菌感染、蠕虫感染或病毒感染))的病症、需要提高疫苗接种效率的病症,等等)。

[0085] 术语“免疫应答”包括T细胞介导的免疫应答和/或B细胞介导的免疫应答。示例性免疫应答包括T细胞应答,例如,细胞因子产生和细胞的细胞毒性。此外,术语免疫应答包括间接地受到T细胞活化影响的免疫应答,例如,抗体产生(体液应答)和细胞因子应答细胞(例如,巨噬细胞)活化。

[0086] 术语“免疫治疗剂”可以包括可以刺激宿主免疫系统对受试者中的肿瘤或癌症产生免疫应答的任何分子、肽、抗体或其他剂。各种免疫治疗剂都可以用于本文所述的组合物和方法中。

[0087] 术语“抑制”或“缺陷”包括例如特定的动作、功能或相互作用减少、受限或受阻。在一些实施方案中,如果癌症的至少一种症状得到缓解、终止、减缓或预防,则该癌症被“抑制”。如本文所用,如果癌症的复发或转移减少,得到减缓、延迟或预防,则该癌症也被“抑制”。类似地,如果生物功能(诸如蛋白质的功能)与参考状态(诸如野生型状态那样的对照)

相比降低,则该生物功能被抑制。例如,如果CDK4或CDK6激酶的稳定性由于与CDK4或CDK6抑制剂接触而相比没有与该CDK4或CDK6抑制剂接触的CDK4或CDK6蛋白降低,则与该CDK4或CDK6抑制剂接触的CDK4或CDK6蛋白的CDK活性被抑制或缺陷。类似地,如果突变型CDK4或CDK6激酶的激酶活性由于突变和/或与该抑制剂接触而相比没有与该抑制剂接触的野生型CDK4或CDK6激酶和/或突变型CDK4或CDK6激酶降低,则该突变型CDK4或CDK6激酶的激酶活性被抑制或缺陷。这种抑制或缺陷可以被诱导产生(诸如通过在特定的时间和/或位置施用剂),或者可以是组成型的(诸如通过可遗传的突变)。这种抑制或缺陷也可以是部分的或完全的(例如,与参考状态(诸如野生型状态那样的对照)相比基本上没有可测量的活性)。基本上完全抑制或缺陷被称为阻断。

[0088] 当提及两个分子之间的相互作用时,术语“相互作用”是指分子彼此的物理接触(例如,结合)。一般来讲,这种相互作用导致一种或两种所述分子的活性(产生生物效应)。

[0089] “分离的蛋白质”是指这样的蛋白质:当从细胞中分离或通过重组DNA技术产生时基本上不含其他蛋白质、细胞物质、分离介质和培养基,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。“分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物活性部分基本上不含细胞或组织来源(由其获得抗体、多肽、肽或融合蛋白)的细胞物质或其他污染蛋白质,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。用语“基本上不含细胞物质”包括生物标志物多肽或其片段的制剂,其中蛋白质与由其分离或重组产生该蛋白质的细胞的细胞组分分离。在一个实施方案中,用语“基本上不含细胞物质”包括生物标志物蛋白或其片段的制剂,其具有少于约30%(以干重计)的非生物标志物蛋白(在本文中也称为“污染蛋白质”)、更优选地少于约20%的非生物标志物蛋白、还更优选地少于约10%的非生物标志物蛋白,以及最优选地少于约5%的非生物标志物蛋白。当重组产生抗体、多肽、肽或者融合蛋白或其片段(例如,其生物活性片段)时,其也优选地基本上不含培养基,即,培养基占该蛋白质制剂体积的小于约20%、更优选地小于约10%、最优选地小于约5%。

[0090] “试剂盒”是包括至少一种试剂(例如探针或小分子)的任何制品(例如包装或容器),用于特异性地检测和/或影响本发明标志物的表达。试剂盒可以作为一个单元进行促销、分发或销售,用于执行本发明方法。试剂盒可以包括表达可用于本发明方法的组合物所必需的一种或多种试剂。在某些实施方案中,试剂盒还可以包括参考标准,例如,编码不影响和不调节控制细胞的生长、分裂、迁移、存活和凋亡的信号传导通路的蛋白质的核酸。本领域的技术人员可以设想许多这样的对照蛋白,包括但不限于常见的分子标签(例如,绿色荧光蛋白和 β -半乳糖苷酶);通过GeneOntology参考,未被归类于涵盖细胞生长、分裂、迁移、存活或凋亡的任何通路的蛋白质;或普遍存在的管家蛋白。试剂盒中的试剂可以在各个容器中提供,或者在单个容器中作为两种或更多种试剂的混合物提供。此外,可以包括描述试剂盒内的组合物的用途的指导性材料。

[0091] 术语“新辅助疗法”是指在初次治疗之前给予的治疗。新辅助疗法的实例可以包括化学疗法、辐射疗法和激素疗法。

[0092] 生物标志物的“正常”表达水平是未罹患癌症的受试者(例如,人患者)的细胞中的该生物标志物的表达水平。生物标志物的“过表达”或“显著更高的表达水平”是指测试样品中的表达水平高于用于评定表达的测定法的标准误差,并且优选地比对照样品(例如,来自未患有该生物标志物相关联疾病的健康受试者的样品)中的该生物标志物的表达活性或水

平,以及优选地,几个对照样品中的该生物标志物的平均表达水平至少高10%,并且更优选地为后者的1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更大的倍数。生物标志物的“显著更低的表达水平”是指测试样品中的表达水平比对照样品(例如,来自未患有该生物标志物相关联疾病的健康受试者的样品)中的该生物标志物的表达水平,以及优选地,几个对照样品中的该生物标志物的平均表达水平至少低10%,并且更优选地为后者的1/1.2、1/1.3、1/1.4、1/1.5、1/1.6、1/1.7、1/1.8、1/1.9、1/2.0、1/2.1、1/2.1、1/2.2、1/2.3、1/2.4、1/2.5、1/2.6、1/2.7、1/2.8、1/2.9、1/3、1/3.5、1/4、1/4.5、1/5、1/5.5、1/6、1/6.5、1/7、1/7.5、1/8、1/8.5、1/9、1/9.5、1/10、1/10.5、1/11、1/12、1/13、1/14、1/15、1/16、1/17、1/18、1/19、1/20或1/更大的数。生物标志物的“过表达”或“显著更高的表达水平”是指测试样品中的表达水平高于用于评定表达的测定法的标准误差,并且优选地比对照样品(例如,来自未患有该生物标志物相关联疾病的健康受试者的样品)中的该生物标志物的表达活性或水平,以及优选地,几个对照样品中的该生物标志物的平均表达水平至少高10%,并且更优选地为后者的1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更大的倍数。生物标志物的“显著更低的表达水平”是指测试样品中的表达水平比对照样品(例如,来自未患有该生物标志物相关联疾病的健康受试者的样品)中的该生物标志物的表达水平,以及优选地,几个对照样品中的该生物标志物的平均表达水平至少低10%,并且更优选地为后者的1/1.2、1/1.3、1/1.4、1/1.5、1/1.6、1/1.7、1/1.8、1/1.9、1/2.0、1/2.1、1/2.1、1/2.2、1/2.3、1/2.4、1/2.5、1/2.6、1/2.7、1/2.8、1/2.9、1/3、1/3.5、1/4、1/4.5、1/5、1/5.5、1/6、1/6.5、1/7、1/7.5、1/8、1/8.5、1/9、1/9.5、1/10、1/10.5、1/11、1/12、1/13、1/14、1/15、1/16、1/17、1/18、1/19、1/20或1/更大的数。

[0093] 这种“显著性”水平也可以应用于本文所述的任何其他测量参数,诸如表达、抑制、细胞毒性、细胞生长等的测量参数。

[0094] 术语“预定的”生物标志物量和/或活性测量值可以是用于(仅以举例的方式)评估可以被选择进行特定治疗的受试者、评估对单独的治疗(诸如一种或多种CDK4或CDK6抑制剂)或者治疗与一种或多种CDK4或CDK6抑制剂的组合的应答、和/或评估疾病状态的生物标志物量和/或活性测量值。可以在患有或不患有癌症的患者群体中测定预定的生物标志物量和/或活性测量值。预定的生物标志物量和/或活性测量值可以是单个数字,其同等适用于每个患者,或者预定的生物标志物量和/或活性测量值可以根据患者的特定亚群而变化。受试者的年龄、体重、身高和其他因素可能影响个体的预定的生物标志物量和/或活性测量值。另外,可以单独地为每个受试者确定预定生物标志物的量和/或活性。在一个实施方案中,在本文所述的方法中确定和/或比较的量基于绝对测量值。在另一个实施方案中,在本文所述的方法中确定和/或比较的量基于相对测量值,诸如比率(例如,相对于管家生物标志物或其他通常恒定的生物标志物的表达标准化的血清生物标志物)。预定的生物标志物量和/或活性测量值可以是任何合适的标准。例如,预定的生物标志物量和/或活性测量值可以从正在针对其评定患者选择的同一人或不同的人获得。在一个实施方案中,预定的生物标志物量和/或活性测量值可以从同一患者的先前评定中获得。以这种方式,可以随时间

推移监测患者选择的进展。此外,如果受试者是人,则可以从另一个人或多个人(例如,选定的人群)的评定中获得对照。以这种方式,可以将正在针对其评定选择的人的选择程度与合适的其他人(例如,与感兴趣的人处于类似情况的其他人,诸如患有相似或相同的一种或多种疾患和/或同一种族群体的那些人)进行比较。

[0095] 术语“预测的”包括在疗法之前、期间或之后使用生物标志物核酸和/或蛋白质状态(例如,肿瘤的过度活性或活性不足、出现、表达、生长、缓解、复发或抗性)来确定癌症对抗癌疗法诸如CDK4或CDK6抑制剂疗法(例如,CDK4或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)有应答的可能性。该生物标志物的这种预测的用途可以通过例如以下来证实:(1)例如在超过约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%或更多的所测定的人癌症类型或癌症样品中,增加或减少的拷贝数(例如,通过FISH、FISH+SKY、单分子测序(例如,如本领域至少在J.Biotechnol.,86:289-301中所述)或qPCR)、生物标志物核酸的过表达或表达不足(例如,通过ISH、RNA印迹或qPCR)、增加或减少的生物标志物蛋白(例如,通过IHC)和/或生物标志物靶标,或者增加或降低的活性;(2)该生物标志物在生物样品中的受绝对或相对调控的存在或缺失,其中生物样品例如来自罹患癌症的受试者(例如,人)的包含组织、全血、血清、血浆、口腔刮擦物、唾液、脑脊液、尿液、粪便或骨髓的样品;(3)该生物标志物在癌症患者(例如,对特定的抗癌疗法(例如,CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法组合)有应答的那些,或对其产生抗性的那些)的临床亚组中的绝对或相对调控的存在或缺失。

[0096] 术语“预防”、“预防性治疗”等是指降低在未患有但处于患上疾病、病症或疾患的风险下或易患疾病、病症或疾患的受试者患上疾病、病症或疾患的可能性。

[0097] 术语“探针”是指能够选择性地结合特定目标靶分子的任何分子,例如,由生物标志物核酸编码或对应于生物标志物核酸的核苷酸转录物或蛋白质。探针可以由本领域技术人员合成,或者来源于适当的生物制剂。如本文所述,出于检测靶分子的目的,可以特异性地设计探针以进行标记。可以用作探针的分子的实例包括但不限于RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0098] 术语“预后”包括预测癌症的可能病程和结果或从疾病中恢复的可能性。在一些实施方案中,统计算法的使用为个体提供了癌症的预后。例如,预后可以是手术、癌症的临床亚型(例如,实体肿瘤,诸如肺癌、黑素瘤和肾细胞癌)的发展、一种或多种临床因素的发展、肠癌的发展,或从疾病中恢复。

[0099] 术语“对疗法(例如,CDK4或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)的应答”涉及对疗法(例如,CDK4或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)的任何应答,并且对于癌症,优选地涉及新辅助或辅助化学疗法开始之后癌细胞数量、肿瘤质量和/或体积的变化。可以评定过度增殖性病症应答,例如其功效,或在新辅助或辅助情况下评定该应答,其中可以通过CT、PET、乳房X光检查、超声波或触诊测量,将全身介入之后肿瘤的大小与初始的大小和尺寸进行比较。在活组织检查或手术切除之后,还可以通过卡尺测量或肿瘤的病理检查来评定应答。可以以如肿瘤体积百分比变化的定量方式,或以如“病理完全应答”(pCR)、“临床完全缓解”(cCR)、“临床部分缓解”(cPR)、“临床稳定疾病”(cSD)、“临床进展性疾病”(cPD)或其他定性标准的定性方式来记录

应答。对过度增殖性病征应答的评定可以在新辅助或辅助疗法开始之后的早期进行,例如,在数小时、数天、数周之后或优选地数月之后进行。应答评定的典型端点是在终止新辅助化学疗法之后或在手术切除残留的肿瘤细胞和/或肿瘤床之后。这典型地是在新辅助疗法开始之后三个月。在一些实施方案中,可以通过测量临床受益率(CBR)来确定本文所述治疗性处理的临床功效。临床受益率通过在疗法结束后至少6个月的时间点确定完全缓解(CR)患者的百分比、部分缓解(PR)患者的数量和患有稳定疾病(SD)的患者的数量的总和来测量。该公式的简写是超过6个月的 $CBR=CR+PR+SD$ 。在一些实施方案中,特定癌症治疗方案的CBR为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。用于评估对癌症疗法的应答的附加标准与“存活”有关,其中存活包括以下中的全部:存活直至死亡,也称为总存活(其中所述死亡可以与病因或相关肿瘤无关);“无复发存活”(其中术语复发应当包括局部和远处复发);无转移存活;无病存活(其中术语疾病应当包括癌症和与之相关联的疾病)。所述存活的长度可以通过参考限定的起点(例如,诊断时间或治疗开始时间)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。此外,治疗功效的标准可以扩展到包括对化学疗法的应答、存活概率、给定时间段内转移的概率,以及肿瘤复发的概率。例如,为了确定适当的阈值,可以将特定的癌症治疗方案施用于受试者群体,并且可以将结果与在施用任何癌症疗法之前确定的生物标志物测量值相关联。结果测量可以是对新辅助治疗中给予的疗法的病理性应答。作为替代,可以在一段时间内监测癌症疗法后受试者的结果测量,诸如总存活和无病存活,所述受试者的生物标志物测量值是已知的。在某些实施方案中,施用的剂量是本领域已知的癌症治疗剂的标准剂量。监测受试者的时间段可以变化。例如,可以监测受试者至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。

[0100] 术语“抗性”是指癌症样品或哺乳动物对癌症疗法的获得性或天然抗性(即,对治疗性治疗无应答或对治疗性治疗具有降低的或有限的应答),诸如对治疗性治疗的应答降低5%或更多,例如,10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多,降低至1/2、1/3、1/4、1/5、1/10、1/15、1/20或1/更大的数。可以通过在获得抗性之前与相同的癌症样品或哺乳动物进行比较,或通过已知对治疗性治疗无抗性的不同癌症样品或哺乳动物进行比较,来测量应答的降低。对化学疗法的典型获得性抗性被称为“多药抗性”。多药抗性可以通过P-糖蛋白介导或可以通过其他机制介导,或者多药抗性可以在哺乳动物感染多药抗性微生物或微生物的组合时出现。确定对治疗性治疗的抗性在本领域中是常规的,并且在普通熟练的临床医生的技能范围内,例如,可以通过如本文描述为“致敏”的细胞增殖测定法和细胞死亡测定法来测量。在一些实施方案中,术语“逆转抗性”意味着在单独的主要癌症疗法(例如,化学治疗疗法或辐射疗法)不能产生与未治疗的肿瘤的肿瘤体积相比在统计学上显著的肿瘤体积减小的情况下,将第二剂与主要癌症疗法(例如,化学治疗疗法或辐射疗法)组合使用能够产生与未治疗的肿瘤的肿瘤体积相比时的统计学显著性水平(例如, $p<0.05$)的肿瘤体积的显著减小。这通常适用于在未治疗的肿瘤有节奏地对数生长时进行的肿瘤体积测量。

[0101] 术语“应答”或“应答性”是指对疗法的应答。例如,抗癌应答包括减小肿瘤大小或抑制肿瘤生长。这些术语也可以指改善的预后,例如,由复发时间增加或总存活期增加所反映,复发时间是在审查作为第一次事件的第二次原发性癌症或没有复发迹象的死亡的情况下到第一次复发的时期,总存活期是从治疗到任何原因造成的死亡的时期。应答或有应答

意味着当暴露于刺激时获得有益的端点。作为替代,在暴露于刺激时使负面或有害的症状最小化、减轻或减弱。应当认识到,评估肿瘤或受试者将表现出有利应答的可能性等同于评估肿瘤或受试者不会表现出有利应答(即,将表现出缺乏应答或无应答)的可能性。

[0102] 如本文所用的“RNA干扰剂”,被定义为通过RNA干扰(RNAi)来干扰或抑制靶标生物标志物基因表达的任何剂。此类RNA干扰剂包括但不限于核酸分子,其包括与本发明的靶标生物标志物基因同源的RNA分子或其片段、短干扰RNA(siRNA),以及通过RNA干扰(RNAi)来干扰或抑制靶标生物标志物核酸表达的小分子。

[0103] “RNA干扰(RNAi)”是一种进化上保守的过程,由此,与靶标生物标志物核酸相同或高度相似的序列的RNA的表达或引入导致从该靶基因转录的信使RNA(mRNA)的序列特异性降解或特异性转录后基因沉默(PTGS)(参见Coburn,G.and Cullen,B.(2002) J. of Virology 76(18):9225),从而抑制靶标生物标志物核酸的表达。在一个实施方案中,该RNA是双链RNA(dsRNA)。该过程已经在植物、无脊椎动物和哺乳动物细胞中描述过。在自然界中,RNAi由dsRNA特异性内切核酸酶Dicer引发,其促进将长dsRNA进行性切割成称为siRNA的双链片段。siRNA被掺入到识别和切割靶标mRNA的蛋白质复合物中。RNAi还可以通过引入核酸分子(例如,合成的siRNA、shRNA或其他RNA干扰剂)来引发,以抑制或沉默靶标生物标志物核酸的表达。如本文所用,“靶标生物标志物核酸表达的抑制”或“标志物基因表达的抑制”包括靶标生物标志物核酸或由该靶标生物标志物核酸编码的蛋白质的表达或者蛋白质活性或水平的任何降低。与尚未被RNA干扰剂靶向的靶标生物标志物核酸的表达或者由尚未被RNA干扰剂靶向的靶标生物标志物核酸编码的蛋白质的活性或水平相比,降低可以是至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或更多。

[0104] 除RNAi之外,可以使用基因组编辑来调控感兴趣的生物标志物的拷贝数或基因序列,诸如感兴趣的CDK4和/或CDK6生物标志物的组成型或诱导型敲除或突变。例如,CRISPR-Cas系统可以用于精确编辑基因组核酸(例如,用于产生非功能性或无效突变)。在此类实施方案中,可以表达CRISPR向导RNA和/或Cas酶。例如,可以将仅含有向导RNA的载体施用于针对Cas9酶转基因的动物或细胞。可以使用类似的策略(例如,设计者锌指、转录激活因子样效应子(TALE)或归巢大范围核酸酶)。此类系统在本领域中是熟知的(参见例如,美国专利号8,697,359;Sander和Joung(2014) Nat. Biotech. 32:347-355;Hale等人(2009) Cell 139:945-956;Karginov和Hannon(2010) Mol. Cell 37:7;美国专利公布2014/0087426和2012/0178169;Boch等人(2011) Nat. Biotech. 29:135-136;Boch等人(2009) Science 326:1509-1512;Moscou和Bogdanove(2009) Science 326:1501;Weber等人(2011) PLoS One 6:e19722;Li等人(2011) Nucl. Acids Res. 39:6315-6325;Zhang等人(2011) Nat. Biotech. 29:149-153;Miller等人(2011) Nat. Biotech. 29:143-148;Lin等人(2014) Nucl. Acids Res. 42:e47)。根据本领域熟知的方法,此类遗传策略可以使用组成型表达系统或诱导型表达系统。

[0105] 术语“小分子”是本领域的术语,包括分子量小于约1000或小于约500的分子。在一个实施方案中,小分子不仅仅包含肽键。在另一个实施方案中,小分子不是低聚体。可以筛选活性的示例性小分子化合物包括但不限于肽、肽模拟物、核酸、碳水化合物、小有机分子(例如,聚酯化合物)(Cane等人(1998) Science 282:63),以及天然产物提取物文库。在另一个实施方案中,所述化合物是小的有机非肽化合物。在一个另外的实施方案中,小分子不是

生物合成的。

[0106] 用于检测或确定至少一种生物标志物的存在或水平的术语“样品”典型地是全血、血浆、血清、唾液、尿液、粪便(例如,大便)、眼泪和任何其他体液(例如,如上文在“体液”的定义下所述),或组织样品(例如,活组织检查),诸如小肠、结肠样品或手术切除组织。在某些情况下,本发明的方法还包括在检测或确定样品中的至少一种标志物的存在或水平之前从个体获得该样品。

[0107] 应用于生物活性剂的术语“选择性抑制”或“选择性地抑制”是指与脱靶信号传导活性相比,所述剂经由与靶标的直接或交互的相互作用来选择性地降低靶标信号传导活性的能力。例如,相比于另一种CDK激酶选择性地抑制CDK4和/或CDK6的剂可以具有针对CDK4和/或CDK6的活性,该活性比该化合物针对至少一种其他CDK的活性至少高5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或2x(倍)(例如,至少约3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、15x、20x、25x、30x、35x、40x、45x、50x、55x、60x、65x、70x、75x、80x、85x、90x、95x、100x、105x、110x、120x、125x、150x、200x、250x、300x、350x、400x、450x、500x、600x、700x、800x、900x、1000x、1500x、2000x、2500x、3000x、3500x、4000x、4500x、5000x、5500x、6000x、6500x、7000x、7500x、8000x、8500x、9000x、9500x、10000x、或更大倍数,或介于两者之间的任何范围(包括端值在内))。为了比较,本文所述的其他CDK可以是CDK1、CDK2、CDK3、CDK5、CDK7、CDK8、CDK9、CDK10、CDK11、CDK12、CDK13或其他非CDK4/6CDK中的至少一种。这些度量典型地以将活性降低一半所需的剂的相对量表示。

[0108] 更一般地讲,术语“选择性”是指优先的行为或功能。术语“选择性”可以根据特定的感兴趣靶标相对于其他靶标的优先效应来量化。例如,感兴趣的靶标相比于非预期或非期望的靶标不同的是,测量的变量(例如,Treg相对于其他细胞(诸如其他免疫细胞)的减少)可以是10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、或更大倍数,或介于两者之间的任何范围(包括端值在内)(例如,50%至16倍)。相同的倍数分析可以用于确认给定的组织、细胞群、测量的变量、测量的效果等中的效果的大小,诸如Treg:Teff比率、过度增殖细胞生长速率或体积、Treg增殖速率,等等。

[0109] 相比之下,术语“特异性”是指排他性的行为或功能。例如,CDK4和/或CDK6的特异性调控是指对CDK4和/或CDK6、而不是对其他CDK家族成员的排他性调控。在另一个实例中,抗体与预定抗原的特异性结合是指抗体结合感兴趣抗原而不结合其他抗原的能力。典型地,当使用感兴趣抗原作为被分析物并使用抗体作为配体,在BIACORE®测定仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术测定时,抗体以大约小于 1×10^{-7} M(诸如大约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或甚至更低)的亲和力(K_D)进行结合,并且与预定抗原结合的亲和力是其与除该预定抗原或紧密相关抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力的至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、或10.0倍或更大。此外, K_D 是 K_A 的倒数。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”在本文中可与术语“与抗原特异

性结合的抗体”互换使用。

[0110] 术语“致敏”是指改造细胞(诸如癌细胞或肿瘤细胞)以使得允许用疗法(例如,CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)更有效地治疗的方式。在一些实施方案中,正常细胞受影响的程度不会导致正常细胞被该疗法(例如,CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)过度损伤。根据本领域已知的用于下文所述的特定治疗和特定方法的方法测量对治疗性治疗的增加的敏感性或降低的敏感性,所述方法包括但不限于细胞增殖测定法(Tanigawa N,Kern D H,Kikasa Y,Morton D L,Cancer Res 1982;42:2159-2164)、细胞死亡测定法(Weisenthal L M,Shoemaker R H,Marsden J A,Dill P L,Baker J A,Moran E M,Cancer Res 1984;94:161-173;Weisenthal L M,Lippman M E,Cancer Treat Rep 1985;69:615-632;Weisenthal L M,In:Kaspers G J L,Pieters R,Twentyman P R,Weisenthal L M,Veerman A J P编辑,Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma.Langhorne,P A:Harwood Academic Publishers,1993:415-432;Weisenthal L M,Contrib Gynecol Obstet 1994;19:82-90)。还可以通过测量一段时间内(例如,对于人为6个月,对于小鼠为4至6周)的肿瘤大小的减小来测量动物的敏感性或抗性。如果与不存在组合物或方法时的治疗敏感性或抗性相比,治疗敏感性的增加或抗性的降低为5%或更多,例如10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多,至2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或更多,则这种组合物或方法使对治疗性治疗的应答敏感。确定对治疗性治疗的敏感性或抗性在本领域中是常规的,并且在普通熟练的临床医生的技能范围内。应当理解,本文所述的用于增强癌症疗法功效的任何方法可以同样地应用于使过度增殖细胞或其他癌性细胞(例如,抗性细胞)对癌症疗法敏感的方法。

[0111] 术语“协同效应”是指两种或更多种治疗剂(诸如,两种或更多种CDK4和/或CDK6抑制剂、CDK4和/或CDK6抑制剂和免疫疗法、单独的CDK4和/或CDK6抑制剂或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)的组合,等等)的组合效果可以大于单独的抗癌剂的单独效果的总和。

[0112] “短干扰RNA”(siRNA),在本文中也称为“小干扰RNA”,被定义为例如通过RNAi用于抑制靶标生物标志物核酸表达的剂。siRNA可以化学合成、可以通过体外转录产生,或者可以在宿主细胞内产生。在一个实施方案中,siRNA是长约15至约40个核苷酸、优选地长约15至约28个核苷酸、更优选地长约19至约25个核苷酸、更优选地长约19、20、21或22个核苷酸的双链RNA(dsRNA)分子,并且每条链上可以含有3'和/或5'突出端,其长度为约0、1、2、3、4或5个核苷酸。突出端的长度在两条链之间是独立的,即,一条链上的突出端的长度不依赖于第二条链上的突出端的长度。优选地,siRNA能够通过靶标信使RNA(mRNA)的降解或特异性转录后的基因沉默(PTGS)来促进RNA干扰。

[0113] 在另一个实施方案中,siRNA是小发夹(也称为茎环)RNA(shRNA)。在一个实施方案中,这些shRNA由短的(例如,19至25个核苷酸)反义链、然后是5至9个核苷酸的环和类似的有义链构成。作为替代,有义链可以在核苷酸环结构之前,反义链可以在其后。这些shRNA可以包含在质粒、逆转录病毒和慢病毒中,并且可以从例如pol III U6启动子或另一种启动子处表达(参见例如Stewart等人(2003)RNA Apr;9(4):493-501,以引用方式并入本文)。

[0114] RNA干扰剂(例如siRNA分子)可以施用于患有癌症或有患癌风险的患者,以抑制在癌症中过表达的生物标志物基因的表达,从而治疗、预防或抑制受试者中的癌症。

[0115] 术语“受试者”是指任何健康的动物、哺乳动物或人,或者罹患癌症的任何动物、哺乳动物或人,所述癌症例如肺癌、卵巢癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌和结肠癌,以及黑色素瘤和多发性骨髓瘤。术语“受试者”可与“患者”互换。

[0116] 术语“存活”包括以下中的全部:存活直至死亡,也称为总存活(其中所述死亡可以与病因或相关肿瘤无关);“无复发存活”(其中术语复发应当包括局部和远处复发);无转移存活;无病存活(其中术语疾病应当包括癌症和与之相关联的疾病)。所述存活的长度可以通过参考限定的起点(例如,诊断时间或治疗开始时间)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。此外,治疗功效的标准可以扩展到包括对化学疗法的应答、存活概率、给定时间段内转移的概率,以及肿瘤复发的概率。

[0117] 术语“治疗作用”是指由药理学活性物质引起的动物,特别是哺乳动物、更特别是人的局部或全身作用。因此,该术语是指旨在用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防疾病,或者增强动物或人所需的身体或精神发育和状况的任何物质。短语“治疗有效量”意味着这样的物质的量:其以适用于任何治疗的合理的益处/风险比产生一些期望的局部或全身作用。在某些实施方案中,化合物的治疗有效量将取决于其治疗指数、溶解度,等等。例如,通过本发明的方法发现的某些化合物可以以足够的量施用,以产生适用于这种治疗的合理的益处/风险比。

[0118] 如本文所用的术语“治疗有效量”和“有效量”意味着包含本发明化合物的化合物、材料或组合物的量,其在动物的至少一个细胞亚群中以适用于任何医学治疗的合理益处/风险比有效地产生一些期望的治疗作用。主题化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中例如用于测定LD₅₀和ED₅₀的标准药理学程序测定。表现出大治疗指数的组合物是优选的。在一些实施方案中,可以测量剂的LD₅₀(致死剂量)并且可以使其相对于不施用该剂时减小例如至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多。类似地,可以测量剂的ED₅₀(即,实现症状的半数最大抑制的浓度)并且可以使其相对于不施用该剂时增大例如至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多。另外,类似地,可以测量剂的IC₅₀(即,对癌细胞实现半数最大细胞毒性或细胞抑制作用的浓度)并且可以使其相对于不施用该剂时增大例如至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多。在一些实施方案中,测定中的癌细胞生长可以被抑制至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,或甚至100%。癌细胞死亡可以被促进至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,或甚至100%。在另一个实施方案中,可以实现癌细胞数和/或实体恶性肿瘤减少至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,或甚至100%。

[0119] “转录的多核苷酸”或“核苷酸转录物”是与成熟mRNA的全部或一部分互补或同源的多核苷酸(例如,mRNA、hnRNA、cDNA,或这种RNA或cDNA的类似物),所述成熟mRNA是通过生

物标志物核酸的转录和对RNA转录物进行任何可能存在的正常转录后加工(例如剪接),以及对所述RNA转录物进行逆转录而制得的。

[0120] 如遗传密码(如下所示)所定义,特定蛋白质的氨基酸序列与可以编码所述蛋白质的核苷酸序列之间存在已知且确定的对应关系。同样地,在特定核酸的核苷酸序列与由该核酸编码的氨基酸序列之间存在已知且确定的对应关系,如遗传密码所定义。

[0121] 遗传密码

[0122]	丙氨酸(Ala,A)	GCA、GCC、GCG、GCT
[0123]	精氨酸(Arg,R)	AGA、ACG、CGA、CGC、CGG、CGT
[0124]	天冬酰胺(Asn,N)	AAC、AAT
[0125]	天冬氨酸(Asp,D)	GAC、GAT
[0126]	半胱氨酸(Cys,C)	TGC、TGT
[0127]	谷氨酸(Glu,E)	GAA、GAG
[0128]	谷氨酰胺(Gln,Q)	CAA、CAG
[0129]	甘氨酸(Gly,G)	GGA、GGC、GGG、GGT
[0130]	组氨酸(His,H)	CAC、CAT
[0131]	异亮氨酸(Ile,I)	ATA、ATC、ATT
[0132]	亮氨酸(Leu,L)	CTA、CTC、CTG、CTT、TTA、TTG
[0133]	赖氨酸(Lys,K)	AAA、AAG
[0134]	蛋氨酸(Met,M)	ATG
[0135]	苯丙氨酸(Phe,F)	TTC、TTT
[0136]	脯氨酸(Pro,P)	CCA、CCC、CCG、CCT
[0137]	丝氨酸(Ser,S)	AGC、AGT、TCA、TCC、TCG、TCT
[0138]	苏氨酸(Thr,T)	ACA、ACC、ACG、ACT
[0139]	色氨酸(Trp,W)	TGG
[0140]	酪氨酸(Tyr,Y)	TAC、TAT
[0141]	缬氨酸(Val,V)	GTA、GTC、GTG、GTT
[0142]	终止信号(末端)	TAA、TAG、TGA

[0143] 遗传密码的一个重要且熟知的特征是其冗余,由此,对于用于制备蛋白质的大多数氨基酸,可以采用多于一种编码核苷酸三联体(如上所展示)。因此,许多不同的核苷酸序列可以编码给定的氨基酸序列。这些核苷酸序列被认为是功能上等同的,因为它们导致在所有生物体中产生相同的氨基酸序列(尽管某些生物体可以比其他生物体更有效地翻译某些序列)。另外,偶尔可以在给定的核苷酸序列中发现嘌呤或嘧啶的甲基化变体。这种甲基化不影响三核苷酸密码子与对应的氨基酸之间的编码关系。

[0144] 鉴于前述内容,通过使用遗传密码将DNA或RNA翻译成氨基酸序列,编码生物标志物核酸(或其任何部分)的DNA或RNA的核苷酸序列可以用于衍生多肽氨基酸序列。同样,对于多肽氨基酸序列,可以从遗传密码推导出可以编码多肽的对应核苷酸序列(由于其冗余,将为任何给定的氨基酸序列产生多个核酸序列)。因此,本文中对编码多肽的核苷酸序列的描述和/或公开应当被认为还包括对由该核苷酸序列编码的氨基酸序列的描述和/或公开。类似地,本文中对多肽氨基酸序列的描述和/或公开应当被认为还包括对可以编码该氨基

酸序列的所有可能核苷酸序列的描述和/或公开。

[0145] 最后,本发明的基因座和生物标志物以及相关生物标志物(例如,表1中列出的生物标志物)的核酸和氨基酸序列信息是本领域熟知的,并且可在可公开获得的数据库(诸如美国国家生物技术信息中心(NCBI))中容易地获得。例如,下文提供了来源于可公开获得的序列数据库的示例性核酸序列和氨基酸序列。

[0146] 上述生物标志物的代表性序列在下表1中呈现。应当注意,上述的那些术语还可以用于指代本文所述的关于生物标志物的特征的任何组合。例如,序列组成、百分比同一性、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合可以用于描述本发明的生物标志物。

[0147] 表1

[0148] SEQ ID NO:1人CDK4 cDNA序列(NM_000075.3)(来自位置293至1204的CDS)

```

1 cacctcctgt cgcgccctca gcgcatgggt ggcggtcagc tgcccagaac gtcggcgctt
61 cgcgccgcc tcccagtttc cgcgcgcctc tttggcagct ggtcacatgg tgagggtggg
121 ggtgaggggg cctctctagc ttgcggcctg tgtctatggt cgggccctct gctccagct
181 gctccggacc gagctcgggt gtatggggcc gtaggaaccg gctccggggc cccgataacg
241 ggccgcccc acagcaccac gggctggcgt gagggctctc cttgatctga gaatggctac
301 ctctcgatat gagccagtgg ctgaaattgg tgtcggtgcc tatgggacag tgtacaaggc
361 cagtgatccc cacagtggcc actttgtggc cctcaagagt gtgagagtcc ccaatggagg
421 aggaggtgga ggaggccttc ccatacagc agttcgtgag gtggctttac tgaggcgact
481 ggaggctttt gagcatccca atgtgtccg gctgatggac gtcgtgcca catcccgaac
541 tgaccgggag atcaaggtaa cctggtggtt tgagcatgta gaccaggacc taaggacata
601 tctggacaag gcacccccac caggcttgcc agccgaaacg atcaaggatc tgatgcccga
661 gtttctaaga ggcctagatt tccttcatgc caattgcatc gttcacccag atctgaagcc
721 agagaacatt ctggtgacaa gtggtggaac agtcaagctg gctgactttg gcctggccag
781 aatctacagc taccagatgg cacttacacc cgtggttgtt acactctggt accgagctcc
841 cgaagtctct ctgcagtcca catatgcaac acctgtggac atgtggagtg ttggctgtat
901 ctttgacagag atgtttcgtc gaaagcctct cttctgtgga aactctgaag ccgaccagtt
961 gggcaaaatc tttgacctga ttgggctgcc tccagaggat gactggcctc gagatgtatc
[0149] 1021 cctgccccgt ggagccttcc cccccagagg gccccgcca gtgcagtcgg tggtaacctga
1081 gatggaggag tcgggagcac agctgctgct ggaaatgctg actttaacc cacacaacg
1141 aatctctgcc tttcgagctc tgcagcactc ttatctacat aaggatgaa gtaatccgga
1201 gtgagcaatg gagtggctgc catggaagga agaaaagctg ccatttcctt tctggacact
1261 gagagggcaa tctttgcctt tatctctgag gctatggagg gtccctctcc atctttctac
1321 agagattact ttgctgcctt aatgacattc ccctcccacc tctccttttg aggcttctcc
1381 ttctccttcc catttctcta cactaagggg tatgttcctt cttgtccctt tccctacctt
1441 tatatttggg gtcctttttt atacaggaaa acaaaaaca agaaataatg gtcctttttt
1501 tttttttaat gtttcttctc ctgtttggct ttgccattgt gcgatttggg aaaaccactt
1561 ggaagaaggg actttcctgc aaaaccttaa agactgggta aattacaggg cctaggaagt
1621 cagtggagcc ccttgactga caaagcttag aaaggaactg aaattgcttc tttgaatatg
1681 gatttttaggc ggggctgggt ggctcacgcc tataatcca gcacgttggg aggccaacgc
1741 ggggtgatca cctgaggtca ggagtccgag accagcctga ctaacatggt gaaaccctgt

1801 ctctactaaa aatacaaaat tagtcaggcg tgggtggtgca cacctgtaat cccagctact
1861 tgggagactg aggcaggagg atcgcttgaa cccgggaggc agagggttgcg gtgagccgag
1921 atcatgccat tgcaactccag cctgggcaac agagcaagac tctgtgtcaa aaaaaaaaaa
1981 agaatataga tttttaaatg gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

[0150] SEQ ID NO:2人CDK4氨基酸序列(NP_000066.1)

```

1 matsryepva eigvgaygtv ykardphsgh fvalksvrpv nggggggglp istvrevall
61 rrleafehpn vvrlmdvcat srtdreikvt lvfehvdqdl rtyldkapp glpaetikdl
[0151] 121 mrqflrgldf lhancivhrd lkpenilvts ggtvkladfg lariysyqma ltpvvvtlwy
181 rapevllqst yatpvdmwsv gcifaemfrr kplfcgnea dqlgkifdli glppeddwpr
241 dvsllprgafp prgprpvqsv vpemeesgaq lllemltfnp hkrisafra qhsylhkdeg
301 npe

```

[0152] SEQ ID NO:3小鼠CKD4 cDNA序列(NM_009870.3)(来自位置174至1085的CDS)

[0153] 1 gtgggggtga gggggcctct cttagctcgcg gcctgtgtct atgggtctggc ccgaagcgtc
 61 cagctgcccc ggaccgatcc ccggtgtatg gcgcccaggg aaccggctcc cgggccccaga
 121 taaagggcca cctccagagc tcttagccga gcgtaagatc ccctgcttcg agaatggctg
 181 ccaactcgata tgaacccgtg gctgaaattg gtgtcgggtg ctatgggacg gtgtacaaag
 241 cccgagatcc ccacagtggc cactttgtgg ccctcaagag tgtgagagtt cctaattggag
 301 gagcagctgg agggggcctt cccgtcagca cagttcgtga ggtggccttg ttaaggaggc
 361 tggaggcctt tgaacatccc aatgtttgtac ggctgatgga tgtctgtgct acttcccga
 421 ctgatcggga catcaaggtc accctagtgt ttgagcatat agaccaggac ctgaggacat
 481 acctggacaa agcacctcca ccgggcctgc cggttgagac cattaaggat ctaatgcgtc
 541 agtttctaag cggcctggat tttcttcacg caaactgcat tgttcaccgg gacctgaagc
 601 cagagaacat tctagtgaca agtaattggg ccgtcaagct ggctgacttt ggcctagcta
 661 gaatctacag ctaccagatg gccctcacgc ctgtggtggt tacgctctgg taccgagctc
 721 ctgaagttct tctgcagtct acatacgcaa caccctgga catgtggagc gttggctgta
 781 tctttgcaga gatgttccgt cggaagcctc tcttctgtgg aaactctgaa gccgaccagt
 841 tggggaaaat ctttgatctc attggattgc ctccagaaga cgactggcct cgagaggtat
 901 ctctacctcg aggagccttt gccccagag ggctcggcc agtgcagtca gtggtgccag
 961 agatggagga gtctggagcg cagctgctac tggaaatgct gacctttaac ccacataagc
 1021 gaatctctgc cttccgagcc ctgcagcact cctacctgca caaggaggaa agcgacgcag
 1081 agtgagaaga ggggctgcct ttcccagtct tggtgagaaa accctcgctg aagcggcagc
 1141 ctctgtttcc cccaaggct gtggagaatc ctccagtttt ttacagagaa tattttaagc
 1201 cttaaataac aagtccccac ctctccttac gaggttcacc cccattacc tcccctagct
 1261 ctacactaaa gggcaggtgt atctgtcttc tccctccct gatttatact gggatctttt
 1321 ttatacagga aaacaagaca agacaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

[0154] SEQ ID NO:4小鼠CDK4氨基酸序列(NP_034000.1)

[0155] 1 maatriyepva eigvgaygtv ykardphshg fvalksvrpv nggaaggglp vstvrevall
 61 rrleafehpn vvrlmdvcat srtdrdikvt lvfehidqdl rtyldkappp glpvetikdl
 121 mrqflsgldf lhancivhrd lkpenilvts ngtvkladfg lariysyqma ltpvvvtlwy
 181 rapevllqst yatpvdmwsv gcifaemfrr kplfcgnsea dqlgkifdli glppeddwpr
 241 evslprgafa prgprpvqsv vpemeesgaq lllemltfnp hkrisafra qhsylhkees
 301 dae

[0156] SEQ ID NO:5人CDK6 cDNA序列(转录物变体1)(NM_001259.6)(来自位置413至1393的CDS)

[0157] 1 aacctctccg cgcaagacg gottcagccc tgcagggaaa gaaaagtgca atgattctgg
 61 actgagacgc gcttgggcag aggctatgta atcgtgtctg tgttgaggac ttcgcttcca
 121 ggaggaaga ggagggatcg gctcgtcct ccggcggcgg cggcggcggc gactctgcag
 181 gcggagtttc gcggcggcgg caccaggggt acgccagccc cgcgggagg tctctccatc
 241 cagcttctgc agcggcgaaa gccccagcgc ccgagcgcct gagccggcgg ggagcaagta
 301 aagctagacc gatctccggg gagccccgga gtaggcgagc ggcgccgccc agctagttga
 361 gcgcaccccc cgcccgcgcc agcggcgccg cggcggcggc cgtccaggcg gcatggagaa
 421 ggacggcctg tgccgcgctg accagcagta cgaatgcgtg gcggagatcg gggagggcgc
 481 ctatgggaag gtgttcaagg cccgcgactt gaagaacgga ggccgttctg tggcgttgaa
 541 gcgcgtgcgg gtgcagaccg gcgaggaggg catgccgctc tccaccatcc gcgaggtggc

[0158]

```

601 ggtgctgagg cacctggaga ccttcgagca ccccaacgtg gtcaggttgt ttgatgtgtg
661 cacagtgtca cgaacagaca gagaaaccaa actaacttta gtgtttgaac atgtcgatca
721 agacttgacc acttacttgg ataaagtcc agagcctgga gtgccactg aaaccataaa
781 ggatatgatg tttcagcttc tccgaggtct ggactttctt cattcacacc gagtagtgca
841 tcgcgatcta aaaccacaga acattctggg gaccagcagc ggacaaataa aactcgctga
901 cttcggcctt gcccgcatct atagtttcca gatggctcta acctcagtgg tcgtcacgct
961 gtggtacaga gcacccgaag tcttgctcca gtccagctac gccacccccg tggatctctg
1021 gagtgttggc tgcataattg cagaaatggt tcgtagaaaag cctctttttc gtggaagttc
1081 agatgttgat caactagga aaatcttgga cgtgattgga ctcccaggag aagaagactg
1141 gcctagagat gttgcccttc ccaggcaggc ttttcattca aaatctgccc aaccaattga
1201 gaagtttgta acagatatcg atgaactagg caaagaccta cttctgaagt gtttgacatt
1261 taaccagacc aaaagaatat ctgcctacag tgccctgtct cacccatact tccaggacct
1321 ggaaaggtgc aaagaaaacc tggattcca cctgccgccc agccagaaca cctcggagct
1381 gaatacagcc tgaggcctca gcagccgct taagctgatc ctgctggaga caccctggg
1441 ggcttatggg tccccctcag caagccctac agagctgtgg aggattgcta tctggaggcc
1501 ttccagctgc tgtcttctgg acaggctctg cttctccaag gaaaccgcct agtttactgt
1561 tttgaaatca atgcaagagt gattgcagct ttatgttcat ttgtttgttt gtttgtctgt
1621 ttgtttcaag aacctggaaa aattccagaa gaagagaagc tgctgacca ttgtgtctgc
1681 atttgatatt tctaaccttg aatgctgcca gtgtggagtg ggtaatccag gcacagctga
1741 gttatgatgt aatctctctg cagctgcccg cctgatttg gtaacttga gtgtgtgtg
1801 gcatgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtatgt gagagattct gtgatctttt
1861 aaagtgttac tttttgtaa cgacaagaat aattcaattt taaagactca aggtggtcag
1921 taaataacag gcatttgttc actgaagggtg attcaccaa atagcttctt caaattagaa
1981 agttaacccc atgtcctcag catttctttt ctggccaaaa gcagtaaat tgctagcagt
2041 aaaagatgaa gttttataca cacagcaaaa aggagaaaaa attctagtat attttaagag
2101 atgtgcatgc attctattta gtcttcagaa tgctgaattt acttgttgta agtctatttt
2161 aaccttctgt atgacatcat gctttatcat ttcttttggg aaatagcctg taagcttttt
2221 attacttgct ataggttag ggagtgtacc tcagatagat ttaaaaaaaa agaatagaaa
2281 gcttttattt cctggttga aattcctttc ttcccttttt ttgtgtgtgt tattgttggt
2341 tgttgttgtt attttgtttt tgtttttagg aatttgtcag aaactctttc ctgttttggg
2401 ttggagagta gttctctcta actagagaca ggagtggcct tgaatttttc ctcatctatt
2461 aactgtact ttctgccaca cactgccttg ttggcaaagt atccatcttg tctatctccc
2521 ggcacttctg aaatatattg ctaccattgt ataactaata acagattgct taagctgttc
2581 ccatgcacca cctgtttctg tgctttcaat gaacctttca taaattcgca gtctcagctt
2641 atggtttatg gcctcgattc tgcaaaccta acagggctac atatgttctc taatgcagtc
2701 cttctacctg gtgtttactt ttgttaccta aataatgagt aggatcttgt tttgttttat
2761 caccagcaca cagattgcta taaactgta ctttgtgaat tacattttta tagaagatat
2821 tttcagtgtc tttacctgag ggtagtctt tagctatggt ttagggccat acatttactc
2881 tatcaaatga tcttttctcc atccccagg ctgtgcttat ttctagtgcc ttgtgctcac
2941 tctgctctc tacagagcca gcctggcctg ggcattgtaa acagcttttc ctttttctct
3001 tactgttttc tctacagtcc tttatatttc ataccatctc tgcttataa gtggtttagt
3061 gctcagttgg ctctagtaac cagaggacac agaaagtatc ttttgaaag ttagccacc
3121 tgtgctttct gactcagagt gcatgcaaca gttagatcat gcaacagtta gattatgttt
3181 agggtttaga ttttcaaaga atggagggtg ctgcaactcag aaaataattc agatcatggt
3241 tatgcattat taagttgtac tgaattcttt gcagcttaat gtgatatatg actatcttga
3301 acaagagaaa aaactaggag atgtttctcc tgaagagctt ttggggttgg gaactattct
3361 ttttaattg ctgtactact taacattggt ctaattcagt agcttgagga acaggaacat
3421 tgttttctag agcaagataa taaaggagat gggccataca aatgttttct actttcgttg
3481 tgacaacatt gattaggtgt tgtcagtact ataaatgctt gagatataat gaatccacag
3541 cattcaaggt caggtctact caaagtctca catggaaaag tgagttctgc ctttctttg
3601 atcgagggtc aaaatacaaa gacatttttg ctagggccta caaattgaat ttaaaaactc
3661 actgcactga ttcactctgag ctttttgggt agtattcatg gctagagtga acatagcttt
3721 agtttttctg gttgtaaaag tgttttcata agttcactca agaaaaatgc agctgttctg
3781 aactggaatt tttcagcatt ctttagaatt ttaaattgagt agagagctca acttttattc
3841 ctagcatctg cttttgactc atttctagge agtgcttatg aagaaaaatt aaagcacaaa
3901 cattctggca ttcaatcgtt ggcagattat cttctgatga cacagatgta agggcatct
3961 cagcctctct gaactttgta aaaatctgtc ccagttctt ccatcggtg aattgttgca
4021 tttgagtgaa tactctcttg atttatgtat tttatgtcca gattcgccat tctgaaatc
4081 cagatccaac acaagcagtc ttgccgtag ggcattttga agcagatagt agagtaagaa
4141 cttagtgact acagcttatt cttctgtaac atatggtttc aaacatcttt gccaaaagct
4201 aagcagtggt gaactgaaaa gggcatattg cccaaggtt aactgaagc agctcatagc

```

[0159]

4261 aagttaaaat attgtgacag atttgaaatc atgtttgaat ttcatagtag gaccagtaca
 4321 agaatgtccc tgctagtttc tgtttgatgt ttggttctgg cggctcaggc attttgggaa
 4381 ctgttgacaca ggggtggagtc aaaacaacct acatataaaa agagaaaaag agaaacttgt
 4441 ccatttagct ttcataagaa atcccatggc aaagggtaat aaaaaggacc taatcttaaa
 4501 aatacaattht ctaagcactt gtaagaacct agtgggttgg agcctcccac tttgtccctc
 4561 ctttgaagtg gatgggaact caaggtgcaa agaacctgtt ttggaagaaa gcttggggcc
 4621 atttcagccc cctgtattct catgattttc tctcaggaag cacacactgt gaatggcaga
 4681 cttttcattt agccccaggt gacttactaa aaatagttga aaattattca cctaagaata
 4741 gaatctcagc attgtgttaa ataaaaatga aagctttaga aggcattgaga tgttcctatc
 4801 ttaaataaag catgtttctt ttctatagag aaatgtatag tttgactctc cagaatgtac
 4861 tatccatctt gatgagaaaa ctcttaataa gtaccaaaaca ttttgaactt taaattatgt
 4921 atttaaagtg agtgtttaag aaactgtagc tgcttctttt acaagtgggtg cctattaaag
 4981 tcagtaatgg ccattattgt tccattgtgg aaattaaatt atgtaagctt cctaataatca
 5041 taaacatatt aaaattcttc taaaatattg cttttctttt aagtgacaat ttgactattc
 5101 ttatgataag cacatgagag tgtcttacct tttccaaaag caggctttaa ttgcatagtt
 5161 gagtctagga aaaaataatg ttaaagtga atatgccacc ataattactt aattatgtta
 5221 gtatagaaac tacagaatat ttaccctgga aagaaaatat tggaatgtta ttataaactc
 5281 ttagatattt atataattca aaagaatgca tgtttcacat tgtgacagat aaagatgtat
 5341 gatttctaag gctttaaaaa ttattcataa aacagtgggc aatagataaa ggaaattctg
 5401 gagaaaatga aggtatttaa aggttagttt caaagctata tatattttga aggatattt
 5461 ctttatgaac aaatatattg taaaaattha tactaaggct atctggtaac tgtgggatta
 5521 atatggtcga aaacaaatgt tatggagaag ctgtccaag caactaaat tacctgact
 5581 tttttcccat ttcaaggga gaggcaacca catgaagcaa tacttcttac acatgcctaa
 5641 gaacgttcat tgaaaaata aatttttaaa aggcattgtt ttctatgcc accaatactt
 5701 ttgaaaaatt gtgaacctta cccaaaacca tttatcatgt ccattaagta ttttgggta
 5761 tataattagg aagatattta catgttccat ctccacagtg gaaaaactta ttgaggctac
 5821 caaagtgtgc caagaaatgt aagtccttag agtaattaga aatgctgttt tctctaaaag
 5881 catgagaaac tagcattttc atttcttatt tactcccttt ctatatcaat gcaattcaca
 5941 acccaatttt aatacatccc tatactcaa gcatttctat cttgtacttt ttcagaaaat
 6001 aaacaaaaaa taatcctttg gtctctctat cttctgacct ttgtaagcaa cagaaatgta
 6061 aaaacagaag gggccaatt tttacacgtt tttttctcaa gtacgctttc tggggatttt
 6121 tattttctta atgaagtgcc aatcagcttt tcaaaatggt ttctatttct cagcatttcc
 6181 aggaagtgat aacgtttagc taaatgagta gaagtggact tcttcaaac tattgttacc
 6241 ttgtctagcc ttaggaagaa aacaagagcc acctgaaaat aaatacaggc tctttcagag
 6301 catctgctga aatactgtta cagcaatttg aagttgatgt ggtaggaaaag gaaggtgact
 6361 tttcttgcaa aagtctttct aaacattcac actgtcctaa gagatgagct ttctgtttt
 6421 attccgggat attccacaag gtggcacttt tagagaaaaa caaatctgat gaagactaaa
 6481 gaggtacttc taaaagagat ttcatctaa ctttattttt ctgctcatat ttaactcttt
 6541 cctagcactt gtttttggg atgattaata gtctctataa tgttctgtaa cttcaatatt
 6601 ttacttgtaa cctaggttct gaacaattgt ctgcaataa attgttctta aggatggata
 6661 atacacccat tttgatcatt taagtaaaga aagcctagtc attcattcag tcaagaaaaa
 6721 atttttgaag taccagttta ccttactttt ctagattaaa acaggcttag ttactaaaaa
 6781 ggcagtcctc atctgtgaac aggatagttt cgttagaagt ataaaactcc tttagtggcc
 6841 ccagttaaaa cacacatacc ctctctgtg ctttcaaatt ccctagcatg gtggccttcc
 6901 aacattgatt aaattttaaa atcctaattt aaagatcagg tgagcaaaat gagtagcaca
 6961 tcagtaattc agtagacaaa acttttgtct gaaaaattgc tgtattgaaa gagagcccta
 7021 aaatacaaaa agaccaggta attttaacat ttgtggaatc acaaatgtaa attcataaga
 7081 agctctaatt aaaaaaaaaa agtctgaagt atatgagcat aacaacttag gagggtgtct
 7141 acatacttaa cttttgaagt tttttggcaa ctttatatac tttttttaaa tttacaagtc
 7201 tacttaaaaga cttcttatac cccaaatgat taagtttaatt tttagaggta ctttctcac
 7261 agcagtgcca cttgaaattt agtagggag gatattgcag tatttttcag tttccttagc
 7321 acagcaccac agaaagcagc ttattccttt tgagtgagc agactcgagc gtgctgccc
 7381 aactttcctc ctgagtgga agcagatgag tctcagtaat tcatactgaa ccaaatgccc
 7441 acatacacta ggggcagtca gaaactggc gagaaatccc ccgctcatt cgcccctctg
 7501 ctcccaggaa ctagagtcca gttaaagccc ctatgcgaaa ggccgaattc caccaccagg
 7561 tttgttataa cagtggccag tctgaacccc atttgctgt gctcaaaact tactccac
 7621 ttgaaagcct tccgggcgct ctgctctgtt gccccgccc tttggcagga gagaggcagt
 7681 gggcgaggcc gggctggggc cccgctccc actcaactgc cgggtgctga aattatgtgc
 7741 ggccccgagg gctgctttcc gaggtcagag tgccctgctg ctgtctcaga ggcattctgt
 7801 ctgcaaatct taggaagaaa aatgtcccta gtagcaaacg ggtgtcttct gtgcataaat
 7861 aagtacaaca caattctccc aaagtccggg taaaaagaga tgcggtagca gctgcctgt

7921 gtgaagctgt ctaccccgca tctctcaggc gctaagctca gtttttgttt ttgtttttgt
7981 ttttttaaag aaaagatgta taattgcagg aatTTTTTTT tattttttta ttttccatca
8041 ttctatata gtgatggtga aagatatgcc tggaaaagtt ttgttttgaa aagtttattt
8101 tctgcttcgt cttcagttgg caaaagctct caattcttta gcttccagtt tcttttctct
8161 ctttttcttt gttaggtaat taaaggtatg taaacaaatt atctcatgta gcaggggatt
8221 ttcatgttga gaggaatctt ccggtgtgagt tgtttggcca cacaaataac cttttctcaa
8281 ttttaggagt ttggattgtc aaatgtaggt ttttctcaaa gggggcatat aactacatat
8341 tgactgcaa gaactatgac tgtagcacta atcagcacac atagagccac acaattattt
8401 aatTTTCTAAC tctctgtggt ccctagaaaa attccgTTGA tgtgcttagg ttaaagttct
8461 gaagatacc gttgtaccct tacttgaaag tttctaactc taagttttat gaaatgcaat
8521 aatatgtatc agctagcaat atttctgtga tcaccaacaa ctctcagttt gatcttaaag
8581 tctgaataat aaaacaaatc ccagcagtaa tacatttctt aaacctcaca gtgcatgata
8641 tatcttttca ttctgatcct gtgtttgcaa aaatatacac atgtatatca tagttcctca
8701 ctttttattc atttgttttc ctattacctg tagtaaata attagttagt acatggaatt
8761 tatagcatca gctaccccca ggaacagcac ctgacaggcg ggggattttt tttcaagttg
8821 ttctacattt gcataaatta tttctattat tattcatgta tgttatttat ttctgaatca
8881 cactagtcct gtgaaagtac aactgaaggc agaaagtgtt aggattttgc atctaattgtt
8941 cattatcatg gtattgatgg acctaagaaa ataaaaatta gactaagccc ccaaataagc
9001 tgcatgcat tgtaacatga ttagtagatt tgaatatata gatgtagat ttgggtatc
9061 taggtgtttt atcattatgt aaaggaatta aagtaaagga cttttagttt gtttttatta
9121 aatatgcata tagtagagtg caaaaatata gcaaaaataa aaactaaagg tagaaaagca
9181 ttttagatat gccttaattt agaaaactgtg ccagggtggcc ctcggaatag atgccaggca
9241 gagaccagt cctgggtggt gcctcctctt gtctgccctc atgaagaagc ttccctcacg
9301 tgatgtagtg ccctcgtagg tgtcatgtgg agtagtggga acaggcagta ctgttgagag
9361 gagagcagt tgagagttt tctgtagaag cagaactgtc agcttgtgcc ttgaggcttc
9421 cagaacgtgt cagatggaga agtccaagtt tccatgcttc aggcaactta gctgtgtaca
9481 gaagcaatcc agtgtggtaa taaaaagcaa ggattgcctg tataatttat tataaaataa
9541 aagggatttt aacaaccaac aattcccaac acctcaaaag cttgttgcat tttttggtat
9601 ttgaggtttt tatctgaagg ttaaagggca agtgtttggt atagaagagc agtatgtgtt
9661 aagaaaagaa aatatgtggt tcacgtagag tgcaaatag aactagaaag ttttatcga
9721 ttatcatttt gagatgtgtt aaagtaggtt ttcactgtaa aatgtattag tgtttctgca
9781 ttgccatagg gcctggttaa aactttctct taggtttcag gaagactgtc acatacagta
9841 agcttttttc cttctgactt ataatagaaa atgttttgaa agtaaaaaaa aaaaatctaa
9901 tttggaaatt tgacttgta gtttctgtgt ttgaaatcat ggttctagaa atgtagaaat
9961 tgtgtatatc agatactcat ctaggctgtg tgaaccagcc caagatgacc aacatcccca
10021 cacctctaca tctctgtccc ctgtatctct tcttttctac cactaaagtg ttccctgcta
10081 ccatcctggc ttgtccacat ggtgctctcc atcttctccc acatcatgga ccacagggtg
10141 gcctgtctag gcctggccac cactcccaac ttgacctagc cacattcatc tagagatggt
10201 tcctgatgct gggcacagac tgtgctcatg gcaccatta gaaatgcctc tagcatctt
10261 tatgcatctc tgatttttaa accaagtcat tgtacagagc attcagtttt ggctgtggta
10321 ccaagagaaa aactaatcaa gaatataaac cacattccag gctgctgttt tctctccatc
10381 tacaggccac acttttactg tatttcttca tacttgaaat tcattctgct attttcatat
10441 cagggtagag acttataagg gtgcatgttc cttaaagggtg cataattatt cttattccgt
10501 ttgcttatat tgctacagaa tgctctgttt tgggtccttg agttctgcag acccaagaag
10561 cagtgtggaa attcactgcc tgggacacag tcttataaga atgttggcag gtgactttgt
10621 atcagatgtt gcttctcttt tctctgtaca cagattgaga gttaccacag tggcctgtcg
10681 ggtccaccct gtgggtgcag cacagctctc tgaaagcaag aaccttcta cctattctaa
10741 cgTTTTTgCC ctctaagaaa aatggcctca ggtatggtat agacatagca agaggggaag
10801 ggctgtctca ctctagcaac catccctcca ttacacacag aaagccctc tgaagcaaaa
10861 gaagaagaaa gaaagaaagc ttatctctaa ggctactgtc ttcagaatgc tctgagctga
10921 atgctcttgc tcctttccca agaggcagat gaaaatatag ccagtttatc tatacccttc
10981 ctatctgagg aggagaatag aaaagtaggg taaatatgta acgtaaaaaa tgtcattcaa
11041 ggaccaccaa aactttaagt accctatcat taaaaatctg gttttaaaag tagctcaagt
11101 aagggatgct ttgtgacca gggtttctga agtcagatag ccattcttac ctgcccctta
11161 ctctgactta ttgggaaagg gagaactgca gtgggtgttc tgttgcaagt gcaaaggtaa
11221 catgtcagaa aattcagagg gttgcatacc aataatcctt tggaaactgg atgtcttact
11281 ggggtgctaga atgaaaatgt aggtatttat tgtcagatga tgaagttcat tgttttttct
11341 aaaattgggt ttgaaatata actgtccaat gtgttcaact atgtgaaagc taaattgaaat
11401 gaggcaaaaa gagcaaatag tttgtatatt ttgtataact tttgtatttc taacaataaa
11461 aatatgtgta gcaataaaaa ataataaaaa caataacttt aaactgcttt ctggagatga
11521 attactctcc tggctatttt cttttttact ttaatgtaaa atgagtataa ctgtagttag
11581 taaaattcat taaattccaa gtttttagcag aaaaaaaaa aaaaaaaa

[0161] SEQ ID NO:6人CDK6 cDNA序列(转录物变体2)(NM_001145306.1)(来自位置518至

1498的CDS)

[0162]

```

1 cgccgctgtg cccaccccct cgccggagag agtgctggta actccttccc cagagtctga
61 ttacctgctc cgcgaggccg cggacacgtg cggagagccg actgacactc gcagcccctt
121 cgggaggccc gacgcgactg ggcccctcag gtgcaatgat tctggactga gacgcgcttg
181 ggcagaggct atgtaatcgt gtctgtgttg aggacttcgc ttcgaggagg gaagaggagg
241 gatcggctcg ctccctccggc ggcggcggcg gcggcgactc tgcaggcgga gtttcgcggc
301 ggcggcacca gggttacgcc agccccgcg ggaggtctct ccatccagct tctgcagcgg
361 cgaaagcccc agcgcgccgag cgctgagcc ggcggggagc aagtaaagct agaccgatct
421 ccggggagcc ccggagtagg cgagcggcgg ccgccagcta gttgagcgca cccccgccc
481 gccccagcgg cgccgcggcg ggcggcgtcc aggcggcatg gagaaggacg gcctgtgccg
541 cgctgaccag cagtacgaat gcgtggcgga gatcggggag ggcgcctatg ggaaggtgtt
601 caaggccccg gacttgaaga acggaggccg tttcgtggcg ttgaagcgcg tcggggtgca
661 gaccggcgag gagggcatgc cgctctccac catccgcgag gtggcgggtc tgaggcacct
721 ggagaccttc gagcacccca acgtggtcag gttgtttgat gtgtgcacag tgtcacgaac
781 agacagagaa accaaactaa ctttagtggt tgaacatgtc gatcaagact tgaccactta
841 cttggataaa gttccagagc ctggagtgcc cactgaaacc ataaaggata tgatgtttca
901 gcttctccga ggtctggact ttcttcattc acaccgagta gtgcatcgcg atctaaaacc
961 acagaacatt ctggtgacca gcagcggaca aataaaaactc gctgacttcg gccttgcccg
1021 catctatagt ttccagatgg ctctaacctc agtggctcgc acgctgtggg acagagcacc
1081 cgaagtcttg ctccagtcca gctacgccac ccccgtagg ctctggagtg ttggctgcat
1141 atttgcagaa atgtttcgta gaaagcctct tttcgtgga agttcagatg ttgatcaact
1201 aggaaaaatc ttggacgtga ttggactccc aggagaagaa gactggccta gagatgttgc
1261 ccttcccagg caggcttttc attcaaaatc tgccaacca attgagaagt ttgtaacaga
1321 tatcgatgaa ctaggcaaag acctacttct gaagtgtttg acatttaacc cagccaaaag
1381 aatatctgcc tacagtgcc tgtctcacc atactccag gacctgaaa gacgcaaga
1441 aaacctggat tcccacctgc cgcccagcca gaacacctcg gagctgaata cagcctgagg
1501 cctcagcagc cgcttaagc tgatcctgcg gagaacaccc ttgggtggct atgggtcccc
1561 ctcagcaagc cctacagagc tgtggaggat tgctatctgg aggccttcca gctgctgtct
1621 tctggacagg ctctgcttct ccaaggaaac cgctagttt actgttttga aatcaatgca
1681 agagtgattg cagctttatg ttcatttggt tgtttgtttg tctgtttgtt tcaagaacct
1741 ggaaaaatc cagaagaaga gaagctgctg accaattgtg ctgccatttg atttttctaa
1801 ccttgaatgc tgccagtgtg gagtgggtaa tccaggcaca gctgagttat gatgtaatct
1861 ctctgcagct gccgggcctg atttggtagc tttgagtgtg tgtgtgcatg tgtgtgtgtg
1921 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatgtgagag attctgtgat cttttaaagt gttacttttt
1981 gtaaacgaca agaataattc aattttaaag actcaagggtg gtcagtaaat aacaggcatt
2041 tgttctactg aggtgattca ccaaaatagt ctctcaaat tagaaagtta accccatgtc
2101 ctcagcattt cttttctggc caaaagcagt aaatttgcta gcagtaaaag atgaagtttt
2161 atacacacag caaaaaggag aaaaaattct agtatattt aagagatgtg catgcattct
2221 atttagtctt cagaatgctg aatttacttg ttgtaagtct attttaacct tctgtatgac
2281 atcatgcttt atcatttctt ttggaaaata gcctgtaagc tttttattac ttgctatagg
2341 tttagggagt gtacctcaga tagattttta aaaaaagaat agaaagcctt tatttctcgg
2401 tttgaaatc ctttcttccc ttttttgggt gttgttattg ttgtttgggt ttgttatttt
2461 gtttttgggt tttagaattt gtcagaaact ctttctggt ttggtttgga gtagtagtct
2521 ctctaactag agacaggagt ggccttghaa ttttctcat ctattacact gtactttctg
2581 ccacacactg ccttgttggc aaagtatcca tcttgtctat ctcccggcac tctgaaata
2641 tattgctacc attgtataac taataacaga ttgcttaagc tgttcccag caccacctgt
2701 ttgcttgctt tcaatgaacc tttcataaat tcgcagtctc agcttatggg ttatggcctc
2761 gattctgcaa acctaacagg gtcacatatg ttctctaag cagtccttct acctggtgtt
2821 tacttttgggt acctaaataa tgagtaggat cttgttttgt tttatcacca gcacacagat
2881 tgctataaac tgttactttg tgaattacat ttttatagaa gatattttca gttctttac
2941 ctgaggggat gcttttagct atgttttagg gccatacatt tactctatca aatgatcttt
3001 tctccatccc ccaggctgtg cttatttcta gtgccttgat ctcactcctg ctctctacag
3061 agccagcctg gcctgggcat tgtaaacagc ttttctttt tctcttactg ttttctctac
3121 agtcctttat atttcatacc atctctgcct tataagtggg ttagtgctca gttggctcta
3181 gtaaccagag gacacagaaa gtatcttttg gaaagtttag ccacctgtgc tttctgactc
3241 agagtgcag caacagttag atcatgcaac agttagatta tgtttagggg taggattttc
3301 aaagaatgga gttgctgca ctcagaaaat aattcagatc atgtttatgc attattaagt

```

[0163]

```

3361 tgtactgaat tctttgcagc ttaatgtgat atatgactat cttgaacaag agaaaaaact
3421 aggagatggt tctcctgaag agcttttggg gttgggaact attcctttttt aattgctgta
3481 ctacttaaca ttgttctaata tcagtagcct gaggaacagg aacattgttt tctagagcaa
3541 gataataaag gagatgggcc atacaaatgt tttctacttt cgttgtgaca acattgatta
3601 ggtgttgtca gtactataaa tgcttgagat ataatgaatc cacagcattc aaggtcaggt
3661 ctactcaaag tctcacatgg aaaagtgagt tctgcctttc ctttgatcga gggcaaaaat
3721 acaaagacat ttttgctagg gcctacaaat tgaatttaaa aactcactgc actgattcat
3781 ctgagctttt tggtagtat tcatggctag agtgaacata gctttagttt ttgctgttgt
3841 aaaagtgttt tcataagttc actcaagaaa aatgcagctg ttctgaactg gaatttttca
3901 gcattcctta gaattttaaa tgagttagaga gctcaacttt tttccttagc atctgttttt
3961 gactcatttc taggcagtgc ttatgaagaa aaattaaagc acaaacattc tggcattcaa
4021 tcgttggcag attatcttct gatgacacag aatgaaaggg catctcagcc tctctgaact
4081 ttgtaaaaat ctgtccccag ttcttccatc ggtgtagtgt ttgcatttga gtgaatactc
4141 tcttgattta tgtattttat gtccagattc gccatttctg aaatccagat ccaacacaag
4201 cagtcttgcc gttagggcat tttgaagcag atagtagagt aagaacttag tgactacagc
4261 ttattcttct gtaacatatt gtttcaaaac tctttgcaa aagctaagca gtggtgaact
4321 gaaaagggca tattgcccc aaggttacact gaagcagctc atagcaagtt aaaatattgt
4381 gacagatttg aaatcatggt tgaatttcat agtaggacca gtacaagaat gtccttgcta
4441 gtttctgttt gatgtttggt tctggcggct caggcatttt gggaaactgt gcacaggggtg
4501 gagtcaaaac aacctacata taaaaagaga aaaagagaaa cttgtccatt tagctttcat
4561 aagaaatccc atggcaaagg gtaataaaaa ggacctaatc ttaaaaaaac aatttctaag
4621 cacttgtaag aaccacagtgg gttggagcct cccactttgt cctcctttg aagtggatgg
4681 gaactcaagg tgcaaagaac ctgttttggg agaaagcttg gggccatttc agccccctgt
4741 attctcatga ttttctctca ggaagcacac actgtgaatg gcagactttt catttagccc
4801 caggtgactt actaaaaata gttgaaaatt attcacctaa gaatagaatc tcagcattgt
4861 gttaataaaa aatgaaagct ttagaaggca tgagatgttc ctatcttaaa taaagcatgt
4921 ttcttttcta tagagaaatg tatagtttga ctctccagaa tgtactatcc atcttgatga
4981 gaaaactctt aaatagtacc aaacattttg aactttaaat tatgtattta aagtgaagtgt
5041 ttaagaactt gtagctgctt cttttacaag tggcgctat taaagtcagt aatggccatt
5101 attgttccat tgtggaaatt aaattatgta agcttcctaa tatcataaac atattaaaaat
5161 tcttctaaaa tattgctttt cttttaagtg acaatttgac tattcttatg ataagcacat
5221 gagagtgtct tacattttcc aaaagcaggc tttaattgca tagttgagtc taggaaaaaa
5281 taatgttaaa agtgaatatg ccaccataat tacttaatta tgttagtata gaaactacag
5341 aatatttacc ctggaagaaa aatattggaa tgttattata aactcttaga tatttatata
5401 attcaaaaaga atgcatgttt cacattgtga cagataaaga tgtatgattt ctaaggcttt
5461 aaaaattatt cataaaacag tgggcaatag ataaaggaaa ttctggagaa aatgaaggta
5521 tttaaagggg agtttcaaag ctatatatat tttgaaggat atattcttta tgaacaaata
5581 tattgtaaaa atttatacta aggtcatctg gtaactgtgg gattaatatg ctcgaaaaaa
5641 aatgttatgg agaagctgtc ccaagcaaac taaattacct gtactttttt cccatttcaa
5701 gggaagaggc aaccacatga agcaataact cttacacatg cctaagaacg ttcattgaaa
5761 aaataaattt ttaaaaggca tgtgtttcct atgccaccaa tacttttgaa aaattgtgaa
5821 ccttacccaa aaccatttat catgtccatt aagtatattt gggatataaa tttaggaagat
5881 atttacatgt tccatctcca cagtggaaaa acttattgag gctaccaaag tgtgccaaaga
5941 aatgtaagtc cttagagtaa ttagaaatgc tgttttctc aaaagcatga gaaactagca
6001 ttttcatttc ttatttactc cttttctata tcaatgcaat tcacaacca attttaatac
6061 atccctatat ctcaagcatt tctatcttgt actttttcag aaaataaacc aaaaataatc
6121 ctttggctct tctatcttct gaccttttga agcaacagaa atgtaaaaac agaaggggtc
6181 caatttttac acgttttttt ctcaagtagc ctttctgggg atttttattt tcttaatgaa
6241 gtgccaatca gcttttcaaa atgttttcta tttctcagca tttccaggaa gtgataacgt
6301 ttagctaaat gagtagaagt ggacttcctt caacatattg ttacctgtc tagccttagg
6361 aagaaaacaa gagccacctg aaaataaata caggctctt tcgagcatct gctgaaatac
6421 tgttacagca atttgaagtt gatgtggtag gaaaggaagg tgacttttct tgcaaaagtc
6481 tttctaaaca tccacactgt cctaagagat gagctttctt gttttattcc ggtatattcc
6541 acaaggtggc acttttagag aaaaacaaat ctgatgaaga ctaaagagg tctttcctag
6601 gagatttcat tctaacttta tttttctgcg catatttaac tctttcctag cacttgtttt
6661 ttgggatgat taatagtctc tataatgttc tgtaacttca atattttact tgttacctag
6721 gttctgaaca atgtctgca aataaattgt tcttaaggat ggataataca cccattttga
6781 tcatttaagt aaagaaagcc tagtcattca ttcagtcaag aaaaaatttt tgaagtacc
6841 agttacctta cttttctaga ttaaacagg cttagttact aaaaaggcag tccctcatctg
6901 tgaacaggat agtttctgta gaagtataaa actcctttag tggcccag taaaacacac
6961 atacctctc tgctgctttc aaattcccta gcatggtggc ctttcaacat tgattaaatt

```

[0164]

```

7021 ttaaaaatcct aatttaaaga tcaggtgagc aaaatgagta gcacatcagt aattcagtag
7081 acaaaaacttt tgtctgaaaa attgctgtat tgaacacagag ccctaaaaata ccaaaagacc
7141 aggtaaat ttt aacatttgtg gaatcacaaa tgtaaattca taagaagctc taattaaana
7201 aaaaaagtct gaagtatatg agcataacaa cttaggagtg tgtctacata cttaactttt
7261 gaagtttttt ggcaacttta tatacttttt ttaaatttac aagtctactt aaagacttct
7321 tatacccaa atgattaagt taattttaga ggtcaccttt ctacacagcag tgtcacttga
7381 aatttagtag ggaaggatat tgcagtat ttcagtttcc ttagcacagc accacagaaa
7441 gcagcttatt ctttttgagt ggcagacact cgacggtgcc tgccaactt tccctgtgag
7501 tggcaagcag atgagtctca gtaattcata ctgaaccaa atgccacata cactcagggc
7561 agtcagaaac tggctgagaa atccccgcc tcattcgccc ctctgctccc aggaactaga
7621 gtccagttaa agcccctatg cgaaaggccg aattccaccc cagggtttgt tataacagtg
7681 gccagctga accccatttg ctctgtctca aaacttgatt cccacttga agccttccgg
7741 gcgcgctgcc tcgttgcccc gccctttgg caggagagag gcagtggcg aggccggct
7801 gggccccgc ctcccactca cctgccggtg cctgaaatta tgtgcccgc cgcggtctgc
7861 tttccgaggt cagagtgcc tgcctgtctc tcagaggcat ctgttctgca aatcttagga
7921 agaaaaatgt ccctagtagc aaacgggtgt cttctgtgca taaataagta caacacaatt
7981 ctccgaaagt tcgggtaaaa agagatgagg tagcagctgc cctgtgtgaa gctgtctacc
8041 ccgcatctct caggcgctaa gctcagtttt tgtttttgt tttgttttt taaagaaaag
8101 atgtataatt gcaggaattt ttttttattt ttttattttc catcattcta tatatgtgat
8161 ggtgaaagat atgcctggaa aagttttgtt ttgaaaagtt tattttctgc tctgtctca
8221 gttggcaaaa gctctcaatt ctttagcttc cagtttcttt tctctctttt tctttgttag
8281 gtaataaag gtatgtaaac aaattatctc atgtagcagg ggattttcat gttgagagga
8341 atcttccgtg tgagttgttt ggtcacacaa ataacccttt ctcaatttta ggagtttggg
8401 ttgtcaaatg taggtttttc tcaaaggggg catataacta catattgact gccaagaact
8461 atgactgtag cactaatcag cacacataga gccacacaat tattaattt ctaactctct
8521 gtggcccta gaaaattcc gttgatgctc ttagggtaaa gttctgaaga taacctgtgt
8581 acccttactt gaaagtttct aatcttaagt tttatgaaat gcaataatat gtatcagcta
8641 gcaatatttc tgtgatcacc aacaactctc agtttgatct taaagtctga ataataaac
8701 aaatcccagc agtaatacat ttcttaaacc tcacagtgca tgatatact tttcattctg
8761 atctgtgtt tgcaaaaata tacacatgta tatcatagtt cctcactttt tattcatttg
8821 ttttctatt acctgtagta aatatattag ttagtacatg gaatttatag catcagctac
8881 cccaggaac agcacctgac agcgggggg ttttttttca agttgttcta catttgcata
8941 aattatttct attattattc atgtatgtta tttatttctg aatcacacta gtccgtgtaa
9001 agtacaactg aaggcagaaa gtgttaggat tttgcatcta atgttcatta tcatggatt
9061 gatggacctg agaaaataaa aattagacta agccccaaa taagctgcat gcattttaa
9121 catgattagt agatttgaat atatagatgt agtatttgg gtatctaggt gttttatcat
9181 tatgtaaagg aattaaagta aaggactttg tagttgtttt tattaatat gcatatagta
9241 gagtgcaaaa atatagcaaa aataaaaact aaaggtagaa aagcatttta gatatgcctt
9301 aatttagaaa ctgtgccagg tggccctcg aatagatgcc aggcagagac cagtgcctgg
9361 gtgtgacctc ctcttctctg ccctcatgaa gaagcttccc tcacgtgatg tagtgccctc
9421 gtaggtgtca tgtggagtag tgggaacagg cagtactgtt gagaggagag cagtgtgaga
9481 gtttttctgt agaagcagaa ctgtcagctt gtgccttgag gcttcagaa cgtgtcagat
9541 ggagaagtcc aagtttccat gcttcaggca acttagctgt gacagaagc aatccagtg
9601 cgtataaaa agcaaggatt gcctgtataa tttattataa aataaaaggg attttaacaa
9661 ccaacaattc ccaacacctc aaaagcttgt tgcatttttt ggtatttgag gttttatct
9721 gaaggttaa gggcaagtgt ttggtataga agagcagtat gtgttaagaa aagaaaaata
9781 ttggttcacg tagagtgcaa attagaacta gaaagtttta tacgattatc attttgagat
9841 gtgttaaagt aggttttcac tgtaaaatgt attagtgtt ctgcattgcc atagggcctg
9901 gttaaaactt tctcttaggt ttcaggaaga ctgtcacata cagtaagctt tttccttct
9961 gacttataat agaaaatgt ttgaaagtaa aaaaaaaaaa tctaatttgg aaatttgact
10021 tgttagtttc tgtgtttgaa atcatggttc tagaaatgta gaaattgtgt atatcagata
10081 ctcatctagg ctgtgtgaac cagccaaga tgaccaacat cccacacct ctacatctct
10141 gtcccctgta tctcttctt tctaccaata aagtgttccc tgetaccatc ctggctgtc
10201 cacatggtgc tctccatctt cctccacatc atggaccaca ggtgtgctg tctaggcctg
10261 gccaccactc ccaacttgac ctagccacat tcatctagag atggttctct atgctgggca
10321 cagactgtgc tcatggcacc cattagaaat gcctctagca tctttgtatg catcttgatt
10381 tttaaaccaa gtcattgtac agagcattca gttttggctg tggtaaccaag agaaaaacta
10441 atcaagaata taaaccacat tccaggctgc tgttttctct ccatctacag gccacactt
10501 tactgtat tttcactctt gaaattcatt ctgctat ttt catatcaggg tacagactta
10561 taagggtgca tgttccctaa aggtgcataa ttattcttat tccgtttgct tatattgcta
10621 cagaatgctc tgttttggtg ctttgagttc tgcagacca agaagcagtg tggaaattca

```

```

10681 ctgcctggga cacagtctta taagaatggt ggcaggtgac tttgtatcag atgttgcttc
10741 tcttttctct gtacacagat tgagagttac cacagtggcc tgtcgggtcc accctgtggg
10801 tgcagcacag ctctctgaaa gcaagaacct tcctacctat tctaactgtt ttgccctcta
10861 agaaaaatgg cctcaggtat ggtatagaca tagcaagagg ggaagggctg tctcactcta
10921 gcaaccatcc ctccattaca cacagaaagc cctcttgaag caaaagaaga agaaagaaag
10981 aaagcttatc tctaaggcta ctgtcttcag aatgctctga gctgaatgct cttgctcctt
11041 tcccaagagg cagatgaaaa tatagccagt ttatctatac ccttcctatc tgaggaggag
11101 aatagaaaag tagggtaaat atgtaacgta aaatatgtca ttcaaggacc accaaaactt
[0165] 11161 taagtaccct atcattaata atctggtttt aaaagtagct caagtaaggg atgctttgtg
11221 acccaggggt tctgaagtca gatagccatt cttacctgcc cttactctg acttattggg
11281 aaagggagaa ctgcagtggt gtttctgttg cagtggcaaa ggtaacatgt cagaaaattc
11341 agagggttgc ataccaataa tcctttggaa actggatgtc ttactgggtg ctagaatgaa
11401 aatgtaggta tttattgtca gatgatgaag ttcattgttt ttttcaaat tgggtgtgaa
11461 atatcactgt ccaatgtggt cacttatgtg aaagctaat tgaatgaggc aaaaagagca
11521 aatagtttgt atatttgtaa taccttttgt atttcttaca ataaaaatat tggtagcaaa
11581 taaaaataat aaaaacaata acttttaaact gctttctgga gatgaattac tctcctggct
11641 attttctttt ttactttaat gtaaatgag tataactgta gtgagtaaaa ttcattaat
11701 tccaagtttt agcagaaaaa aaaaaaaaaa aaa

```

[0166] SEQ ID NO:7人CDK6氨基酸序列(NP_001250.1)

```

1 mekdglcrad qyecvaeig egaygkvfka rdlknggrfv alkrvrvtg eegmplstir
61 evavlrlhet fehpnvrlf dvctvsrtrd etkltlvfeh vdqdlttyld kvpepgvpte
[0167] 121 tikdmmfql1 rgldflhshr vvhrdlkpqn ilvtssgqik ladfglariy sfqmaltsv
181 vtlwyravev llqssyatpv dlwsvgcifa emfrrkplfr gssdvdqlgk ildviglipe
241 edwprdvalp rqafhksaq piekfvtid elgkdlllkc ltfnpakris aysalshpyf
301 qdlerckenl dshlpsqnt selnta

```

[0168] SEQ ID NO:8小鼠CDK6 cDNA序列(NM_009873.3) (来自位置328至1308的CDS)

```

1 cccgcgctgc gctcatcccc gaggggcccc agcaacctct ccttcgtgaa gactgcacga
61 gccctgctgt ggaagaaaag tgcagagatt gtgggcagac tatgtaatcg ctgcggaggg
121 ggaagaggag ggatcggcgc tctcctgctg cggcggcgcg gcgactcggc taggcggagt
181 ttcgcagcgg ctgcgcccgg cttgcacccg cggcgagaaa ggtegggtccg tctagcccgg
241 cggccgcgag tccgactccc cgaggcgtgt aaggcagcga gtgagcacc cggttccact
301 gtgccgcacc cgcagcctga agccagcatg gagaaggaca gcctgagtcg cgccgatcag
361 cagtatgagt gcgtggcgga gatcggcgaa ggcgcctatg ggaaggtgtt caagcccgc
421 gacctgaaga acggcggcgg cttcgtggct ctgaagcgcg tgcgagtgca accagtgag
481 gagggcatgc cgctctccac catccgcgag gtggcgggtg tgaggcacct ggagacctt
541 gagcacccca acgtggtcag gttgtttgat gtgtgcacag tgtcacggac ggacagagaa
601 accaagctta cactagtgtt tgagcatggt gatcaagact tgaccactta cttggataaa
661 gttccagagc ccggcgtacc cacagaaacc ataaaggata tgatgtttca gcttctccga
721 ggtctggact ttcttcattc tcacagagta gtgcatcgtg atctgaaacc gcagaacatt
781 ctggtgacca gcagtggaca gataaagctg gctgactttg gccttgcccg catctatagt
841 tttcagatgg cccttacctc ggtggctgct acgctgtggt accgagcccc agaagtcctg
[0169] 901 ctccagtcca gctatgccac cctgtggac ctctggagtg tcggttgcac ctttgagaa
961 atgtttcgca gaaagcctct ttttcgtgga agttcagacg tggatcaact agaaaaatc
1021 ttggacatca ttggactccc aggagaggaa gactggccta gggacgtggc ccttccccgg
1081 caggcttttc attccaaatc tgcacacccc atcgagaagt ttgtgacaga tattgacgaa
1141 ctaggcaaag acctacttct gaaatgctg acgtttaatc cagctaaaag gatatccgcc
1201 tacggcgccc tgaatcaccg gtacttccaa gatctggaga gatacaagga caacctgaa
1261 tctcacctgc catccaacca gagcacctcg gagctgaaca cagcctgagg ttccacgggg
1321 atgcccatga gctcgtcatc tgaacacatt ggcggtcgcg agtcccctaa gcaagcctct
1381 cagagcagtt gaagattgct ggctgccaac cttctggctg ccagcttctg ggtgggctct
1441 gccttaccac ggaaaccacc tagtttactg ttcagagatc aatgcaaggg tgattgcagc
1501 tttatggtcg tttgtacact tgtttgtttt gtctgtttgt ttcaagaacc tggaaaactt
1561 ccagaagaag agaagctgct gaccaattgt gctgcaattt cgttttctaa cttgaaatgc
1621 tgccagtgta ggggtgggaat ccaggcccag ctgagttatg atgtaatccg cctgcagctg
1681 ctgggcctgc tttggtactt gtgagtgtgt gtgcatgcgt atgtgtgtgt aagagagaag
1741 aggaggggag agaaagaccg ctgatctcgt caagtgttac tttttttttg tagaaaacaa
1801 gaataattga gttttaaaga gtagaggtga ctgatagtaa gaagggcttg ttcagtga

```

[0170]

```

1861 ggtgattcac aatggagtct tgttaggaag gttggaccta agtctcaga gttgccttcc
1921 tgtccaaaag cttttgctag cagtaaacia taaaggttta gatgccacia aaaatggggg
1981 gaaccacaat attttttaag agacttttta aggcatacat cttctattta ctctttggaa
2041 agctgaactt aatgtgtccc aggccctata tatagtacag tatgtactta attgtttctt
2101 tggggaaaga tgctataagt atcttattac ttgcaataca ttaaggagt gagtgtacct
2161 cagataggtt ttaaagatag agagcacctg ttttctggtg tgagatgta tcattttctt
2221 cacgtctctt gataccttga taccttgtca ccttagggaa tcaacttctg ctctgactag
2281 aggcgggaat accatctagc tgtctccacc accaccatg gcgcatctgc cttgtgtctg
2341 cttgtgtagt gcgaagctct caaccaccag cacttctaata cacttttctt gccactgcct
2401 ggctaacgac agatggcca gctgcccaca tcccacacc gcttgacgc ttaccgtctt
2461 tcaccgaatg ctttggcgt aggtcccat tccgaaacc taacagtatc cccttgtgcc
2521 tttgtaatac agtcttcccc ctgcccgcagc tgaggtcacc taggcagtga agagtgtctg
2581 ttctgtgtgt gtatagacta ctaccgactg tcaacttggg tttctatct ttaagtgtat
2641 gttgtcagtg taatgtctga ggaaatgtct tttctctct tctagagata actacttact
2701 ctctaaagt atctctctgt ctgtccgcag gatgtgttct tgggtttttg ttctttttt
2761 ttttttttt tttttttgt ctgaggcctc atgtcagccc tgctttctgc agagccagcc
2821 taccctgggc attataaaca actgtacctt actgttttct ttcagtcctt tacattctgt
2881 gccacctttg cttattata tccgtggctt agtgctaacg tggcactact ccatagaagg
2941 tgtagaaggc agctttcggg aagcgtagct gacttttgtt tgaactcgtg ttgagcacat
3001 ttaagtaaac gctagatgat gcttcaactgt agagcttga aagactgcct gatgtttcac
3061 acggcagtg aggtccaga tgggtttgt atgttatgga ccttactgtg tttctcgtag
3121 ctgaacaatg catgtgtgta tttgtttgt tgtttttgg tttctctgtg tagccctggc
3181 tgcctggaa ctcactctgt agaccaggct ggcctcgaat tcagaaatgc gcctgcctct
3241 gcctccaag tgctgggatc aaaggcgtgc gccaccacgc ccggctttgc atatggttat
3301 ctgtatggag aagaattaga tgtctttcct gagagctttg gaggttggga atcatcttct
3361 tctgtttatt tttattttta acattacatt acattcttct gattcagtat cgcaagaaag
3421 gattttttct tttttcaaaa acaaaacttt aagaagccag aggttaggct gagaatgttc
3481 tgcctctgct ctcacagctc tgcctggcag actgccaacg ctcgagacag tcagcctgga
3541 acctcggga caaggtctac tgcaggtctc acttggacag cgacttctcg atgtcattg
3601 aacaaggtcc aaaatacaga ctttttggct agggcctaga aatcgacat aaaactcact
3661 gcattgaggc ctaatccatt ctatattaac atccatgtga taaagtgaaa ataattttga
3721 gggttttgct ttcgcaaaa aaaaaaaga aagaagaaa aaaaaagaaa ggaagaaaaa
3781 gaaaaagaa aggattgttt tccttagctt tgctcaagaa aaatacagct atcctaaact
3841 ggaatcttcc cgtattcttt agagtcttaa gtatagagt taacttcaat tttgtcagct
3901 gtcttgagct tatttctaag tagttttgt ttggctttg gtgagtgagg tagtggagg
3961 ttaattttg ggtcttttt tttttggct ttgtttgtg gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt
4021 ttatgtgttt ggcttttggg tttggttggt tagttgttta gtttgtttt ttgttgtgt
4081 ttaatttgct ttttctaggc agggtttctg tatgtggccc tggctgtcct agaacttct
4141 ctgtagacca ggctagctc aaactcagc atccactgc ctctgtctcg agtctgttg
4201 aactaaaggc atgagctacc ctcctcagcc cactcacaac tttgagtaat attttaaat
4261 catagacatg ttggtattag aaacatggcg tattgtggtg gatggtagag aaagggcgcc
4321 gcaacctctc aggacatcat atgtctggcc agctcttcat tcatataggt gctctctgga
4381 tatgtcttta catcagactc acacctctga aaccggttt tcacacaagg agacttgcca
4441 ttggggctct tagtagccca gggaaacata gagtaaactg aagagcttac tgtgtgccgc
4501 ttatccttag atggcctcat ccagtcacag gtctttgtca gaatctaacc attgattcac
4561 tgaggagacc ctactgcctt gaggttccac tgaagcagct tttagtgaga ctagggcaag
4621 aatataccga atagcttctg ttcaaggttt ggttccagag actctacat ttacaggact
4681 ggctggagtt acaacaacct cttaaagagg gttagggcggg ttctccagtt agaccctta
4741 acctcacagg tgagtagtcc taacctgaca gccttagaaa cacagttgcc gactacctga
4801 gagcaccagg tggccgcgc cctcctattc agcccctct taaagacgac agacggttaa
4861 gccatggaga agctgttcag gtagcacggg gccatttctg cccccagctt gtcattgttt
4921 ttctctcagg accactctc tgaccagtag acttgaattt agccccaggt gatttactaa
4981 actcagctca gaagctcact taaaaatagg acctccacat ggtcgtgcta agtaaaaatg
5041 aagaccccaa gttgcacagg gtgctgctat ctcaaagaca atactttctt ttgaatagaa
5101 agctgtgccg tccaccctgc aatgggtgct agccaacttg cttgagaaaag tcaggagcaa
5161 gcattttgag ttttaagaa tgtcctgaac ttgtctttta agtaaacata gctgctttat
5221 taaaagctgt gactactaaa gccagtcaca gccatcgtca ctgtgggagt taaatcatgt
5281 caactttcaa acatcacagt tgtttcaatc ttctgtccaa agaactctc ttctggagaa
5341 aacctgattt tggttttggc tttttgtctt gtcttgtttt gtttttctg agatggggtc
5401 tctctgtgaa gccttgcta tcttggaaact cagtgtgtag accaggtgg ccttgaactc
5461 atgtagatct gcctgctaaa actaaagaca tgcaccacca tgacagctga ctatttttta

```

[0171]

5521 tgatgagcac agaagtggct cacatTTTTct taaagcacac ttttgtcaca tagtagagtc
5581 taggaaagaa taacattgaa aatccccatc ccagtgtgac acttgtgtaa gcacatatgg
5641 atagccattg gaagaataca tgcttgcttg taacatgaaa ttaaagacat tgtataatTT
5701 cttaatcttt aaaaattacc aaaaaagtgg caacagtatg ttttaaggTTa ttttaatTTT
5761 tacataaatt gttaccata tttgtttgcc ttttaagtata ttctaagaat tataattaag
5821 tataattata agtcatcccg cacattcagc acttatggac taggtatgtc aaaatacaca
5881 aattctgtat ttcttgtttc ataggaagaa agcagccatc tgaagctcta ctcatatata
5941 tgcctaagaa tatctataca aaattaaagt ttaaaaggcc tttgcctctc gtgcagctga
6001 gaatagacaa cttataagcc ttatccaaaa accatgataa agggatcatg tgcatcctta
6061 caaaaacccc ttatcctgtg catacttaca tccaagtaca tctaaggaa ggtgtccgtg
6121 cattcatctg ccacagtggg gaagctgcct ggtgcaaggT gtgagtcctg gaatgattag
6181 tgatagtggT ctcaaagag gacaccttcg tctcccacca gtttccttcc tatggacagg
6241 ctcagtcag ttatacaggg caggaggggc tggTgccac agcctcccgc ctctgcaagg
6301 taggattgca tatctcaaac atctctaact cagtttcggc tttgtttggTc ttgtttaagg
6361 aaataagcca gtaagccaaa actatTTTTg ttgtttgtct cttgtcttct gaaagagagg
6421 ggatatcaat tttaaatgtt tctctcaatt tgatctttca aatTTTTcta ataaagtgcc
6481 aaattgctgc tgccttcttct tcttcttctc tcttcttctt cttcttcttc ttcttcttct
6541 tcttcttctt cttcttcttc ttcttcttct tcttcttctc gttttctgct agggTTTTct
6601 tggTTTTgTt tggtttcagt ttgttttatt ttcagcaagt taggtaactt gagaggactt
6661 ccactaggat gttcacacct ctgtgctctg gtccctgac ccctccaaaa aatagccacc
6721 tgggaataaa tgcaagctcc ccccctccag catctaccaa aatactgttg cagcaattcc
6781 aagttcaaat ggtggggatg gaaggtagtt tggagttggg ttgggttggg ttgggttagg
6841 ttggacagaa gtcagtttta aaattcacag cgccctaagg tcagtgTggg gtttattcct
6901 ctatcccaat gtgtttcaca aggtggcgct ttcagagaaa actctaaacc tgaccaagac
6961 tgagaggtat tctagagaca gtacttgtaa ctatTTTcct gcacatctgt aactatcacc
7021 tagcatattc cttcagacaa ttaacagcct tcataatatt ctacagctta tatgtttTgc
7081 tttttagcta ggttctgagt gactaagtta ggcttgagag tgatgtttaa gcaataaaga
7141 aggcctttac ttaagagaca tttttgatgt acccaataaa cctgaaattc taggacatac
7201 aactaaaaac ttccctgaag ccggccctcg tctgtgagca gcacggtttc attagaatg
7261 gcaaaaactcc ttgCGgggtt gggagtggg gacagtccta actctcacag ccctgacat
7321 gtctgctgcg gttcaccct cactatccat gaccttttga cactgtcatt tctaaactca
7381 agtgaacaaa ggaagcactg catctgtaac tgagtatgca gaccatTTTc taaagaacca
7441 cagtgtcTga caaatactgg aagaactggT atgtttTaca cgcacataaa ctacaagtgc
7501 aaactcttac attccaattc ctaaattaca gtatatagt acatatgaac attacagttt
7561 agacaggaac ctgcataagg ctttggtttt tctactctcg aggtcacttt tatactacat
7621 tttaaattca cacttttctc agagaccag ccccctgagc caatagtgc agtacactgg
7681 gatgaacaga cacagtacca caccatggca gaaagcagtt tattccttat ggtcacaca
7741 cacacacaca cacaccctgc ctgacttcac acacacacac acacactgcc tgacttcaca
7801 cacacacacc ctgectgact tcactccaga aaggctggca gggaggTTTc agtcatttac
7861 acagaccagg tgctcaagca ttgagaaatc gattcTTTca accctctgct ctcactgaag
7921 cagatctcag gttaagcccc tcagtgaag gccaagggtc ccctgggtct gccaccattc
7981 tggagttcct gagcctgacc ccaccctac tctctgctgaa tgacaggggg cggggcagcg
8041 gagccaggcc aagcaggata ttgtgggagg accagtgacc tgctgcacct cagccatctg
8101 ttgtgccatc ttaggaagca gggTgctcga gaaacacaga gctgtcctct gagctacaat
8161 aactacagtt tgctcactag gctagctagc tctggTgtag agatgcaagc cctatatgaa
8221 atgtctccca ctcaaagttt tgctgggggg tgggggttga gatgtataat tgcaggagaa
8281 attctgactt tactgttttc tatctgatac atccatggTg gggaaaagat atgaaactgt
8341 ctcagtttga aaagctcttc tacttcaatt ggcaaacgca tggagttcgt tactttctac
8401 tttcttctt tttctcctt agtgagcaaa ttattccttg aacagaaaga ggattttccc
8461 atttagagga agcttctgtg tgaattgtca ggtcacacaa ataatgccat tatattgttg
8521 agtgtagggc tttggTTTTt caggggacac atagccaagc agtgatggTc aggaattatg
8581 tctcactcta tcatttctta ctcaagcagg gttccagcca gattctattg tgagctgagg
8641 ttagtcgggg gaccctgtgc tctacttgaa gtttcataat ctttagttct atgaaatgca
8701 ataacatata ttagccagca atattcctgt ggtcggcagc atctctgagt ttgacctca
8761 gtctctggat ggttaaaata gatcccagca gtaatccatt tcttgacatc agtgcttaag
8821 tcaagtatct ttccactctg gtccattttg caacaatgta ttcatgtatg tttcatttcc
8881 tttattcatt attttcctat gaacagtgat aaatgtatta gcacattgaa ttaatagcat
8941 aatagaaga gcacttagca gatggggatt tttatcaag tcccacttt acataagtta
9001 tttctattat tattcatgta tattatttat tgctaagcct cacaccattc ctgtgaaagt
9061 gcaactaaag gcagatatta gggcttgat ttaatgttcc ttatcatggT cttgacaaa
9121 aaattcagtg atgccccaa ataagctgcc tgcgtTTTTa acacgactgc tagatttcag

9181 taggttaagt gtaacacttt tgggtgctag gtgtcttttt acattaaaag aggcaaagca
 9241 gcagaactct gtagctattg cttctggcag agatttgttt agcatagtgt ggtattaatt
 9301 atagcaaatg ttaaggtagc atgtagaggt tgccttcaat aaggactgt gccagggtggc
 9361 cagcaagtgt gattctaggc agagcaggcg tctaggtgct gcctcctgtc tggttgtgtg
 9421 aagagagctg ctccgagcaa tgtagtgcc cctgcccccc gtagggtgtcc tgggcagcgg
 9481 tgggaacacg tggtagctga gagaagggat cagcgtgagg ggtgttctgt aggaacagaa
 9541 ctggtagcgt atgccttgag gcttctgtcc cgtgttttca gattccaggc atacattctg
 9601 tatacagaag cagtccatcc tagcaataaa acctaggaat cccaacaac tcaaaaggca
 9661 gttgcctgct tgtggtttct gtcctgagct gaaggttaac gggcaagtgt taggcacaga
 9721 agagcatcgt gtgctggggt gccgtgccac ggcccagggt gcgtgttagc agtagagact
 9781 gttacagggt tgtcccttct aggtgcgtag aagtatatgg cttcactgta aagtgtgat
 9841 tgtttctgta ttcccacagg gacttggttaa agcttctaga ggcttcagca aagctgtaga
 9901 ccacagtaag ctgctttttg tttgacttat tcttagacta ggaaatgttt aaaggttaa
 9961 aaaaaaaaaa aaagaatcct catttagaca ctgaaactgc tttttctgg actgaaatca
 10021 tggctctaga actgtagaaa tcacacccat tagatgctaa tctaggttgt gtaagccagc
 10081 cccaagagtc tagcatcccc acactgtatc tgcattctcc tgcattctac cttccttccc
 10141 aaaggtgctc cctaccacta cctgacctg tccctttggg gcttcccac tcttggtctg
 10201 aaagttaggc atcaagcatg tgatgagaaa tactttcagc accaagtatg cctgcctagg
 10261 cctagccacc gccccactt tgctttggc tagccatagt caacaagaga taatacctgg
 [0172] 10321 tgctggcac agaatgaacc catgatgtca gtcagaaaag ccctcaagca ttttctct
 10381 gtacgtcctg atctttaaac ccagtcatta tgcaagcgt tgcgtgttg ctatagtcct
 10441 aggttaaaaa aaaaaaaaaac attccaggct gctgtaggct gtccatagc agtctctgct
 10501 tttaccttgc tttttcatac ttgaaattcg ttctgccatt ttgatttcac ggtgcagaca
 10561 tcagggtaca cgttccctct ggggtgataa ttgctctcat tccgtttgt cacactgta
 10621 caggatgctc tgttttggtg ctttggttcc agcgggtcaa aaagcactgt gggaaatcac
 10681 tgcctagaac acagtcttaa aagcatttgg gcaggagtct tgggttgat tgcgctctg
 10741 ctcttctctg tgccctccag atggagttac caggttgccc tgccaggctc cccactcca
 10801 cccaagac ctttctctga atggcctgtg aaccctgtgc tgtatccaag ggtgaatgtg
 10861 acgatctcc tctggcgacc ctaccttcc tggttactca ccatcagaaa caacctaggt
 10921 tacatatagc aaactctaca cagccttcc gaggaaagc ataaaaggat atctctaagg
 10981 ttgctcttca aagccctgag ctgaaggcct ttgctccgt ccttgagct gatgaaaata
 11041 ctggtcaatt tatccaagcc cttcccactt acaagaatgg gaaagtagag gtttgtgtcg
 11101 ataccatcta aagaccacaa cttctagcca taggtatct catatagtc cattttcaaa
 11161 agcagctcag gtgagtgtg actccaggct ccatgcaggc atcttaacat gggacttccc
 11221 tagagagagc tacagtgttc attctatgtc acagggcagg agaggagacc ggcaggaaat
 11281 ttggagggtg acagatcaat actcctttgg aaactggatg tcttactggg tgctagaatg
 11341 caaatttatg tatttattgt ctggctattg aattcattgc ctttcaaac cattgttcaa
 11401 atgtcactat cattggcctc acttgatgc cagccgaatt ggttgaaagc aaaccagaga
 11461 atggtttgtg catttgcctt accatttga cttcttaca taaaaatgct agtagcaaat
 11521 aaaaaaaaaa aaaa

[0173] SEQ ID NO:9小鼠CDK6氨基酸序列(NP_034003.1)

1 mekdslsruad qqyecvaeig egaygkvfka rdlknggrfv alkrvrvtqs eegmplstir
 61 evavlrhlet fehpnvrlf dvctvsrtldr etkltlvfeh vdqdltyld kvpepgvpte
 [0174] 121 tikdmfql1 rgldflhshr vvhrdlkpqn ilvtssgqik ladflglariy sfqmaltsvv
 181 vtlwyravev llqssyatpv dlwsvgcifa emfrkplfr gssdvdqlgk ildiiglpge
 241 edwprdvalp rqafhksaq piekfvtidid elgkdlllk ltfnpakris aygalnhpyf
 301 qdlerykdnl nshlpsnqst selnta

[0175] *表1中包括RNA核酸分子(例如,用尿嘧啶替换胸腺嘧啶)、编码所编码蛋白质的直系同源物的核酸分子,以及包含在全长上与表1中列出的任何SEQ ID NO的核酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更大的同一性的核酸序列或其部分的DNA或RNA核酸序列。此类核酸分子可以具有如本文进一步描述的全长核酸的功能。

[0176] *表1中包括蛋白质的直系同源物,以及包含在全长上与表1中列出的任何SEQ ID NO的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更大的同一性的氨基酸序列或其部分的多肽分子。此类多肽可以具有如本文进一步描述的全长多肽的功能。

[0177] II. 受试者

[0178] 在一个实施方案中,受试者具有将受益于免疫应答的上调的疾患。受试者可以用至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂(单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)治疗。受试者可以是哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、灵长类动物、非人哺乳动物、家畜(诸如狗、猫、奶牛、马)),并且优选地是人。术语“受试者”是指任何健康的动物、哺乳动物或人,或者罹患免疫病症的任何动物、哺乳动物或人。术语“受试者”可与“患者”互换。

[0179] 在本发明方法的另一个实施方案中,受试者尚未经治疗,诸如化学疗法、辐射疗法、靶向疗法和/或抗癌疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)。在又一个实施方案中,受试者已经经历了治疗,诸如化学疗法、辐射疗法、靶向疗法和/或抗癌疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)。在再一个实施方案中,受试者是有免疫活性的或无免疫活性的。“有免疫活性的”受试者是具有在暴露于抗原后建立正常或期望的免疫应答所需的免疫细胞和免疫功能的那些受试者。“无免疫活性的”受试者是缺乏一种或多种免疫细胞类型或者缺乏所述一种或多种免疫细胞类型的在暴露于抗原后建立正常或期望的至少一种免疫应答水平的免疫功能的那些受试者。无免疫活性的受试者更容易患上机会性感染,例如病毒感染、真菌感染、原生动物感染或细菌感染、朊病毒疾病和某些赘生物。“免疫缺陷的”受试者是其中可能没有天然宿主免疫应答的受试者,诸如,重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠就是这种情况。“免疫减弱的”受试者相对于有免疫活性的受试者具有至少一种显著降低的免疫功能。在任一种情况下,免疫功能和/或免疫细胞类型的减少或缺失可以由许多不同和熟知的方式产生。例如,在其任何项目中产生所有免疫细胞的造血干细胞(HSC)可能在发育、功能、分化、存活等方面受到负面影响。

[0180] 在一些实施方案中,受试者需要上调的免疫应答,诸如通过减少Treg以去除对免疫应答的抑制。上调免疫应答的剂可以是增强现有免疫应答或引发初始免疫应答的形式。因此,使用主题组合物和方法增强免疫应答可用于治疗癌症,但也可能可用于治疗感染性疾病(例如,细菌感染、病毒感染、原生动物感染、蠕虫感染或其他寄生生物感染)、与气道耐受性受损相关联的哮喘和免疫抑制性疾病。示例性的感染性疾病包括病毒性皮肤病,诸如疱疹或带状疱疹,在这种情况下,这种剂可以局部递送至皮肤。此外,全身性病毒性疾病(诸如脑炎)可以通过全身性施用此类剂来缓解。如下所述,呼吸道感染(诸如流感和普通感冒)可以通过基于呼吸的施用(诸如鼻内、肺吸入、肺沉积和本领域熟知的相关途径)来治疗。在某些实施方案中,受试者已经进行了手术以去除癌性或癌前组织,诸如通过血液隔室纯化。在其他实施方案中,癌性组织尚未被去除,例如,癌性组织可以位于身体的不可操作区域中,诸如在对于生命必不可少的组织中、或在外科手术将对患者造成相当大的伤害风险的区域中。

[0181] 本发明的方法可以用于确定受试者(诸如上文所述的那些)中的许多不同癌症对抗癌疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)的应答性。

[0182] III. 样品收集、制备和分离

[0183] 在一些实施方案中,将来自受试者的样品中的生物标志物的存在、缺失、量和/或活性测量值(诸如基线Treg数量、Treg比率、生物标志物表达水平、干扰素或干扰素信号传导通路基因表达、CDK4、CDK6、干扰素、ISG、免疫检查点、DNMT1、STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、

IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2、MDA5等)与预定的对照(标准)样品进行比较。来自受试者的样品典型地来自患病组织(诸如癌细胞或癌组织),但可以是任何感兴趣的组织,诸如血清或本文所述的其他身体样品。对照样品可以来自相同的受试者或来自不同的受试者。对照样品典型地是正常的非患病样品。然而,在一些实施方案中,诸如用于疾病分期或用于评估治疗功效,对照样品可以来自患病组织。对照样品可以是来自几个不同受试者的样品的组合。在一些实施方案中,将来自受试者的生物标志物量和/或活性测量值与预定的水平进行比较。该预定水平典型地从正常样品获得,诸如与从其获得测试样品的物种相同的物种的成员的细胞或组织类型中的生物标志物的正常拷贝数、量或活性,或者来自从其获得测试样品的受试者的非患病细胞或组织中的生物标志物的正常拷贝数、量或活性。如本文所述,“预定的”生物标志物量和/或活性测量值可以是用于(仅以举例的方式)评估可以被选择进行治疗的受试者、评估对抗癌疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)的应答、和/或评估对组合抗癌疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)的应答的生物标志物量和/或活性测量值。可以在患有或不患有感兴趣疾患(诸如癌症)的患者群体中测定预定的生物标志物量和/或活性测量值。预定的生物标志物量和/或活性测量值可以是单个数字,其同等适用于每个患者,或者预定的生物标志物量和/或活性测量值可以根据患者的特定亚群而变化。受试者的年龄、体重、身高和其他因素可能影响个体的预定的生物标志物量和/或活性测量值。另外,可以单独地为每个受试者确定预定生物标志物的量和/或活性。在一个实施方案中,在本文所述的方法中确定和/或比较的量基于绝对测量值。在另一个实施方案中,在本文所述的方法中确定和/或比较的量基于相对测量值,诸如比率(例如,相对于管家基因的表达或在各个时间点处的基因表达标准化的生物标志物表达)。

[0184] 预定的生物标志物量和/或活性测量值可以是任何合适的标准。例如,预定的生物标志物量和/或活性测量值可以从正在针对其评定患者选择的同一人或不同的人获得。在一个实施方案中,预定的生物标志物量和/或活性测量值可以从同一患者的先前评定中获得。以这种方式,可以随时间推移监测患者选择的进展。此外,如果受试者是人,则可以从另一个人或多个人(例如,选定的人群)的评定中获得对照。以这种方式,可以将正在针对其评定选择的人的选择程度与合适的其他人(例如,与感兴趣的人处于类似情况的其他人,诸如患有相似或相同的一种或多种疾患和/或同一种族群体的那些人)进行比较。

[0185] 在本发明的一些实施方案中,生物标志物量和/或活性测量值从预定水平的变化是约0.5倍、约1.0倍、约1.5倍、约2.0倍、约2.5倍、约3.0倍、约3.5倍、约4.0倍、约4.5倍、或者约5.0倍或更大。在一些实施方案中,该倍数变化小于约1、小于约5、小于约10、小于约20、小于约30、小于约40,或小于约50。在其他实施方案中,与预定水平相比,生物标志物量和/或活性测量值的倍数变化超过约1、超过约5、超过约10、超过约20、超过约30、超过约40、或超过约50。

[0186] 可以从包括包含核酸和/或蛋白质的体液样品、细胞样品或组织样品在内的患者的多种来源收集生物样品。“体液”是指从体内排出或分泌的流体,以及通常不从体内排出或分泌的流体(例如,羊水、房水、胆汁、血液和血浆、脑脊液、盯聆和耳垢、考珀液或射精前

液、乳糜、食糜、粪便、女性射精、间质液、细胞内液、淋巴液、月经、母乳、粘液、胸膜液、脓液、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、泪液、尿液、阴道润滑、玻璃体液、呕吐物)。在一个优选的实施方案中,受试者样品和/或对照样品选自细胞、细胞系、组织切片、石蜡包埋组织、活检组织、全血、乳头抽吸物、血清、血浆、口腔刮擦物、唾液、脑脊液、尿液、粪便和骨髓。在一个实施方案中,样品是血清、血浆或尿液。在另一个实施方案中,样品是血清。

[0187] 可以在纵向时间段内(例如,大约每天、每周、每月、每年、每半年一次或多次等)重复地从个体收集样品。在一段时间内从个体获得大量样品可以用于验证早期检测的结果和/或鉴定由于例如疾病进展、药物治疗等导致的生物学模式的改变。例如,根据本发明,可以每个月、每两个月或者一个月、两个月或三个月间隔的组合来采集和监测受试者样品。此外,随时间推移获得的受试者的生物标志物量和/或活性测量值可以方便地在监测期间彼此比较、以及与正常对照的那些生物标志物量和/或活性测量值比较,从而提供受试者自身的值作为内部对照或个人对照用于长期监测。

[0188] 样品制备和分离可以涉及任何程序,这取决于收集的样品类型和/或生物标志物测量值的分析。仅以举例的方式,此类程序包括浓缩、稀释、调节pH、去除高丰度多肽(例如,白蛋白、 γ 球蛋白和转铁蛋白等)、添加防腐剂和校准物、添加蛋白酶抑制剂、添加变性剂、样品脱盐、样品蛋白浓缩、脂质的提取和纯化。

[0189] 样品制备还可以将与非共价复合物结合的分子与其他蛋白质(例如,载体蛋白)分离。该过程可以分离与特定载体蛋白(例如白蛋白)结合的那些分子,或使用更一般的过程,诸如经由蛋白质变性(例如使用酸)从所有载体蛋白释放结合分子,然后除去该载体蛋白。

[0190] 使用高亲和力试剂、高分子量过滤器、超速离心和/或电渗析可以实现从样品中除去不需要的蛋白质(例如,高丰度、无信息或不可检测的蛋白质)。高亲和力试剂包括选择性地结合高丰度蛋白质的抗体或其他试剂(例如,适体)。样品制备还可以包括离子交换色谱、金属离子亲和色谱、凝胶过滤、疏水色谱、色谱聚焦、吸附色谱、等电聚焦和相关技术。分子量过滤器包括基于尺寸和分子量来分离分子的膜。此类过滤器还可以采用反渗透、纳滤、超滤和微滤。

[0191] 超速离心是用于从样品中除去不需要的多肽的方法。超速离心是以约15,000至60,000rpm离心样品,同时用光学系统监测颗粒的沉降(或其缺乏)。电渗析是一种在过程中使用电膜或半透膜的程序,其中离子在电位梯度的影响下通过半透膜从一种溶液输送到另一种溶液。由于电渗析中使用的膜可能具有选择性地输送具有正电荷或负电荷的离子、排斥相反电荷的离子或者允许物质基于尺寸和电荷迁移通过半透膜的能力,因此使得电渗析可用于浓缩、去除或分离电解质。

[0192] 本发明中的分离和纯化可以包括本领域已知的任何程序,诸如毛细管电泳(例如,在毛细管中或芯片上)或色谱法(例如,在毛细管中、柱中或芯片上)。电泳是一种可以用于在电场的影响下分离离子分子的方法。电泳可以在凝胶、毛细管或芯片上的微通道中进行。用于电泳的凝胶的实例包括淀粉、丙烯酰胺、聚环氧乙烷、琼脂糖,或它们的组合。凝胶可以通过其交联、添加洗涤剂或变性剂、固定酶或抗体(亲和电泳)或底物(酶谱法)和掺入pH梯度来修饰。用于电泳的毛细管的实例包括与电喷雾连接的毛细管。

[0193] 毛细管电泳(CE)优选用于分离复杂的亲水性分子和高度带电的溶质。CE技术也可以在微流体芯片上实现。根据所用毛细管和缓冲液的类型,CE可以进一步分为分离技术,诸

如毛细管区带电泳 (CZE)、毛细管等电聚焦 (CIEF)、毛细管等速电泳 (cITP) 和毛细管电色谱 (CEC)。将CE技术与电喷雾电离相结合的一个实施方案涉及使用挥发性溶液,例如含有挥发性酸和/或碱和有机物(诸如醇或乙腈)的含水混合物。

[0194] 毛细管等速电泳 (cITP) 是一种其中被分析物以恒定速度移动穿过毛细管但仍然被它们各自的迁移率分开的技术。毛细管区带电泳 (CZE), 也称为自由溶液CE (FSCE), 基于由分子上的电荷决定的物种的电泳迁移率的差异, 以及分子在迁移过程中遇到的摩擦阻力, 该摩擦阻力通常与分子的大小成正比。毛细管等电聚焦 (CIEF) 允许弱电离的两性分子通过pH梯度电泳而分离。CEC是传统高效液相色谱 (HPLC) 与CE之间的混合技术。

[0195] 用于本发明的分离技术和纯化技术包括本领域已知的任何色谱程序。色谱可以基于某些被分析物的差异吸附和洗脱, 或者被分析物在移动相与固定相之间的分配。色谱的不同实例包括但不限于液相色谱 (LC)、气相色谱 (GC)、高效液相色谱 (HPLC) 等。

[0196] IV. 生物标志物核酸和多肽

[0197] 本发明的一个方面涉及分离的核酸分子的用途, 这些分离的核酸分子对应于编码生物标志物多肽或这种多肽的一部分的生物标志物核酸, 诸如CDK4、CDK6、干扰素、ISG、免疫检查点、DNMT1、STAT1、STAT2、IRF2、IRF6、IRF7、IRF9、NLRC5、OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Icam1、Vcam1、IL-29、IL-28a、IL-28b、ERV3-1、ERVK13-1、RIG-1、LGP2和MDA5。如本文所用, 术语“核酸分子”旨在包括DNA分子(例如, cDNA或基因组DNA) 和RNA分子(例如, mRNA) 以及使用核苷酸类似物产生的DNA或RNA的类似物。核酸分子可以是单链或双链的, 但优选的是双链DNA。

[0198] “分离的”核酸分子是与存在于该核酸分子的天然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。优选地, “分离的”核酸分子不含在该核酸所来源的生物体的基因组DNA中天然地位于该核酸的侧翼的序列(优选地为蛋白质编码序列)(即, 位于该核酸的5'端和3'端处的序列)。例如, 在各种实施方案中, 分离的核酸分子可以含有小于约5kB、4kB、3kB、2kB、1kB、0.5kB或0.1kB的在该核酸所来源的细胞的基因组DNA中天然地位于该核酸分子的侧翼的核苷酸序列。另外, “分离的”核酸分子, 诸如cDNA分子, 当通过重组技术产生时基本上不含其他细胞物质或培养基, 或者当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。

[0199] 可以使用标准分子生物学技术和本文所述的数据库记录中的序列信息来分离本发明的生物标志物核酸分子。藉由此类核酸序列的全部或一部分, 可以使用标准杂交技术和克隆技术来分离本发明的核酸分子(例如, 如Sambrook等人编辑, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989中所述)。

[0200] 可以使用cDNA、mRNA或基因组DNA作为模板和根据标准PCR扩增技术的适当的寡核苷酸引物来扩增本发明的核酸分子。如此扩增的核酸分子可以克隆到适当的载体中, 并通过DNA序列分析进行表征。另外, 对应于本发明核酸分子的全部或一部分的寡核苷酸可以通过标准合成技术(例如, 使用自动化DNA合成仪)来制备。

[0201] 另外, 本发明的核酸分子可以仅包含核酸序列的一部分, 其中全长核酸序列包含本发明的标志物或其编码对应于本发明标志物的多肽。此类核酸分子可以用作例如探针或引物。探针/引物典型地作为一种或多种基本上纯化的寡核苷酸使用。寡核苷酸典型地包含在严格条件下与生物标志物核酸序列的至少约7个, 优选地约15个, 更优选地约25、50、75、

100、125、150、175、200、250、300、350或400或更多个连续核苷酸杂交的核苷酸序列区域。基于生物标志物核酸分子的序列的探针可以用于检测对应于本发明的一种或多种标志物的转录物或基因组序列。探针包含与其附接的标记基团，例如，放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。

[0202] 还设想了生物标志物核酸分子，其由于遗传密码的简并性而不同于编码对应于该生物标志物的蛋白质的核酸分子的核苷酸序列，因而编码相同的蛋白质。

[0203] 此外，本领域的技术人员应当认识到，导致氨基酸序列变化的DNA序列多态性可以存在于群体（例如，人群）之内。由于天然等位基因变异，这种遗传多态性可能存在于群体内的个体之间。等位基因是在给定遗传基因座处交替出现的一组基因之一。此外，应当认识到，还可以存在影响RNA表达水平的DNA多态性，其可以影响该基因的总表达水平（例如，通过影响调节或降解）。

[0204] 本文中可与“等位基因变体”互换使用的术语“等位基因”是指基因或其部分的替代性形式。等位基因在同源染色体上占据相同的基因座或位置。当受试者具有一个基因的两个相等等位基因时，该受试者被认为是该基因或等位基因的纯合子。当受试者具有一个基因的两个不同等位基因时，该受试者被认为是该基因或等位基因的杂合子。例如，生物标志物等位基因可以在单个核苷酸或几个核苷酸中彼此不同，并且可以包括核苷酸的置换、缺失和插入。基因的等位基因也可以是含有一个或多个突变的基因的形式。

[0205] 本文中可互换使用的术语“基因多态性区域的等位基因变体”或“等位基因变体”是指基因的替代性形式，其具有在群体中该基因的该区域中发现的几种可能的核苷酸序列之一。如本文所用，等位基因变体意在涵盖功能性等位基因变体、非功能性等位基因变体、SNP、突变和多态性。

[0206] 术语“单核苷酸多态性”（SNP）是指由单个核苷酸占据的多态性位点，其是等位基因序列之间的变异位点。该位点通常在等位基因的高度保守序列（例如，在群体的小于1/100或1/1000成员中变化的序列）之前和之后。SNP通常由于在多态性位点处用一个核苷酸置换另一个核苷酸而产生。SNP还可以源自相对于参考等位基因的核苷酸的缺失或核苷酸的插入。典型地，该多态性位点被参考碱基之外的碱基占据。例如，当参考等位基因在多态性位点处含有碱基“T”（胸苷）时，改变的等位基因可以在该多态性位点处含有“C”（胞苷）、“G”（鸟嘌呤）或“A”（腺嘌呤）。SNP可以在编码蛋白质的核酸序列中发生，在这种情况下，它们可能产生有缺陷的或其他变异的蛋白质、或者遗传疾病。这样的SNP可以改变基因的编码序列，因此指定另一种氨基酸（“错义”SNP），或SNP可以引入终止密码子（“无义”SNP）。当SNP不改变蛋白质的氨基酸序列时，该SNP被称为“沉默”。SNP也可以在核苷酸序列的非编码区中发生。这可能导致蛋白质表达缺陷（例如，由于替代性剪接），或者它可能对蛋白质的功能没有影响。

[0207] 如本文所用，术语“基因”和“重组基因”是指包含编码对应于本发明标志物的多肽的开放阅读框的核酸分子。此类天然等位基因变异典型地可以导致给定基因的核苷酸序列中1%至5%的变异。可以通过在许多不同个体中对感兴趣的基因测序，来鉴定替代性等位基因。这可以通过使用杂交探针在多种个体中鉴定相同的遗传基因座而容易地进行。任何和所有这样的核苷酸变异和由天然等位基因变异引起的并且不改变功能活性的所得氨基酸多态性或变异都旨在处于本发明的范围之内。

[0208] 在另一个实施方案中,生物标志物核酸分子至少长7、15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3500、4000、4500或更多个核苷酸,并且在严格条件下与对应于本发明标志物的核酸分子或编码对应于本发明标志物的蛋白质的核酸分子杂交。如本文所用,术语“在严格条件下杂交”旨在描述杂交和洗涤的条件,在这些条件下彼此至少60% (65%、70%、75%、80%,优选85%) 相同的核苷酸序列典型地保持彼此杂交。此类严格条件是本领域技术人员已知的,可以在Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y. (1989) 的6.3.1至6.3.6节中找到。严格杂交条件的优选的非限制性实例是在约45°C下在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中杂交,然后在50至65°C下在0.2X SSC、0.1% SDS中洗涤一次或多次。

[0209] 除了可以存在于群体中的本发明核酸分子的天然存在的等位基因变体之外,本领域的技术人员还将认识到,可以通过突变引入序列改变,从而导致所编码蛋白质的氨基酸序列的改变,而不改变由其编码的蛋白质的生物活性。例如,可以进行核苷酸置换,导致“非必需”氨基酸残基处的氨基酸置换。“非必需”氨基酸残基是可以从野生型序列改变而来且不改变生物活性的残基,而“必需”氨基酸残基则是生物活性所需要的。例如,在各种物种的同源物中不保守或仅半保守的氨基酸残基可能对活性不是必需的,因而可能是改变的靶标。或者,在各种物种(例如,鼠和人)的同源物中保守的氨基酸残基可能对活性是必需的,因而可能不是改变的靶标。

[0210] 因此,本发明的另一个方面涉及编码本发明多肽的核酸分子,其含有对活性不是必需的氨基酸残基的变化。此类多肽的氨基酸序列与对应于本发明标志物的天然存在的蛋白质的氨基酸序列不同,但仍保留生物活性。在一个实施方案中,生物标志物蛋白具有与本文所述的生物标志物蛋白的氨基酸序列至少约40%相同,50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、87.5%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或相同的氨基酸序列。

[0211] 编码变体蛋白的分离的核酸分子可以通过将一个或多个核苷酸置换、添加或缺失引入到本发明核酸的核苷酸序列中来产生,使得一个或多个氨基酸残基的置换、添加或缺失被引入到所编码蛋白质中。可以通过标准技术(诸如定点诱变和PCR介导的诱变)引入突变。优选地,在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸置换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。作为替代,可以沿着全部或部分编码序列随机引入突变,诸如通过饱和诱变,并且可以筛选所得突变体的生物活性以鉴定保留活性的突变体。诱变后,可以重组表达所编码蛋白质,并可以确定该蛋白质的活性。

[0212] 在一些实施方案中,本发明还设想了使用抗生物标志物反义核酸分子,即与本发明的有义核酸互补的分子,例如与对应于本发明标志物的双链cDNA分子的编码链互补或与

对应于本发明标志物的mRNA序列互补的分子。因此,本发明的反义核酸分子可以与本发明的有义核酸形成氢键(即,与其退火)。该反义核酸可以与整条编码链互补,或仅与其一部分(例如,全部或部分蛋白质编码区(或开放阅读框))互补。反义核酸分子也可以与编码本发明多肽的核苷酸序列的编码链的全部或部分非编码区反义。非编码区(“5'和3'非翻译区”)是5'序列和3'序列,其位于编码区的侧翼并且不翻译成氨基酸。

[0213] 反义寡核苷酸的长度可以是例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50或更多个核苷酸。可以使用本领域已知的程序,使用化学合成反应和酶促连接反应来构建反义核酸。例如,反义核酸(例如,反义寡核苷酸)可以使用天然存在的核苷酸或各种经修饰的核苷酸来化学合成,所述经修饰的核苷酸被设计成增加分子的生物稳定性或增加反义核酸与有义核酸之间所形成的双链体的物理稳定性,例如,可以使用硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸。可以用于产生反义核酸的经修饰的核苷酸的实例包括5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖Q核苷、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖Q核苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、怀丁苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w和2,6-二氨基嘌呤。作为替代,可以使用核酸已经以反义方向(即,从插入的核酸转录的RNA将具有感兴趣的靶标核酸的反义取向,在下面的小节中进一步描述)亚克隆到其中的表达载体以生物学方式产生反义核酸。

[0214] 本发明的反义核酸分子典型地施用于受试者或原位产生,使得它们与编码对应于本发明的所选择标志物的多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA杂交或结合,从而例如通过抑制转录和/或翻译来抑制标志物表达。杂交可以通过常规的核苷酸互补性形成稳定的双链体,或者例如,反义核酸分子通过双螺旋的大沟中的特异性相互作用来结合DNA双链体。本发明的反义核酸分子的施用途径的实例包括在组织部位处直接注射或将反义核酸输注到血液或骨髓相关的体液中。作为替代,可以修饰反义核酸分子以靶向所选择的细胞,然后全身施用。例如,对于全身施用,可以修饰反义分子,使得它们特异性地结合所选择细胞表面上表达的受体或抗原,例如,通过将反义核酸分子连接到与细胞表面受体或抗原结合的肽或抗体。也可以使用本文所述的载体将反义核酸分子递送至细胞。为了获得足够的细胞内反义分子浓度,优选的是在其中将反义核酸分子置于强pol II或pol III启动子控制下的载体构建体。

[0215] 本发明的反义核酸分子可以是 α -异头核酸分子。 α -异头核酸分子与互补RNA形成特殊的双链杂交体,其中与通常的 α -单元相反,链走向彼此平行(Gaultier等人,1987, *Nucleic Acids Res.*15:6625-6641)。反义核酸分子还可以包含2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue等人,1987, *Nucleic Acids Res.*15:6131-6148)或嵌合RNA-DNA类似物(Inoue等人,1987, *FEBS Lett.*215:327-330)。

[0216] 本发明还涵盖核酶。核酶是具有核糖核酸酶活性的催化性RNA分子,其能够切割与

其具有互补区的单链核酸,诸如mRNA。因此,核酶(例如,如Haselhoff和Gerlach,1988, Nature 334:585-591中所述的锤头状核酶)可以用于催化地切割mRNA转录物,从而抑制由mRNA编码的蛋白质的翻译。可以基于对应于本发明标志物的cDNA的核苷酸序列设计对编码对应于该标志物的多肽的核酸分子具有特异性的核酶。例如,可以构建四膜虫(Tetrahymena)L-19IVS RNA的衍生物,其中活性位点的核苷酸序列与待切割的核苷酸序列互补(参见Cech等人,美国专利号4,987,071;以及Cech等人,美国专利号5,116,742)。作为替代,编码本发明多肽的mRNA可以用于从RNA分子库中选择出具有特异性核糖核酸酶活性的催化性RNA(参见例如Bartel和Szostak,1993,Science 261:1411-1418)。

[0217] 本发明还涵盖形成三螺旋结构的核酸分子。例如,可以通过靶向与编码多肽的基因的调节区(例如,启动子和/或增强子)互补的核苷酸序列来抑制生物标志物蛋白的表达,以形成防止基因在靶标细胞中转录的三螺旋结构。通常参见Helene(1991) Anticancer Drug Des.6(6):569-84;Helene(1992) Ann.N.Y.Acad.Sci.660:27-36;以及Maher(1992) Bioassays 14(12):807-15。

[0218] 在各种实施方案中,可以在碱基部分、糖基部分或磷酸骨架上修饰本发明的核酸分子,以改善例如分子的稳定性、杂交或溶解性。例如,可以修饰核酸分子的脱氧核糖磷酸骨架以产生肽核酸分子(参见Hyrup等人,1996,Bioorganic&Medicinal Chemistry 4(1):5-23)。如本文所用,术语“肽核酸”或“PNA”是指核酸模拟物,例如,DNA模拟物,其中脱氧核糖磷酸骨架被伪肽骨架替换,并且仅保留了四个天然核碱基。已经证实,PNA的中性骨架允许在低离子强度的条件下与DNA和RNA特异性杂交。PNA寡聚体的合成可以使用如Hyrup等人(1996),出处同上;Perry-O'Keefe等人(1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:14670-675中所述的标准固相肽合成方案来进行。

[0219] PNA可以用于治疗应用和诊断应用中。例如,PNA可以用作反义或反基因剂,用于通过例如诱导转录或翻译停滞或者抑制复制来进行基因表达的序列特异性调控。PNA也可以用于例如通过例如PNA指导的PCR钳夹分析基因中的单碱基对突变;当与其他酶(例如S1核酸酶)组合使用时,用作人工限制酶(Hyrup(1996),出处同上);或用作DNA序列和杂交的探针或引物(Hyrup,1996,出处同上;Perry-O'Keefe等人,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:14670-675)。

[0220] 在另一个实施方案中,可以通过将亲脂性或其他辅助基团附接至PNA、通过形成PNA-DNA嵌合体、或者通过使用脂质体或本领域中已知的其他药物递送技术来修饰PNA,例如以增强其稳定性或细胞摄取。例如,可以产生PNA-DNA嵌合体,其可以结合PNA和DNA的有利特性。此类嵌合体允许DNA识别酶(例如,RNASE H聚合酶和DNA聚合酶)与DNA部分相互作用,而PNA部分将提供高结合亲和力与特异性。可以使用根据碱基堆积、核碱基之间的键数和取向选择的适当长度的接头来连接PNA-DNA嵌合体(Hyrup,1996,出处同上)。PNA-DNA嵌合体的合成可以如Hyrup(1996),出处同上和Finn等人(1996) Nucleic Acids Res.24(17):3357-63中所述进行。例如,可以使用标准亚磷酰胺偶联化学和经修饰的核苷类似物在固体支持物上合成DNA链。诸如5'-(4-甲氧基三苯甲基)氨基-5'-脱氧-胸苷亚磷酰胺的化合物可以用作PNA与DNA的5'端之间的连接(Mag等人,1989,Nucleic Acids Res.17:5973-88)。然后以逐步方式偶联PNA单体,以产生具有5'PNA区段和3'DNA区段的嵌合分子(Finn等人,1996,Nucleic Acids Res.24(17):3357-63)。作为替代,可以用5'DNA区段和3'PNA区段合

成嵌合分子(Peterser等人,1975,Bioorganic Med.Chem.Lett.5:1119-11124)。

[0221] 在其他实施方案中,寡核苷酸可以包括其他附加的基团,诸如肽(例如,用于体内靶向宿主细胞受体),或者促进跨细胞膜转运的剂(参见例如,Letsinger等人,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:6553-6556;Lemaitre等人,1987,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:648-652;PCT公布号W0 88/09810)或促进跨血脑屏障转运的剂(参见例如PCT公布号W0 89/10134)。此外,寡核苷酸可以用杂交触发的切割剂(参见例如,Krol等人,1988,Bio/Techniques 6:958-976)或插入剂(参见例如,Zon,1988,Pharm.Res.5:539-549)修饰。为此,寡核苷酸可以与另一分子缀合,例如肽、杂交触发的交联剂、转运剂、杂交触发的裂解剂等。

[0222] 本发明的另一个方面涉及生物标志物蛋白及其生物活性部分的用途。在一个实施方案中,可以使用标准蛋白质纯化技术通过适当的纯化方案从细胞或组织来源分离对应于标志物的天然多肽。在另一个实施方案中,通过重组DNA技术产生对应于本发明标志物的多肽。作为重组表达的替代,可以使用标准肽合成技术化学合成对应于本发明标志物的多肽。

[0223] “分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物活性部分基本上不含细胞或组织来源(由其获得该蛋白质)的细胞物质或其他污染蛋白质,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。用语“基本上不含细胞物质”包括蛋白质制剂,其中蛋白质与由其分离或重组产生该蛋白质的细胞的细胞组分分离。因此,基本上不含细胞物质的蛋白质包括具有少于约30%、20%、10%或5%(干重)异源蛋白质(在本文中也称为“污染蛋白质”)的蛋白质制剂。当重组产生蛋白质或其生物活性部分时,它也优选地基本上不含培养基,即,培养基占蛋白质制剂体积的小于约20%、10%或5%。当通过化学合成产生蛋白质时,它优选地基本上不含化学前体或其他化学物质,即,它与参与蛋白质合成的化学前体或其他化学物质分离。因此,此类蛋白质制剂具有少于约30%、20%、10%、5%(干重)的化学前体或除感兴趣的多肽之外的化合物。

[0224] 生物标志物多肽的生物活性部分包括含有与本文所述的生物标志物蛋白氨基酸序列充分相同或由此衍生的氨基酸序列的多肽,但其包含比全长蛋白质更少的氨基酸,并且表现出对应全长蛋白质的至少一种活性。典型地,生物活性部分包含具有对应蛋白质的至少一种活性的结构域或基序。本发明的蛋白质的生物活性部分可以是例如长度为10、25、50、100或更多个氨基酸的多肽。另外,其他生物活性部分(其中蛋白质的其他区域缺失)可以通过重组技术制备,并且就本发明的多肽的天然形式的一种或多种功能活性进行评估。

[0225] 优选的多肽具有由本文所述的核酸分子编码的生物标志物蛋白的氨基酸序列。其他有用的蛋白质与这些序列之一基本上相同(例如,至少约40%,优选50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%),并保留对应的天然存在的蛋白质的蛋白质功能活性,但由于天然的等位基因变异或诱变而氨基酸序列不同。

[0226] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸的百分比同一性,将序列进行比对以用于最佳比较目的(例如,可以在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入空位,以与第二氨基或核酸序列最佳比对)。然后比较对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被第二序列中对应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则这些分子在该位置处是相同的。这两个序列之间的百分比同一性是这两个序列共有的相同位置数的函数

(即, %同一性=相同位置的数量/位置(例如, 重叠位置)总数 \times 100)。在一个实施方案中, 这两个序列的长度相同。

[0227] 可以使用数学算法来确定两个序列之间的百分比同一性。用于比较两个序列的数学算法的一个优选的非限制性实例是Karlin和Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268的算法, 如Karlin和Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877中所修改。这种算法被并入到Altschul等人 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410的NBLAST程序和XBLAST程序中。可以用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索, 得分=100, 字长=12, 以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索, 得分=50, 字长=3, 以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对, 可以如Altschul等人 (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402中所述利用空位BLAST。作为替代, 可以使用PSI-Blast来执行迭代搜索, 其检测分子之间的远距离关系。当利用BLAST、空位BLAST和PSI-Blast这些程序时, 可以使用相应程序(例如, XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 的网站ncbi.nlm.nih.gov。用于比较序列的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers和Miller, (1988) Comput Appl Biosci, 4:11-7的算法。这种算法被并入到ALIGN程序(版本2.0)中, 该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时, 可以使用PAM120权重残基表, 空位长度罚分为12, 空位罚分为4。用于鉴定局部序列相似性和比对的区域的另一种有用算法是如Pearson和Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448中所述的FASTA算法。当使用FASTA算法比较核苷酸序列或氨基酸序列时, PAM120权重残基表可以例如与k元组值2一起使用。

[0228] 两个序列之间的百分比同一性可以在允许或不允许空位的情况下, 使用与上述那些类似的技术确定。在计算百分比同一性时, 仅对精确匹配进行计数。

[0229] 本发明还提供了对应于生物标志物蛋白的嵌合蛋白或融合蛋白。如本文所用, “嵌合蛋白”或“融合蛋白”包括与异源多肽(即, 除对应于本发明标志物的多肽之外的多肽)可操作地连接的对应于本发明标志物的多肽的全部或部分(优选地生物活性部分)。在融合蛋白内, 术语“可操作地连接”旨在表示本发明的多肽和异源多肽彼此框内融合。异源多肽可以与本发明多肽的氨基末端或羧基末端融合。

[0230] 一种有用的融合蛋白是GST融合蛋白, 其中对应于本发明标志物的多肽与GST序列的羧基末端融合。此类融合蛋白可以促进纯化本发明的重组多肽。

[0231] 在另一个实施方案中, 融合蛋白含有异源的信号序列、免疫球蛋白融合蛋白、毒素或其他有用的蛋白质序列。本发明的嵌合蛋白和融合蛋白可以通过标准重组DNA技术产生。在另一个实施方案中, 融合基因可以通过常规技术(包括自动化DNA合成仪)合成。作为替代, 可以使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增, 所述锚定引物在两个连续基因片段之间产生互补突出端, 其随后可以退火并重新扩增以产生嵌合基因序列(参见例如, Ausubel等人, 出处同上)。另外, 许多表达载体可商购获得, 其已经编码融合部分(例如, GST多肽)。可以将编码本发明多肽的核酸克隆到这样的表达载体中, 使得融合部分与本发明的多肽框内连接。

[0232] 信号序列可以用于促进分泌蛋白或其他感兴趣蛋白的分泌和分离。信号序列典型地以疏水性氨基酸的核心为特征, 所述疏水性氨基酸通常在一个或多个切割事件的分泌期

间从成熟蛋白质中切割。此类信号肽含有加工位点,当它们经过分泌途径时,所述加工位点允许信号序列从成熟蛋白质中切割。因此,本发明涉及所述具有信号序列的多肽,以及信号序列已经被蛋白水解切割的多肽(即,切割产物)。在一个实施方案中,编码信号序列的核酸序列可以在表达载体中与感兴趣的蛋白质(诸如通常不分泌或难以分离的蛋白质)可操作地连接。该信号序列指导蛋白质诸如从转化表达载体的真核宿主中分泌,并且该信号序列随后或同时被切割。然后可以通过本领域公认的方法从细胞外培养基中容易地纯化该蛋白质。作为替代,可以使用促进纯化的序列(诸如具有GST结构域)将信号序列与感兴趣的蛋白质连接。

[0233] 本发明还涉及本文所述的生物标志物多肽的变体。这些变体具有改变的氨基酸序列,其可以作为激动剂(模拟物)或作为拮抗剂起作用。变体可以通过诱变(例如,离散点突变或截短)产生。激动剂可以保留与天然存在形式的蛋白质基本上相同的生物活性或这些生物活性的子集。蛋白质的拮抗剂可以通过例如竞争性结合包含感兴趣的蛋白质的细胞信号传导级联的下游或上游成员来抑制天然存在形式的蛋白质的一种或多种活性。因此,可以通过用有限功能的变体治疗来引发特定的生物效应。相对于用天然存在形式的蛋白质治疗,用具有天然存在形式的蛋白质的生物活性的子集的变体来治疗受试者可以在受试者中产生较少的副作用。

[0234] 可以通过针对激动剂或拮抗剂活性筛选本发明蛋白质的突变体(例如,截短突变体)的组合文库,来鉴定生物标志物蛋白的充当激动剂(模拟物)或充当拮抗剂的变体。在一个实施方案中,多样化的变体文库通过核酸水平的组合诱变来产生,并且由多样化的基因文库编码。可以通过例如将合成寡核苷酸的混合物酶促连接到基因序列中来产生多样化的变体文库,使得简并的潜在蛋白质序列组可以作为单独的多肽表达,或作为替代,作为一组较大的融合蛋白表达(例如,用于噬菌体展示)。有多种方法可以用于从简并寡核苷酸序列产生本发明的多肽的潜在变体文库。用于合成简并寡核苷酸的方法是本领域已知的(参见例如Narang,1983,Tetrahedron 39:3;Itakura等人,1984,Annu.Rev.Biochem.53:323;Itakura等人,1984,Science 198:1056;Ike等人,1983Nucleic Acid Res.11:477)。

[0235] 此外,对应于本发明标志物的多肽编码序列的片段文库可以用于产生多样化的多肽群,其用于筛选和随后的选择变体。例如,可以通过在一定条件下用核酸酶处理感兴趣的编码序列的双链PCR片段来产生编码序列片段的文库,其中每个分子仅发生约一次切口,使双链DNA变性,使DNA复原以形成双链DNA(其可以包括来自不同切口产物的有义/反义对),通过用S1核酸酶处理从重组双链体中除去单链部分,并且将所得的片段文库连接到表达载体中。通过该方法,可以衍生出表达文库,其编码各种大小的感兴趣蛋白质的氨基末端片段和内部片段。

[0236] 本领域已知几种技术用于筛选通过点突变或截短产生的组合文库的基因产物,并用于筛选具有所选择特性的基因产物的cDNA文库。适用于高通量分析的用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术典型地包括将基因文库克隆到可复制的表达载体中,用所得的载体文库转化适当的细胞,并且在一定条件下表达组合基因,其中检测期望的活性有助于分离编码检测到其产物的基因的载体。递归整体诱变(REM)是一种增强文库中的功能性突变体的频率的技术,可以与筛选测定组合使用以鉴定本发明蛋白质的变体(Arkin和Yourvan,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:7811-7815;Delgrave等人,1993,Protein

Engineering 6(3):327-331)。

[0237] 通过使用标准重组技术可以促进本文所述的生物标志物核酸和/或生物标志物多肽分子的生产和使用。在一些实施方案中,此类技术使用载体(优选表达载体),其含有编码生物标志物多肽或这种多肽的一部分的核酸。如本文所用,术语“载体”是指能够转运已经与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,是指其中可以连接额外的DNA区段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入宿主细胞后被整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。另外,某些载体(即表达载体)能够指导它们可操作地连接的基因的表达。一般来讲,在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒(载体)的形式。然而,本发明旨在包括这些其他形式的具有相同功能的表达载体,诸如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0238] 本发明的重组表达载体包含适合于在宿主细胞中表达该核酸的形式本发明的核酸。这意味着重组表达载体包括一种或多种调节序列,其基于待用于表达的宿主细胞选择,与待表达的核酸序列可操作地连接。在重组表达载体内,“可操作地连接”旨在意指感兴趣的核苷酸序列以允许该核苷酸序列表达的方式与一种或多种调节序列连接(例如,在体外转录/翻译系统中或当载体被引入到宿主细胞中时在宿主细胞中)。术语“调节序列”旨在包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。此类调节序列描述于例如Goeddel, *Methods in Enzymology: Gene Expression Technology* 第185卷, Academic Press, San Diego, CA (1991) 中。调节序列包括在许多类型的宿主细胞中指导核苷酸序列的组成型表达的那些调节序列,以及仅在某些宿主细胞中指导核苷酸序列表达的那些调节序列(例如,组织特异性调节序列)。本领域的技术人员应当认识到,表达载体的设计可以取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等因素。可以将本发明的表达载体引入到宿主细胞中,从而产生由如本文所述的核酸编码的蛋白质或肽,包括融合蛋白或肽。

[0239] 在本发明中使用的重组表达载体可以被设计用于在原核细胞(例如,大肠杆菌(*E. coli*))或真核细胞(例如,昆虫细胞{使用杆状病毒表达载体}、酵母细胞或哺乳动物细胞)中表达对应于本发明标志物的多肽。合适的宿主细胞在Goeddel(出处同上)中进一步讨论。作为替代,重组表达载体可以在体外转录和翻译,例如使用T7启动子调节序列和T7聚合酶。

[0240] 蛋白质在原核生物中的表达最常在大肠杆菌中用含有组成型或诱导型启动子的载体进行,所述启动子指导融合蛋白或非融合蛋白的表达。融合载体向其中编码的蛋白质添加许多氨基酸,通常添加到重组蛋白质的氨基末端。此类融合载体典型地用于三个目的: 1) 增加重组蛋白的表达; 2) 增加重组蛋白的溶解度; 以及3) 通过在亲和纯化中充当配体来帮助纯化重组蛋白。通常,在融合表达载体中,在融合部分和重组蛋白的连接点处引入蛋白水解切割位点,以使融合蛋白纯化后重组蛋白与融合部分分离。这些酶及其同源识别序列包括因子Xa、凝血酶和肠激酶。典型的融合表达载体包括pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith和Johnson, 1988, *Gene* 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) 和 pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), 其将谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋

白质A分别与靶标重组蛋白融合。

[0241] 合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的实例包括pTrc (Amann等人,1988,Gene 69:301-315)和pET 11d (Studier等人,第60-89页,载于Gene Expression Technology: Methods in Enzymology,第185卷,Academic Press,San Diego,CA,1991)。来自pTrc载体的靶标生物标志物核酸表达依赖于来自杂合trp-lac融合启动子的宿主RNA聚合酶转录。来自pET 11d载体的靶标生物标志物核酸的表达依赖于由共表达的病毒RNA聚合酶(T7 gn1)介导的来自T7 gn10-lac融合启动子的转录。这种病毒聚合酶由宿主菌株BL21 (DE3)或HMS174 (DE3)提供,其来自含有lacUV 5启动子转录控制下的T7 gn1基因的常驻原噬菌体。

[0242] 在大肠杆菌中最大化重组蛋白表达的一种策略是在蛋白水解切割重组蛋白的能力受损的宿主细菌中表达蛋白质 (Gottesman,第119至128页,载于Gene Expression Technology:Methods in Enzymology,第185卷,Academic Press,San Diego,CA,1990)。另一种策略是改变待插入到表达载体中的核酸的核酸序列,使得每个氨基酸的各个密码子是优先用于大肠杆菌的那些密码子(Wada等人,1992,Nucleic Acids Res.20:2111-2118)。本发明的核酸序列的这种改变可以通过标准DNA合成技术来进行。

[0243] 在另一个实施方案中,表达载体是酵母表达载体。用于在酿酒酵母中表达的载体的实例包括pYepSec1 (Baldari等人,1987,EMBO J.6:229-234)、pMFa (Kurjan和Herskowitz,1982,Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultz等人,1987,Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation,San Diego,CA)和pPicZ (Invitrogen Corp,San Diego,CA)。

[0244] 作为替代,表达载体是杆状病毒表达载体。可用于在培养的昆虫细胞(例如,Sf 9细胞)中表达蛋白质的杆状病毒载体包括pAc系列 (Smith等人,1983,Mol.Cell Biol.3:2156-2165)和pVL系列 (Lucklow和Summers,1989,Virology 170:31-39)。

[0245] 在再一个实施方案中,使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达本发明的核酸。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8 (Seed,1987,Nature 329:840)和pMT2PC (Kaufman等人,1987,EMBO J.6:187-195)。当在哺乳动物细胞中使用时,表达载体的控制功能通常由病毒调节元件提供。例如,常用的启动子衍生自多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒和猿猴病毒40。对于原核细胞和真核细胞两者的其他合适的表达系统,参见Sambrook等人(出处同上)的第16章和第17章。

[0246] 在另一个实施方案中,重组哺乳动物表达载体能够优先指导核酸在特定细胞类型中的表达(例如,组织特异性调节元件用于表达核酸)。组织特异性调节元件是本领域已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝特异性;Pinkert等人,1987,Genes Dev.1:268-277);淋巴特异性启动子(Calame和Eaton,1988,Adv.Immunol.43:235-275),特别是T细胞受体的启动子(Winoto和Baltimore,1989,EMBO J.8:729-733)和免疫球蛋白启动子(Banerji等人,1983,Cell 33:729-740;Queen和Baltimore,1983,Cell 33:741-748);神经元特异性启动子(例如,神经细丝启动子;Byrne和Ruddle,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:5473-5477);胰腺特异性启动子 (Edlund等人,1985,Science 230:912-916)和乳腺特异性启动子(例如,乳清启动子;美国专利号4,873,316和欧洲申请公开号264,166)。还涵盖了发育调节的启动子,例如鼠hox启动子(Kessel和Gruss,1990,Science 249:374-379)和 α -胎蛋白启动子(Camper和Tilghman,1989,Genes Dev.3:537-

546)。

[0247] 本发明还提供了重组表达载体,其包含以反义取向克隆到表达载体中的DNA分子。也就是说,DNA分子以允许表达(通过DNA分子的转录)RNA分子的方式与调节序列可操作地连接,该RNA分子与编码本发明多肽的mRNA反义。可以选择与以反义取向克隆的核酸可操作地连接的调节序列,其指导反义RNA分子在多种细胞类型中的连续表达,例如病毒启动子和/或增强子,或可以选择指导反义RNA的组成型、组织特异性或细胞类型特异性表达的调节序列。反义表达载体可以是重组质粒、噬菌粒或减毒病毒的形式,其中反义核酸在高效调节区的控制下产生,其活性可以由引入载体的细胞类型决定。关于使用反义基因调节基因表达的讨论(参见Weintraub等人,1986,Trends in Genetics,第1(1)卷)。

[0248] 本发明的另一个方面涉及已经向其中引入了本发明的重组表达载体的宿主细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中可互换使用。应当理解,此类术语不仅指特定的受试细胞,还指这种细胞的后代或潜在后代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而在后续世代中发生,所以这样的后代事实上可能与亲本细胞不同,但仍包括在如本文所用术语的范围之内。

[0249] 宿主细胞可以是任何原核(例如,大肠杆菌)或真核细胞(例如,昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞)。

[0250] 可以经由常规的转化或转染技术将载体DNA引入到原核或真核细胞中。如本文所用,术语“转化”和“转染”旨在指多种本领域公认的用于将外来核酸引入到宿主细胞中的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适方法可以在Sambrook等人(出处同上)和其他实验室手册中找到。

[0251] 对于稳定转染哺乳动物细胞,已知的是,取决于所用的表达载体和转染技术,只有一小部分细胞可以将外来DNA整合到它们的基因组中。为了鉴定和选择这些整合体,通常将编码选择性标记(例如,对抗生素的抗性)的基因与感兴趣的基因一起引入到宿主细胞中。优选的选择性标记包括赋予对药物(诸如G418、潮霉素和甲氨蝶呤)的抗性的那些标记。用引入的核酸稳定转染的细胞可以通过药物选择来鉴定(例如,已经掺入该选择性标记基因的细胞将存活,而其他细胞死亡)。

[0252] V. 分析生物标志物核酸、多肽和细胞

[0253] 可以根据本文所述的方法和本领域技术人员已知的技术分析生物标志物核酸和/或生物标志物多肽,以鉴定可用于本发明的此类遗传改变或表达改变,包括但不限于:1)生物标志物转录物或多肽水平的改变,2)来自生物标志物基因的一个或多个核苷酸的缺失或添加,4)生物标志物基因的一个或多个核苷酸的置换,5)生物标志物基因的异常修饰,诸如表达调节区,等等。

[0254] a. 用于检测拷贝数和/或基因组核酸突变的方法

[0255] 评估生物标志物核酸的拷贝数和/或基因组核酸状态(例如,突变)的方法是本领域的技术人员熟知的。可以简单地通过确定本文所鉴定的区域或标志物的拷贝数来评估染色体获得或缺失的存在或不存在。

[0256] 在一个实施方案中,测试生物样品中含有基因组标志物的基因组基因座中拷贝数变化的存在。

[0257] 评估生物标志物基因座的拷贝数的方法包括但不限于基于杂交的测定法。基于杂

交的测定法包括但不限于传统的“直接探针”方法,诸如DNA印迹、原位杂交(例如,FISH和FISH+SKY)方法,以及“比较探针(comparative probe)”方法,诸如比较基因组杂交(CGH),例如基于cDNA或基于寡核苷酸的CGH。这些方法可以以各种各样的形式使用,包括但不限于基质(例如膜或玻璃)结合方法或基于阵列的方法。

[0258] 在一个实施方案中,评估样品中的生物标志物基因拷贝数涉及DNA印迹。在DNA印迹中,基因组DNA(典型地在电泳凝胶上片段化并分离)与对靶标区域具有特异性的探针杂交。来自针对靶标区域的探针的杂交信号强度与来自正常基因组DNA(例如,相同或相关的细胞、组织、器官等的非扩增部分)分析的对照探针信号强度的比较提供了靶标核酸的相对拷贝数的估计值。作为替代,可以利用RNA印迹来评估样品中的编码核酸的拷贝数。在RNA印迹中,mRNA与对靶标区域具有特异性的探针杂交。来自针对靶标区域的探针的杂交信号强度与来自正常RNA(例如,相同或相关的细胞、组织、器官等的非扩增部分)分析的对照探针信号强度的比较提供了靶标核酸的相对拷贝数的估计值。作为替代,可以使用本领域熟知的用于检测RNA的其他方法,使得相对于适当对照(例如,相同或相关的细胞组织、器官等的非扩增部分)的更高或更低的表达提供了靶标核酸的相对拷贝数的估计值。

[0259] 用于确定基因组拷贝数的一种替代性方式是原位杂交(例如,Angerer(1987)Meth.Enzymol 152:649)。一般来讲,原位杂交包括以下步骤:(1)固定待分析的组织或生物结构;(2)生物结构的预杂交处理,以增加靶标DNA的可接近性,并减少非特异性结合;(3)核酸混合物与生物结构或组织中的核酸杂交;(4)杂交后洗涤以除去未在杂交中结合的核酸片段,以及(5)检测杂交的核酸片段。在这些步骤中的每一个中使用的试剂和使用条件根据具体应用而变化。在典型的原位杂交测定法中,将细胞固定至固体支持物(典型地是载玻片)。如果要探测核酸,典型地用热或碱使细胞变性。然后使细胞在中等温度下与杂交溶液接触,以使对编码蛋白质的核酸序列具有特异性的标记探针退火。然后典型地以预定的严格性或以增加严格性洗涤靶标(例如,细胞),直到获得适当的信噪比为止。探针典型地用例如放射性同位素或荧光报道分子标记。在一个实施方案中,探针足够长,以便在严格条件下与一种或多种靶标核酸特异性杂交。探针的长度通常在从约200个碱基至约1000个碱基的范围内。在一些应用中,必须阻断重复序列的杂交能力。因此,在一些实施方案中,tRNA、人基因组DNA或Cot-I DNA用于阻断非特异性杂交。

[0260] 用于确定基因组拷贝数的一种替代性方式是比较基因组杂交。一般来讲,如有必要,从正常参考细胞以及测试细胞(例如,肿瘤细胞)分离出基因组DNA并扩增。将这两种核酸差异标记,然后原位杂交至参照细胞的中期染色体。通过某些方式除去参照DNA和测试DNA两者中的重复序列或降低它们的杂交能力,例如通过与适当的封闭核酸预杂交和/或在所述杂交期间包含所述重复序列的此类封闭核酸序列。然后,如有必要,以可视化的形式呈现所结合的标记DNA序列。可以通过检测来自两个DNA的信号比率被改变的区域来鉴定测试细胞中拷贝数增加或减少的染色体区域。例如,与基因组的其他区域相比,测试细胞中拷贝数减少的那些区域将显示来自测试DNA的相对低于参考的信号。测试细胞中拷贝数已经增加的区域将显示来自测试DNA的相对较高的信号。在存在染色体缺失或倍增的情况下,将检测来自两个标记的信号的比率的差异,并且所述比率将提供拷贝数的量度。在CGH的另一个实施方案阵列CGH(aCGH)中,固定的染色体元件被阵列上的固体支持物结合的靶标核酸的集合替换,从而允许大的或完整百分比的基因组在固体支持物结合的靶标的集合中表示。

靶标核酸可以包含cDNA、基因组DNA、寡核苷酸(例如,以检测单核苷酸多态性)等等。基于阵列的CGH也可以用单色标记进行(与用两种不同的染料标记对照和可能的肿瘤样品并在杂交前将它们混合相反,由于阵列上探针的竞争性杂交,这将产生比率)。在单色CGH中,标记对照且将其与一个阵列杂交,并读取绝对信号,标记可能的肿瘤样品且将其与第二阵列(具有相同的内容)杂交,并读取绝对信号。基于来自两个阵列的绝对信号计算拷贝数差异。制备固定化染色体或阵列并进行比较基因组杂交的方法是本领域熟知的(参见例如,美国专利号6,335,167、6,197,501、5,830,645和5,665,549,以及Albertson(1984)EMBO J. 3:1227-1234;Pinkel(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:9138-9142;EPO公布号430,402;Methods in Molecular Biology,第33卷:In situ Hybridization Protocols,Choo编辑,Humana Press,Totowa,N.J.(1994),等等。)在另一个实施方案中,使用Pinkel等人(1998)Nature Genetics 20:207-211或Kallioniemi(1992)Proc.Natl Acad Sci USA 89:5321-5325(1992)的杂交方案。

[0261] 在又一个实施方案中,可以使用基于扩增的测定法来测量拷贝数。在这种基于扩增的测定法中,核酸序列在扩增反应(例如,聚合酶链式反应(PCR))中充当模板。在定量扩增中,扩增产物的量将与原始样品中模板的量成比例。与适当对照(例如健康组织)的比较提供了拷贝数的量度。

[0262] “定量”扩增的方法是本领域的技术人员熟知的。例如,定量PCR涉及使用相同的引物同时共扩增已知量的对照序列。这提供了可以用于校准PCR反应的内标。定量PCR的详细方案提供于Innis等人(1990)PCR Protocols,A Guide to Methods and Applications,Academic Press,Inc.N.Y.)中。Ginzonger等人(2000)Cancer Research 60:5405-5409中描述了使用定量PCR分析测量微卫星基因座处的DNA拷贝数。已知的基因核酸序列足以使本领域的技术人员能够常规地选择引物来扩增基因的任何部分。荧光定量PCR也可以用于本发明的方法中。在荧光定量PCR中,定量基于荧光信号的量,例如TaqMan和SYBR绿。

[0263] 其他合适的扩增方法包括但不限于连接酶链式反应(LCR)(参见Wu和Wallace(1989)Genomics 4:560,Landegren等人(1988)Science 241:1077,以及Barringer等人(1990)Gene 89:117)、转录扩增(Kwoh等人(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173)、自主序列复制(Guatelli等人(1990)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 87:1874)、dot PCR和接头衔接子PCR,等等。

[0264] 杂合性丢失(LOH)和主要拷贝比例(MCP)作图(Wang,Z.C.等人(2004)Cancer Res 64(1):64-71;Seymour,A.B.等人(1994)Cancer Res 54,2761-4;Hahn,S.A.等人(1995)Cancer Res 55,4670-5;Kimura,M.等人(1996)Genes Chromosomes Cancer 17,88-93;Li等人(2008)MBC Bioinform.9,204-219)也可以用于鉴定扩增区域或缺失区域。

[0265] b.用于检测生物标志物核酸表达的方法

[0266] 可以通过用于检测转录分子或蛋白质的表达的各种各样的熟知方法中的任一种来评定生物标志物表达。此类方法的非限制性实例包括用于检测分泌蛋白、细胞表面蛋白、细胞质蛋白或核蛋白的免疫学方法;蛋白质纯化方法;蛋白质功能或活性测定法;核酸杂交方法;核酸逆转录方法;以及核酸扩增方法。

[0267] 在优选的实施方案中,特定基因的活性通过基因转录物(例如,mRNA)的量度、通过翻译蛋白质的量的量度或通过基因产物活性的量度来表征。可以以多种方式来监测标志物

表达,包括通过检测mRNA水平、蛋白质水平或蛋白质活性,其中任一种都可以使用标准技术来测量。检测可以涉及基因表达水平的定量(例如,基因组DNA、cDNA、mRNA、蛋白质或酶活性),或者作为替代,可以是基因表达水平的定性评定,特别是与对照水平相比较。从上下文可以明确检测到的水平类型。

[0268] 在另一个实施方案中,检测或测定生物标志物及其功能相似同源物,包括其片段或遗传改变(例如,在其调节区域或启动子区域中)的表达水平包括检测或测定感兴趣的标志物的RNA水平。在一个实施方案中,获得来自待测试受试者的一个或多个细胞,并从这些细胞中分离RNA。在一个优选的实施方案中,从受试者获得乳腺组织细胞样品。

[0269] 在一个实施方案中,RNA是从单个细胞获得的。例如,可以通过激光捕获显微切割(LCM)从组织样品中分离细胞。使用这种技术,可以从组织切片(包括染色的组织切片)中分离细胞,从而确保分离所需的细胞(参见例如,Bonner等人(1997) *Science* 278:1481; Emmert-Buck等人(1996) *Science* 274:998; Fend等人(1999) *Am. J. Path.* 154:61,以及Murakami等人(2000) *Kidney Int.* 58:1346)。例如,Murakami等人(出处同上)描述了从先前免疫染色的组织切片中分离细胞。

[0270] 还可以从受试者获得细胞并在体外培养这些细胞,诸如以便获得可以从中提取RNA的更大细胞群。用于建立非转化细胞的培养物(即,原代细胞培养物)的方法是本领域已知的。

[0271] 当从来自个体的组织样品或细胞中分离RNA时,在从受试者中移出组织或细胞之后防止基因表达的任何进一步改变可能是重要的。已知表达水平的变化在扰动(例如,热休克或者用脂多糖(LPS)或其他试剂激活)后迅速改变。此外,组织和细胞中的RNA可能迅速降解。因此,在一个优选的实施方案中,尽快速冻从受试者获得的组织或细胞。

[0272] 可以通过多种方法(例如硫氰酸胍裂解)从组织样品中提取RNA,然后进行CsCl离心(Chirgwin等人,1979, *Biochemistry* 18:5294-5299)。来自单细胞的RNA可以如用于从单细胞制备cDNA文库的方法中所述获得,所述方法诸如Dulac, C. (1998) *Curr. Top. Dev. Biol.* 36, 245和Jena等人(1996) *J. Immunol. Methods* 190:199中描述的那些。必须注意避免RNA降解,例如通过包含RNasin。

[0273] RNA样品然后可以富集特定的物质。在一个实施方案中,从RNA样品中分离聚(A)+RNA。一般来讲,这种纯化利用mRNA上的聚A尾。特别地并且如上所述,可以将聚T寡核苷酸固定在固体支持物之内和之上,以充当mRNA的亲体和配体。用于该目的的试剂盒可商购获得,例如,MessageMaker试剂盒(Life Technologies, Grand Island, NY)。

[0274] 在一个优选的实施方案中,RNA群体富集标志物序列。可以例如通过引物特异性cDNA合成,或基于cDNA合成和模板指导的体外转录的多轮线性扩增进行富集(参见例如,Wang等人(1989) *PNAS* 86, 9717; Dulac等人,出处同上;以及Jena等人,出处同上)。

[0275] 可以进一步扩增富集或不富集特定物质或序列的RNA群体。如本文所定义,“扩增过程”被设计成加强、增加或扩大RNA内的分子。例如,在RNA是mRNA的情况下,可以利用诸如RT-PCR的扩增过程来扩增mRNA,使得信号可检测或增强检测。尤其当生物、组织或肿瘤样品具有小尺寸或小体积时,这种扩增过程是有益的。

[0276] 可以使用各种扩增方法和检测方法。例如,将mRNA逆转录为cDNA,然后进行聚合酶链式反应(RT-PCR);或者,如美国专利号5,322,770中所述将单一酶用于两个步骤,或如

R.L.Marshall等人,PCR Methods and Applications 4:80-84(1994)所述将mRNA逆转录为cDNA,然后进行对称空位连接酶链式反应(RT-AGLCR)也在本发明的范围之内。也可以使用实时PCR。

[0277] 可以在本文中利用的其他已知扩增方法包括但不限于PNAS USA 87:1874-1878(1990)中描述的以及Nature 350(第6313期):91-92(1991)中描述的所谓的“NASBA”或“3SR”技术;如公开的欧洲专利申请(EPA)号4544610中所述的Q-β扩增;链替换扩增(如G.T.Walker等人,Clin.Chem.42:9-13(1996)和欧洲专利申请号684315中所述;靶标介导的扩增,如PCT公开W09322461所述;PCR;连接酶链式反应(LCR)(参见例如,Wu和Wallace,Genomics 4,560(1989),Landegren等人,Science 241,1077(1988));自主序列复制(SSR)(参见例如,Guatelli等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,87,1874(1990));以及转录扩增(参见例如,Kwoh等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,1173(1989))。

[0278] 在现有技术中已知许多技术用于确定基因表达的绝对水平和相对水平,适用于本发明的常用技术包括RNA印迹分析(Northern analysis)、RNA酶保护测定法(RPA)、微阵列和基于PCR的技术,诸如定量PCR和差异显示PCR。例如,RNA印迹涉及在变性琼脂糖凝胶上运行RNA制剂,并将其转移至合适的支持物,诸如激活的纤维素、硝化纤维素或者玻璃膜或尼龙膜。然后将放射性标记的cDNA或RNA与该制剂杂交,洗涤并通过放射自显影来分析。

[0279] 还可以采用原位杂交可视化,其中放射性标记的反义RNA探针与活检样品的薄片杂交,洗涤,用RNA酶切割并暴露于敏感乳液用于放射自显影。这些样品可以用苏木精染色以证明样品的组织学组成,并且用合适的滤光器进行的暗视野成像显示了显影的乳液。也可以使用非放射性标记,诸如地高辛(digoxigenin)。

[0280] 作为替代,可以在DNA阵列、芯片或微阵列上检测mRNA表达。从受试者获得的测试样品的标记的核酸可以与包含生物标志物DNA的固体表面杂交。用含有生物标志物转录物的样品获得阳性杂交信号。制备DNA阵列的方法及其用途是本领域熟知的(参见例如,美国专利号:6,618,6796、6,379,897、6,664,377、6,451,536、548,257;U.S.20030157485和Sчена等人(1995)Science 20,467-470;Gerhold等人(1999)Trends In Biochem.Sci.24,168-173;以及Lennon等人(2000)Drug Discovery Today 5,59-65,它们全文以引用方式并入本文)。还可以进行基因表达的系列分析(SAGE)(参见例如美国专利申请20030215858)。

[0281] 为了监测mRNA水平,例如从待测试的生物样品中提取mRNA,逆转录,并产生荧光标记的cDNA探针。然后用标记的cDNA探针探测能够与标志物cDNA杂交的微阵列,扫描载玻片并测量荧光强度。该强度与杂交强度和表达水平相关联。

[0282] 可以在本文所述的方法中使用的探针类型包括cDNA、核糖核酸探针、合成寡核苷酸和基因组探针。所使用的探针的类型通常将由特定情况决定,诸如用于原位杂交的核糖核酸探针,和用于RNA印迹的cDNA。在一个实施方案中,该探针针对的是对于该RNA独特的核苷酸区域。探针可以与差异识别标志物mRNA转录物所需的一样短,并且可以短至例如15个碱基;然而,可以使用至少17、18、19或20或更多个碱基的探针。在一个实施方案中,引物和探针在严格条件下特异性杂交至具有对应于标志物的核苷酸序列的DNA片段。如本文所用,术语“严格条件”是指仅在核苷酸序列中存在至少95%同一性时才会发生杂交。在另一个实施方案中,在“严格条件”下的杂交在序列之间存在至少97%同一性时发生。

[0283] 探针的标记形式可以是任何适当的形式,诸如使用放射性同位素,例如³²P和³⁵S。

无论探针是化学合成的还是生物学合成的,通过使用适当标记的碱基,都可以实现用放射性同位素进行标记。

[0284] 在一个实施方案中,生物样品含有来自测试受试者的多肽分子。作为替代,生物样品可以含有来自测试受试者的mRNA分子或来自测试受试者的基因组DNA分子。

[0285] 在另一个实施方案中,所述方法还涉及从对照受试者获得对照生物样品,使对照样品与能够检测标志物多肽、mRNA、基因组DNA或它们的片段的化合物或剂接触,以便在生物样品中检测标志物多肽、mRNA、基因组DNA或它们的片段的的存在,并将对照样品中标志物多肽、mRNA、基因组DNA或它们的片段的的存在与测试样品中标志物多肽、mRNA、基因组DNA或它们的片段的的存在进行比较。

[0286] c. 用于检测生物标志物蛋白表达的方法

[0287] 可以通过对表达的多肽进行检测或定量,来对生物标志物蛋白的活性或水平进行检测和/或定量。可以通过本领域技术人员熟知的许多方法中的任一种来对多肽进行检测和定量。由生物标志物核酸及其功能相似的同源物(包括其片段或遗传改变(例如,在其调节区域或启动子区域中))编码的多肽的多肽异常表达水平与癌症对抗癌疗法(例如,CDK4和/或CDK6抑制剂疗法)的应答可能性相关联。可以使用本领域已知的用于检测多肽的任何方法。这些方法包括但不限于免疫扩散、免疫电泳、放射免疫测定法(RIA)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、免疫荧光测定法、蛋白质印迹、结合物-配体测定法、免疫组织化学技术、凝集、补体测定法、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、超扩散色谱等(例如,Basic and Clinical Immunology, Sites和Terr编辑, Appleton and Lange, Norwalk, Conn., 第217至262页,1991年,其以引用方式并入)。优选的是结合物-配体免疫测定方法,包括使抗体与一个或多个表位反应并竞争性地替换标记的多肽或其衍生物。

[0288] 例如,可以进行ELISA程序和RIA程序,以便标记(用放射性同位素诸如¹²⁵I或³⁵S,或可测定的酶,诸如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)期望的生物标志物蛋白标准物,并连同未标记的样品一起与对应的抗体发生接触,其中第二抗体用于结合第一抗体,并测定放射性或固定化酶(竞争性测定法)。作为替代,使样品中的生物标志物蛋白与对应的固定化抗体反应,使放射性同位素或酶标记的抗生物标志物蛋白抗体与系统反应,并测定放射性或酶(ELISA夹心测定法)。其他常规方法也可以适当使用。

[0289] 上述技术可以基本上作为“一步”或“两步”测定法进行。“一步”测定法涉及使抗原与固定的抗体接触,并且在不洗涤的情况下,使混合物与标记的抗体接触。“两步”测定法涉及在使混合物与标记的抗体接触之前进行洗涤。其他常规方法也可以适当使用。

[0290] 在一个实施方案中,用于测量生物标志物蛋白水平的方法包括以下步骤:使生物样本与选择性结合生物标志物蛋白的抗体或其变体(例如,片段)接触,并检测所述抗体或其变体是否与所述样品结合,从而测量生物标志物蛋白的水平。

[0291] 生物标志物蛋白和/或抗体的酶促和放射性标记可以通过常规方式实现。这些方式通常将包括酶与所考虑的抗原或抗体的共价连接,诸如通过戊二醛,特别是为了不对酶的活性产生不利影响,这意味着酶必须仍然能够与其底物相互作用,但是没有必要使所有的酶都具有活性,只要有足够的酶保持活性以允许完成该测定即可。实际上,一些用于结合酶的技术是非特异性的(诸如使用甲醛),并且仅将产生一定比例的活性酶。

[0292] 通常希望将测定系统的一个组分固定在支持物上,从而允许该系统的其他组分与

所述组分发生接触且无需费力费时的劳动就易于被除去。第二相可能远离第一相固定,但一相通常就足够了。

[0293] 可以将酶本身固定在支持物上,但是如果需要固相酶,那么这通常最好通过与抗体结合并将抗体附连到本领域熟知的支持物、模型和系统来实现。简单的聚乙烯可以提供合适的支持物。

[0294] 可用于标记的酶没有特别限制,但可以选自例如氧化酶组的成员。这些通过与其底物反应来催化过氧化氢的产生,并且葡萄糖氧化酶由于其良好的稳定性、易于获得和便宜,以及其底物(葡萄糖)的易得性而经常被使用。氧化酶的活性可以通过测量在本领域熟知的受控条件下酶标记的抗体与底物反应之后形成的过氧化氢的浓度来测定。

[0295] 基于本公开,根据从业者的偏好,可以使用其他技术来检测生物标志物蛋白。一种这样的技术是蛋白质印迹(Towbin等人,Proc.Nat.Acad.Sci.76:4350(1979)),其中适当处理过的样品在SDS-PAGE凝胶上电泳,然后被转移到固体支持物(诸如硝化纤维素过滤器)上。然后使抗生物标志物蛋白抗体(未标记)与该支持物发生接触,并通过第二免疫试剂进行检测,该第二免疫试剂诸如标记的蛋白质A或抗免疫球蛋白(合适的标记包括¹²⁵I、辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶)。也可以使用色谱检测。

[0296] 免疫组织化学可以用于检测生物标志物蛋白的表达,例如在活组织检查样品中的表达。使合适的抗体与例如薄细胞层发生接触,洗涤,然后与第二种标记的抗体接触。可以通过荧光标记物、酶(诸如过氧化物酶)、亲和素或放射性标记进行标记。使用显微镜对测定进行目测评分。

[0297] 抗生物标志物蛋白抗体(诸如胞内抗体)也可以用于成像目的,例如,以检测受试者的细胞和组织中生物标志物蛋白的存在。合适的标记包括放射性同位素碘(¹²⁵I、¹²¹I)、碳(¹⁴C)、硫(³⁵S)、氚(³H)、铟(¹¹²In)和锝(^{99m}Tc);荧光标记,诸如荧光素和罗丹明;以及生物素。

[0298] 对于体内成像目的,抗体本身不能从体外检测到,因此必须进行标记或以其他方式修饰,以允许检测。用于该目的的标志物可以是基本上不干扰抗体结合但允许外部检测的任何标志物。合适的标志物可以包括可通过X射线照相术、NMR或MRI检测的那些标志物。对于X射线照相技术,合适的标志物包括任何放射性同位素,其发射可检测的辐射但对受试者没有明显的伤害,诸如钷或铯。用于NMR和MRI的合适标志物通常包括具有可检测的特征性自旋的那些标志物,诸如氘,其可以通过例如适当标记相关杂交瘤的营养物而掺入到抗体中。

[0299] 受试者的大小和使用的成像系统将确定产生诊断图像所需的成像部分的量。就放射性同位素部分而言,对于人受试者,注射的放射性量通常将为约5至20毫居里的锝-99。然后标记的抗体或抗体片段将优先在含有生物标志物蛋白的细胞的位置处聚积。然后可以使用已知技术检测标记的抗体或抗体片段。

[0300] 可以用于检测生物标志物蛋白的抗体包括天然或合成、全长或其片段、单克隆或多克隆的任何抗体,其与待检测的生物标志物蛋白足够强烈且特异性地结合。抗体的K_d可以为至多约10⁻⁶M、10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M、10⁻¹⁰M、10⁻¹¹M或10⁻¹²M。短语“特异性结合”是指例如抗体与表位或抗原或抗原决定簇的结合,采用的方式使得结合可以用相同或相似的表位、抗原或抗原决定簇的第二制剂替换或与该第二制剂竞争。相对于其他蛋白质(诸如相关蛋白

质), 抗体可以优先结合生物标志物蛋白。

[0301] 抗体可商购获得, 或者可以根据本领域已知的方法来制备。

[0302] 可以使用的抗体及其衍生物涵盖多克隆或单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体、人源化抗体、灵长类化(CDR移植)抗体、饰面或单链抗体以及抗体的功能片段, 即, 生物标志物蛋白结合片段。例如, 可以使用能够结合生物标志物蛋白或其部分的抗体片段, 包括但不限于Fv、Fab、Fab' 和F(ab')₂片段。此类片段可以通过酶促切割或通过重组技术产生。例如, 木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割可以分别产生Fab或F(ab')₂片段。具有必需底物特异性的其他蛋白酶也可以用于产生Fab或F(ab')₂片段。还可以使用已经在天然终止位点的上游引入了一个或多个终止密码子的抗体基因, 以多种截短形式产生抗体。例如, 编码F(ab')₂重链部分的嵌合基因可以被设计成包括编码重链的CH₁结构域和铰链区的DNA序列。

[0303] 合成的抗体和工程化的抗体描述于例如Cabilly等人的美国专利号4,816,567、Cabilly等人的欧洲专利号0,125,023B1; Boss等人的美国专利号4,816,397; Boss等人的欧洲专利号0,120,694B1; Neuberger, M. S. 等人的WO 86/01533; Neuberger, M. S. 等人的欧洲专利号0,194,276B1; Winter的美国专利号5,225,539; Winter的欧洲专利号0,239,400B1; Queen等人的欧洲专利号0451216B1; 和Padlan, E. A. 等人的EP 0519596A1。还可参见关于灵长类化抗体的Newman, R. 等人, *BioTechnology*, 10:1455-1460 (1992) 和关于单链抗体的Ladner等人, 美国专利号4,946,778和Bird, R. E. 等人, *Science*, 242:423-426 (1988)。还可以使用由文库(例如, 噬菌体展示文库)产生的抗体。

[0304] 在一些实施方案中, 使用特异性结合除抗体之外的生物标志物蛋白的剂, 诸如肽。可以通过本领域已知的任何方式鉴定特异性结合生物标志物蛋白的肽。例如, 可以使用肽噬菌体展示文库筛选生物标志物蛋白的特异性肽结合物。

[0305] d. 用于检测生物标志物的结构性改变的方法

[0306] 以下说明性方法可以用于鉴定生物标志物核酸和/或生物标志物多肽分子中结构性改变的存在, 以便例如鉴定影响铁硫簇生物合成相关基因的翻译的序列或剂。

[0307] 在某些实施方案中, 所述改变的检测涉及在聚合酶链式反应(PCR)(参见例如, 美国专利号4,683,195和4,683,202)诸如锚定PCR或RACE PCR中, 或作为替代, 在连接链式反应(LCR)中使用探针/引物(参见例如, Landegran等人(1988) *Science* 241:1077-1080; 和Nakazawa等人(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), 后者对于检测生物标志物核酸(诸如生物标志物基因)中的点突变可能特别有用(参见Abravaya等人(1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682)。该方法可以包括以下步骤: 从受试者收集细胞样品, 从样品细胞中分离核酸(例如, 基因组、mRNA或两者), 使核酸样品与一种或多种引物接触, 所述引物在使得生物标志物基因(如果存在)发生杂交和扩增的条件下与生物标志物基因特异性杂交, 以及检测扩增产物的存在或不存在, 或者检测扩增产物的大小并将长度与对照样品进行比较。预期PCR和/或LCR可能需要连同用于检测本文所述突变的任何技术一起用作初步扩增步骤。

[0308] 替代性扩增方法包括: 自主序列复制(Guatelli, J. C. 等人(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh, D. Y. 等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177)、Q-β复制酶(Lizardi, P. M. 等人(1988) *Bio-Technology* 6:1197), 或任何其他核酸扩增方法, 然后使用本领域技术人员熟知的技术来

检测扩增分子。如果此类分子以非常低的数量存在,则这些检测方案对于核酸分子的检测特别有用。

[0309] 在一个替代性实施方案中,来自样品细胞的生物标志物核酸中的突变可以通过限制酶切割模式的改变来鉴定。例如,分离样品DNA和对照DNA,扩增(任选地),用一种或多种限制性内切核酸酶消化,通过凝胶电泳确定片段长度大小并进行比较。样品DNA和对照DNA之间片段长度大小的差异表明样品DNA中存在突变。另外,序列特异性核酶的使用(参见例如,美国专利号5,498,531)可以用于通过核酶切割位点的出现或丧失来对特定突变的存在进行评分。

[0310] 在其他实施方案中,生物标志物核酸中的遗传突变可以通过将样品核酸和对照核酸(例如,DNA或RNA)杂交至含有数百或数千个寡核苷酸探针的高密度阵列来鉴定(Cronin, M.T.等人(1996) *Hum. Mutat.* 7:244-255; Kozal, M.J.等人(1996) *Nat. Med.* 2:753-759)。例如,生物标志物基因突变可以在含有光产生的DNA探针的二维阵列中鉴定,如Cronin等人(1996)(出处同上)所述。简而言之,通过制备顺序重叠探针的线性阵列,第一杂交探针阵列可以用于扫描样品和对照中的长DNA片段,以鉴定序列之间的碱基变化。该步骤允许鉴定点突变。该步骤之后是第二杂交阵列,其允许通过使用与检测到的所有变体或突变互补的较小的、专门的探针阵列来表征特定突变。每个突变阵列由平行探针组组成,一个组与野生型基因互补,另一个组与突变型基因互补。可以在多种情况下鉴定此类生物标志物基因突变,包括例如生殖系细胞突变和体细胞突变。

[0311] 在再一个实施方案中,本领域已知的多种测序反应中的任何一种可以用于直接对生物标志物基因测序,并通过比较样品生物标志物的序列与对应的野生型(对照)序列来检测突变。测序反应的实例包括基于由Maxam和Gilbert(1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560或Sanger(1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463开发的技术的那些测序反应。还设想,在进行诊断测定时可以利用多种自动化测序程序中的任一种(Naeve(1995) *Biotechniques* 19:448-53),包括通过质谱测序(参见例如PCT国际公布号W0 94/16101; Cohen等人(1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162;以及Griffin等人(1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159)。

[0312] 用于检测生物标志物基因中的突变的其他方法包括使用避免切割剂来检测RNA/RNA或RNA/DNA异源双链体中的错配碱基的方法(Myers等人(1985) *Science* 230:1242)。一般来讲,“错配切割”的本领域技术开始于提供通过使(标记的)含有野生型生物标志物序列的RNA或DNA与从组织样品获得的潜在突变型RNA或DNA杂交而形成的异源双链体。用切割双链体的单链区(诸如将由于对照链与样品链之间的碱基对错配而存在的单链区)的剂处理双链体。例如,可以用RNA酶和用SI核酸酶处理的DNA/DNA杂交体来处理RNA/DNA双链体,以酶促消化错配区。在其他实施方案中,DNA/DNA双链体或RNA/DNA双链体可以用羟胺或四氧化钬以及用哌啶处理,以便消化错配区。在消化错配区之后,然后在变性聚丙烯酰胺凝胶上通过大小来分离所得物质,以确定突变位点。参见例如,Cotton等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397和Saleeba等人(1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295。在一个优选的实施方案中,可以标记对照DNA或RNA用于检测。

[0313] 在又一个实施方案中,错配切割反应采用一种或多种在限定的系统中识别双链DNA中的错配碱基对的蛋白质(所谓的“DNA错配修复”酶),用于检测和定位从细胞样品中获

得的生物标志物cDNA中的点突变。例如,大肠杆菌的mutY酶在G/A错配时切割A,而来自HeLa细胞的胸苷DNA糖基化酶在G/T错配时切割T(Hsu等人(1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662)。根据一个示范性实施方案,可以从电泳方案等(例如,美国专利号5,459,039)检测基于生物标志物序列的探针,例如,用DNA错配修复酶处理的野生型生物标志物和切割产物(如果有的话)。

[0314] 在其他实施方案中,电泳迁移率的改变可以用于鉴定生物标志物基因中的突变。例如,单链构象多态性(SSCP)可以用于检测突变型核酸与野生型核酸之间的电泳迁移率的差异(Orita等人(1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 86:2766;还可参见Cotton(1993) *Mutat. Res.* 285:125-144和Hayashi(1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79)。将样品生物标志物核酸和对照生物标志物核酸两者的单链DNA片段变性并使其复性。单链核酸的二级结构根据序列而变化,所导致的电泳迁移率的改变使得甚至能够检测到单个碱基变化。可以用标记的探针标记或检测DNA片段。通过使用RNA(而不是DNA)可以增强该测定的灵敏度,其中二级结构对序列的变化更敏感。在一个优选的实施方案中,主题方法利用异源双链体分析,以基于电泳迁移率的变化来分离双链异源双链体分子(Keen等人(1991) *Trends Genet.* 7:5)。

[0315] 在再一个实施方案中,使用变性梯度凝胶电泳(DGGE)(Myers等人(1985) *Nature* 313:495)测定突变型或野生型片段在含有变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶中的移动。当DGGE用作分析方法时,DNA将被修饰以确保其不会完全变性,例如通过借助PCR添加大约40bp的富含GC的高熔点DNA的GC钳。在一个另外的实施方案中,使用温度梯度代替变性梯度,以鉴定对照DNA和样品DNA的迁移率差异(Rosenbaum和Reissner(1987) *Biophys. Chem.* 265:12753)。

[0316] 用于检测点突变的其他技术的实例包括但不限于选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增或选择性引物延伸。例如,可以制备寡核苷酸引物,其中将已知突变集中放置,然后在允许杂交的条件下(只有在发现完全匹配时才能进行杂交)与靶标DNA杂交(Saiki等人(1986) *Nature* 324:163;Saiki等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230)。当寡核苷酸附接到杂交膜并与标记的靶标DNA杂交时,此类等位基因特异性寡核苷酸与PCR扩增的靶标DNA或许多不同的突变杂交。

[0317] 作为替代,依赖于选择性PCR扩增的等位基因特异性扩增技术可以连同本发明一起使用。用作特异性扩增的引物的寡核苷酸可以在分子的中心(因此,扩增取决于差异杂交)(Gibbs等人(1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448)或在一种引物的极端3'端携带感兴趣的突变,其中在适当的条件下,错配可以阻止或减少聚合酶延伸(Prossner(1993) *Tibtech* 11:238)。此外,可能期望在突变区中引入新的限制性位点,以产生基于切割的检测(Gasparini等人(1992) *Mol. Cell Probes* 6:1)。预期在某些实施方案中,还可以使用用于扩增的Taq连接酶进行扩增(Barany(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:189)。在此类情况下,只有在5'序列的3'端处存在完全匹配时才会发生连接,使得可以通过寻找扩增的存在或不存在来检测特定位点处是否存在已知突变。

[0318] e, 用于检测细胞生物标志物的方法

[0319] 可以根据本领域熟知的方法来分析细胞。例如,在一个实施方案中,使用荧光激活细胞分选(FACS)(也称为流式细胞术)来分选和分析不同的细胞群。用结合细胞标志物的抗

体或典型地抗体混合物对具有细胞标志物或其他感兴趣的特异性标志物的细胞加标签。将针对不同标志物的每种抗体与可检测分子(特别是可以与偶联到其他抗体的其他荧光染料区分开的荧光染料)缀合。使加标签或“染色”细胞的料流经过激发荧光染料的光源,并检测来自细胞的发射光谱以确定特定标记抗体的存在。通过同时检测不同的荧光染料(在本领域中也称为多色荧光细胞分选),可以鉴定显示不同细胞标志物组的细胞并将其从细胞群中的其他细胞分离。其他FACS参数(包括(例如但不限于)侧向散射(SSC)、前向散射(FSC)和活体染料染色(例如,用碘化丙啶)允许基于大小和活力选择细胞。HSC和相关谱系细胞的FACS分选和分析是本领域熟知的,并且描述于例如美国专利号5,137,809、5,750,397、5,840,580、6,465,249;Manz等人(202)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.99:11872-11877;以及Akashi等人(200)Nature 404:193-197中。关于荧光激活细胞分选的通用指南描述于例如Shapiro(2003)Practical Flow Cytometry,第4版,Wiley-Liss(2003)和Ormerod(2000)Flow Cytometry:A Practical Approach,第3版,Oxford University Press中。

[0320] 分离有用细胞群的另一种方法涉及其上结合了与特异性细胞表面标志物相互作用的抗体或配体的固体或不溶性基质。在免疫吸附技术中,使细胞与含有抗体的基质(例如,珠粒柱、烧瓶、磁性颗粒等)接触,然后除去任何未结合的细胞。免疫吸附技术可以按比例放大,用于直接处理临床收获的大量细胞。合适的基质包括(例如但不限于)塑料、纤维素、葡聚糖、聚丙烯酰胺、琼脂糖和本领域已知的其他物质(例如,Pharmacia Sepharose的6MB大珠粒)。当使用包含磁性或顺磁性珠粒的固体基质时,可以通过磁性分离器容易地分离与珠粒结合的细胞(参见例如,Kato and Radbruch(1993)Cytometry 14:384-92)。亲和层析细胞分离典型地涉及使细胞悬液在表面固定有选择性配体的支持物上通过。配体在细胞上与其特定的靶标分子相互作用并被捕获在基质上。通过向柱的运行缓冲液中添加洗脱剂而释放结合的细胞,并将游离细胞通过柱洗涤并收获为均质群。对于本领域技术人员显而易见的是,吸附技术不限于采用特异性抗体的那些,而是可以使用非特异性吸附。例如,硅石吸附就是用于从细胞制剂中除去吞噬细胞的简单程序。

[0321] FACS和大多数分批免疫吸附技术可以适于阳性选择程序和阴性选择程序两者(参见例如,美国专利号5,877,299)。在阳性选择中,用抗体标记所需的细胞,并将其从剩余的未标记/不需要的细胞中除去。在阴性选择中,标记并除去不需要的细胞。可以采用的另一种类型的阴性选择是使用抗体/补体治疗或免疫毒素来除去不需要的细胞。

[0322] 应当理解,细胞的纯化或分离还包括上述方法的组合。典型的组合可以包括可有效除去大量不需要的细胞和细胞物质的初始程序,例如白细胞清除术。第二步可以包括通过对结合于底物的抗体进行免疫吸附来分离表达一种或多种祖细胞群共有的标志物的细胞。可以使用提供不同细胞类型的更高分辨率的附加步骤(诸如用针对一组特异性细胞标志物的抗体进行FACS分选)来获得所需细胞的基本上纯的群体。

[0323] 3. 免疫调节疗法

[0324] 本文提供了在受试者的体外、离体和/或体内使用的免疫调节疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)。在一个实施方案中,这种疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)或疗法组合(例如,还包括疫苗、化学疗法、辐射、表观遗传修饰剂、靶向疗法等)可以施用于期望的受试者,或者一旦受试者被指示为是对疗法的可能应答

者。在另一个实施方案中，一旦受试者被指示为不是对一种或多种疗法的可能应答者，则可以避免这样的一种或多种疗法，并且可以施用替代性治疗方案。

[0325] 如下文进一步描述的，免疫应答可以在体外、离体和/或在体内上调。例如，示例性的离体方法涉及从患者体内取出免疫细胞，使免疫细胞在体外与本文所述的剂接触，然后将体外调控的免疫细胞重新引入患者体内。

[0326] 在一些实施方案中，还设想了特定的组合疗法，这些组合疗法可以包括(例如)一种或多种化学治疗剂和辐射、一种或多种化学治疗剂和免疫疗法，或者一种或多种化学治疗剂、辐射和化学疗法，它们中的每个组合都可以与本文所述的疗法(例如，至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂，单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)一起或。例如，可能期望进一步施用上调免疫应答的其他剂，例如，经由共刺激受体转导信号的其他B7家族成员的形式，以便进一步增强免疫应答。此类附加的剂和疗法在下文进一步描述。此外，应当理解，具有多于一种剂的组合可以作为组合的单一组合物施用或单独施用(同时和/或相继)。例如，可以预先施用至少一种剂，随后接着施用所述至少一种剂和一种或多种上调免疫应答的附加的剂或疗法的组合，以实现某种效果(例如，增加MHC表达、减少Treg等)。

[0327] 上调免疫应答的剂可以预防性地用于针对各种多肽(例如，来源于病原体的多肽)的疫苗中。通过在适当的佐剂中用病毒蛋白连同上调免疫应答的剂一起进行疫苗接种，可以诱导针对病原体(例如，病毒)的免疫。

[0328] 在另一个实施方案中，如本文所述的上调或增强免疫应答功能可用于诱导肿瘤免疫。

[0329] 在另一个实施方案中，可以通过本文所述的方法刺激免疫应答，从而克服预先存在的耐受性、克隆缺失和/或耗竭(例如，T细胞耗竭)。例如，通过施用本文所述的上调免疫应答的适当剂，可以诱导针对受试者不能对其产生显著免疫应答的抗原(例如，对自体抗原，诸如肿瘤特异性抗原)的免疫应答。在一个实施方案中，可以共同施用自体抗原，诸如肿瘤特异性抗原。在另一个实施方案中，主题剂可以用作佐剂，以便在主动免疫过程中增强对外来抗原的应答。

[0330] 在一个实施方案中，从受试者获得免疫细胞，并在如本文所述的剂存在下离体培养，以扩增免疫细胞群和/或增强免疫细胞活化。在一个另外的实施方案中，然后将免疫细胞施用于受试者。如本领域已知的，通过例如向免疫细胞提供初级激活信号和共刺激信号，可以体外刺激免疫细胞。各种剂也可以用于共刺激免疫细胞的增殖。在一个实施方案中，根据PCT申请号W0 94/29436中描述的方法离体培养免疫细胞。共刺激多肽可以是可溶的、附接到细胞膜，或附接到固体表面(诸如珠粒)。

[0331] 在又一个实施方案中，本文所述的可用于上调免疫应答的剂可以使用本领域已知的技术(例如，交联或经由重组DNA技术)进一步与毒素连接或可操作地附接。此类剂可以导致所需细胞的细胞破坏。在一个实施方案中，毒素可以与抗体(诸如双特异性抗体)缀合。此类抗体可用于靶向特定的细胞群，例如，使用仅在某种类型的细胞上发现的标志物。一般来讲，免疫毒素的制备是本领域熟知的(参见例如，美国专利号4,340,535，以及EP 44167)。已知许多类型的含二硫键的接头可以成功地用于将毒素部分与多肽缀合。在一个实施方案中，优选的是含有在空间上“受阻”的二硫键的接头，因为它们体内具有更高的稳定性，从而在结合于作用位点处之前防止毒素部分释放。已知各种各样的毒素可以与本发明的多肽

或抗体缀合。实例包括：许多有用的植物、真菌或甚至细菌衍生的毒素，其例如包括各种A链毒素，特别是蓖麻毒素A链、核糖体失活蛋白（诸如皂草素或白树毒素）、 α -帚曲霉素、曲霉素、局限曲菌素、核糖核酸酶（诸如胎盘核糖核酸酶）、血管生成毒素、白喉毒素和假单胞菌（*Pseudomonas*）外毒素，等等。结合本发明使用的优选毒素部分是经过处理以修饰或除去碳水化合物残基的毒素A链，去糖基化的A链。（美国专利5,776,427）。将此类细胞毒性剂（例如，蓖麻毒素融合物）中的一种或组合输注到患者体内可以导致免疫细胞死亡。

[0332] 特别地，上文已经描述了CDK4抑制剂和/或CDK6抑制剂，以及可用于抑制CDK4和/或CDK6、或者本文所述的其他生物标志物的示例性剂。

[0333] 根据本发明的方法有用的其他免疫调节疗法也是本领域熟知的。

[0334] 术语“靶向疗法”是指施用选择性地与所选的生物分子相互作用的剂，从而治疗癌症，诸如免疫疗法。例如，贝伐单抗（bevacizumab）（**Avastin®**）是靶向血管内皮生长因子以抑制伴随肿瘤生长的血管生成的人源化单克隆抗体（参见例如，美国专利公布2013/0121999、WO 2013/083499和Presta等人（1997）*Cancer Res.* 57:4593-4599）。在一些情况下，靶向疗法可以是免疫疗法的一种形式，具体取决于靶标是否调节免疫调节功能。在另一个实例中，与免疫检查点抑制剂的抑制有关的靶向疗法可用于与本发明的方法组合。术语“免疫检查点抑制剂”意味着CD4+T细胞和/或CD8+T细胞的细胞表面上的一群分子，它们通过下调或抑制抗肿瘤免疫应答来微调免疫应答。免疫检查点蛋白是本领域熟知的，包括但不限于CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α （CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR（参见例如WO 2012/177624）。一种或多种免疫检查点抑制剂的抑制可以阻断或以其他方式中和抑制性信号传导，从而上调免疫应答以便更有效地治疗癌症。

[0335] 免疫疗法是靶向疗法的一种形式，可以包括例如使用癌症疫苗和/或致敏抗原呈递细胞。例如，溶瘤病毒是能够感染和裂解癌细胞，同时使正常细胞不受伤害的病毒，这使得它们可能在癌症疗法中 useful。溶瘤病毒的复制既促进肿瘤细胞的破坏，又在肿瘤部位处产生剂量扩增。它们还可以充当抗癌基因的载体，允许这些基因被特异性地递送到肿瘤部位。免疫疗法可以涉及用于短期保护宿主的被动免疫，该被动免疫通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预先形成的抗体（例如，向肿瘤抗原施用任选地与化学治疗剂或毒素连接的单克隆抗体）来实现。例如，已知抗VEGF和mTOR抑制剂可有效地治疗肾细胞癌。免疫疗法还可以集中于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别的表位。作为替代，可以使用反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三螺旋多核苷酸等来选择性地调控与肿瘤或癌症的起始、进展和/或病理学相关的生物分子。

[0336] 另外，某些免疫疗法可以用于促进免疫应答。免疫疗法可以涉及用于短期保护宿主的被动免疫，该被动免疫通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预先形成的抗体（例如，向肿瘤抗原施用任选地与化学治疗剂或毒素连接的单克隆抗体）来实现。免疫疗法还可以集中于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别的表位。作为替代，可以使用反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三螺旋多核苷酸等来选择性地调控与肿瘤或癌症的起始、进展和/或病理学相关的生物分子。

[0337] 在一个实施方案中，免疫疗法包括基于过继细胞的免疫疗法。熟知的基于过继细

胞的免疫治疗方式包括但不限于经辐照的自体或同种异体肿瘤细胞、肿瘤裂解物或凋亡肿瘤细胞、基于抗原呈递细胞的免疫疗法、基于树突状细胞的免疫疗法、过继性T细胞转移、过继性CAR T细胞疗法、自体免疫增强疗法(AIET)、癌症疫苗,和/或抗原呈递细胞。可以进一步修饰此类基于细胞的免疫疗法以表达一种或多种基因产物,以便进一步调控免疫应答,诸如表达细胞因子如GM-CSF,和/或表达肿瘤相关抗原(TAA)抗原,诸如Mage-1、gp-100,患者特异性新抗原疫苗,等等。

[0338] 在另一个实施方案中,免疫疗法包括基于非细胞的免疫疗法。在一个实施方案中,使用包含具有或不具有疫苗增强佐剂的抗原的组合物。此类组合物以许多熟知的形式存在,诸如肽组合物、溶瘤病毒、包含重组抗原的融合蛋白,等等。在又一个实施方案中,使用免疫调节性白介素(诸如IL-2、IL-6、IL-7、IL-12、IL-17、IL-23等),以及它们的调节剂(例如,阻断抗体,或者更强效或更持久的形式)。在再一个实施方案中,使用免疫调节性细胞因子(诸如干扰素、G-CSF、咪喹莫特(imiquimod)、TNF α 等),以及它们的调节剂(例如,阻断抗体,或者更强效或更持久的形式)。在另一个实施方案中,使用免疫调节性趋化因子(诸如CCL3、CCL26和CXCL7等),以及它们的调节剂(例如,阻断抗体,或者更强效或更持久的形式)。在另一个实施方案中,使用靶向免疫抑制的免疫调节分子,诸如STAT3信号传导调节剂、NF- κ B信号传导调节剂和免疫检查点调节剂。以上描述了术语“免疫检查点”和“抗免疫检查点疗法”。

[0339] 术语“非靶向疗法”是指施用不选择性地与所选的生物分子相互作用但却治疗癌症的剂。非靶向疗法的代表性实例包括但不限于化学疗法、基因疗法和辐射疗法。

[0340] 例如,增强免疫应答的营养补充剂(诸如维生素A、维生素E、维生素C等)是本领域熟知的(参见例如,美国专利号4,981,844和5,230,902,以及PCT公布号WO 2004/004483),可以用于本文所述的方法中。

[0341] 类似地,除免疫疗法或其组合之外的剂和疗法可以用于刺激免疫应答,从而治疗将由此受益的疾患。例如,化学疗法、辐射、表观遗传修饰剂(例如,组蛋白脱乙酰酶(HDAC)修饰剂、甲基化修饰剂、磷酸化修饰剂等)等是本领域熟知的。

[0342] 在一个实施方案中,使用化学疗法。化学疗法包括施用化学治疗剂。这种化学治疗剂可以是,但不限于,选自以下化合物组的那些:铂化合物、细胞毒性抗生素、抗代谢物、抗有丝分裂剂、烷化剂、砷化合物、DNA拓扑异构酶抑制剂、紫杉烷类、核苷类似物、植物生物碱和毒素;以及它们的合成衍生物。示例性化合物包括但不限于烷化剂:顺铂、曲奥舒凡(treosulfan)和曲磷胺(trofosfamide);植物生物碱:长春碱、紫杉醇、多西他赛(docetaxol);DNA拓扑异构酶抑制剂:替尼泊苷(teniposide)、克立那托(crisnatol)和丝裂霉素;抗叶酸剂:甲氨蝶呤、霉酚酸和羟基脲;嘧啶类似物:5-氟尿嘧啶、脱氧氟尿苷和胞嘧啶阿拉伯糖苷;嘌呤类似物:巯基嘌呤和硫鸟嘌呤;DNA抗代谢物:2'-脱氧-5-氟尿苷、甘氨酸阿非迪霉素(aphidicolin glycinate)和吡唑并咪唑;和抗有丝分裂剂:软海绵素(halichondrin)、秋水仙碱(colchicine)和根瘤菌素。还可以使用包含一种或多种化学治疗剂(例如,FLAG、CHOP)的组合物。FLAG包括氟达拉滨(fludarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Ara-C)和G-CSF。CHOP包括环磷酰胺、长春新碱、多柔比星和泼尼松。在另一个实施方案中,使用PARP(例如,PARP-1和/或PARP-2)抑制剂,并且此类抑制剂是本领域熟知的(例如,奥拉帕尼(Olaparib)、ABT-888、BSI-201、BGP-15(N-Gene Research Laboratories, Inc.);INO-

1001 (Inotek Pharmaceuticals Inc.); PJ34 (Soriano等人, 2001; Pacher等人, 2002b); 3-氨基苯甲酰胺 (Trevigen); 4-氨基-1,8-萘二甲酰亚胺 (Trevigen); 6 (5H)-菲啶酮 (Trevigen); 苯甲酰胺 (美国专利 Re. 36, 397); 和 NU1025 (Bowman等人)。作用机制通常与 PARP 抑制剂结合 PARP 并降低其活性的能力有关。PARP 催化 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 转化为烟酰胺和聚-ADP-核糖 (PAR)。聚 (ADP-核糖) 和 PARP 一直都与转录调节、细胞增殖、基因组稳定性和致癌作用有关 (Bouchard V.J. 等人, *Experimental Hematology*, 第31卷, 第6期, 2003年6月, 第446-454 (9) 页; Herceg Z.; Wang Z.-Q. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 第477卷, 第1期, 2001年6月2日, 第97-110 (14) 页)。聚 (ADP-核糖) 聚合酶1 (PARP1) 是修复 DNA 单链断裂 (SSB) 的关键分子 (de Murcia J. 等人, 1997. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7303-7307; Schreiber V, Dantzer F, Ame J C, de Murcia G (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:517-528; Wang Z Q 等人 (1997) *Genes Dev* 11:2347-2358)。通过抑制 PARP1 功能来敲除 SSB 修复诱导 DNA 双链断裂 (DSB), 其可以在具有缺陷同源指导的 DSB 修复的癌细胞中触发合成致死性 (Bryant H E 等人 (2005) *Nature* 434:913-917; Farmer H 等人 (2005) *Nature* 434:917-921)。前述化学治疗剂的实例是说明性的, 而不旨在进行限制。

[0343] 在另一个实施方案中, 使用辐射疗法。辐射疗法中使用的辐射可以是电离辐射。辐射疗法也可以是 γ 射线、X 射线或质子束。辐射疗法的实例包括但不限于外部线束辐射疗法、放射性同位素 (I-125、钷、铯) 的间质植入、放射性同位素 (诸如铈-89)、胸部辐射疗法、腹膜内 P-32 辐射疗法, 和/或全腹和盆腔辐射疗法。关于辐射疗法的总体概述, 参见 Hellman, 第16章: *Principles of Cancer Management: Radiation Therapy*, 第6版, 2001年, DeVita 等人编辑, J.B. Lippencott Company, Philadelphia。辐射疗法可以作为外部线束辐射或远距离放射疗法施用, 其中辐射来自远程源。辐射治疗还可以作为内部疗法或近距离放射疗法施用, 其中放射源放置在体内靠近癌细胞或肿瘤块的位置。还涵盖使用光动力疗法, 包括施用光敏剂, 诸如血卟啉及其衍生物、维替泊芬 (Vertoporphin) (BPD-MA)、酞菁、光敏剂 Pc4、去甲氧基-竹红菌素 A; 和 2BA-2-DMHA。

[0344] 在又一个实施方案中, 使用免疫调节药物, 诸如免疫细胞抑制药物、糖皮质激素、细胞抑制剂、免疫亲和素及其调节剂 (例如, 雷帕霉素 (rapamycin)、钙调神经磷酸酶抑制剂、他克莫司 (tacrolimus)、环孢素 (环孢菌素)、吡美莫司 (pimecrolimus)、阿贝莫司 (abetimus)、胍立莫司 (gusperimus)、地磷莫司 (ridaforolimus)、依维莫司 (everolimus)、替西罗莫司 (temsirolimus)、佐他莫司 (zotarolimus) 等)、氢化可的松 (hydrocortisone) (皮质醇 (cortisol))、醋酸可的松 (cortisone acetate)、泼尼松 (prednisone)、泼尼松龙 (prednisolone)、甲基强的松龙 (methylprednisolone)、地塞米松 (dexamethasone)、倍他米松 (betamethasone)、曲安奈德 (triamcinolone)、倍氯米松 (beclometasone)、醋酸氟氢可的松 (fludrocortisone acetate)、醋酸脱氧皮质酮 (doca) 醛固酮、非糖皮质激素类固醇、嘧啶合成抑制剂、来氟米特 (leflunomide)、特立氟胺 (teriflunomide)、叶酸类似物、甲氨蝶呤、抗胸腺细胞球蛋白、抗淋巴细胞球蛋白、沙利度胺 (thalidomide)、来那度胺 (lenalidomide)、己酮可可碱、安非他酮 (bupropion)、姜黄素、儿茶素、阿片类药物、IMPDH 抑制剂、霉酚酸、多球壳菌素、芬戈莫德 (fingolimod)、NF- κ B 抑制剂、雷洛昔芬 (raloxifene)、替加色罗 α (drotrecogin alfa)、狄诺塞麦 (denosumab)、NF- κ B 信号传导级

联抑制剂、双硫仑 (disulfiram)、奥美沙坦 (olmesartan)、二硫代氨基甲酸酯、蛋白酶体抑制剂、硼替佐米 (bortezomib)、MG132、Prol、NPI-0052、姜黄素、染料木黄酮、白藜芦醇、小白菊内酯、沙利度胺、来那度胺、夫拉平度、非甾体抗炎药 (NSAID)、三氧化二砷、脱羟基甲基环氧醌霉素 (DHMEQ)、I3C (吡啶-3-甲醇)/DIM (二吡啶甲烷) (I3C/DIM)、Bay 11-7082、木犀草素、细胞渗透性肽SN-50、IKBa.-超级阻遏物过表达、NFkB诱饵寡脱氧核苷酸 (ODN), 或者它们中任一者的衍生物或类似物。在再一个实施方案中, 使用免疫调节抗体或蛋白质。例如, 结合CD40、Toll样受体 (TLR)、OX-40、GITR、CD27或4-1BB的抗体, T细胞双特异性抗体、抗IL-2受体抗体、抗CD3抗体、OKT3 (莫罗单抗 (muromonab))、奥昔珠单抗 (otelixizumab)、替利珠单抗 (teplizumab)、维西珠单抗 (visilizumab)、抗CD4抗体、克立昔单抗 (clenoliximab)、克立昔单抗 (keliximab)、扎木单抗 (zanolimomab)、抗CD11抗体、依法利珠单抗 (efalizumab)、抗CD18抗体、厄利珠单抗 (erlizumab)、罗维珠单抗 (rovelizumab)、抗CD20抗体、阿夫土珠单抗 (afutuzumab)、奥美珠单抗 (ocrelizumab)、奥法木单抗 (ofatumumab)、帕考珠单抗 (pascolizumab)、利妥昔单抗 (rituximab)、抗CD23抗体、鲁昔单抗 (lumiliximab)、抗CD40抗体、替奈昔单抗 (teneliximab)、托利珠单抗 (toralizumab)、抗CD40L抗体、鲁利单抗 (ruplizumab)、抗CD62L抗体、阿塞珠单抗 (aselizumab)、抗CD80抗体、加利昔单抗 (galiximab)、抗CD147抗体、加维莫单抗 (gavilimomab)、B淋巴细胞刺激因子 (BLyS) 抑制抗体、贝利木单抗 (belimumab)、CTLA4-Ig融合蛋白、阿巴西普 (abatacept)、贝拉西普 (belatacept)、抗CTLA4抗体、易普利姆玛 (ipilimumab)、替西木单抗 (tremelimumab)、抗嗜酸性粒细胞趋化因子1抗体、柏替木单抗 (bertilimumab)、抗a4-整联蛋白抗体、那他珠单抗 (natalizumab)、抗IL-6R抗体、托珠单抗 (tocilizumab)、抗LFA-1抗体、奥度莫单抗 (odulimomab)、抗CD25抗体、巴利昔单抗 (basiliximab)、达利珠单抗 (daclizumab)、伊诺莫单抗 (inolimomab)、抗CD5抗体、阿佐莫单抗 (zolimomab)、抗CD2抗体、希普利珠单抗 (siplizumab)、奈瑞莫单抗 (nerelimomab)、法拉莫单抗 (faralimomab)、托珠单抗 (atlizumab)、阿托木单抗 (atorolimomab)、西利珠单抗 (cedelizumab)、阿托度莫单抗 (dorlimomab aritox)、达利株单抗 (dorlixizumab)、芳妥珠单抗 (fontolizumab)、刚奈鲁单抗 (gantenerumab)、鲁昔单抗 (gomiliximab)、莱利珠单抗 (lebrilizumab)、马司莫单抗 (maslimomab)、莫罗木单抗 (morolimomab)、培克珠单抗 (pexelizumab)、瑞利珠单抗 (reslizumab)、罗维珠单抗 (rovelizumab)、他利珠单抗 (talizumab)、阿替莫单抗 (telimomab aritox)、伐利昔单抗 (vapaliximab)、维帕莫单抗 (vepalimomab)、阿柏西普 (aflibercept)、阿法赛特 (alefacept)、利纳西普 (rilonacept)、IL-1受体拮抗剂、阿那白滞素、抗IL-5抗体、美泊利单抗 (mepolizumab)、IgE抑制剂、奥马佐单抗 (omalizumab)、他利珠单抗 (talizumab)、IL12抑制剂、IL23抑制剂、优特克单抗 (ustekinumab), 等等。

[0345] 在另一个实施方案中, 使用激素疗法。激素治疗性治疗可以包括例如激素激动剂、激素拮抗剂 (例如, 氟他胺 (flutamide)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、他莫昔芬 (tamoxifen)、雷洛昔芬 (raloxifene)、醋酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate) (LUPRON)、LH-RH拮抗剂)、激素生物合成和加工的抑制剂, 以及类固醇 (例如, 地塞米松、类维生素A (retinoid)、三角肌 (deltoid)、倍他米松 (betamethasone)、皮质醇、可的松 (cortisone)、泼尼松 (prednisone)、脱氢睾酮、糖皮质激素、盐皮质激素、雌激素、睾酮、孕激素)、维生素A衍生物 (例如, 全反式维甲酸 (ATRA)); 维生素D3类似物; 抗孕激素 (例如, 米非司酮

(mifepristone)、奥那司酮(onapristone)),或抗雄激素(例如,醋酸环丙孕酮(cyproterone acetate))。

[0346] 在另一个实施方案中,使用热疗,一种使身体组织暴露于高温(高达106°F)的程序。热量可以通过破坏细胞或剥夺它们存活所需的物质来帮助缩小肿瘤。热疗疗法可以是使用外部和内部加热装置的局部、区域性和全身的热疗。热疗几乎总是与其他形式的疗法(例如,辐射疗法、化学疗法和生物疗法)一起使用,以试图提高其有效性。局部热疗是指施加于非常小的区域(诸如肿瘤)的热量。该区域可以在外部用来自体外装置的瞄准肿瘤的高频波加热。为了实现内部加热,可以使用几种类型的无菌探针中的一种,包括细的加热的电线或填充有温水的中空管;植入的微波天线;以及射频电极。在区域性热疗时,器官或肢体被加热。将产生高能量的磁体和装置放置在待加热的区域之上。在称为灌注的另一种方法中,将患者的一些血液移出,加热,然后泵送(灌注)到内部待加热的区域中。全身加热用于治疗已扩散到全身的转移性癌症。它可以使用温水毯、热蜡、感应线圈(如电热毯中的那些)或热室(类似于大型培养箱)来实现。热疗不会引起辐射副作用或并发症的任何显著增加。然而,直接施加于皮肤的热量可能导致约一半接受治疗的患者的不适或甚至显著的局部疼痛。它还可能引起水疱,不过水疱通常迅速愈合。

[0347] 在又一个实施方案中,光动力疗法(也称为PDT、光辐射疗法、光疗法或光化学疗法)用于治疗某些类型的癌症。它基于以下发现:当生物体暴露于特定类型的光时,某些称为光敏剂的化学物质可以杀死单细胞生物体。PDT通过使用固定频率激光与光敏剂结合来破坏癌细胞。在PDT中,光敏剂被注射到血流中并被全身的细胞吸收。与在正常细胞中相比,该剂在癌细胞中的存留时间更长。当处理过的癌细胞暴露于激光时,光敏剂吸收光并产生破坏这些处理过的癌细胞的活性氧形式。必须仔细定时曝光,以便在大多数光敏剂已离开健康细胞但仍存在于癌细胞中进行曝光。PDT中使用的激光可以通过光纤(非常细的玻璃束)引导。将光纤靠近癌放置,以递送适量的光。光纤可以通过支气管窥镜导入肺部以治疗肺癌,或通过内窥镜导入食道以治疗食道癌。PDT的一个优点是它对健康组织造成的损害最小。然而,由于目前使用的激光不能通过超过约3厘米的组织(略大于一英寸又八分之一英寸),所以PDT主要用于治疗皮肤上或恰好在皮肤下或者内部器官内膜上的肿瘤。光动力疗法使治疗后皮肤和眼睛对光敏感持续6周或更长时间。建议患者避免阳光直射和明亮的室内照明至少6周。如果患者必须到户外,则需要穿戴防护服,包括太阳镜。PDT的其他临时副作用与特定区域的治疗有关,并且可能包括咳嗽、吞咽困难、腹痛,以及呼吸疼痛或呼吸短促。在1995年12月,美国食品与药物管理局(FDA)批准了一种名为卟吩姆钠(porphimer sodium)或**Photofrin®**的光敏剂,以缓解引起阻塞的食道癌的症状以及仅用激光不能令人满意地治疗的食道癌。在1998年1月,FDA批准卟吩姆钠用于治疗不适合进行常规肺癌治疗的患者的早期非小细胞肺癌。美国国家癌症研究所和其他机构正在支持临床试验(调查研究),以评估光动力疗法针对几种类型的癌症(包括膀胱癌、脑癌、喉癌和口腔癌)的用途。

[0348] 在再一个实施方案中,激光疗法用于利用高强度光来破坏癌细胞。这种技术通常用于缓解癌症的症状,诸如出血或阻塞,特别是当癌症不能通过其他治疗来治愈时。它还可以通过缩小或破坏肿瘤来用于治疗癌症。术语“激光”代表通过受激辐射发射的光放大。普通光,诸如来自灯泡的普通光,具有许多波长并在所有方向上扩散。另一方面,激光具有特定波长并聚焦在窄光束中。这种高强度光含有大量能量。激光具有非常大的功率,可以用来

切割钢材或塑造钻石。激光还可以用于非常精确的外科手术,诸如修复眼睛中受损的视网膜或切割组织(代替手术刀)。虽然有几种不同种类的激光,但只有三种在医学中得到广泛应用:二氧化碳(CO₂)激光--这种类型的激光可以从皮肤表面去除薄层而不会穿透更深的层。这种技术特别适用于治疗尚未扩散深入皮肤的肿瘤和某些癌前状态。作为传统手术刀手术的一种替代性方案,CO₂激光还能够切割皮肤。以这种方式使用激光去除皮肤癌。钕:钇-铝-石榴石(Nd:YAG)激光--来自这种激光的光可以比来自其他类型激光的光更深地穿透到组织中,并且可以使血液快速凝结。它可以通过光纤传输到身体不易接近的部位。这种类型的激光有时用于治疗喉癌。氩激光--这种激光只可以通过表层的组织,因此可用于皮肤科和眼科手术。它还在称为光动力疗法(PDT)的程序中与光敏染料一起用于治疗肿瘤。与标准手术工具相比,激光具有几种优势,包括:激光比手术刀更精确。切口附近的组织受到保护,因为与周围皮肤或其他组织几乎没有接触。激光产生的热量将手术部位消毒,从而降低感染风险。由于激光的精度允许切口较小,因此需要的操作时间可以较短。愈合时间往往缩短;因为激光将血管热封,所以出血、肿胀或疤痕较少。激光手术可能不那么复杂。例如,利用光纤,无需做大的切口就可以将激光引导到身体的多个部位。可以在门诊的基础上完成更多程序。激光可以通过两种方式用于治疗癌症:通过加热缩小或破坏肿瘤,或通过激活一种化学物质(称为光敏剂)来破坏癌细胞。在PDT中,光敏剂保留在癌细胞中并且可以被光刺激以引起杀死癌细胞的反应。CO₂激光和Nd:YAG激光用于缩小或破坏肿瘤。它们可以与内窥镜、管子一起使用,使医师能够看到身体的某些区域,诸如膀胱。来自某些激光器的光可以通过配有光纤的柔性内窥镜传输。这使得医师能够看到并在除了手术之外无法到达的身体部位工作,因此可以非常精确地瞄准激光束。激光也可以与低功率显微镜一起使用,让医生清楚地看到正在治疗的部位。与其他仪器一起使用时,激光系统可以产生直径小至200微米(小于非常细的线的宽度)的切割区域。激光用于治疗多种类型的癌症。激光手术是声门(声带)癌、宫颈癌、皮肤癌、肺癌、阴道癌、外阴癌和阴茎癌的某些阶段的标准治疗方法。除了用于摧毁癌症之外,激光手术还用于帮助缓解癌症引起的症状(姑息治疗)。例如,激光可以用于缩小或破坏阻塞患者气管的肿瘤,使其更容易呼吸。它有时也用于结肠直肠癌和肛门癌的姑息治疗。激光诱导的间质热疗(LITT)是激光疗法的最新发展之一。LITT使用与称为热疗的癌症治疗相同的想法;热量可以通过破坏细胞或剥夺它们存活所需的物质来帮助缩小肿瘤。在这种治疗中,激光被引导到体内的间质区域(器官之间的区域)。然后激光升高肿瘤的温度,从而损害或破坏癌细胞。

[0349] 用抗癌疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)治疗的持续时间和/或剂量可以根据特定的CDK4和/或CDK6抑制剂或其组合而变化。本领域技术人员将认识到特定癌症治疗剂的适当治疗时间。本发明设想了对每种癌症治疗剂的最佳治疗时间表的持续评定,其中通过本发明的方法确定的受试者的癌症表型是决定最佳治疗剂量和时间表的因素。

[0350] 用于将多核苷酸引入人或非人哺乳动物或其细胞中的任何方式可以适用于本发明的实践,用于将本发明的各种构建体递送到预期的接受者中。在本发明的一个实施方案中,通过转染,即通过递送“裸”DNA或在与胶体分散系统的复合物中递送而将DNA构建体递送至细胞。胶体系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统(包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体)。本发明优选的胶体系统是脂质复合的或脂质体制配的

DNA。在前一种方法中,在例如用脂质配制DNA之前,可以首先对含有携带所需DNA构建体的转基因的质粒进行实验优化以进行表达(例如,在5'非翻译区中包含内含子并消除不必要的序列(Felgner等人,Ann NY Acad Sci 126-139,1995)。然后可以使用已知的方法和材料实现DNA的配制(例如用各种脂质或脂质体材料),并将其递送至受体哺乳动物。参见例如,Canonica等人,Am J Respir Cell Mol Biol 10:24-29,1994;Tsan等人,Am J Physiol 268;Alton等人,Nat Genet.5:135-142,1993,以及Carson等人的美国专利号5,679,647。

[0351] 脂质体的靶向可以基于解剖因素和机理因素来分类。解剖分类基于选择性水平,例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性。机理靶向可以基于它是被动的还是主动的来区分。被动靶向利用脂质体的自然趋势分布到含有窦状毛细血管的器官中的网状内皮系统(RES)的细胞中。另一方面,主动靶向涉及通过将脂质体偶联至特定配体(诸如单克隆抗体、糖、糖脂或蛋白质)或通过改变脂质体的组成或大小来改变脂质体,以便实现靶向除天然存在的定位位点以外的器官和细胞类型。

[0352] 可以以多种方式修饰靶向递送系统的表面。就脂质体靶向递送系统而言,脂质基团可以掺入到脂质体的脂质双层中,以便维持靶向性配体与脂质体双层稳定缔合。各种连接基团可以用于将脂质链连接至靶向性配体。裸DNA或与递送媒介物(例如脂质体)缔合的DNA可以施用于受试者中的几个位点(参见下文)。

[0353] 核酸可以在任何所需的载体中递送。这些载体包括病毒或非病毒载体(包括腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体和质粒载体)。示例性的病毒类型包括HSV(单纯疱疹病毒)、AAV(腺相关病毒)、HIV(人免疫缺陷病毒)、BIV(牛免疫缺陷病毒)和MLV(鼠白血病病毒)。核酸可以以任何所需的形式施用,所述形式提供足够有效的递送水平,包括在病毒颗粒中、在脂质体中、在纳米颗粒中和与聚合物复合。

[0354] 编码感兴趣的蛋白质或核酸的核酸可以在质粒或病毒载体中,或本领域已知的其他载体中。这些载体是熟知的,可以针对特定的应用选择任何载体。在本发明的一个实施方案中,基因递送媒介物包含启动子和脱甲基酶编码序列。优选的启动子是组织特异性启动子和通过细胞增殖激活的启动子,诸如胸苷激酶启动子和胸苷酸合酶启动子。其他优选的启动子包括可被病毒感染激活的启动子,诸如 α -和 β -干扰素启动子,以及可被激素(诸如雌激素)激活的启动子。可以使用的其他启动子包括莫洛尼病毒LTR、CMV启动子和小鼠白蛋白启动子。启动子可以是组成型的或诱导型的。

[0355] 在另一个实施方案中,如W0 90/11092和美国专利5,580,859中所述,使用裸多核苷酸分子作为基因传递媒介物。此类基因递送媒介物可以是生长因子DNA或RNA,并且在某些实施方案中,与杀死的腺病毒连接。Curiel等人,Hum.Gene.Ther.3:147-154,1992。可以任选地使用的其他媒介物包括DNA配体(Wu等人,J.Biol.Chem.264:16985-16987,1989)、脂质-DNA组合(Felgner等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7417,1989)、脂质体(Wang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.84:7851-7855,1987)和微弹(Williams等人,Proc.Natl.Acad.Sci.88:2726-2730,1991)。

[0356] 基因递送媒介物可以任选地包含病毒序列,诸如病毒复制起点或包装信号。这些病毒序列可以选自诸如星状病毒、冠状病毒、正粘病毒、乳多空病毒、副粘病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、痘病毒、逆转录病毒、披膜病毒或腺病毒之类的病毒。在一个优选的实施方案中,所述生长因子基因递送媒介物是重组逆转录病毒载体。重组逆转录病毒及其各种

用途已在许多参考文献中描述,包括例如,Mann等人,Cell 33:153,1983;Cane和Mulligan, Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 81:6349,1984;Miller等人,Human Gene Therapy 1:5-14, 1990;美国专利号4,405,712、4,861,719和4,980,289;以及PCT申请号WO 89/02,468、WO 89/05,349和WO 90/02,806。许多逆转录病毒基因递送媒介物都可以用于本发明,包括例如描述于下列中的那些:EP 0,415,731;WO 90/07936;WO 94/03622;WO 93/25698;WO 93/25234;美国专利号5,219,740;WO 9311230;WO 9310218;Vile和Hart,Cancer Res.53:3860-3864,1993;Vile和Hart,Cancer Res.53:962-967,1993;Ram等人,Cancer Res.53:83-88,1993;Takamiya等人,J.Neurosci.Res.33:493-503,1992;Baba等人,J.Neurosurg.79:729-735,1993(美国专利号4,777,127、GB 2,200,651、EP 0,345,242和W091/02805)。

[0357] 可以用于递送本发明的多核苷酸的其他病毒载体系统已经衍生自疱疹病毒,例如单纯疱疹病毒(1997年5月20日颁布的Woo等人的美国专利号5,631,236,以及Neurovex的W000/08191)、牛痘病毒(Ridgeway(1988)Ridgeway,“Mammalian expression vectors,”载于:Rodriguez R L、Denhardt D T编辑的Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses.Stoneham:Butterworth,;Baichwal和Sugden(1986)“Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses:Transient and stable expression of transferred genes,”载于:Kucherlapati R编辑的Gene transfer.New York:Plenum Press;Coupar等人(1988)Gene,68:1-10),和几种RNA病毒。优选的病毒包括甲病毒、痘病毒、沙粒病毒、痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒,等等。它们为各种哺乳动物细胞提供了几种有吸引力的特征(Friedmann(1989)Science,244:1275-1281;Ridgeway,1988,出处同上;Baichwal和Sugden,1986,出处同上;Coupar等人,1988;Horwich等人,(1990)J.Virol.,64:642-650)。

[0358] 在其他实施方案中,可以使用本领域熟知的方法来操纵基因组中的靶标DNA。例如,基因组中的靶标DNA可以通过缺失、插入和/或突变来操纵用于引入外源DNA或产生经修饰的DNA/经修饰的核DNA,所述缺失、插入和/或突变是逆转录病毒插入、人工染色体技术、基因插入、用组织特异性启动子随机插入、基因靶向、转座因子和/或任何其他方法。其他修饰技术包括从基因组中缺失DNA序列和/或改变核DNA序列。例如,核DNA序列可以通过定点诱变来改变。

[0359] 在其他实施方案中,重组生物标志物多肽及其片段可以施用于受试者。在一些实施方案中,可以构建和施用具有增强的生物学特性的融合蛋白。此外,生物标志物多肽及其片段可以根据本领域熟知的药理学方法(例如,聚乙二醇化、糖基化、寡聚化等)进行修饰,以便进一步增强所需的生物活性,诸如提高的生物利用度和降低的蛋白水解性降解。

[0360] 4. 临床功效

[0361] 临床功效可以通过本领域已知的任何方法来测量。例如,对本文所述疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)的应答涉及免疫应答,诸如癌症(例如,肿瘤)对该疗法的应答,优选地涉及新辅助或辅助化学疗法开始后的肿瘤质量和/或体积的变化。例如,可以在新辅助或辅助情况下评定肿瘤应答,其中可以通过CT、PET、乳房X光检查、超声波或触诊测量,将全身介入之后肿瘤的大小与初始的大小和尺寸进行比较,并且可以在组织学上估计肿瘤的细胞构成并与在开始治疗之

前进行的肿瘤活组织检查的细胞构成进行比较。在活组织检查或手术切除之后,还可以通过卡尺测量或肿瘤的病理检查来评定应答。可以以定量方式,如肿瘤体积或细胞构成的百分比变化,或使用半定量评分系统诸如残留癌症负荷(Symmans等人,J.Clin.Oncol.(2007) 25:4414-4422)或Miller-Payne得分(Ogston等人,(2003) Breast (Edinburgh, Scotland) 12:320-327),以定性方式,如“病理完全应答”(pCR)、“临床完全缓解”(cCR)、“临床部分缓解”(cPR)、“临床稳定疾病”(cSD)、“临床进展性疾病”(cPD)或其他定性标准来记录应答。对肿瘤应答的评定可以在新辅助或辅助疗法开始之后的早期进行,例如,在数小时、数天、数周之后或优选地数月之后进行。应答评定的典型端点是在终止新辅助化学疗法之后或在手术切除残留的肿瘤细胞和/或肿瘤床之后。

[0362] 在一些实施方案中,可以通过测量临床受益率(CBR)来确定本文所述治疗性处理的临床功效。临床受益率通过在疗法结束后至少6个月的时间点确定完全缓解(CR)患者的百分比、部分缓解(PR)患者的数量和患有稳定疾病(SD)的患者的数量的总和来测量。该公式的简写是超过6个月的 $CBR = CR + PR + SD$ 。在一些实施方案中,特定的CDK4和/或CDK6抑制剂治疗方案的CBR为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。

[0363] 用于评估对疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)的应答的附加标准与“存活”有关,其中存活包括以下中的全部:存活直至死亡,也称为总存活(其中所述死亡可以与病因或相关肿瘤无关);“无复发存活”(其中术语复发应当包括局部和远处复发);无转移存活;无病存活(其中术语疾病应当包括癌症和与之相关联的疾病)。所述存活的长度可以通过参考限定的起点(例如,诊断时间或治疗开始时间)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。此外,治疗功效的标准可以扩展到包括对化学疗法的应答、存活概率、给定时间段内转移的概率,以及肿瘤复发的概率。

[0364] 例如,为了确定适当的阈值,可以将特定的CDK4和/或CDK6抑制剂治疗方案施用于受试者群体,并且可以将结果与在施用任何感兴趣的疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)之前确定的生物标志物测量值相关联。结果测量可以是对新辅助治疗中给予的疗法的病理性应答。作为替代,可以在一段时间内监测疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)后受试者的结果测量,诸如总存活和无病存活,所述受试者的生物标志物测量值是已知的。在某些实施方案中,向每个受试者施用相同剂量的CDK4和/或CDK6抑制剂。在相关的实施方案中,施用的剂量是本领域已知的CDK4和/或CDK6抑制剂的标准剂量。监测受试者的时间段可以变化。例如,可以监测受试者至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。可以使用诸如本文提供的实施例部分和具体实施方式中所描述的那些方法之类的方法来确定与疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)的结果相关的生物标志物测量阈值。例如,本文提供了在除癌症之外的其他环境(诸如感染、免疫病症等)中的治疗应答,并且这些治疗应答可用作治疗功效的量度。

[0365] 5. 本发明的另外的用途和方法

[0366] 本文所述的组合物可以用于关于本文所述的生物标志物(诸如表1中列出的那些)的多种诊断、预后和治疗应用中。在本文所述的任何方法中,诸如诊断方法、预后方法、治疗

方法或其组合,所述方法的所有步骤可以由单个行动者执行,或作为替代,由不止一个行动者执行。例如,诊断可以由提供治疗性治疗的行动者直接执行。作为替代,提供治疗剂的人可以要求执行诊断测定。诊断医师和/或治疗干预者可以解释诊断测定结果以确定治疗策略。类似地,此类替代性方法可以应用于其他测定,诸如预后测定。

[0367] a. 筛选方法

[0368] 本发明的一个方面涉及筛选测定,包括基于非细胞的测定。在一个实施方案中,所述测定提供了用于鉴定癌症是否可能对疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)有应答和/或剂是否可以抑制不可能对该疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)有应答的癌细胞的生长或将该癌细胞杀死的方法。

[0369] 在一个实施方案中,本发明涉及用于筛选结合或调控表1中列出的至少一种生物标志物的生物活性的测试剂的测定。在一个实施方案中,用于鉴定这种剂的方法需要确定该剂调控(例如,抑制)表1中列出的至少一种生物标志物的能力。

[0370] 在一个实施方案中,测定是无细胞或基于细胞的测定,包括使表1中列出的至少一种生物标志物与测试剂接触,然后测定该测试剂调控(例如,抑制)生物标志物的酶活性的能力,诸如通过测量底物的直接结合或通过测量如下所述的间接参数。

[0371] 在另一个实施方案中,测定是无细胞或基于细胞的测定,包括使表1中列出的至少一种生物标志物与测试剂接触,然后测定该测试剂调控生物标志物调节CDK4/6和/或免疫检查点的能力的的能力,诸如通过测量底物的直接结合或通过测量如下所述的间接参数。

[0372] 例如,在直接结合测定中,生物标志物蛋白(或它们各自的靶标多肽或分子)可以与放射性同位素或酶标记偶联,使得可以通过检测复合物中的标记蛋白或分子来确定结合。例如,可以直接或间接地用 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H 来标记靶标,并通过直接计数放射性发射或通过闪烁计数来检测放射性同位素。作为替代,可以用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶对靶标进行酶促标记,并通过测定适当底物向产物的转化来检测酶标记。确定生物标志物与底物之间的相互作用也可以使用标准的结合或酶分析测定来完成。在上述测定方法的一个或多个实施方案中,可能期望固定多肽或分子以促进蛋白质或分子中的一者或两者的复合形式与未复合形式分离,以及促进适应该测定的自动化。

[0373] 测试剂与靶标的结合可以在适用于容纳反应物的任何容器中完成。此类容器的非限制性实例包括微量滴定板、试管和微量离心管。固定形式的本发明抗体还可以包括与固相结合的抗体,该固相如多孔、微孔(平均孔径小于约1微米)或大孔(平均孔径大于约10微米)的材料,诸如膜、纤维素、硝化纤维素或玻璃纤维;珠粒,诸如由琼脂糖或聚丙烯酰胺或乳胶制成的珠粒;或者碟、板或孔的表面,诸如由聚苯乙烯制成的表面。

[0374] 在一个替代性实施方案中,确定剂调控生物标志物与其天然结合配偶体之间的相互作用的能力可以通过确定该测试剂调控它在CDK4/6之内的位置的下游或上游起作用的多肽或其他产物的活性的能力来实现。

[0375] 本发明还涉及通过上述筛选测定法鉴定的新型剂。因此,在适当的动物模型中进一步使用如本文所述鉴定的剂也在本发明的范围之内。例如,如本文所述鉴定的剂可以用于动物模型中,以确定用这种剂治疗的功效、毒性或副作用。作为替代,如本文所述鉴定的抗体可以用于动物模型中,以确定这种剂的作用机制。

[0376] b. 预测医学

[0377] 本发明还涉及预测医学领域,其中诊断测定、预后测定和监测临床试验用于预后(预测)目的,从而预防性地治疗个体。因此,本发明的一个方面涉及用于在生物样品(例如,血液、血清、细胞或组织)的背景下确定本文所述生物标志物(诸如表1中列出的那些)的存在、不存在、量和/或活性水平的诊断测定,从而确定罹患癌症的个体是否可能对疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)有应答,诸如在原发性或复发性癌症中。此类测定可以用于预后或预测目的,从而在特征在于生物标志物多肽、核酸表达或活性或者与生物标志物多肽、核酸表达或活性相关联的病症发作之前或复发之后预防性地治疗个体。技术人员将会知道,任何方法都可以使用本文所述的一种或多种生物标志物(例如,其组合),诸如表1中列出的那些。

[0378] 本发明的另一方面涉及监测剂(例如,药物、化合物和基于小核酸的分子)对表1中列出的生物标志物的表达或活性的影响。以下部分将更详细地描述这些剂和其他剂。

[0379] 本领域技术人员还将认识到,在某些实施方案中,本发明的方法实施计算机程序和计算机系统。例如,计算机程序可以用于执行本文所述的算法。计算机系统还可以存储和操纵由本发明的方法产生的数据,该数据包括多个生物标志物信号变化/分布,计算机系统可以使用这些变化/分布来实施本发明的方法。在某些实施方案中,计算机系统接收生物标志物表达数据;(ii) 存储该数据;和(iii) 以本文所述的任何数量的方式(例如,相对于适当对照的分析)比较该数据,以确定来自癌性组织或癌前组织的信息性生物标志物的状态。在其他实施方案中,计算机系统(i) 将确定的表达生物标志物水平与阈值进行比较;和(ii) 输出所述生物标志物水平是否相对于阈值被显著调控(例如,高于或低于阈值)的指示,或基于所述指示的表型。

[0380] 在某些实施方案中,此类计算机系统也被认为是本发明的一部分。根据生物信息学和/或计算机领域的技术人员所拥有的知识,可以使用许多类型的计算机系统来实施本发明的分析方法。在这种计算机系统的操作期间,可以将若干软件组件加载到存储器中。这些软件组件可以包括本领域标准的软件组件和本发明特有的组件两者(例如, Lin等人(2004) *Bioinformatics* 20,1233-1240中描述的dCHIP软件;本领域已知的径向基础机器学习算法(RBM))。

[0381] 本发明的方法还可以在数学软件包中编程或建模,这些数学软件包允许方程的符号输入和处理的高级规范,包括待使用的特定算法,从而使用户无需程序性地编程各个方程和算法。此类软件包包括例如来自Mathworks (Natick, Mass.) 的Matlab、来自Wolfram Research (Champaign, Ill.) 的Mathematica或来自MathSoft (Seattle, Wash.) 的S-Plus。

[0382] 在某些实施方案中,计算机包括用于存储生物标志物数据的数据库。此类存储的配置文件可以被访问,并用于在稍后的时间点执行感兴趣的比较。例如,可以存储来源于受试者的非癌性组织的样品的生物标志物表达谱和/或相同物种的相关群体中的感兴趣的信息性基因座的基于群体的分布产生的谱,并且随后将其与来源于该受试者的癌性组织或该受试者的疑似癌性的组织的样品进行比较。

[0383] 除了本文所述的示例性程序结构和计算机系统之外,其他的替代性程序结构和计算机系统对于本领域技术人员来说将是显而易见的。因此,这类替代性系统旨在被涵盖在所附权利要求之内,其在实质和范围上都不脱离上述计算机系统和程序结构。

[0384] c. 诊断测定

[0385] 本发明部分地提供了用于准确分类生物样品是否与可能对疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)有应答的癌症相关联的方法、系统和代码。在一些实施方案中,本发明可用于使用统计算法和/或经验数据(例如,表1中列出的至少一种生物标志物的量或活性)将样品(例如,来自受试者)分类为与对疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)有应答或无应答相关联或处于其风险下。

[0386] 用于检测表1中列出的生物标志物的量或活性,因此可用于将样品分类为是可能还是不可能对疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)有应答的示例性方法涉及从测试受试者获得生物样品并使该生物样品与剂(诸如蛋白质结合剂,如抗体或其抗原结合片段,或者核酸结合剂,如寡核苷酸)接触,从而能够检测该生物样品中的生物标志物的量或活性。在一些实施方案中,使用至少一种抗体或其抗原结合片段,其中两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种此类抗体或抗体片段可以组合(例如,在夹心ELISA中)或串联使用。在某些情况下,统计算法是单个学习统计分类器系统。例如,基于预测或概率值以及生物标志物的存在或水平,单个学习统计分类器系统可以用于将样品分类。单个学习统计分类器系统的使用典型地将样品分类为例如可能的抗癌疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)应答者或进展者样品,其敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和/或总体准确性至少为约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0387] 其他合适的统计算法是本领域的技术人员熟知的。例如,学习统计分类器系统包括机器学习算法技术,其能够适应复杂数据集(例如,感兴趣的标志物小组)并基于此类数据集做出决策。在一些实施方案中,使用单个学习统计分类器系统,诸如分类树(例如,随机森林)。在其他实施方案中,使用2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种学习统计分类器系统的组合,优选串联使用。学习统计分类器系统的实例包括但不限于使用归纳学习(例如,决策/分类树诸如随机森林、分类和回归树(C&RT)、增强树等)、可能近似正确(PAC)学习、连接主义学习(例如,神经网络(NN)、人工神经网络(ANN)、神经模糊网络(NFN)、网络结构、感知器诸如多层感知器、多层前馈网络、神经网络应用、信念网络中的贝叶斯学习等)、强化学习(例如,已知环境中的被动学习诸如初始学习、自适应动态学习和时间差异学习、未知环境中的被动学习、未知环境中的主动学习、学习行动价值功能、强化学习的应用等)以及遗传算法和进化规划的那些系统。其他学习统计分类器系统包括支持向量机(例如,核方法)、多变量自适应回归样条(MARS)、莱文贝格-马夸特算法(Levenberg-Marquardt algorithm)、高斯-牛顿算法(Gauss-Newton algorithm)、混合高斯模型、梯度下降算法和学习矢量量化(LVQ)。在某些实施方案中,本发明的方法还包括将样品分类结果发送给临床医生,例如肿瘤科医生。

[0388] 在另一个实施方案中,对受试者的诊断之后,是基于诊断向个体施用治疗有效量的确定的治疗。

[0389] 在一个实施方案中,所述方法还涉及获得对照生物样品(例如,来自未患有癌症或

其癌症对疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)敏感的受试者的生物样品)、来自在缓解期间的受试者的生物样品,或来自尽管使用疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)却在治疗期间出现癌症发展的受试者的生物样品。

[0390] d. 预后测定

[0391] 本文所述的诊断方法还可以用于鉴定患有癌症或有患上癌症的风险的受试者,所述癌症可能或不可能对疗法(例如,至少一种CDK4和/或CDK6抑制剂,单独的或与免疫疗法(诸如免疫检查点抑制疗法)组合)有应答。本文所述的测定(诸如前述诊断测定或以下测定)可以用于鉴定患有与例如表1中所述的至少一种生物标志物的量或活性的错误调节相关联的病症(诸如癌症)或有患上所述病症的风险的受试者。作为替代,预后测定可以用于鉴定患有与表1中所述的至少一种生物标志物的错误调节相关联的病症(诸如癌症)或有患上所述病症的风险的受试者。另外,本文所述的预后测定可以用于确定受试者是否可以施用剂(例如,激动剂、拮抗剂、肽模拟物、多肽、肽、核酸、小分子或其他候选药物)来治疗与异常的生物标志物表达或活性相关联的疾病或病症。

[0392] e. 治疗方法

[0393] 本发明的另一方面涉及调控本文所述的一种或多种生物标志物(例如,表1和实施例中列出的那些,或其片段)的表达或活性用于治疗目的的方法。已经证实本发明的生物标志物可用于鉴定免疫调节干预。因此,可以调控生物标志物的活性和/或表达,以及一种或多种生物标志物或其片段与其一种或多种天然结合配偶体或其一种或多种片段之间的相互作用,以便调控免疫应答(诸如癌症中的免疫应答)。

[0394] 本发明的调控方法涉及使细胞与本发明的一种或多种生物标志物(包括本发明的一种或多种生物标志物,包括表1和实施例中列出的一种或多种生物标志物)或其片段,或者调控与该细胞相关联的生物标志物活性中的一种或多种活性的剂接触。调控生物标志物活性的剂可以是如本文所述的剂,诸如核酸或多肽、该生物标志物的天然存在的结合配偶体、针对该生物标志物的抗体、针对该生物标志物的抗体与针对其他免疫相关靶标的抗体的组合、一种或多种生物标志物激动剂或拮抗剂、一种或多种生物标志物激动剂或拮抗剂的肽模拟物、一种或多种生物标志物肽模拟物、其他小分子,或者针对一种或多种生物标志物核酸基因表达产物的小RNA或该基因表达产物的模拟物。

[0395] 调控本发明的一种或多种生物标志物(包括本发明的一种或多种生物标志物,包括表1和实施例中列出的一种或多种生物标志物)或其片段的表达的剂是例如,反义核酸分子、RNAi分子、shRNA、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA*、抗miRNA、或miRNA结合位点、或其变体,或者其他小RNA分子、三链体寡核苷酸、核酶,或用于表达一种或多种生物标志物多肽的重组载体。例如,可以合成与一个或多个生物标志物多肽翻译起始位点周围区域互补的寡核苷酸。可以将一种或多种反义寡核苷酸添加到细胞培养基中,典型地以200 μ g/ml添加,或者将其施用于患者以防止合成一种或多种生物标志物多肽。该反义寡核苷酸被细胞摄取,然后与一种或多种生物标志物mRNA杂交以防止翻译。作为替代,可以使用结合双链DNA以形成三链体构建体,从而防止DNA解旋和转录的寡核苷酸。作为任一操作的结果,生物标志物多肽的合成被阻断。当调控生物标志物表达时,优选地,通过除了敲除生物标志物基因之外的方式进行这种调控。

[0396] 调控表达的剂控制细胞中的生物标志物的量,由于这一事实,这些剂也调控细胞中的生物标志物活性的总量。

[0397] 在一个实施方案中,所述剂刺激本发明的一种或多种生物标志物(包括表1和实施列中列出的一种或多种生物标志物)或其片段的一种或多种活性。此类刺激剂的实例包括活性生物标志物多肽或其片段,以及已经引入细胞中的编码该生物标志物或其片段的核酸分子(例如,cDNA、mRNA、shRNA、siRNA、小RNA、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA*、抗miRNA、或miRNA结合位点,或其变体,或者本领域技术人员已知的其他功能上等价的分子)。在另一个实施方案中,该剂抑制一种或多种生物标志物活性。在一个实施方案中,该剂抑制或增强生物标志物与其一种或多种天然结合配偶体的相互作用。此类抑制剂的实例包括反义核酸分子、抗生物标志物抗体、生物标志物抑制剂和本文所述的筛选测定中鉴定的化合物。

[0398] 这些调控方法可以在体外进行(例如,通过使细胞与该剂接触),或作为替代,通过使剂在体内与细胞接触(例如,通过将该剂施用于受试者)而进行。因此,本发明提供了治疗罹患下述疾患或病症的个体的方法:所述疾患或病症将受益于上调或下调表1和实施列中列出的本发明的一种或多种生物标志物或其片段,例如,特征在于该生物标志物或其片段的不需要的、不足的或异常的表达或活性的病症。在一个实施方案中,该方法涉及施用调控(例如,上调或下调)生物标志物表达或活性的剂(例如,通过本文所述的筛选测定而鉴定的剂)、或剂的组合。在另一个实施方案中,该方法涉及施用一种或多种生物标志物多肽或核酸分子,作为补偿降低的、异常的或不需要的生物标志物表达或活性的疗法。

[0399] 在生物标志物被异常下调和/或增加的生物标志物活性可能具有有益效果的情况下,刺激生物标志物活性是合乎需要的。同样地,在生物标志物被异常上调和/或降低的生物标志物活性可能具有有益效果的情况下,抑制生物标志物活性是合乎需要的。

[0400] 此外,这些调控剂还可以与例如化学治疗剂、激素、抗血管形成剂、放射性标记的化合物,或者手术、冷冻疗法和/或放射疗法组合施用。前述治疗方法可以连同其他形式的常规疗法(例如,本领域技术人员熟知的癌症标准护理治疗)一起施用,要么与常规疗法连续施用、在常规疗法之前施用,要么在常规疗法之后施用。例如,这些调控剂可以与治疗有效剂量的化学治疗剂一起施用。在另一个实施方案中,这些调控剂连同化学疗法一起施用,以增强化学治疗剂的活性和功效。Physicians' Desk Reference (PDR) 公开了已经用于治疗各种癌症的化学治疗剂的剂量。这些前述化学治疗药物的治疗有效的给药方案和剂量将取决于正在治疗的特定黑素瘤、疾病的程度,以及本领域技术熟悉的医师所熟悉并且可以由该医师确定的其他因素。

[0401] 6. 药物组合物

[0402] 在另一个方面,本发明提供了药学上可接受的组合物,其包含治疗有效量的调控(例如,降低)生物标志物表达和/或活性的剂,该剂连同一种或多种药学上可接受的载剂(添加剂)和/或稀释剂一起配制。如下文详细描述,本发明的药物组合物可以特别配制成为固体或液体形式施用,包括适合于下列的那些:(1)口服施用,例如浸液(水性或非水性的溶液剂或混悬剂)、片剂、大丸剂、散剂、颗粒剂、糊剂;(2)肠胃外施用,例如作为例如无菌溶液剂或混悬剂通过皮下、肌肉内或静脉内注射;(3)局部施用,例如作为施用于皮肤的霜剂、软膏剂或喷雾剂;(4)阴道内或直肠内,例如作为子宫托、霜剂或泡沫;或(5)气溶胶剂,例如

作为含有所述化合物的水性气溶胶剂、脂质体制剂或固体颗粒。

[0403] 如本文所用的短语“治疗有效量”意味着调控(例如,抑制)生物标志物表达和/或活性的剂的量,其以合理的益处/风险比有效地产生一些期望的治疗作用(例如,癌症治疗)。

[0404] 短语“药学上可接受的”在本文中用来指在合理的医学判断范围之内,适用于与人和动物的组织接触而无过量的毒性、刺激、变应性应答或者其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称的那些剂、材料、组合物和/或剂型。

[0405] 如本文所用的短语“药学上可接受的载剂”意味着将受试化学物质从一个器官或身体的一部分运载或输送到另一个器官或身体的一部分所涉及的药学上可接受的材料、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或囊封材料。在与制剂的其他成分相容并且对受试者无害的意义上,每种载剂都必须是“可接受的”。可以充当药学上可接受的载剂的材料的一些实例包括:(1)糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙纤维素;(4)粉末状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;(9)油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液(Ringer's solution);(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;和(21)药物制剂中采用的其他无毒性相容物质。

[0406] 术语“药学上可接受的盐”是指调控(例如,抑制)生物标志物表达和/或活性的剂的相对无毒性的无机酸加成盐和有机酸加成盐。这些盐可以在呼吸解偶联剂的最终分离和纯化期间原位制备,或者通过使纯化的游离碱形式的呼吸解偶联剂与合适的有机或无机酸分别反应,并分离由此形成的盐来制备。代表性的盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘二甲酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸盐和月桂基磺酸盐等(参见例如,Berge等人(1977)“Pharmaceutical Salts”,J.Pharm.Sci.66:1-19)。

[0407] 在其他情况下,可用于本发明的方法中的剂可以含有一个或多个酸性官能团,因此能够与药学上可接受的碱形成药学上可接受的盐。在这些情况下,术语“药学上可接受的盐”是指调控(例如,抑制)生物标志物表达的剂的相对无毒性的无机碱加成盐和有机碱加成盐。这些盐同样地可以在呼吸解偶联剂的最终分离和纯化期间原位制备,或者通过使纯化的游离酸形式的呼吸解偶联剂与合适的碱(诸如药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)、与氨或与药学上可接受的有机伯、仲或叔胺分别反应来制备。代表性的碱金属盐或碱土金属盐包括锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和铝盐等。可用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(参见例如,Berge等人,出处同上)。

[0408] 润湿剂、乳化剂和润滑剂(诸如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁)以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于所述组合物中。

[0409] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸、半胱

氨酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等；(2) 油性抗氧化剂，诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚 (BHA)、丁基化羟基甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等；以及(3) 金属螯合剂，诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0410] 可用于本发明的方法中的制剂包括适用于口服、鼻腔、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道、气溶胶和/或肠胃外施用的那些制剂。这些制剂可以方便地以单位剂型存在，并且可以通过药学领域中熟知的任何方法制备。可以与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据正在治疗的宿主、具体的施用方式而变化。可以与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常将是产生治疗作用的化合物的量。一般来讲，在百分之一百中，该量的范围将为活性成分的约1%至约99%，优选地约5%至约70%，最优选地约10%至约30%。

[0411] 制备这些制剂或组合物的方法包括使调控(例如，抑制)生物标志物表达和/或活性的剂与载剂，并任选地与一种或多种辅助成分发生缔合的步骤。一般来讲，通过使呼吸解偶联剂与液体载剂或细粉碎的固体载剂或两者均匀且紧密地发生缔合，然后在必要时使产品成形来制备制剂。

[0412] 适用于口服施用的制剂可以为胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基础，通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、散剂、颗粒剂的形式，或作为水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂，或作为水包油或油包水液体乳剂，或作为酞剂或糖浆剂，或作为锭剂(使用惰性基质，诸如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等，每种都含有预定量的呼吸解偶联剂作为活性成分。化合物还可以作为大丸剂、药糖剂或糊剂来施用。

[0413] 在用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒剂等)中，活性成分与一种或多种药学上可接受的载剂混合，所述载剂诸如柠檬酸钠或磷酸二钙，和/或下列任一种：(1) 填充剂或增量剂，诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸；(2) 粘合剂，诸如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶；(3) 保湿剂，诸如甘油；(4) 崩解剂，诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠；(5) 溶液缓凝剂，诸如石蜡；(6) 吸收促进剂，诸如季铵化合物；(7) 润湿剂，诸如乙酰胺醇和单硬脂酸甘油酯；(8) 吸收剂，诸如高岭土和膨润土；(9) 润滑剂，诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠，和它们的混合物；以及(10) 着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，药物组合物还可以包含缓冲剂。也可以使用诸如乳糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂将类似类型的固体组合物用作软填充明胶胶囊和硬填充明胶胶囊中的填充剂。

[0414] 片剂可以通过压缩或模制来制备，任选地含有一种或多种辅助成分。可以使用粘合剂(例如，明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如，羟乙基淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂来制备压缩片剂。模制片剂可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉末状肽或肽模拟物的混合物来制备。

[0415] 片剂和其他固体剂型，诸如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂，可以任选地刻痕或用包衣和外壳(诸如肠溶包衣和药物配制领域中熟知的其他包衣)制备。它们也可以使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素(以提供所需的释放曲线)、其他聚合物基质、脂质体和/或微球配制而成，以使其中的活性成分缓慢或受控释放。它们可以通过例如通过细菌截留过滤器过滤，或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌，所述灭菌剂可以在即将使用前溶解于无菌水或一些其他的无菌可注射介质中。这些组合物还可以任选地含有遮光剂，并且

可以是仅在或优先地在胃肠道的某一部分任选地以延迟方式释放一种或多种活性成分的组合物。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。如果合适,活性成分也可以与上述赋形剂中的一种或多种一起呈微囊封形式。

[0416] 用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酞剂。除活性成分外,液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂,诸如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯,以及它们的混合物。

[0417] 除惰性稀释剂外,口服组合物还可以包含佐剂,诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0418] 除活性剂之外,混悬剂还可以含有悬浮剂,诸如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶,以及它们的混合物。

[0419] 用于直肠或阴道施用的制剂可以作为栓剂呈现,其可以通过将一种或多种呼吸解偶联剂与一种或多种合适的无刺激性赋形剂或载剂(包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯)混合来制备,在室温下是固体、但在体温下是液体,因此会在直肠或阴道腔内融化并释放出活性剂。

[0420] 适用于阴道施用的制剂还包括含有本领域已知适当的此类载剂的子宫托、棉塞、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0421] 用于局部或透皮施用的调控(例如,抑制)生物标志物表达和/或活性的剂的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。活性组分可以在无菌条件下与药学上可接受的载剂混合,并且与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0422] 软膏剂、糊剂、霜剂和凝胶剂除了含有呼吸解偶联剂之外,还可以含有赋形剂,诸如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅氧烷、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌,或它们的混合物。

[0423] 散剂和喷雾剂除了含有调控(例如,抑制)生物标志物表达和/或活性的剂之外,还可以含有赋形剂,诸如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂可以另外含有常规推进剂,诸如氯氟烃和挥发性未取代的烃,诸如丁烷和丙烷。

[0424] 调控(例如,抑制)生物标志物表达和/或活性的剂可以替代性地通过气溶胶剂施用。这通过制备含有化合物的水性气溶胶剂、脂质体制剂或固体颗粒来实现。可以使用非水性(例如,碳氟化合物推进剂)混悬剂。声波喷雾器是优选的,因为它们最大限度地减少剂暴露于可以导致化合物降解的剪切。

[0425] 通常,通过将剂的水性溶液剂或混悬剂连同常规的药学上可接受的载剂和稳定剂一起配制来制备水性气溶胶剂。载剂和稳定剂随特定化合物的要求而变化,但典型地包括非离子表面活性剂(吐温类(Tween)、普朗尼克类(Pluronic)或聚乙二醇)、无毒蛋白质如血清白蛋白、脱水山梨糖醇酯、油酸、卵磷脂、氨基酸诸如甘氨酸、缓冲剂、盐、糖或糖醇。气溶胶剂通常由等渗溶液制备。

[0426] 透皮贴剂具有提供呼吸解偶联剂向身体的受控递送的附加优点。此类剂型可以通过将剂溶解或分散在适当的介质中来制备。吸收增强剂还可以用于增加肽模拟物跨皮肤的通量。可以通过提供速率控制膜或将肽模拟物分散在聚合物基质或凝胶中来控制这种通量的速率。

[0427] 眼科制剂、眼用软膏剂、散剂、溶液剂等也被设想为包含在本发明的范围之内。

[0428] 适用于肠胃外施用的本发明药物组合物包含一种或多种呼吸解偶联剂与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液，或者可在临使用之前复溶成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末的组合，其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质，或者悬浮剂或增稠剂。

[0429] 可以用于本发明药物组合物的合适的水性和非水性载剂的实例包括水、乙醇、多元醇（诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）以及它们的合适混合物，植物油（诸如橄榄油）和可注射的有机酯（诸如油酸乙酯）。例如，通过使用包衣材料诸如卵磷脂、通过在分散液的情况下维持所需的粒度，以及通过使用表面活性剂，可以维持适当的流动性。

[0430] 这些组合物还可以含有佐剂，诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂，诸如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等，可以确保防止微生物的作用。还可能期望在组合物中包含等渗剂，诸如糖、氯化钠等。此外，可以通过包含延迟吸收的剂（诸如单硬脂酸铝和明胶）来引起可注射药物形式的吸收延长。

[0431] 在某些情况下，为了延长药物的作用，希望减慢皮下或肌肉注射药物的吸收。这可以通过使用水中溶解度差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。然后，药物的吸收速率取决于其溶解速率，而溶解速率又可以取决于晶体大小和结晶形态。作为替代，通过将药物溶解或悬浮在油性媒介物中来实现胃肠外施用的药物形式的延迟吸收。

[0432] 通过在可生物降解的聚合物诸如聚丙交酯-聚乙交酯中形成调控（例如，抑制）生物标志物表达和/或活性的剂的微囊基质，来制备可注射的贮库形式。依据药物与聚合物的比率，以及所用特定聚合物的性质，可以控制药物释放速率。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚（原酸酯）和聚（酸酐）。还通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备贮库可注射制剂。

[0433] 当本发明的呼吸解偶联剂作为药物施用于人和动物时，它们本身可以给予或作为含有例如0.1%至99.5%（更优选地，0.5%至90%）活性成分与药学上可接受的载剂的组合的药物组合物给予。

[0434] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以通过本发明的方法测定，以便获得有效实现特定受试者、组合物和施用模式所需治疗应答而对该受试者无毒的活性成分的量。

[0435] 可以将本发明的核酸分子插入到载体中并用作基因疗法载体。基因疗法载体可以通过例如静脉内注射、局部施用（参见美国专利号5,328,470）或通过立体定位注射（参见例如，Chen等人（1994）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057）递送给受试者。基因疗法载体的药物制剂可以包含在可接受的稀释剂中的基因疗法载体，或者可以包含其中嵌入该基因递送媒介物的缓释基质。作为替代，当完整的基因递送载体可以从重组细胞完整产生时，例如逆转录病毒载体，药物制剂可以包含一种或多种产生该基因递送系统的细胞。

[0436] 本发明还涵盖用于检测和/或调控本文所述生物标志物的试剂盒。本发明的试剂

盒还可以包括说明材料,其公开或描述了本发明的试剂盒或抗体在如本文所提供的本发明方法中的用途。试剂盒还可以包括附加的组分,以便于该试剂盒被设计用于的特定应用。例如,试剂盒可以另外含有检测标记的手段(例如,用于酶标记的酶底物、用于检测荧光标记的过滤器组、适当的二级标记诸如绵羊抗小鼠-HRP,等等)和对照(例如,对照生物样品或标准品)所需的试剂。试剂盒可以另外包括缓冲剂和被认可用于本发明方法中的其他试剂。非限制性实例包括减少非特异性结合的试剂,诸如载体蛋白或洗涤剂。

[0437] 本发明的其他实施方案在以下实施例中描述。本发明通过以下实施例进一步说明,这些实施例不应被解释为进一步的限制。

[0438] 实施例

[0439] 实施例1:实施例2至8的材料和方法

[0440] a. 动物实验

[0441] 如先前在Goel等人(2016) *Cancer Cell* 29:255-269中所述,用多西环素在MMTV-rtTA/tetO-HER2小鼠中诱导肿瘤形成。雌性FVB小鼠(7周龄)购自Taconic Biosciences (Hudson, NY)。雌性J:NU裸鼠(8周龄)购自Jackson Labs (Bar Harbor, ME)。用作体外研究的T细胞来源的FVB CD45.2+小鼠是Daniel Tenen博士馈赠的。对于J:NU小鼠中的肿瘤生长研究,将MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤外植体双侧原位植入裸鼠中,如先前在Goel等人(2016)(出处同上)中所述。对于J:NU小鼠中的肿瘤生长实验,当肿瘤直径达到5至10mm时开始用玻玛西尼或媒介物进行治疗,并且将小鼠随机分到治疗组中,使得肿瘤体积的分布在组与组之间是平均的。对于转基因MMTV-rtTA/tetO-HER2小鼠中的肿瘤实验,在开始治疗时,测得肿瘤介于5mm与15mm之间。将小鼠分配到治疗组中,使得肿瘤体积的分布在组与组之间是平均的。如先前在Goel等人(2016)(出处同上)中所述计算肿瘤体积,并且每周用卡尺测量肿瘤2至3次。对于肿瘤生长曲线分析,使用Sidak的多重比较检验校正多重比较,由此进行单向ANOVA检验。

[0442] 每天通过口服管饲法施用玻玛西尼(75至90mg/kg,如针对个体实验(Haoyuan Chemexpress, Shanghai, China)所指出,如先前在Goel等人(2016)(出处同上)中所述制备)和帕博西尼(90mg/kg (Haoyuan Chemexpress),在50nM d-乳酸钠中稀释)。对于CD8耗竭实验,在开始玻玛西尼疗法(90mg/kg)前48小时和24小时,用抗CD8抗体(通过腹膜内注射400 μ g; BioXcell (West Lebanon, NH), 克隆YTS 169.4)或同种型对照(通过腹膜内注射400 μ g; 克隆LTF-2, BioXcell)治疗荷瘤小鼠,之后每5天治疗一次。对于使用抗PDL1疗法的联合疗法实验,每天用玻玛西尼以90mg/kg开始治疗。3天后,将剂量降至每天75mg/kg,并开始用抗PD-L1抗体(每72小时通过腹膜内注射200 μ g; BioXcell, 克隆10F.9G2)或同种型对照抗体(每72小时通过腹膜内注射200 μ g)治疗。使用CO₂吸入使小鼠安乐死,然后根据达纳法伯癌症研究所(Dana-Farber Cancer Institute)、哈佛医学院(Harvard Medical School)和波士顿儿童医院(Boston Children's Hospital)的机构动物管理与使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)批准的方案进行所有小鼠实验。

[0443] b. 免疫组织化学和免疫荧光

[0444] 如先前在Goel等人(2016)(出处同上)中所述进行Ki-67、HER2和STAT1的免疫染色。抗Ki-67抗体获自Vector (Burlingame, CA), 抗HER2抗体和抗STAT1抗体获自Abcam (Cambridge, UK)。二抗(AF488 AffiniPure驴抗小鼠IgG和Cy3 AffiniPure驴抗兔IgG)购自

Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA)。在Nikon Ti倒置荧光显微镜上利用Yokogawa转盘式共聚焦,使用MetaMorph® 图像采集软件采集图像,每个肿瘤分析3至5个视野。使用半自动化内部平台 (NIH ImageJ) 进行图像分析。

[0445] 如先前在McAllister等人 (2008) Cell 133:994-1005中所述进行FoxP3免疫荧光检测。CD3 (克隆SP7) 购自Abcam, FoxP3 (克隆FJK-16s) 购自eBioscience, 并且Ki-67抗体 (克隆SP6) 购自Thermo Scientific (Waltham, MA)。二抗 (AF488驴抗兔IgG、AF647山羊抗大鼠IgG) 购自Life Technologies。用DAPI (Invitrogen) 复染组织。在Nikon Eclipse Ni显微镜上使用NIS Elements软件采集图像,每个肿瘤分析5至10个视野。

[0446] c. 细胞系

[0447] 如先前在Goel等人 (2016) (出处同上) 中所述 (略有修改: 抗生素和抗真菌剂未用于细胞培养基中) 维持BT474、SKBR3、MDA-MB-361和MDA-MB-453人乳腺癌细胞系。所有细胞系均获自ATCC, 经检测为支原体阴性, 并通过短串联重复序列分析 (Promega GenePrint® 10System) 验证其身份。

[0448] d. 体外药物研究

[0449] 拉帕替尼购自Haoyuan Chemexpress。如先前在Goel等人 (2016) (出处同上) 中所述将玻玛西尼和拉帕替尼稀释。对于体外使用, 将帕博西尼稀释在DMSO中。用DMSO、拉帕替尼或玻玛西尼处理48小时之后, 测量切割的PARP。拉帕替尼剂量: 对于BT474和SKBR3, 为30nM; 对于MDA-MB-453和MDA-MB-361, 为500nM。玻玛西尼剂量: 对于BT474和SKBR3, 为300nM; 对于MDA-MB-453, 为25nM; 对于MDA-MB-361, 为500nM。对于星形孢菌素实验, 用DMSO或玻玛西尼 (500nM) 预处理MDA-MB-453细胞0、1或7天, 之后暴露于星形孢菌素 (500nM, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) 4小时。为了确定作用的JAK依赖性, 用DMSO、玻玛西尼 (500nM) 和鲁索替尼 (500nM, Selleckchem, Houston, TX) 的适当组合处理细胞7天。

[0450] e. 蛋白质印迹

[0451] 如先前在Goel等人 (2016) (出处同上) 中所述实施蛋白质印迹。针对切割的PARP、切割的半胱天冬酶-3、磷酸-STAT1 Y701、STAT1和FLAG的抗体购自Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), 抗纽蛋白抗体购自Sigma (St. Louis, MO)。

[0452] f. β -半乳糖苷酶活性

[0453] 如先前在Goel等人 (2016) (出处同上) 中所述, 使用衰老检测试剂盒 (Abcam, ab65351) 测定SA- β 半乳糖苷酶表达。

[0454] g. 转录组方法

[0455] 如先前在Ni等人 (2016) Nat Med 22:723-726和Wang等人 (2015) Cell 163:174-186中所述, 构建AmpliSeq™文库, 并根据制造商的说明在Ion Torrent Proton平台 (Thermo Fisher) 上测序。对于细胞系中的人基因分析, Ion AmpliSeq™转录组人基因表达试剂盒经设计用于同时靶向扩增单个引物库中的超过20,000个人RefSeq基因。针对每个靶基因扩增短扩增子 (约110bp)。由于AmpliSeq转录组小鼠试剂盒无法商购获得, 所以制造商 (Thermo Fisher) 使用Ion AmpliSeq™Designer设计了Ion AmpliSeq™Custom Panel, 用于靶向扩增用于小鼠研究的一个引物库中与我们的研究最相关的3,826个小鼠基因 (针对每个基因一个短扩增子)。对于每个样品, 将10ng总RNA用于cDNA文库制备。使用Ion OneTouch™2系统

(Thermo Fisher)对多个文库进行复用和克隆扩增,然后在Ion Torrent™质子机(Thermo Fisher)上测序。首先通过Torrent Suite和ampliSeqRNA分析插件(Thermo Fisher)分析数据,以产生计数数据。

[0456] h. 小鼠转录组分析

[0457] 使用来自转录组学分析的每个基因的原始读数计数,使用DESeq2进行差异表达分析(Love等人(2014)Genome Biol 15:550)。将被认为上调或下调(如在Benjamini-Hochberg多重检验校正之后使用p值截止值0.05确定的)的基因用作基因本体论富集分析的单独列表的输入(The Gene Ontology Consortium(2015)Gene Ontology Consortium: going forward.Nucleic Acids Res 43:D1049-D1056)。使用来自转录组学分析的每个基因的标准化读数计数进行基因集富集分析(Subramanian等人(2005)Proc Natl Acad Sci USA 102:15545-15550;Mootha等人(2003)Nat Genet 34:267-273)。

[0458] i. 人转录组分析

[0459] 如上获得来自人细胞系的转录组学数据,并对每个基因的标准化读数计数进行分析。所有实验均一式三份地进行。仅包括在至少一个样品上的绝对读数计数大于20的基因。对于每个重复实验,确定所包括基因的标准化读数计数的倍数变化。然后计算每个基因的平均倍数变化。然后包括平均倍数变化大于2的基因(DMSO对比玻璃玛西尼),以使用基因本体论富集分析进行分析。

[0460] 对于小鼠和人的转录组学数据,通过t检验测定基因表达的显著性差异,经调整以使用Benjamini-Hochberg校正进行多重比较。

[0461] j. TCGA分析

[0462] 使用用于癌症基因组学的cBioPortal(万维网地址为cbioportal.org)获得来自癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas)的基因表达数据。数据获自乳腺癌数据集“TCGA,临时性(1105个样品)”,用于在细胞周期蛋白D1扩增的肿瘤与二倍体肿瘤之间进行比较(Gao等人(2013)Sci Signal 6:第11页;Cerami等人(2012)Cancer Discov 2:401-404)。

[0463] k. RT-qPCR

[0464] 如先前在Goel等人(2016)(出处同上)中所述进行RT-qPCR。用于qPCR的引物序列如下:Ifng(小鼠)正向:5'-ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC-3'(SEQ ID NO:10);反向:5'-CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC-3'(SEQ ID NO:11)。Tap1(小鼠)正向:5'-GGA CTT GCC TTG TTC CGA GAG-3'(SEQ ID NO:12);反向:5'-GCT GCC ACA TAA CTG ATA GCG A-3'(SEQ ID NO:13)。Tap2(小鼠)正向:5'-CTG GCG GAC ATG GCT TTA CTT-3'(SEQ ID NO:14);反向:5'-CTC CCA CTT TTA GCA GTC CCC-3'(SEQ ID NO:15)。Tapbp(小鼠)正向:5'-GGC CTG TCT AAG AAA CCT GCC-3'(SEQ ID NO:16);反向:CCA CCT TGA AGT ATA GCT TTG GG-3'(SEQ ID NO:17)。Erap1(小鼠)正向:5'-TAA TGG AGA CTC ATT CCC TTG GA-3'(SEQ ID NO:18);反向:5'-AAA GTC AGA GTG CTG AGG TTT G-3'(SEQ ID NO:19)。Nlrc5(小鼠)正向:5'-GCT GAG AGC ATC CGA CTG AAC-3'(SEQ ID NO:20);反向:5'-AGG TAC ATC AAG CTC GAA GCA-3'(SEQ ID NO:21)。I16(小鼠)正向:5'-TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC-3'(SEQ ID NO:22);反向:5'-TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC-3'(SEQ ID NO:23)。B2M(人)正向:5'-GAG GCT ATC CAG CGT ACT CCA-3'(SEQ ID NO:24);反向:5'-CGG CAG GCA TAC

TCA TCT TTT-3' (SEQ ID NO:25)。HLA-A(人)正向:5' -ACC CTC GTC CTG CTA CTC TC-3' (SEQ ID NO:26);反向:5' -CTG TCT CCT CGT CCC AAT ACT-3' (SEQ ID NO:27)。HLA-B(人)正向:5' -CAG TTC GTG AGG TTC GAC AG-3' (SEQ ID NO:28);反向:5' -CAG CCG TAC ATG CTC TGG A-3' (SEQ ID NO:29)。HLA-C(人)正向:5' -GGA CAA GAG CAG AGA TAC ACG-3' (SEQ ID NO:30);反向:5' -CAA GGA CAG CTA GGA CAA CC-3' (SEQ ID NO:31)。STAT1(人)正向:5' -CAG CTT GAC TCA AAA TTC CTG GA-3' (SEQ ID NO:32);反向5' -TGA AGA TTA CGC TTG CTT TTC CT-3' (SEQ ID NO:33)。IL6(人)正向:5' -ACT CAC CTC TTC AGA ACG AAT TG-3' (SEQ ID NO:34);反向:5' -CCA TCT TTG GAA GGT TCA GGT TG-3' (SEQ ID NO:35)。通过计算感兴趣基因相对于GAPDH或HSP90AB1(人)或Actb(小鼠)的倍数变化差异,来确定每个样品的相对拷贝数。qPCR在Applied Biosystems 7300机器上进行。

[0465] 1. 流式细胞术

[0466] 肿瘤细胞系-在胰蛋白酶消化之后对细胞计数,取每种条件下的1百万个细胞,在冰上用在PBS (Hyclone)加2%FBS (Life Technologies)中稀释的适当抗体染色30分钟。针对每种条件进行匹配荧光减一(FMO)染色,作为对照。

[0467] 血液-在实验期间的中间时间点通过眶后采样以及在实验终点通过心脏穿刺来获得血液。通过在4℃下以1,500xg离心8分钟,来分离血细胞和血浆。在RBC裂解(PharmLyse, BD Biosciences)后,在冰上用抗CD16/32(Biolegend, San Diego, CA)将血细胞封闭20分钟。在冰上将细胞与适当的抗体一起温育30分钟。

[0468] 脾脏和胸腺-在机械消化和RBC裂解后,在冰上用抗CD16/32将单细胞悬液封闭20分钟。在冰上将细胞与适当的抗体一起温育30分钟。

[0469] 淋巴结-在机械消化后,在冰上用抗CD16/32将单细胞悬液封闭20分钟。在冰上将细胞与适当的抗体一起温育30分钟。

[0470] 肿瘤-首先通过切碎以机械方式破坏肿瘤,然后在37℃下伴随搅拌在解离缓冲液(2mg/mL IV型胶原酶(Worthington Biochemical, Lakewood, NJ), 0.02mg/mL脱氧核糖核酸酶(Sigma Aldrich)于含有5%FBS (Life Technologies)、PenStrep (Hyclone)的DMEM (Life Technologies)中)中化学消化45分钟。在RBC裂解后,在冰上用抗CD16/32将单细胞悬液封闭20分钟。然后,在冰上将细胞与适当的抗体一起温育30分钟。

[0471] 用于流式细胞术的鼠抗体包括识别CD45(克隆30-F11)、CD3(克隆145-2C11)、CD8(克隆53-6.7)、CD4(克隆RM4-5)、PD-1(克隆29F.1A12)、Tim-3(克隆RMT3-23)、CTLA-4(克隆UC10-4B9)、LAG-3(克隆C9B7W)、B220(克隆RA3-6B2)、NK1.1(克隆PK136)、CD11b(克隆M1/70)、Ly6G(克隆1A8)、Ly6C(克隆AL-21)、FoxP3(克隆FJK-16s)和Ki-67(克隆16A8)的那些抗体。用于流式细胞术的人抗体是识别β2-微球蛋白(克隆2M2)和HLA-A、B、C(克隆W6/32)的那些抗体。抗体都购自Biolegend,除了抗FoxP3购自eBioscience并且抗Ly6C购自BD Pharmingen之外。用于流式细胞术的所有抗体直接与荧光团缀合。根据制造商的说明,将抗小鼠/大鼠FoxP3染色组(eBioscience)用于细胞内染色。使用7AAD来区分活细胞/死细胞,除了当使用eFluor[®] 450可固定的活力染料(eBioscience)或Zombie Yellow[™]可固定的活力染料(Biolegend)时分析需要细胞内染色之外。为了确定样品中细胞的绝对数量,添加了CountBright[™]绝对计数珠(Molecular Probes, ThermoFisher)。在LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA)或FACSCANTOII (BD Biosciences)上进行流式细胞术,并使用FlowJo[®]

(TreeStar) 分析数据。

[0472] m. CD8 T细胞细胞毒性测定

[0473] 如先前在Goel等人(2016)(出处同上)中所述分离原发性肿瘤细胞,然后在培养基中用DMSO或玻玛西尼(500nM)处理7天。使用MACS CD8a微珠试剂盒(Miltenyi Biotec, Cambridge, MA),使用**autoMACS[®] Pro**分离器通过阳性选择从负荷MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤的小鼠的脾脏和淋巴结中分离CD8+T细胞。用CFSE(Biolegend)标记肿瘤细胞,然后将 1×10^4 个肿瘤细胞与CD8+T细胞以指定的比率在37°C下共培养4小时。通过流式细胞术对活CFSE+肿瘤细胞定量,并且相对于在不存在CD8+T细胞的情况下培养的肿瘤细胞计算存活百分比。

[0474] n. p16过表达

[0475] 通过根据制造商的说明,使用Lipofectamine[™]3000(ThermoFisher)瞬时转染pBabepuro3-p16Flag(Addgene, Cambridge, MA, 目录号24934)来在MDA-MB-453细胞和BT464细胞中表达p16。转染后72小时,在嘌呤霉素中选择细胞48小时。通过抗FLAG蛋白质印迹证实p16过表达。

[0476] o. ELISA

[0477] 用DMSO或玻玛西尼(500nM)将细胞处理7天。在最后24小时,将培养基替换为无血清培养基。在使用**Amicon[®] Ultra**离心过滤器(Millipore, Billerica, MA)将条件培养基浓缩后,根据制造商的建议使用以下试剂盒分析细胞因子:人IFN γ ELISA Ready-**SET-Go!**[®](Affymetrix eBioscience)、人TNF α ELISA Ready-**SET-Go!**[®](Affymetrix eBioscience)、Verikine人IFN α ELISA试剂盒(PBL assay science, Piscataway, NJ)、VeriKine-HS人IFN β 血清ELISA试剂盒(PBL assay science)、人IL-28B quantikine ELISA试剂盒(R&D Systems, Minneapolis, MN)、人IL-28A DuoSet ELISA(R&D Systems)和人IL-29 DuoSet ELISA(R&D Systems)。根据制造商关于从无肿瘤小鼠或荷瘤小鼠分离的血浆的说明进行抗ANA和抗dsDNA ELISA(Alpha Diagnostic, San Antonio, TX)。使用Gen5[™]软件在Synergy[™]Neo读板机(BioTek, Winooski, VT)上测量吸光度。

[0478] p. 干扰素中和实验

[0479] 对于所有中和实验,用DMSO或玻玛西尼(500nM)将细胞系处理7天。在药物处理的整个持续期间应用中和抗体,且包括IFN- γ 中和抗体(1 μ g/mL, R&D Systems)和IFN- α 中和抗体(2.0至2.5 μ g/mL, R&D Systems)。使用重组人IFN- γ (Peprotech, Rocky Hill, NJ; 250pg/mL)和IFN- α (Life Technologies, Carlsbad, CA; 250pg/mL)确定这些抗体成功中和,并在收集蛋白质之前施用24小时。

[0480] q. 多柔比星诱导的衰老

[0481] 用多柔比星(Sigma Aldrich, 200nM)处理MDA-MB-453细胞和BT474细胞24小时的时间段。然后在处理后将细胞在新鲜培养基中培养72小时,并提取RNA用于qPCR。

[0482] r. 体外调节性T细胞分化

[0483] 使用**autoMACS[®] Pro**分离器,通过CD4+CD25+调节性T细胞试剂盒(Miltenyi Biotec)从首次用于实验的FVB小鼠的脾脏和淋巴结分离CD4+CD25-T细胞,并在T细胞培养基(含有10%FBS和 β -巯基乙醇(55nM, Life Technologies)与CD3/CD28 Dynabeads(细胞:

珠粒的比率为1:1, ThermoFisher)、100U/mL rhIL-2 (Peprotech)、+/-25ng/mL rhTGF- β (R&D Systems) 和DMSO或玻玛西尼 (125至1000nM) 的RPMI) 中培养72小时。通过FoxP3的细胞内流式细胞术确定每种条件的分化百分比。计算在每种条件下添加rhTGF- β 引起的分化百分比的倍数变化。将分化百分比形式的所有倍数变化标准化为DMSO对照。

[0484] s. 体外T细胞增殖

[0485] 通过CD4+CD25+调节性T细胞试剂盒 (Miltenyl Biotec) 从首次用于实验的FVB小鼠的脾脏和淋巴结分离CD4+CD25-T细胞和CD4+CD25+T细胞;通过CD8a+T细胞分离试剂盒 (Miltenyl Biotec) 分离CD8+T细胞。将分离的T细胞重悬于含有5%FBS的RPMI (ATCC) 中, 室温下在黑暗中用5 μ M CFSE (Biolegend) 标记10分钟, 然后在含有5%FBS的10x体积的PBS (Hyclone) 中洗涤两次。将1 x 10⁵个细胞在含有CD3/CD28珠粒 (细胞与珠粒的比率为1:1)、100U/mL rhIL-2和DMSO或玻玛西尼 (250或500nM) 的T细胞培养基中在37°C下培养72小时。在终点通过流式细胞术分析CFSE稀释度。

[0486] t. 统计分析

[0487] 对于每个实验, 如附图图例中所述进行统计分析。所有统计检验都是双侧检验。所有数据均表示为平均值 \pm SD。在p值小于或等于0.05时, 差异被认为具有统计学显著性。

[0488] 实施例2: CDK4/6抑制触发乳腺癌的免疫清除

[0489] 细胞周期蛋白依赖性激酶4和6 (CDK4/6) 的药理学抑制剂已经显示出针对各种实体肿瘤的显著活性。尽管CDK4/6抑制剂主要诱导细胞周期停滞但不诱导细胞凋亡, 但在患者亚群中看到了肿瘤消退。在本文提供的实施例中, 使用乳腺癌的鼠模型来示出, 选择性CDK4/6抑制剂 (诸如目前处于临床开发中的那些) 通过促进抗肿瘤免疫应答来引起肿瘤消退。这种抗肿瘤免疫通过但不限于至少两种机制发生: (i) Rb/E2F介导的对肿瘤细胞DNA甲基转移酶1表达的阻抑, 其触发干扰素敏感性基因表达, 从而导致增强的抗原呈递, 和(ii) 对调节性T细胞增殖的抑制, 其由阻抑DNA甲基转移酶1在Treg中的表达和随之抑制它们的增殖而引起。总的来说, 这些作用促进细胞毒性T细胞介导的肿瘤细胞清除, 这可以通过添加免疫检查点阻断来进一步增强。本文所述的结果指示CDK4/6抑制剂增加肿瘤免疫原性, 并提出包含CDK4/6抑制剂和免疫疗法的新组合方案作为抗癌治疗。

[0490] 实施例3: CDK4/6抑制剂增强抗原呈递

[0491] 如Goel等人 (2016) (出处同上) 中所述, 使用乳腺癌的MMTV-rtTA/tet0-HER2转基因小鼠模型测试CDK4/6抑制的体内影响。向成年雌性MMTV-rtTA/tet0-HER2小鼠施用多西环素导致人ERBB2致癌基因的乳腺特异性表达和乳腺癌发展具有100%外显率。重要的是, 来源于MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤的细胞保留Rb表达并响应于CDK4/6抑制而经历细胞周期停滞 (Goel等人 (2016), 出处同上)。在三个独立实验的每一个中, 玻玛西尼引起在开始治疗之前正在生长的大体积肿瘤消退, 这通过在12天终点处肿瘤体积平均减小40%证实 (图1A)。在治疗的肿瘤中, 肿瘤细胞增殖显著减少 (图2A), 并且E2F转录因子以及S期和G2/M相关基因的基因表达也显著减少 (图2B至图2D)。

[0492] 在用玻玛西尼或媒介物治疗12天后, 在MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤组织中测量一组3,826个癌症相关基因的表达谱 (图1B)。使用基因本体论 (GO) 和基因集富集分析 (GSEA) 两者来比较转录组谱。因此, 由玻玛西尼显著下调的基因在与细胞周期、有丝分裂和E2F靶标有关的GO条目和GSEA条目之内富集 (图1C和图3A至图3B)。引人注目的是, 只有两个GO过

程条目显著富集了由玻玛西尼上调的基因：“抗原加工和肽抗原的呈递”和“抗原加工和呈递”（图1C）。具体地讲，编码鼠主要组织相容性复合物（MHC）I类分子的组分的基因在用玻玛西尼治疗的肿瘤中上调（例如，MHC I类基因H2d1和H2k1，以及 β -2微球蛋白B2m）（图1D）。同样地，指导肽切割的基因（例如，氨肽酶Erap1）、指导肽转运的基因（例如，与抗原加工相关联的转运体Tap1和Tap2）和指导转运体-MHC相互作用的基因（例如，tapasin、Tapbp）也由玻玛西尼显著上调（图1E）。

[0493] 为了确定CDK4/6抑制是否直接诱导肿瘤细胞表达抗原肽加工和呈递基因，用DMSO或玻玛西尼在体外将两种乳腺癌细胞系（MDA-MB-453和MDA-MB-361）处理7天，然后测量B2M、HLA-A、HLA-B、HLA-C、TAP1、TAP2、TAPBP、ERAP1和ERAP2的表达。与体内结果相符，除了HLA-B（其在MDA-MB-361细胞中不表达）之外，所有这些基因在两种细胞系中都被上调（图1F）。帕博西尼治疗产生类似的结果（图3C）。另外，用任一种抑制剂处理7天增加了B2M和MHC I类蛋白在肿瘤细胞表面的表达（图1G）。为了探索这些发现的功能性结果，用DMSO或玻玛西尼离体处理原代MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤细胞7天。用玻玛西尼处理的细胞显示出被来源于MMTV-rtTA/tet0-HER2小鼠的CD8+T细胞杀伤的更大敏感性（图1H）。

[0494] 测试了玻玛西尼对肿瘤细胞凋亡的直接作用，以确定这是否可能促成了观察到的肿瘤消退。用DMSO或玻玛西尼在体外将三种乳腺癌细胞系（MDA-MB-453、MDA-MB-361和BT474）处理11天的时间段（图4A）。在此期间细胞增殖被完全阻抑。然而，细胞数量得以维持，并且细胞没有表现出细胞凋亡的形态学特征（图4A至图4B）。观察到细胞扩增和 β -半乳糖苷酶活性增加，代表衰老表型（图4B），这与其他报道一致（Choi等人（2012），出处同上；Vora等人（2014），出处同上；Goel等人（2016），出处同上；Puyol等人（2010），出处同上；Witkiewicz等人（2014），出处同上）。有趣的是，细胞衰老一直以来都与细胞凋亡抗性相关联（Campisi和di Fagagna（2007）*Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:729-740）。在该研究中，玻玛西尼始终减少肿瘤细胞中的聚ADP核糖聚合酶切割并阻抑其对星形孢菌素的细胞凋亡应答（图4C至图4D）。因此，CDK4/6抑制剂不直接诱导肿瘤细胞的凋亡，但确实增强了它们对T细胞介导的细胞毒性的敏感性。

[0495] 对来自癌症基因组图谱（TCGA）的基因表达数据的分析（例如，参见Cerami等人（2012）*Cancer Discov* 2:401-404；Gao等人（2013）*Science Signaling* 6:11）揭示，具有细胞周期蛋白D1扩增（用于增强CDK4/6活性的机制）的乳腺癌显示出比非扩增对照显著降低的TAP2、HLA-A、HLA-B和HLA-C的表达（图1I）。这些关联表明，细胞周期蛋白D:CDK4/6-Rb-E2F轴的活性阻抑肿瘤细胞抗原加工和呈递。

[0496] 实施例4:CDK4/6抑制诱导干扰素信号传导

[0497] 对用玻玛西尼或DMSO处理7天的乳腺癌细胞系进行全基因组转录组学分析。在用玻玛西尼处理的MDA-MB-453细胞中富集被上调基因的排在前列的GO过程条目均涉及干扰素信号传导和对病毒的细胞防御应答，包括几种MHC I类基因（图5A）。类似地，MDA-MB-361细胞的排在最前列的条目与免疫应答、防御应答和干扰素介导的信号传导有关（图5A）。几种干扰素敏感性转录因子（STAT1、STAT2、IRF2、IRF6和IRF9）在两种细胞系中被上调的倍数都大于2倍（图5B）。这些因子中的多种激活MHC I类基因和编码肽加工机制的基因的表达（van den Elsen（2011）*Front Immunol* 2:48）。此外，MHC I类转录的主调节因子NLRC5在MDA-MB-453细胞中被上调（图6A）（也参见Meissner等人（2010）*Proc Natl Acad Sci*

USA107:13794-13799)。与干扰素驱动的转录程序的全局上调一致,其他几种干扰素敏感性基因(ISG)(OAS1、OAS2、IFIT1、IFIT2、IFIT6、BST2、SP100、RSAD2)的表达明显增强(图5C)。在蛋白质水平上,在用玻玛西尼处理后,两种细胞系中的磷酸化STAT1和总STAT1(干扰素信号传导的关键介导因子)均增加(图5D)。重要的是,这些变化可能是CDK4/6抑制剂的“在靶(on-target)”作用,因为内源性CDK4/6抑制剂CDKN2A(编码p16^{INK4a})的强制过表达也导致STAT1、B2M和MHC I类基因的表达增加(图6B)。

[0498] 与体外的发现相符,在用玻玛西尼处理后MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤组织中上调的基因富集GSEA条目“同种异体移植排斥”、“干扰素 α 应答”和“干扰素 γ 应答”(图6C)。具体地讲,玻玛西尼处理显著地增加了干扰素应答性转录因子Stat1、Stat2、Irf7和Nlrc5的表达(图5E),以及干扰素诱导型T细胞化学引诱物Cxc19、Cxc110和Cxc111的表达(图6D)。其他转录因子(Irf8、Irf9)未显著增加(图5E)。另外,肿瘤的免疫荧光染色揭示,用玻玛西尼处理的队列的肿瘤细胞内STAT1蛋白显著增加(图5F)。许多其他的ISG在玻玛西尼处理后在体内过表达,包括参与淋巴细胞粘附和共刺激的那些(Icam1和Vcam1)(图6E)。STAT1或NLRC5(两者都作为经由MHC I类的抗原呈递的调节因子)的体内表达水平与H2d1、H2d1、Tap1、Tap2和Tapbp的水平紧密相关(图6F)。因此,CDK4/6抑制直接诱导肿瘤细胞中一连串ISG的表达,这解释了它们的抗原呈递能力增强的原因。

[0499] 实施例5:与DNMT1阻抑相关联的干扰素信号传导

[0500] 有趣的是,在用玻玛西尼处理的肿瘤细胞的条件培养基中未检测到干扰素 α 、 β 和 γ 中的任一者。类似地,如通过STAT1 mRNA以及磷酸化STAT1蛋白和总STAT1蛋白所测量的,针对干扰素 α 和干扰素 γ 的中和抗体没有减轻用玻玛西尼处理的细胞中的干扰素信号传导(图7A至图7C)。相反,在玻玛西尼处理之后,肿瘤细胞条件培养基中的III型干扰素水平显著增加。在MDA-MB-453细胞中,玻玛西尼在mRNA和蛋白质这两种水平上均增加了IL-29、IL-28a和IL-28b(即,分别为IFN- λ 1、IFN- λ 2和IFN- λ 3)的产生(图7D和图8A)。类似地,玻玛西尼增加了MDA-MB-361条件培养基中的IL-29和IL-28b水平(未检测到IL-28a)(图8B)。Janus激酶(JAK)在干扰素受体的配体依赖性激活之后介导细胞内信号传导(Parker等人(2010) *Nat Rev Cancer* 16:131-144)。在该研究中,JAK抑制剂鲁索替尼完全减轻了肿瘤细胞中由玻玛西尼诱导的p-STAT1水平和总STAT1水平的增加(图8C)。总的来说,这些数据表明CDK4/6抑制增加了肿瘤细胞产生的III型干扰素,从而以自分泌方式驱动ISG表达。

[0501] 最近已经证实,肿瘤细胞干扰素信号传导经由III型干扰素产生而增加是作为DNA脱甲基化剂(诸如5-氮杂胞苷)抑制DNA甲基转移酶(DNMT)的结果而出现的(Roulois等人(2015) *Cell* 162:961-973)。在这种背景下,抑制DNMT减少了内源性逆转录病毒基因(ERV)的甲基化,触发了“病毒拟态”,从而引发了双链RNA(dsRNA)应答。这继而又触发了III型干扰素的产生,从而激活了许多ISG的表达(Roulois等人(2015),出处同上)。值得注意的是,哺乳动物的主要DNMT(DNMT1)也是真正的E2F靶标基因,并且CDK4/6酶活性可以以Rb-E2F依赖性方式增强DNMT1基因表达(Kimura等人(2003) *Nucleic Acids Res* 31:3101-3113)。引人注目的是,用玻玛西尼处理明显且迅速地使肿瘤细胞的DNMT1表达下降(图8D)。其他DNMT要么具有非常低的表达水平(例如,TRDMT1和DNMT3B),要么用玻玛西尼处理后表达水平没有变化(DNMT3A)(图7E)。玻玛西尼疗法还降低了MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤组织中的Dnmt1表达(图8E)。与先前在Roulois等人(2015)(出处同上)和Chiappinelli等人(2015) *Cell*

162:974-986中的研究相符, DNMT1的减少与ERV3-1 (在两种细胞系中) 和ERVK13-1 (在MDA-MB-361细胞中) 的表达增加相关联(图7F)。另外, 在玻玛西尼处理7天后, 两种细胞系中的dsRNA RIG-1 (由DDX58编码)、LGP2 (由DHX58编码) 和MDA5 (由IFIH1编码) 的模式识别受体的表达都显著增加, 表明了相关联的dsRNA应答(图8F)。

[0502] 总的来说, 这些数据指示CDK4/6抑制剂疗法降低肿瘤细胞DNMT1表达, 其与增强的ERV表达、dsRNA应答和III型干扰素分泌相关联。因此, 多种ISG表达, 从而增强了抗原呈递。

[0503] 在某些情况下, 衰老相关分泌表型(SASP)也可以促进免疫应答(Coppe等人(2010) Annu Rev Pathol 5:99-118;Xue等人(2007) Nature 445:656-60;Iannello等人(2013) J.Exp.Med.210:2057-2069)。因此, 鉴于玻玛西尼在体外和体内都增加了 β -半乳糖苷酶(图4B和图9A), 寻找了SASP的证据。在玻玛西尼处理后, 主要SASP因子I1-6、I1-1a和I1-1b的表达没有显著增加(图9B至图9C, 和表2)。另外, 更大一组SASP基因的表达分析未显示大多数白细胞趋化因子的变化(表2)。相比之下, 用多柔比星处理肿瘤细胞增加了 β -半乳糖苷酶和白介素-6的表达(图9D), 这与SASP对DNA损伤应答相关衰老具有特异性的观点相符(Coppe等人(2010), 出处同上)。

[0504] 表2: SASP基因在癌细胞和肿瘤中的相对表达

[0505] A. 在玻玛西尼或DMSO处理之后MDA-MB-453细胞中的基因表达

	SASP 基因(任何样品都有大于 20 个读数)	倍数变化(玻玛西尼对比 DMSO 处理)	p 值(未经调整)
	<i>COL18A1</i>	2.14308977	0.628025454
	<i>COL1A1</i>	0.751952379	0.284665275
	<i>CTSB</i>	1.319906094	0.182089524
	<i>EGF</i>	10.38537043	0.034033282
[0506]	<i>EGFR</i>	1.755402285	0.210308062
	<i>ICAM1</i>	2.077293749	0.073024515
	<i>IGFBP3</i>	1.462780156	0.046471908
	<i>IGFBP4</i>	0.496123198	0.057239164
	<i>IGFBP5</i>	1.566771836	0.395853593
	<i>KITLG</i>	1.643409803	0.182654202
	<i>LAMA5</i>	1.681302802	0.024009926
	<i>LAMB1</i>	0.494157967	0.010990484
	<i>LAMB2</i>	3.347286734	0.018753777
	<i>LAMB3</i>	1.547544086	0.426166051
[0507]	<i>LAMC1</i>	2.374592887	0.179689152
	<i>MMP13</i>	6.371474851	0.039579357
	<i>TIMP1</i>	1.75601697	0.169899825
	<i>TNFRSF1A</i>	0.955267238	0.659083377
	<i>VEGFA</i>	2.228713975	0.006925791

[0508] *所有测试的SASP基因包括: ANG、AREG、CCL1、CCL11、CCL13、CCL16、CCL2、CCL20、CCL25、CCL26、CCL3、CCL8、COL10A1、COL11A1、COL18A1、COL1A1、COL1A2、COL2A1、COL3A1、COL4A1、COL4A2、COL4A3、COL5A1、COL5A2、COL6A1、COL8A2、COL9A1、CSF2、CSF3、CTSB、CXCL1、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL2、CXCL3、CXCL5、EGF、EGFR、EREG、FAS、FGF2、FGF7、FN1、HGF、ICAM1、ICAM3、IFNG、IGF2BP2、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP5、IGFBP6、IGFBP7、IL13、IL15、IL1A、

IL1B、IL6、IL6ST、IL7、IL8、KITLG、LAMA1、LAMA2、LAMA3、LAMA5、LAMB1、LAMB2、LAMB3、LAMC1、MMP10、MMP12、MMP13、MMP14、MMP3、NGF、NOS2、NOS3、NRG1、PGF、PLAT、PLAU、PLAUR、SERPINB2、SERPINE1、TIMP1、TIMP2、TNFRSF10C、TNFRSF11B、TNFRSF1A、TNFRSF1B和VEGFA。

[0509] B. 在玻玛西尼或DMSO处理之后MDA-MB-361细胞中的基因表达

SASP 基因(任何样品都有大于 20 个读数)	倍数变化(玻玛西尼对比 DMSO 处理)	p 值(未经调整)
<i>AREG</i>	0.626681127	0.055284433
<i>COL18A1</i>	1.571857267	0.137385603
<i>COL1A1</i>	1.170036717	0.339197062
<i>COL5A1</i>	1.560837456	0.324326246
[0510] <i>COL6A1</i>	1.332350379	0.335634375
<i>COL9A1</i>	1.225731662	0.978083889
<i>CTSB</i>	1.780801304	0.016081846
<i>CXCL12</i>	1.443999821	0.0448026
<i>EGF</i>	1.385812746	0.037825211
<i>EGFR</i>	0.75992877	0.013259226
<i>FN1</i>	0.195639358	5.05426E-05
<i>IGFBP3</i>	7.090709478	0.000101921
<i>IGFBP4</i>	1.45606665	0.040802808
<i>IGFBP5</i>	3.815824804	0.000249738
<i>IL6ST</i>	1.449500336	0.13771422
<i>IL8</i>	0.159803453	0.007373674
<i>KITLG</i>	2.541006002	0.004782748
<i>LAMA3</i>	1.243734528	0.455981486
[0511] <i>LAMA5</i>	1.348551162	0.038245301
<i>LAMB1</i>	1.197727245	0.494121669
<i>LAMB2</i>	2.455238241	0.017673056
<i>LAMB3</i>	1.996357064	6.94597E-05
<i>LAMC1</i>	1.778403907	0.000667982
<i>TIMP1</i>	2.287394858	0.064456848
<i>TIMP2</i>	0.625109788	0.083216225
<i>TNFRSF1A</i>	1.098767024	0.713927362
<i>VEGFA</i>	1.552414463	0.008613273

[0512] *所有测试的SASP基因包括:ANG、AREG、CCL1、CCL11、CCL13、CCL16、CCL2、CCL20、CCL25、CCL26、CCL3、CCL8、COL10A1、COL11A1、COL18A1、COL1A1、COL1A2、COL2A1、COL3A1、COL4A1、COL4A2、COL4A3、COL5A1、COL5A2、COL6A1、COL8A2、COL9A1、CSF2、CSF3、CTSB、CXCL1、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL2、CXCL3、CXCL5、EGF、EGFR、EREG、FAS、FGF2、FGF7、FN1、HGF、ICAM1、ICAM3、IFNG、IGF2BP2、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP5、IGFBP6、IGFBP7、IL13、IL15、IL1A、IL1B、IL6、IL6ST、IL7、IL8、KITLG、LAMA1、LAMA2、LAMA3、LAMA5、LAMB1、LAMB2、LAMB3、LAMC1、MMP10、MMP12、MMP13、MMP14、MMP3、NGF、NOS2、NOS3、NRG1、PGF、PLAT、PLAU、PLAUR、SERPINB2、SERPINE1、TIMP1、TIMP2、TNFRSF10C、TNFRSF11B、TNFRSF1A、TNFRSF1B和VEGFA。

[0513] C. 在玻玛西尼或DMSO处理之后MMTV-HER2肿瘤中的基因表达

	SASP 基因(任何样品都有大于 20 个读数)	倍数变化(玻璃西尼对比 DMSO 处理)	p 值(未经调整)
[0514]	<i>ANG</i>	1.225676662	0.474729975
	<i>CCL11</i>	1.355312179	0.176746265
	<i>CCL2</i>	1.984494667	0.252633898
	<i>CCL20</i>	0.884611074	0.655722436
	<i>CCL25</i>	1.158704207	0.326603365
	<i>CCL3</i>	1.482799881	0.056400123
	<i>CCL8</i>	1.138102405	0.649419739
	<i>COL10A1</i>	0.798950747	0.443540357
	<i>COL11A1</i>	0.681068162	0.003866833
	<i>COL18A1</i>	0.885686324	0.531802755
	<i>COL1A1</i>	1.206588482	0.522569179
	<i>COL1A2</i>	1.245276214	0.543604777
	<i>COL2A1</i>	1.183695134	0.82897355
	<i>COL3A1</i>	0.875849254	0.596687343
	<i>COL4A1</i>	0.792593409	0.089654835
	<i>COL4A2</i>	0.908381442	0.428483522
	<i>COL5A1</i>	0.845559755	0.420192783
	<i>COL5A2</i>	1.155414641	0.409434479
	<i>COL6A1</i>	0.974265193	0.873783785
	<i>CSF3</i>	0.927908765	0.761531034
	<i>CTSB</i>	1.237377178	0.014910104
	<i>CXCL1</i>	0.909178034	0.70556841
	<i>CXCL11</i>	16.38413114	0.234032762
	<i>CXCL12</i>	0.808561619	0.263019649
	<i>CXCL2</i>	1.863609232	0.006107586
	<i>CXCL3</i>	2.480880833	0.114361505
[0515]	<i>CXCL5</i>	1.274664521	0.689493076
	<i>EGFR</i>	1.039344676	0.694770476
	<i>FGF2</i>	1.08743053	0.65752356
	<i>FGF7</i>	0.659732088	0.310191313
	<i>FNI</i>	1.00762147	0.973856619
	<i>HGF</i>	1.349975221	0.031421068
	<i>ICAM1</i>	1.287020321	0.04224503
	<i>IGF2BP2</i>	2.002130473	0.149443123
	<i>IGFBP3</i>	0.727825291	0.113465842
	<i>IGFBP4</i>	0.935344589	0.725841333
	<i>IGFBP5</i>	0.842654986	0.12693988
	<i>IGFBP6</i>	1.084334646	0.737734135
	<i>IGFBP7</i>	0.922164284	0.61510165
	<i>IL15</i>	0.868151561	0.379574856
	<i>IL1A</i>	1.433442413	0.362976826
	<i>IL1B</i>	0.619676155	0.076968622
	<i>IL6ST</i>	1.072873755	0.341378727
	<i>IL7</i>	0.741403367	0.230754151
	<i>LAMA1</i>	0.907453157	0.576504871
	<i>LAMA2</i>	1.808202824	0.023997141
	<i>LAMA3</i>	1.061209015	0.826995245
	<i>LAMA5</i>	0.81881378	0.29454451
	<i>LAMB1</i>	1.027980171	0.887586172
	<i>LAMB2</i>	0.900448643	0.146759198
	<i>LAMB3</i>	0.918256879	0.49400467

	<i>LAMC1</i>	0.887640499	0.333522302
	<i>MIF</i>	0.821602736	0.177271457
	<i>MMP10</i>	1.444959346	0.218881103
	<i>MMP12</i>	1.308150612	0.274337613
	<i>MMP13</i>	2.388118846	0.026331234
	<i>MMP14</i>	1.088668452	0.663022658
	<i>MMP3</i>	2.887064187	0.001332675
	<i>NGF</i>	1.188905392	0.772140802
	<i>NOS2</i>	1.661114766	0.491573439
	<i>NOS3</i>	0.972162007	0.886022832
	<i>NRG1</i>	1.497982399	0.210363913
[0516]	<i>PGF</i>	0.678750771	0.060194457
	<i>PLAT</i>	1.242634169	0.334934406
	<i>PLAU</i>	1.237701789	0.359306964
	<i>PLAUR</i>	1.507013674	0.178174041
	<i>SERPINB2</i>	11.99781166	0.102304859
	<i>SERPINE1</i>	1.231163282	0.347113673
	<i>TIMP1</i>	1.270977274	0.420901109
	<i>TIMP2</i>	1.094449422	0.348606893
	<i>TNFRSF11B</i>	0.88031306	0.649191827
	<i>TNFRSF1A</i>	0.958456528	0.547887704
	<i>TNFRSF1B</i>	1.195587742	0.097096191
	<i>VEGFA</i>	0.874723947	0.596983024

[0517] *所有测试的SASP基因包括:ANG、AREG、CCL1、CCL11、CCL2、CCL20、CCL25、CCL26、CCL3、CCL8、COL10A1、COL11A1、COL18A1、COL1A1、COL1A2、COL2A1、COL3A1、COL4A1、COL4A2、COL4A3、COL5A1、COL5A2、COL6A1、COL8A2、COL9A1、CSF2、CSF3、CTSB、CXCL1、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL2、CXCL3、CXCL5、EGF、EGFR、FAS、FGF2、FGF7、FN1、GENE、HGF、ICAM1、IFNG、IGF2BP2、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP5、IGFBP6、IGFBP7、IL13、IL15、IL1A、IL1B、IL6、IL6ST、IL7、LAMA1、LAMA2、LAMA3、LAMA5、LAMB1、LAMB2、LAMB3、LAMC1、MIF、MMP10、MMP12、MMP13、MMP14、MMP1A、MMP1B、MMP3、NGF、NOS2、NOS3、NRG1、PGF、PLAT、PLAU、PLAUR、SERPINB2、SERPINE1、TIMP1、TIMP2、TNFRSF11B、TNFRSF1A、TNFRSF1B和VEGFA。

[0518] *表2汇总了如通过转录组学分析确定的,相对于DMSO用玻玛西尼(500nM)处理7天的MDA-MB-453细胞(表2A)和MDA-MB-361细胞(表2B)中SASP基因的表达,或相对于媒介物用玻玛西尼处理12天的MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤(表2C)中SASP基因的表达。

[0519] 实施例6:CDK4/6抑制阻抑Treg增殖

[0520] CDK4/6抑制增强肿瘤细胞抗原呈递这一发现促使对免疫微环境进行检查。将荷瘤MMTV-rtTA/tet0-HER2小鼠用玻玛西尼或媒介物处理12天,然后对肿瘤组织执行流式细胞术。广泛的免疫分析揭示,玻玛西尼没有改变肿瘤浸润性B淋巴细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞或单核细胞的分數(图10A)。然而,引人注目的是,浸润性CD3+T细胞的数量明显且显著增加(图11A),这对CD4+群体或CD8+群体不具有特异性。此外,CD4+FOXP3+调节性T细胞(Treg)的比例显著降低(图11B),所述CD4+FOXP3+调节性T细胞是约束抗肿瘤免疫的免疫抑制性细胞群(Plitas和Rudensky(2016)Cancer Immunol Res4:721-725)。另外,在用玻玛西尼处理的情况下,Treg与CD3+细胞的肿瘤内比率降低(图11C)。

[0521] 在用玻玛西尼处理的荷瘤小鼠中观察到循环Treg的显著降低(图11D)。在无肿瘤

小鼠中,玻玛西尼和帕博西尼均显著降低脾脏和淋巴结中的Treg数量,证实了玻玛西尼的肿瘤非依赖性作用(图11E至图11F)。如通过抗核抗体(ANA)水平或抗双链DNA抗体(dsDNA)水平确定的,未检测到自身免疫性表型的相关增加(图10B)。

[0522] 对于CDK4/6抑制对胸腺中的天然Treg发育的作用,帕博西尼和玻玛西尼各自显著减小总胸腺肿块、减少未成熟的CD4+CD8+双阳性胸腺细胞,并增加CD4+或CD8+单阳性淋巴细胞的分数(图10C至图10F),这与先前关于CDK6抑制的报道相符(Malumbres等人(2004) *Cell* 118:493-504)。然而,胸腺Treg群体没有减少,这反驳天然Treg产生中存在缺陷(图10G)。类似地,在用TGF- β 刺激后,CDK4/6抑制剂没有阻止初始CD4+T细胞在体外分化为Treg(相反,存在分化增加的趋势),并且不影响Treg凋亡的速率(图10H至图10I)。

[0523] 对于CDK4/6抑制对各种T细胞群的增殖的作用,从野生型小鼠的脾脏和淋巴结分离Treg(CD4+CD25+)、CD8+T细胞和CD4+CD25-T细胞,并在体外用DMSO或玻玛西尼处理。引人注目的是,存在对Treg增殖的选择性阻抑,这在CD8+群体或CD4+CD25-群体中不明显(图11G)。从在体内用玻玛西尼处理的无肿瘤小鼠的脾脏和淋巴结分离的细胞中观察到类似的现象,由此Treg增殖被显著降低(图11H至图11I)。这些组织中的CD8+T细胞增殖也一定程度减少。然而,它们的基础增殖率(约4%Ki-67+)远低于Treg群体的基础增殖率(约20%Ki-67+)。因此,预计它们的减少对总群体的绝对影响将没有那么深远。与这些结果相符,用玻玛西尼处理显著降低了肿瘤组织内的增殖Treg的分数(图11J)。因此,CDK4/6抑制剂选择性地阻抑Treg增殖,从而导致肿瘤内具有较少的免疫阻抑性Treg。

[0524] 在其他癌症模型中也发现了CDK4/6抑制剂的类似Treg抑制。例如,在携带CT-26结肠直肠癌的小鼠中,CDK4/6抑制(例如,通过玻玛西尼)减少了肿瘤和血液中的Treg数量(图11K)。如上文所提到的,CDK4/6抑制特异性地减少了Treg而不是其他T细胞(诸如CD8+T细胞)的增殖。如图11L中所示,MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤的双重染色显示,在用玻玛西尼处理12天后Ki67+CD8+T细胞的数量没有显著减少。与之相符,CDK4/6抑制剂降低了具有MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤(图11M)或CT-26肿瘤(图11N)的小鼠中的Treg:CD8+T细胞比率。Treg:CD8+比率的这种降低是肿瘤非依赖性的,因为在用CDK4/6抑制剂处理12天后,在无肿瘤FVB小鼠的脾脏和淋巴结中发现了类似的降低(图11O)。

[0525] 另外,CDK4/6抑制(例如,通过玻玛西尼)阻抑了Treg细胞而不是其他T细胞(例如,CD4+T细胞或CD8+T细胞)中的Dnmt1表达(图11P)。这种阻抑与脾脏和淋巴结的Treg细胞中的CDKN1A表达增加相关联(图11Q)。非限制性地,图11R汇总了提出的用于阻抑CDK4/6抑制剂引起的Treg增殖的机制。

[0526] 实施例7:细胞毒性T细胞介导肿瘤消退

[0527] 鉴于经由MHC I类呈递抗原的肿瘤细胞可以被细胞毒性T淋巴细胞(CTL)识别,并且Treg通过促进CTL耗竭来阻抑CTL功效(Penalzoa-MacMaster等人(2014) *J Exp Med* 211:1905-1918; Bauer等人(2014) *J Clin Invest* 124:2425-2440),假设玻玛西尼疗法之后的肿瘤消退可能是由CTL介导的。将MMTV-rtTA/tet0-HER2肿瘤片段原位植入维持多西环素饮食的无胸腺Foxn1tm小鼠中。用玻玛西尼或媒介物治疗已形成的肿瘤。与有免疫活性小鼠中的肿瘤相反,裸鼠中用玻玛西尼治疗的肿瘤继续生长,尽管是以比用媒介物治疗的肿瘤显著更慢的速率(在三个独立实验中证实,图12A)。在任何情况下,肿瘤都没有由于用玻玛西尼治疗而消退。事实上,处理45天之后,用玻玛西尼治疗的肿瘤比植入时的5倍还大(图12A

至图12B),尽管细胞增殖被阻抑到与有免疫活性小鼠中所看到的相似的程度(图12B)。然后在施用玻玛西尼之前,用抗CD8中和抗体处理负荷MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤的小鼠。因此,肿瘤消退显著减轻(图13A和图14A)。因此,由CDK4/6抑制介导的肿瘤消退几乎完全取决于细胞毒性T淋巴细胞的存在。

[0528] 进一步支持细胞毒性CD8+T细胞在介导对CDK4/6抑制的应答中的作用,在用玻玛西尼治疗的肿瘤中的肿瘤浸润性CD8+细胞毒性T细胞显示T细胞耗竭标志物PD-1、Tim-3、CTLA-4和LAG3的细胞表面表达明显降低(图13B至图13C,以及图14B至图14E)。事实上,在任何给定的细胞毒性T细胞上检测到的抑制性受体的数量在用玻玛西尼治疗的肿瘤中较低,且超过50%的CD8+细胞不表达这些中的任一种(图13C)。更具体地,PD-1^高和PD-1+/TIM-3+细胞毒性T细胞的分数(指示耗竭的分布,如Jin等人(2010)Proc Natl Acad Sci USA 107:14733-14738中所示)显著降低,后者降低了50%(图13B和图14B)。另外,Ifng(细胞毒性T细胞的主要效应细胞因子)的mRNA水平在经治疗的大体积肿瘤组织中为4倍以上(图13D)。

[0529] CD4+T细胞还显示PD-1、TIM-3、CTLA-4和LAG-3的细胞表面表达减少。然而,只有PD-1的减少有统计学显著性(图14F至图14K)。总的来说,这些结果证实CDK4/6抑制增加肿瘤浸润性CTL的数量并降低其耗竭程度,并且这些细胞是玻玛西尼诱导肿瘤消退所必需的。

[0530] 实施例8:组合的CDK4/6抑制和检查点阻断

[0531] 鉴于玻玛西尼增加肿瘤细胞抗原呈递并诱导抗肿瘤T细胞应答,然后测试了向玻玛西尼疗法添加免疫检查点阻断是否可以进一步增强肿瘤消退。使用2 x 2随机化,用媒介物或玻玛西尼,以及对照IgG或抗PD-L1抗体治疗负荷MMTV-rtTA/tetO-HER2肿瘤的小鼠(管腔乳腺癌的一种模型)(图13E)。如初始实验所看到的,用玻玛西尼治疗的肿瘤的体积减小(在治疗的第13天平均减小35%)。采用持续时间更长的疗法时,这些肿瘤稳定下来,并且到第21天,几个肿瘤的体积再次开始增加(图13F)。与之形成鲜明对比的是,用玻玛西尼和抗PD-L1疗法的组合治疗的小鼠中的肿瘤消退程度更高(到第13天肿瘤体积平均减少70%),并且到第35天没有显示肿瘤恢复生长(图13F)。

[0532] 基于前述内容,尽管认为CDK4/6抑制剂通过诱导癌细胞周期停滞而发挥其主要的抗肿瘤作用,但是在这里,使用最近描述的和临床相关的乳腺癌转基因模型(Goel等人(2016),出处同上),本文揭示了先前未鉴定的CDK4/6抑制剂功能,即,诱导抗肿瘤免疫应答。该免疫应答是由以下两种现象的组合引起的:肿瘤细胞的抗原呈递增强,以及免疫抑制性微环境的重新编程(图13G,以及图15中汇总的数据)。

[0533] 肿瘤通过包括抗原呈递受损在内的几种机制避开免疫系统。实际上,干扰素信号传导通路和下游转录因子中的缺陷促进免疫逃避和对免疫检查点阻断的抗性(Gao等人(2016)Cell 167:397-404;Zaretsky等人(2016)N Engl J Med 375:819-829;Yoshihama等人(2016)Proc Natl Acad Sci USA 113:5999-6004)。本文显示CDK4/6抑制明显地降低E2F靶标基因DNMT1的表达,其与内源性逆转录病毒基因(ERV)的表达增加、双链RNA应答的上调和III型干扰素的产生相关联。已经描述了在直接抑制DNA甲基转移酶之后肿瘤细胞中的这种“病毒拟态”(Roulois等人(2015),出处同上;以及Chiappinelli等人(2015),出处同上),其导致ISG表达激活以及肿瘤细胞抗原呈递和肿瘤免疫原性增强(图13G)。为支持这些研究,已发现反映病毒防御程序的表达特征与黑色素瘤患者中对免疫检查点阻断的应答的持续时间相关(Chiappinelli等人(2015),出处同上)。CDK4/6抑制剂通过抑制DNMT1来抑制肿瘤

增殖并促进消退。

[0534] 在这些研究之前,尚不清楚CDK4/6抑制剂对肿瘤免疫微环境的作用。实际上,有人担忧由于T细胞周期抑制,这些剂可能使得免疫检查点疗法的效果降低(Sherr (2016) *N Engl J Med* 375:1920-1923)。然而,本文提供的结果证实,CDK4/6抑制剂对免疫微环境的多效性(即,提高抗原呈递、增加T细胞数量、减少T细胞耗竭,以及通过优先抑制增殖来减少Treg(图13G))确认它们的抗肿瘤免疫功能。

[0535] 约70%的人乳腺癌为雌激素受体阳性,其中大多数归类为具有“管腔”模式的基因表达(Parker等人(2009) *J Clin Oncol* 27:1160-1167)。管腔肿瘤通常保留Rb表达,并显示对CDK4/6抑制剂的最大临床应答(Patnaik等人(2016),出处同上;Finn等人(2009),出处同上)。重要的是,与未扩增的肿瘤相比时,患者中具有CCND1扩增的肿瘤显示出MHC I类分子的表达降低。另外,管腔肿瘤中高水平的Treg特异性地预测了不良的临床结果(Bates等人(2006) *J Clin Oncol* 24:5373-5380)。因此,据信CDK4/6抑制剂影响管腔乳腺肿瘤内免疫逃避的两种重要机制。虽然这些癌症通常对基于免疫的疗法具有非常低的应答率,但是CDK4/6抑制剂却能够通过将这些癌症从免疫“冷”转变为免疫“热”,来增强它们对免疫检查点阻断(例如,在当前研究中使用的抗PD-L1抗体)的敏感性。

[0536] 以引用方式并入

[0537] 本文提及的所有出版物、专利和专利申请据此全文以引用方式并入,如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体和单独地指出以引用方式并入一样。在冲突的情况下,以本申请(包括本文中的任何定义)为准。

[0538] 另外全文以引用方式并入的是任何多核苷酸序列和多肽序列,其参考与公共数据库中的条目相关的登录号,诸如由美国基因组研究所(TIGR)在万维网上和/或美国国家生物技术信息中心(NCBI)在万维网上维护的那些。

[0539] 等同物

[0540] 本领域技术人员将认识到或者能够使用不超过常规的实验探知本文所述的本发明具体实施方案的许多等同物。此类等同物旨在由以下权利要求涵盖。

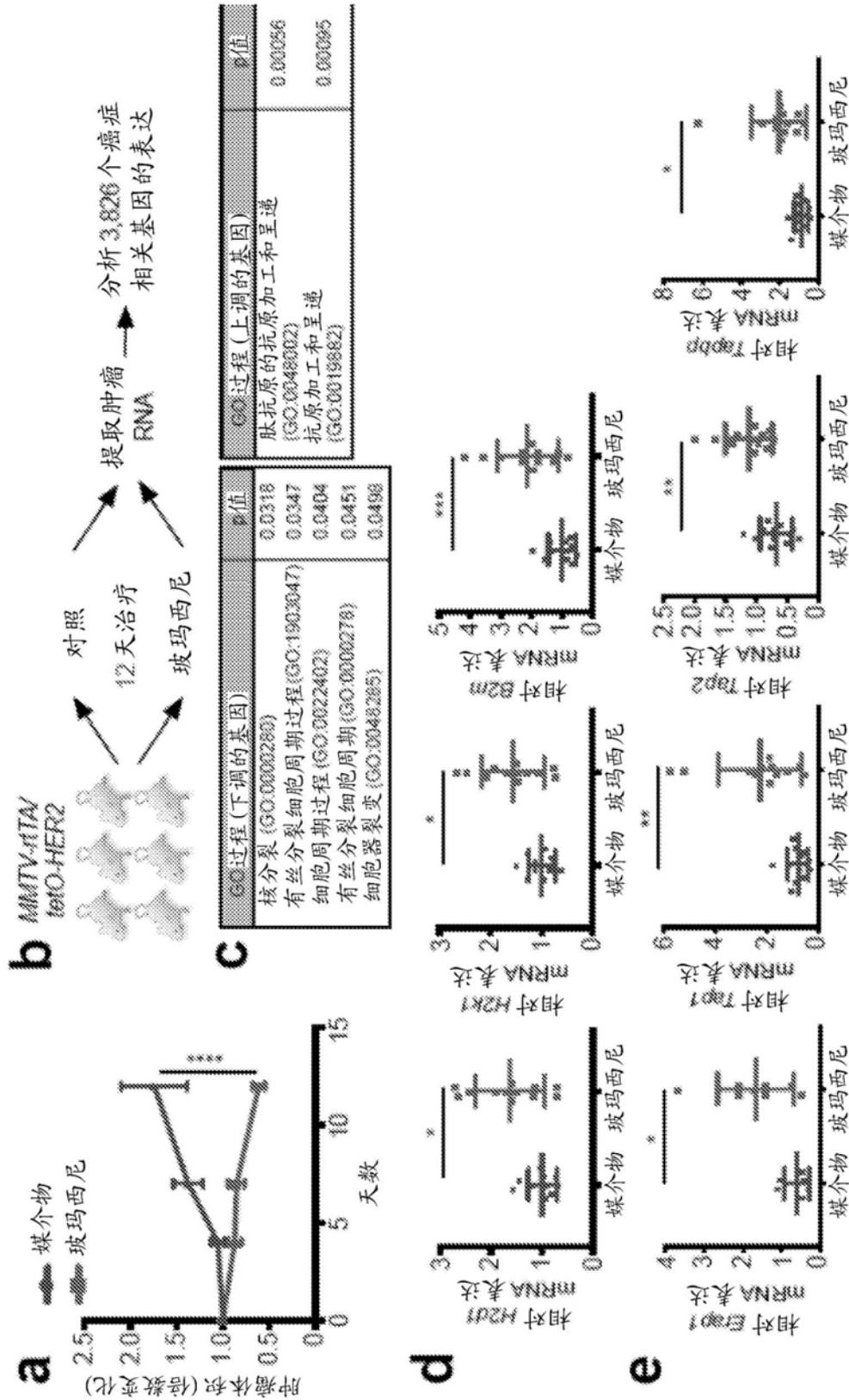


图1

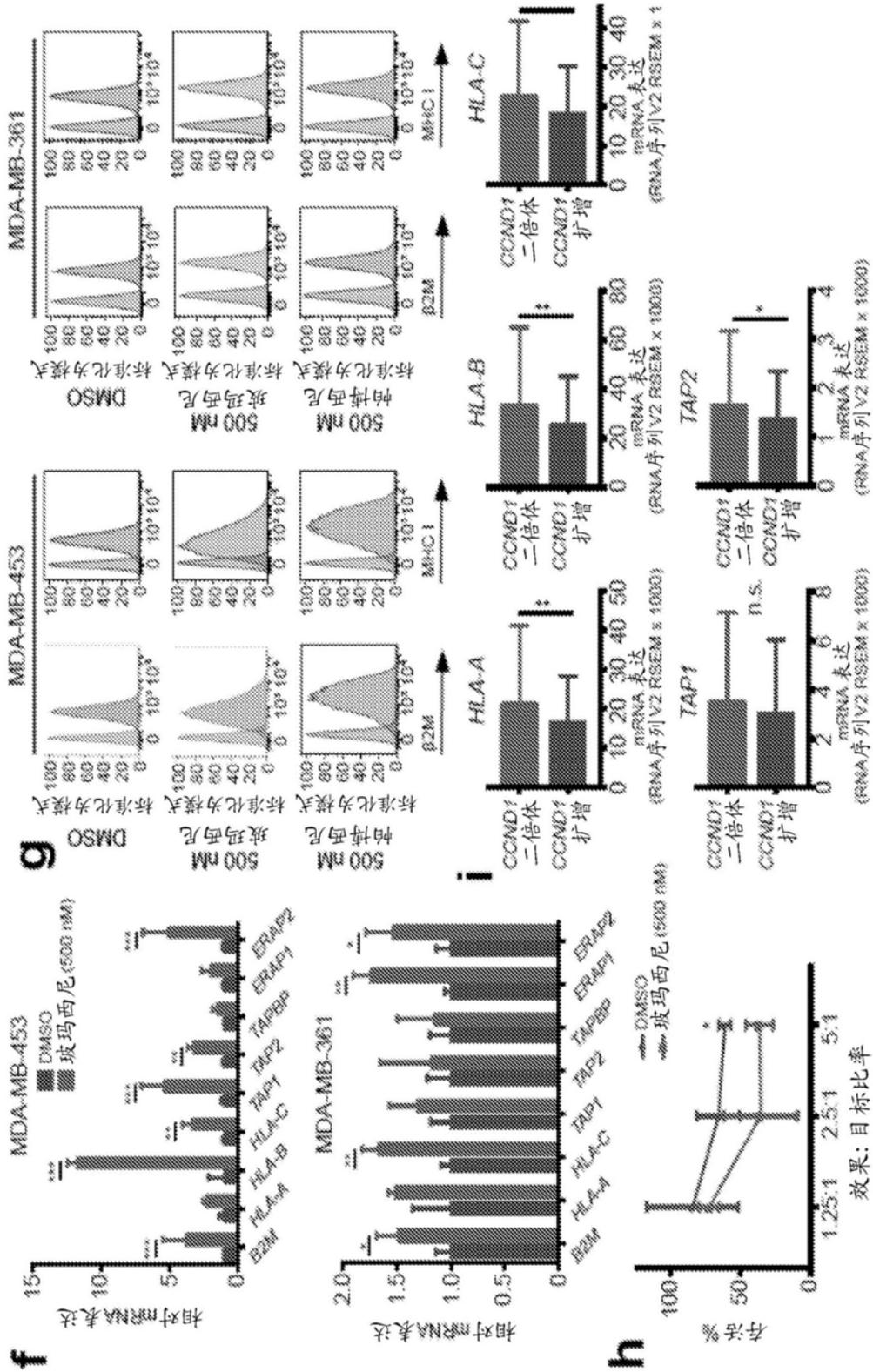


图1 (续)

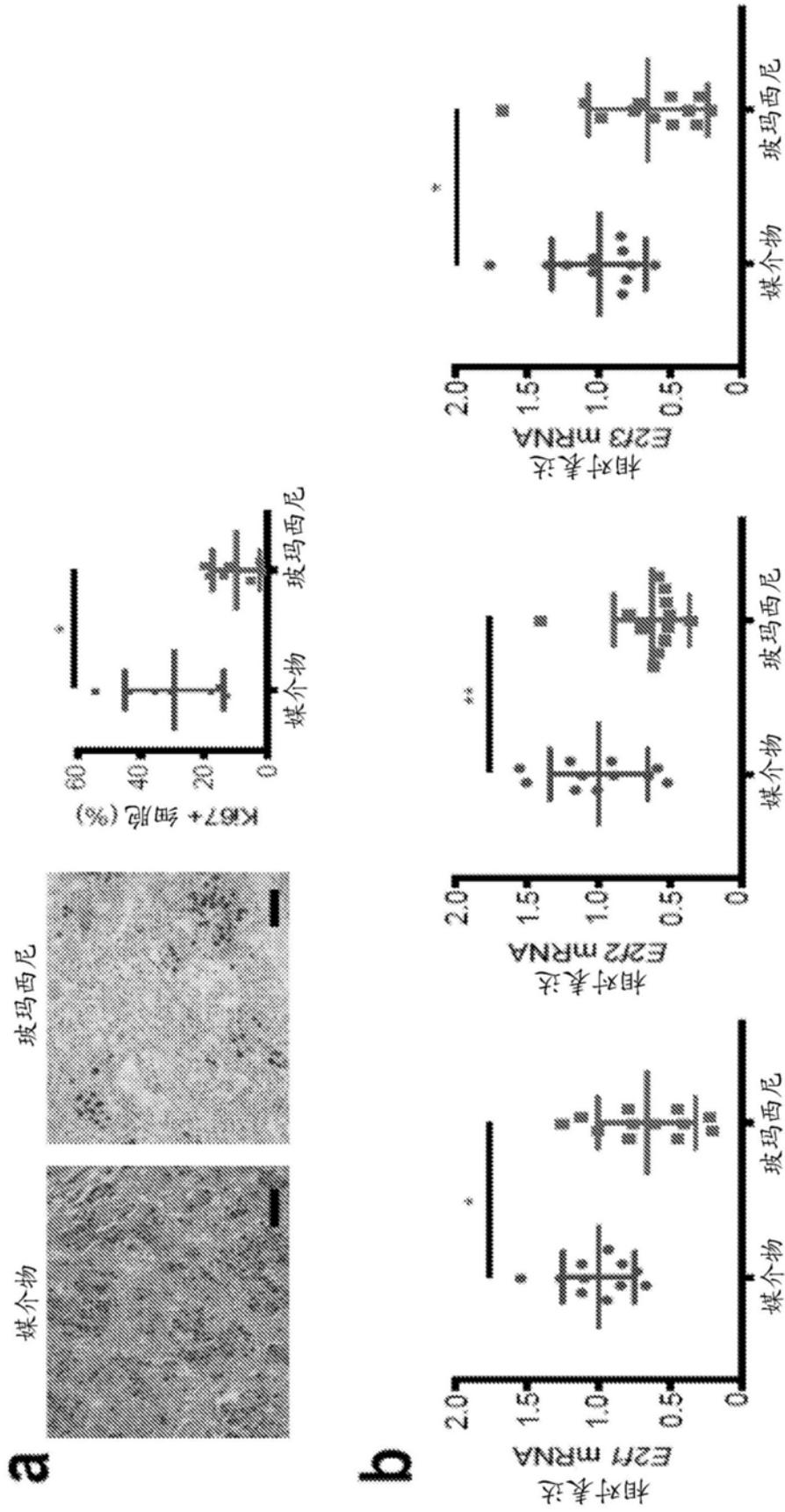


图2

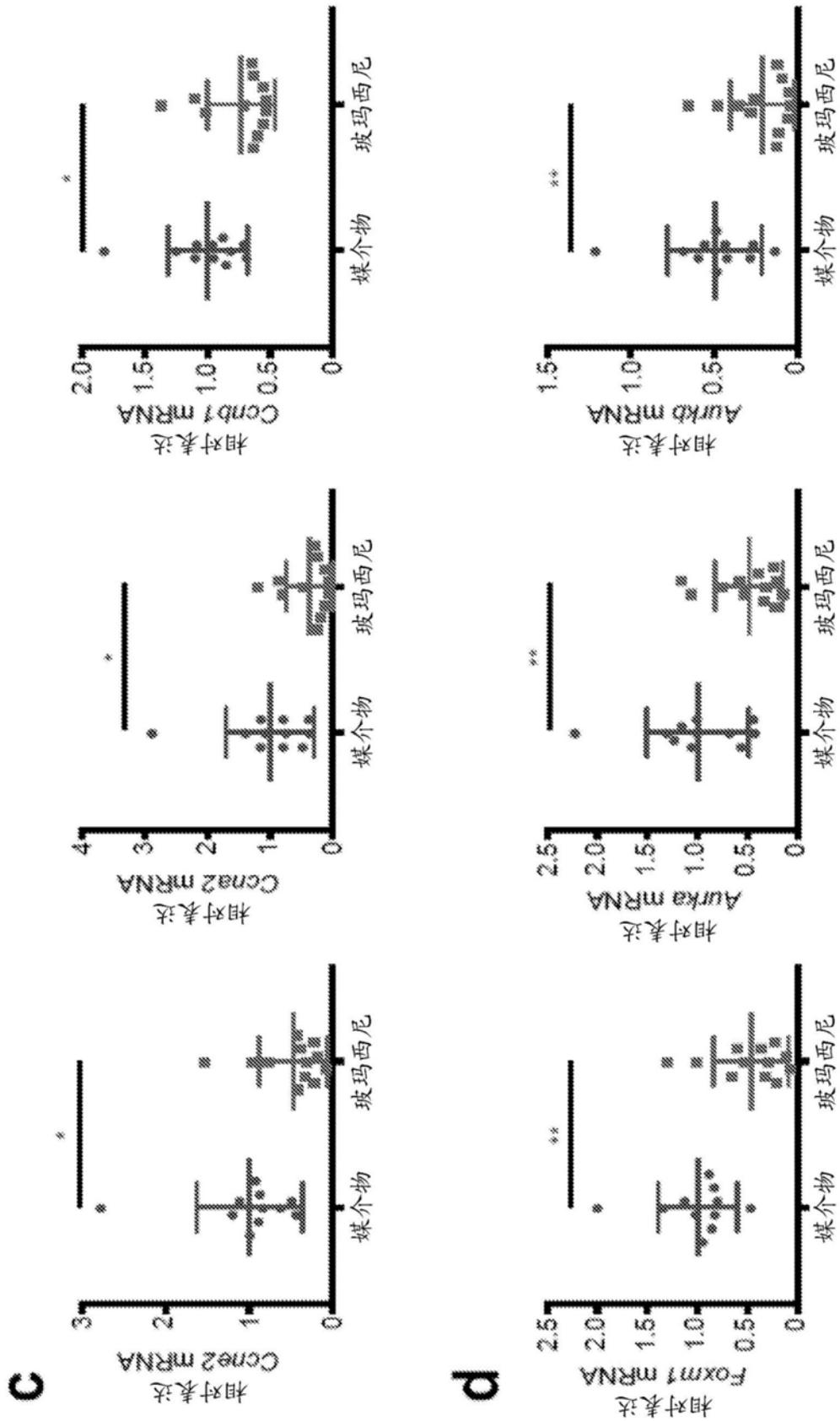


图2(续)

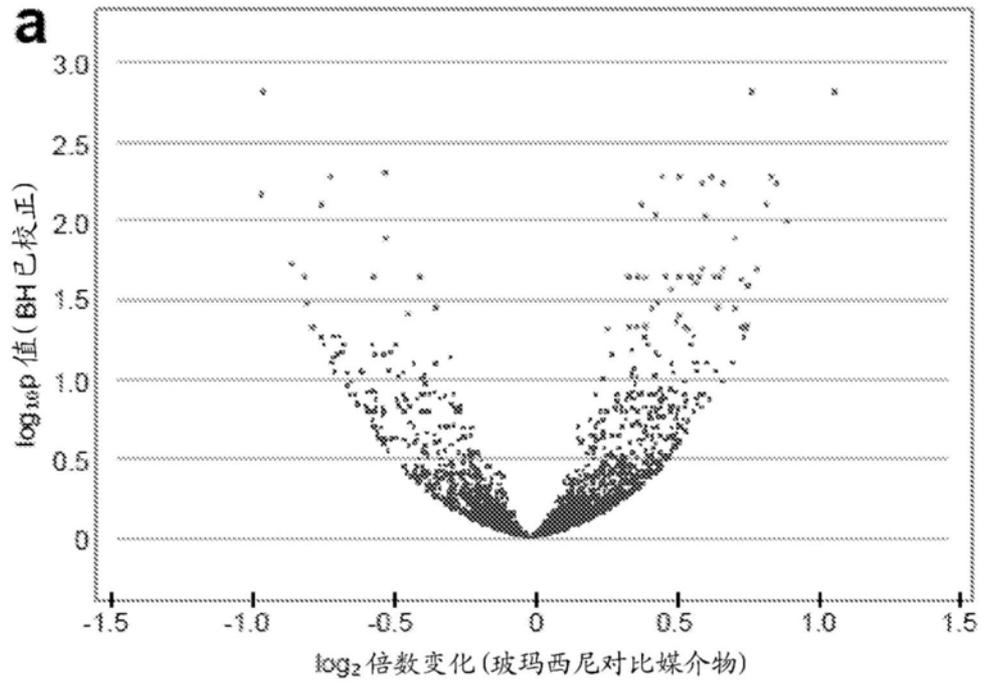


图3

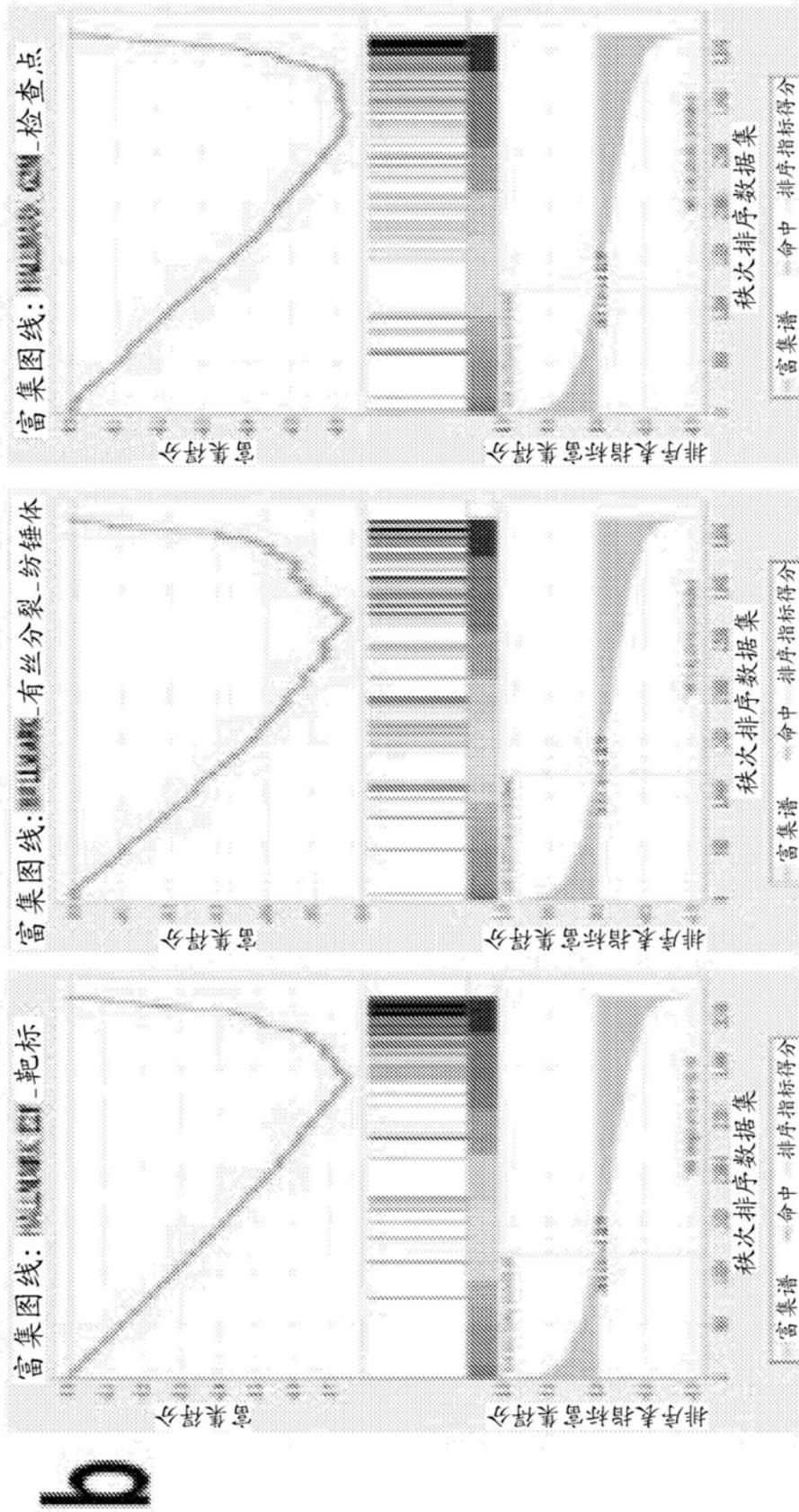


图3(续)

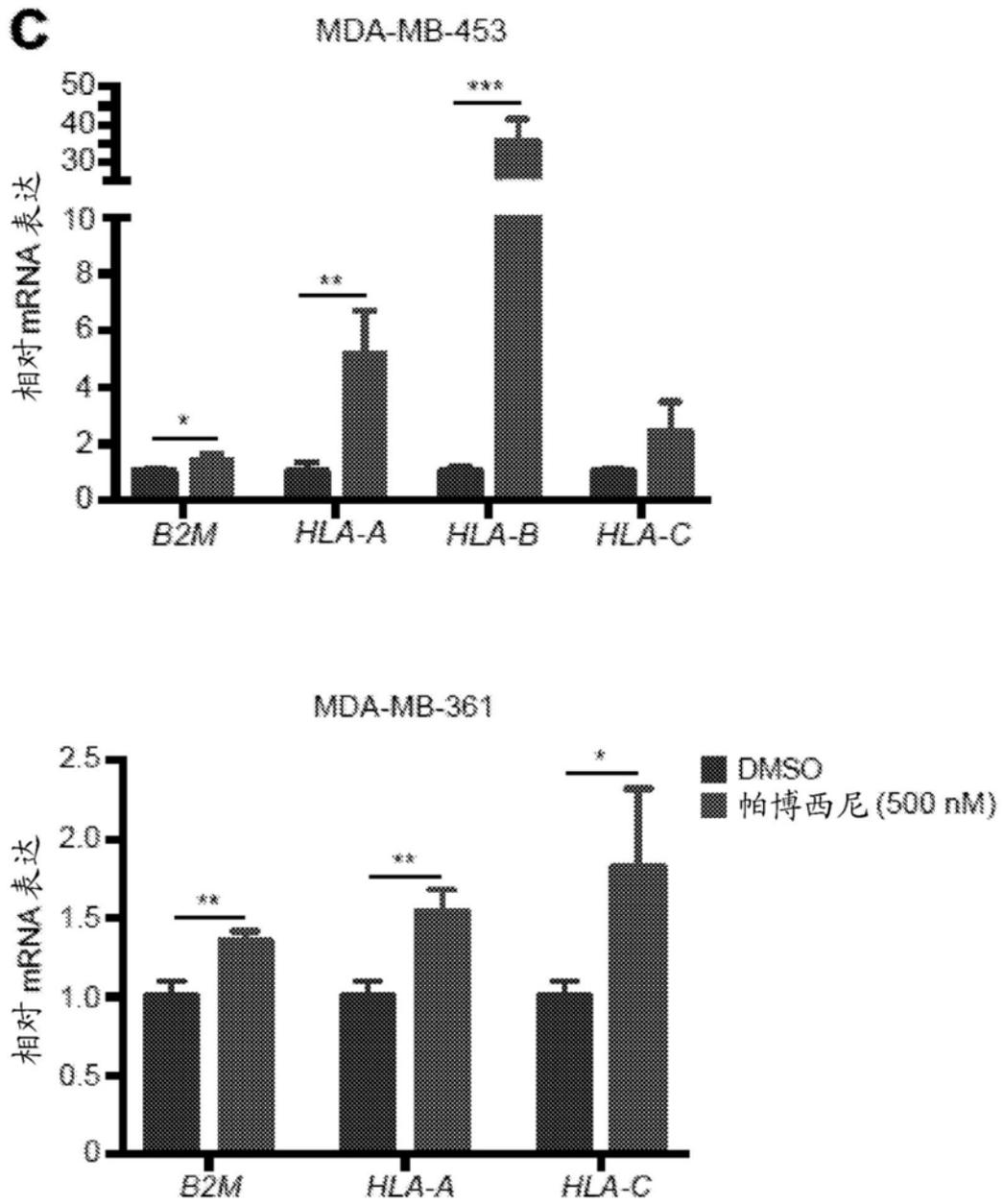


图3(续)

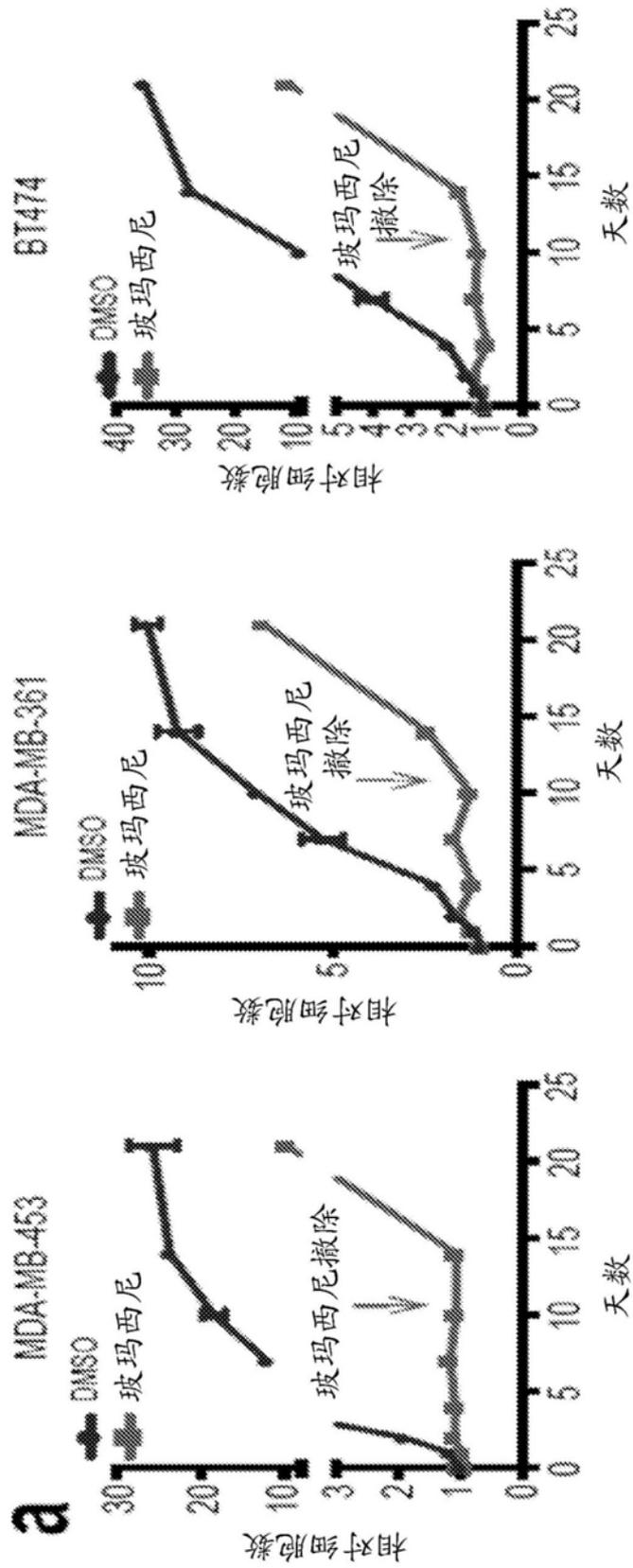


图4

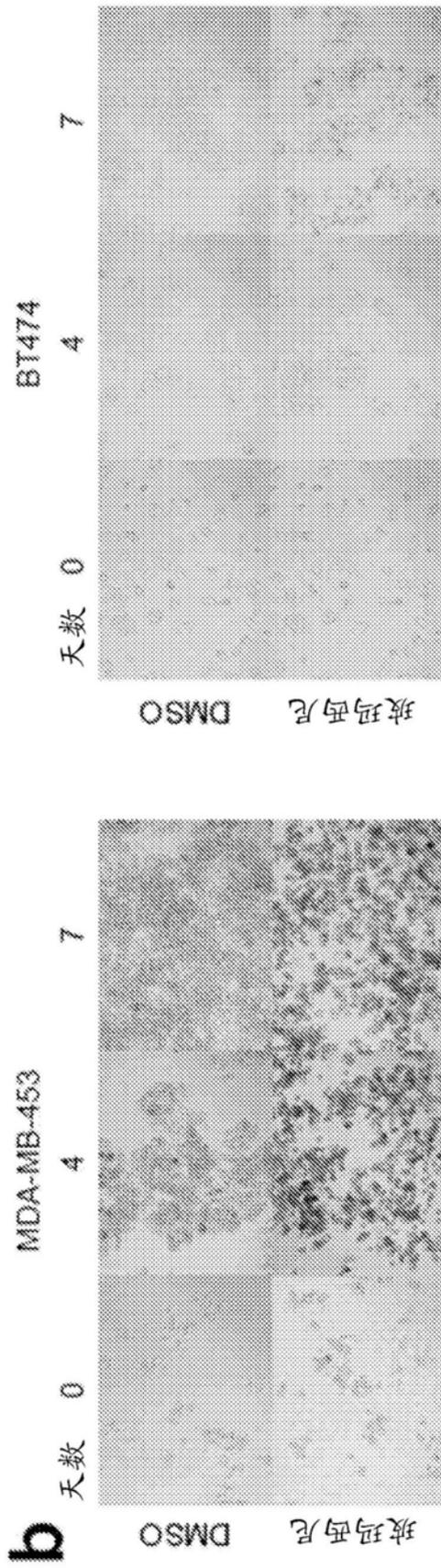


图4(续)

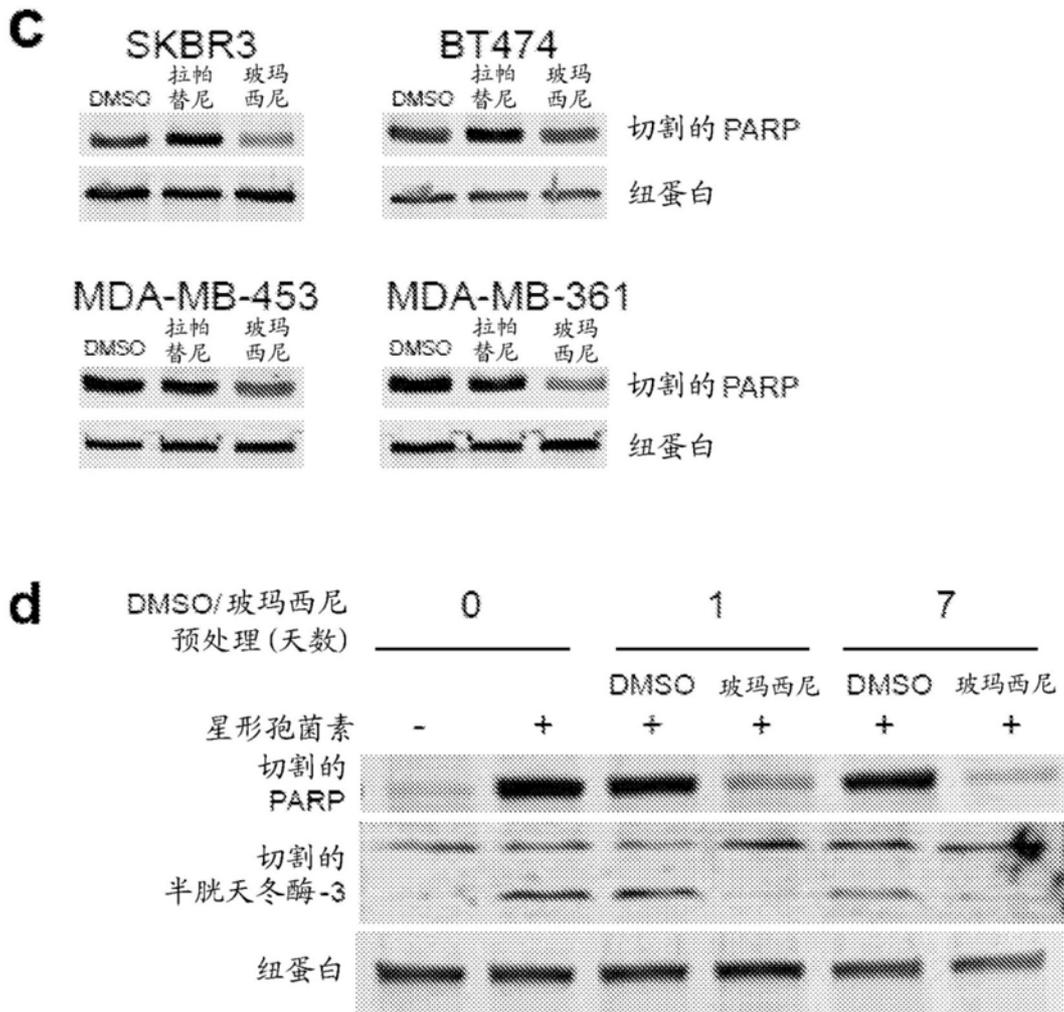


图4(续)

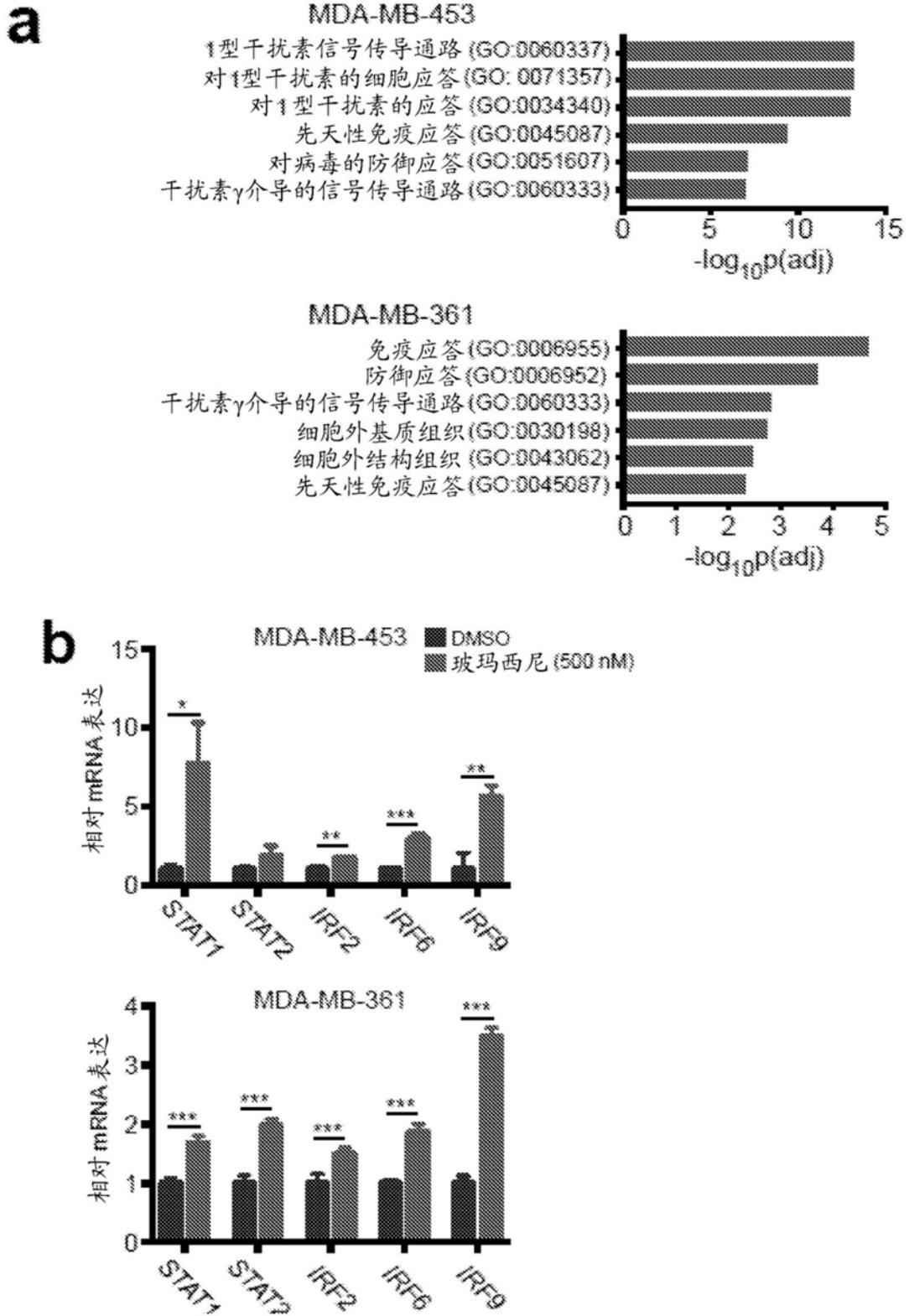


图5

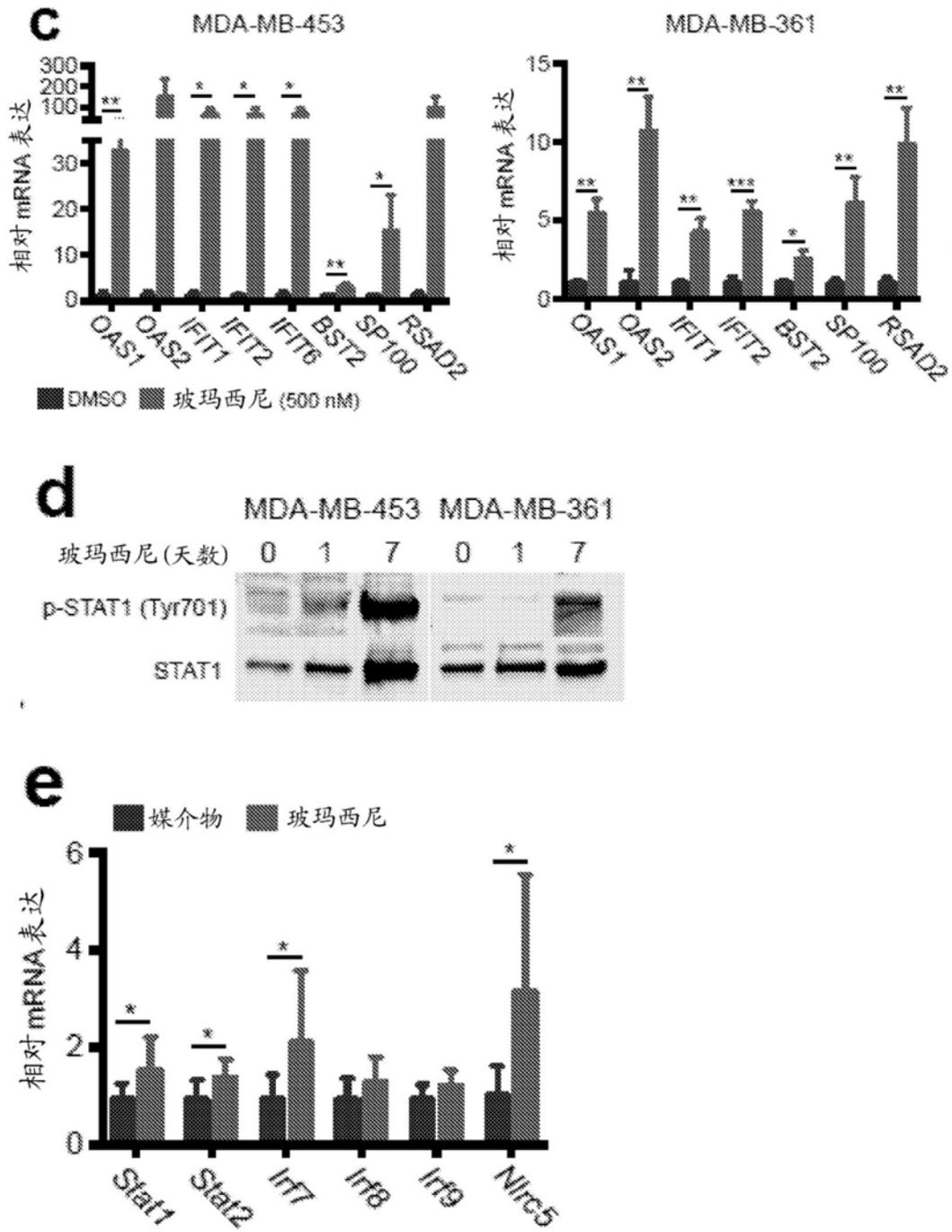


图5(续)

f

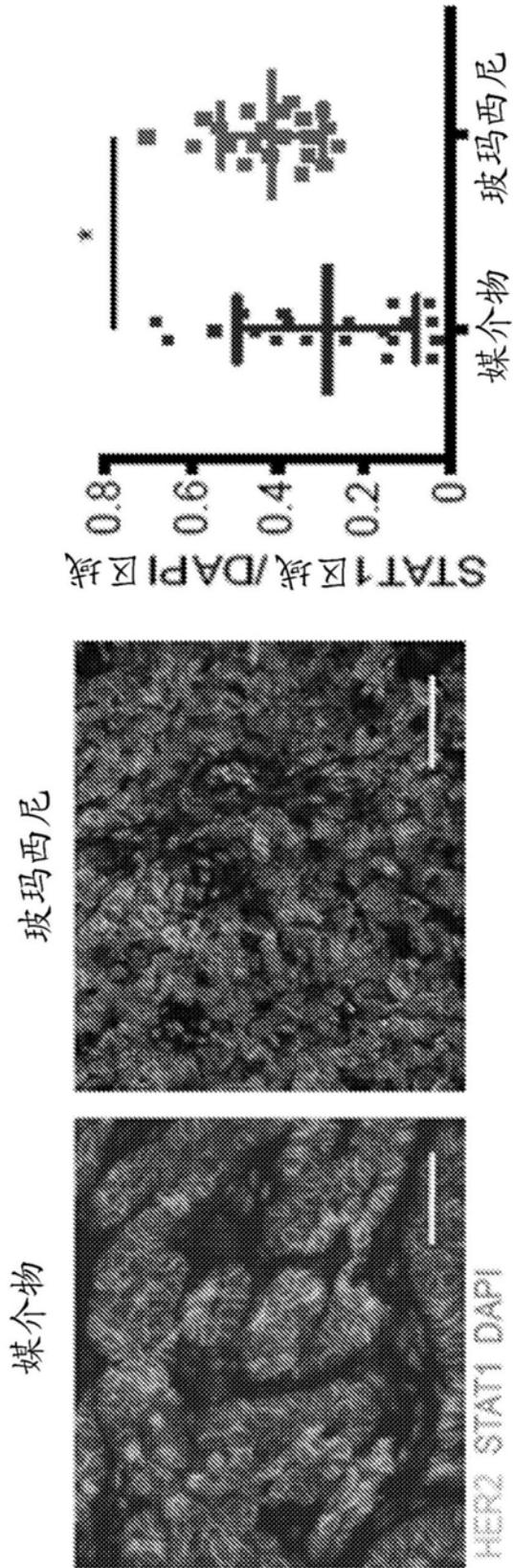


图5(续)

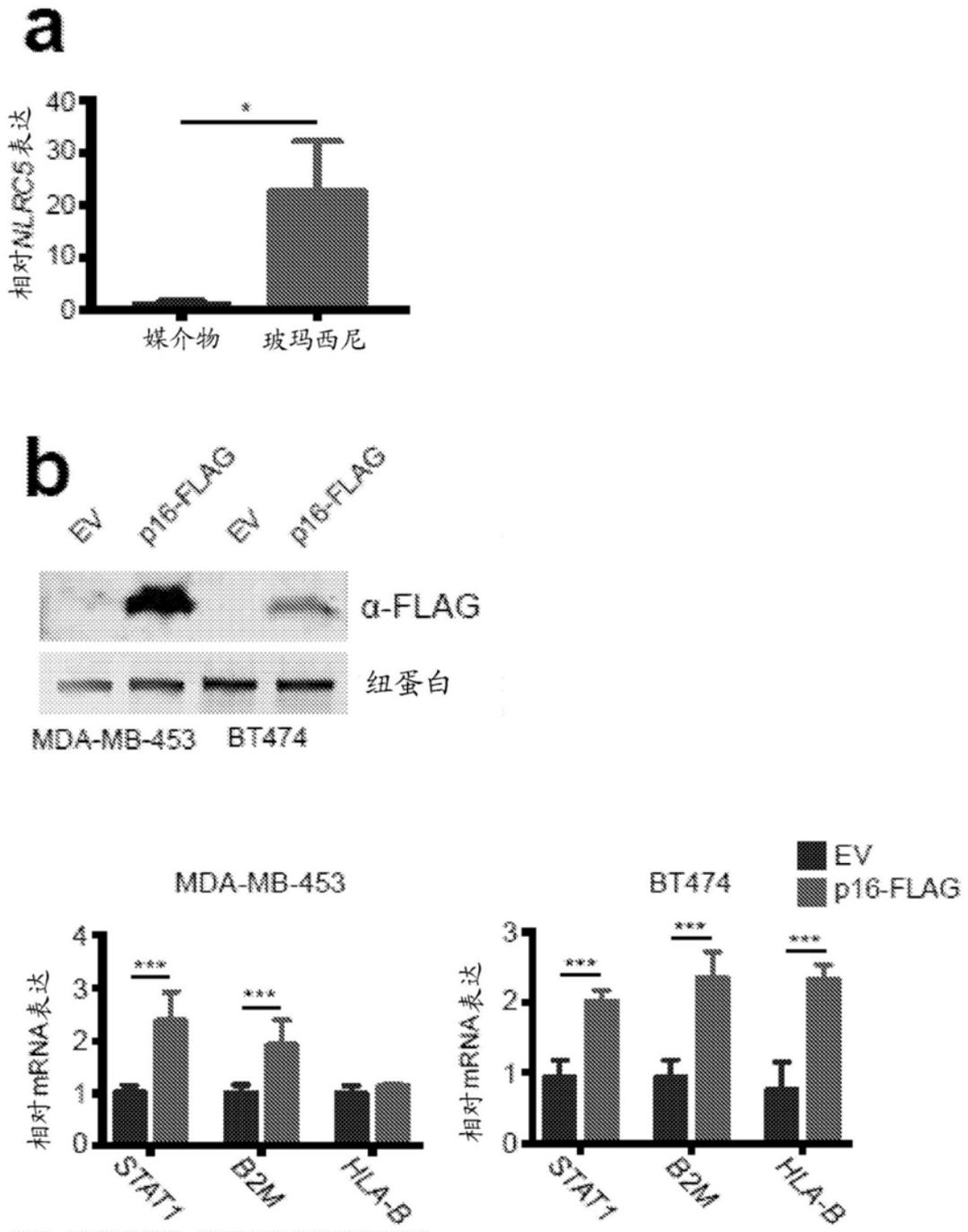


图6

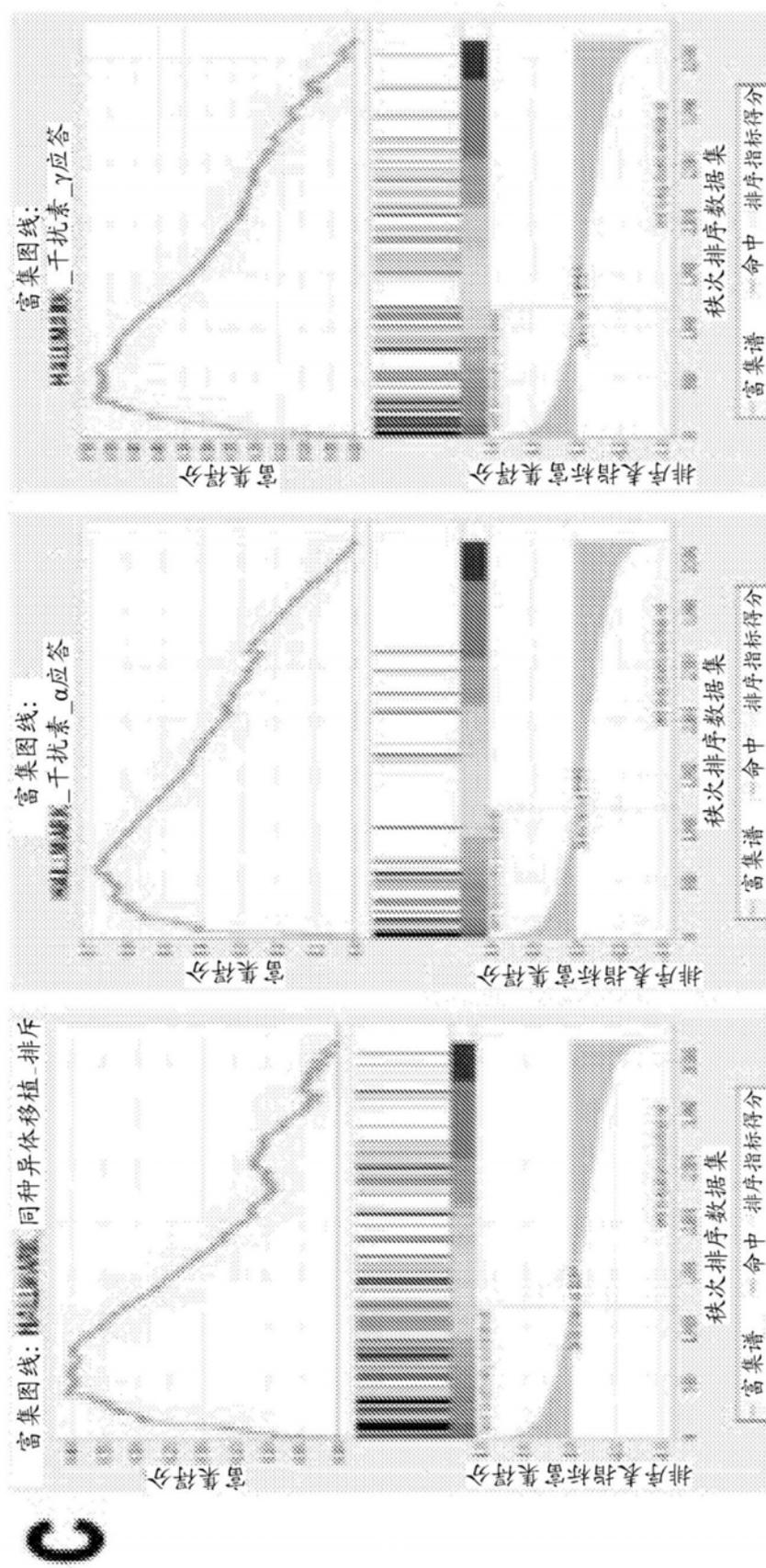


图6(续)

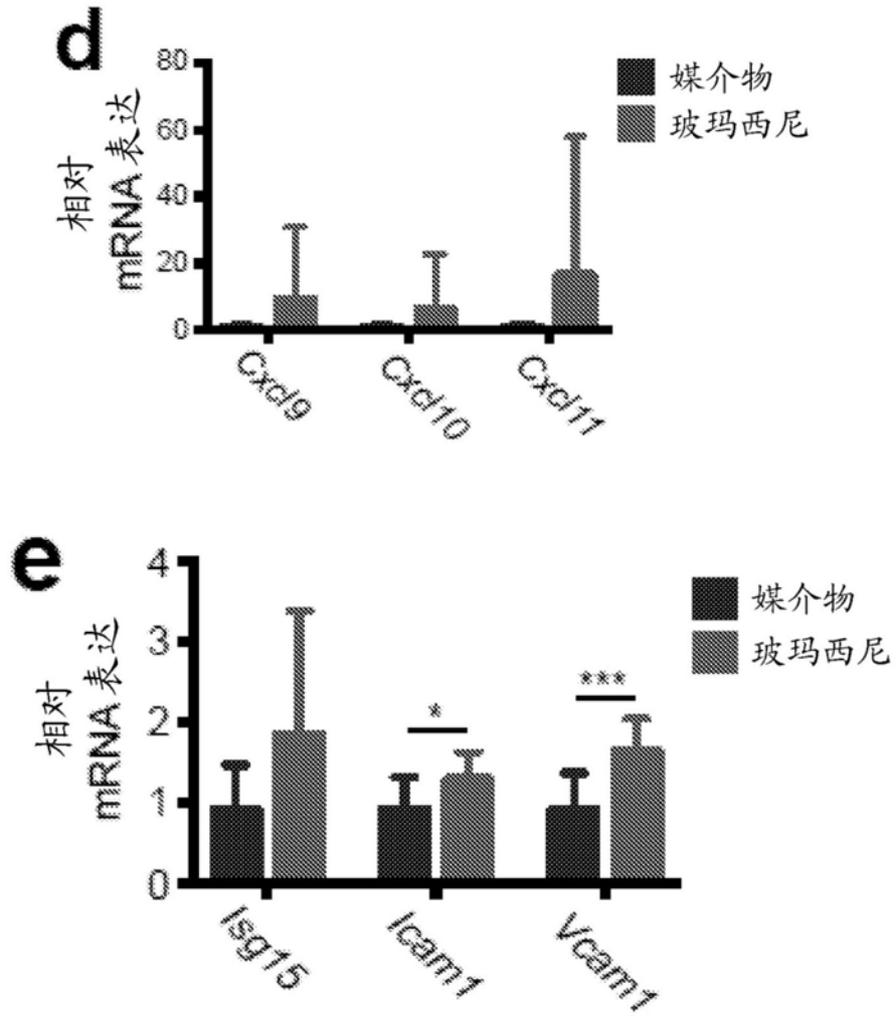


图6(续)

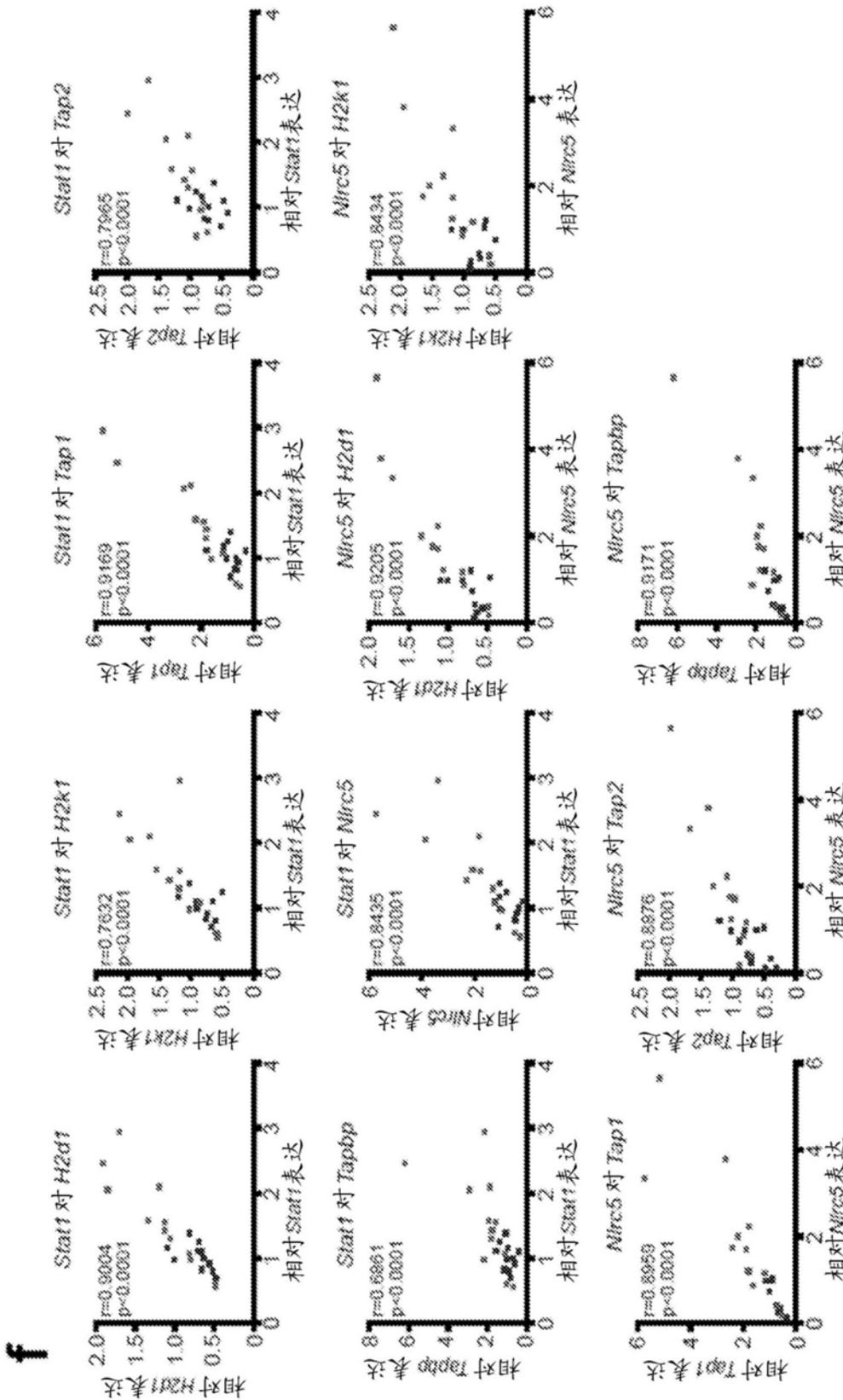


图6(续)

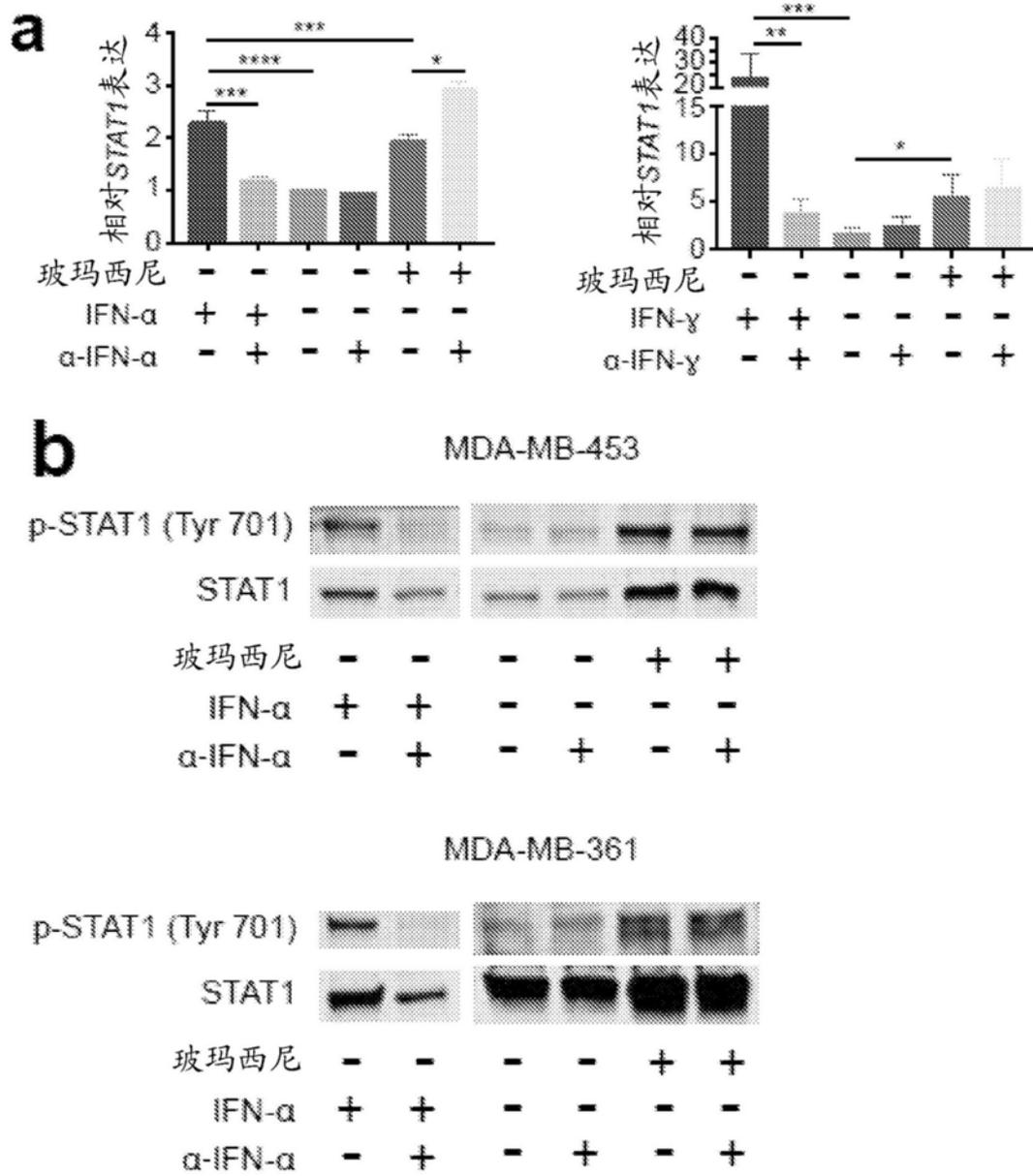


图7

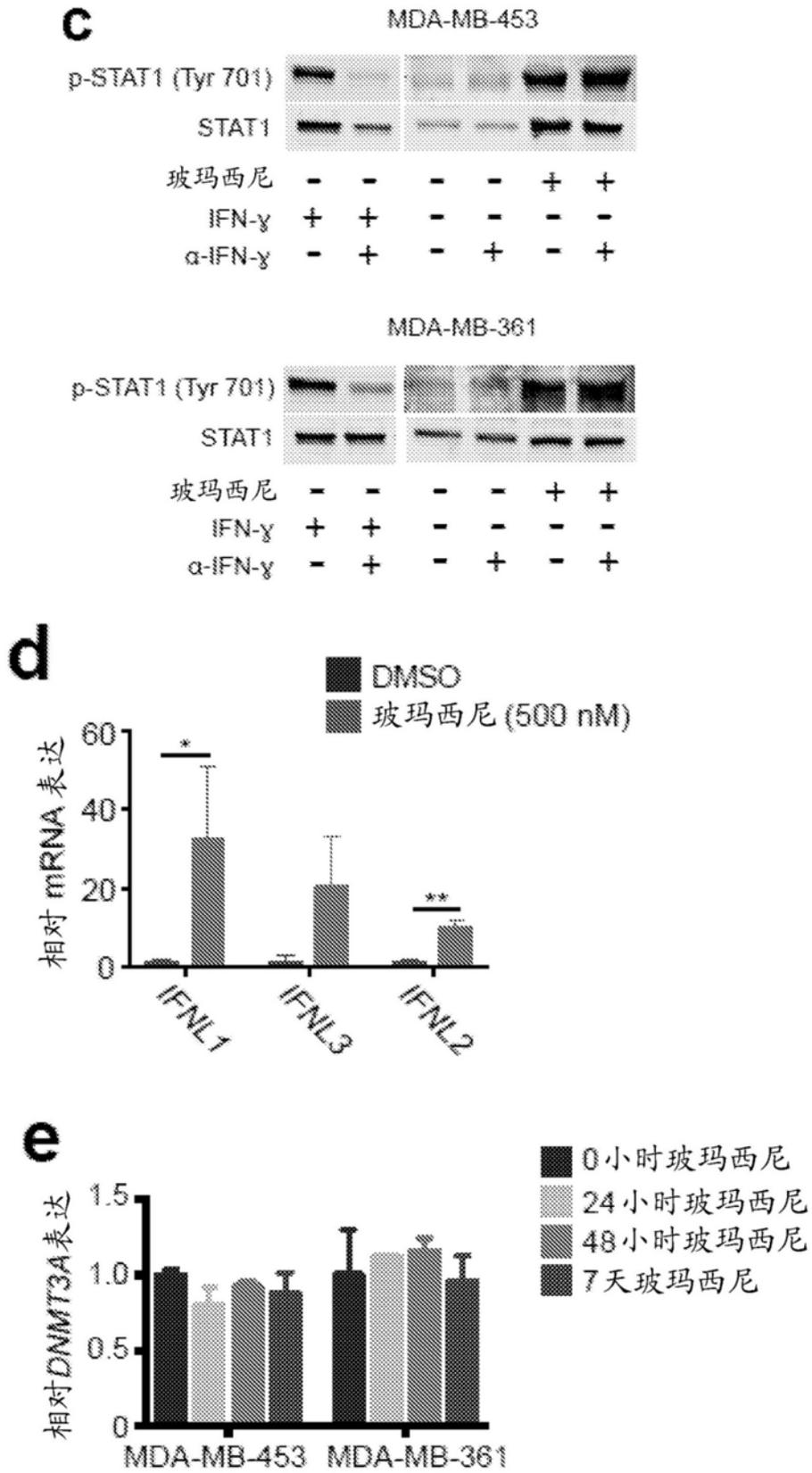


图7(续)

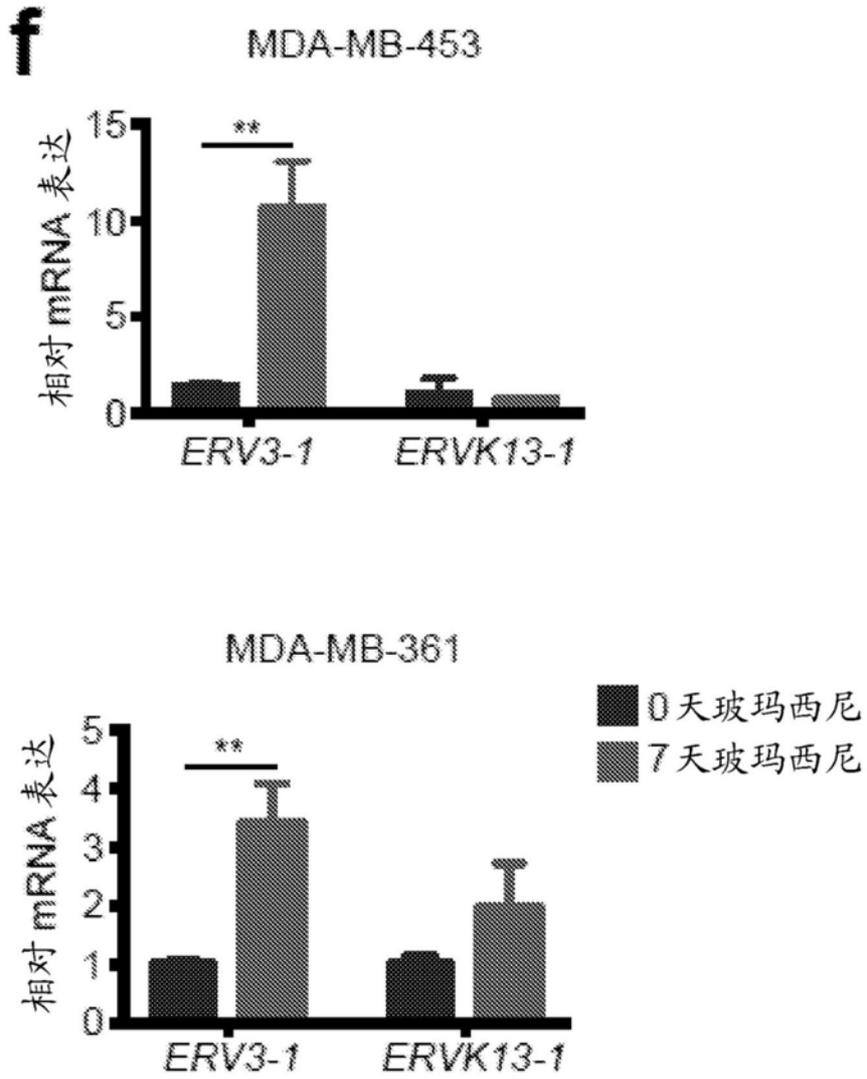


图7(续)

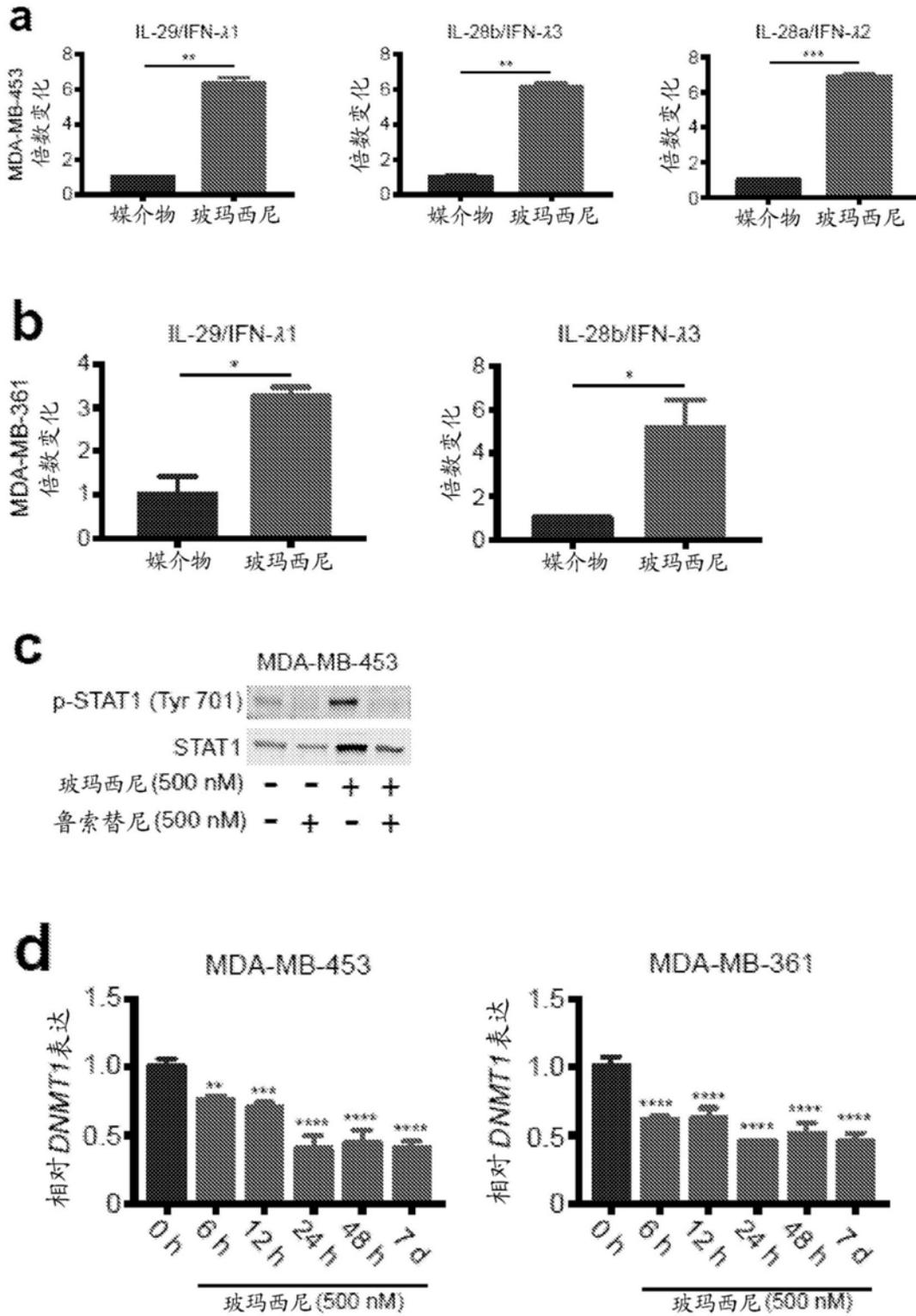
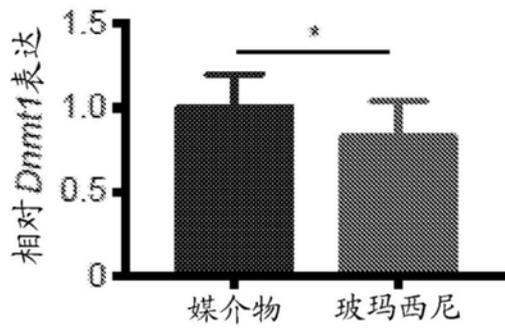


图8

e



f

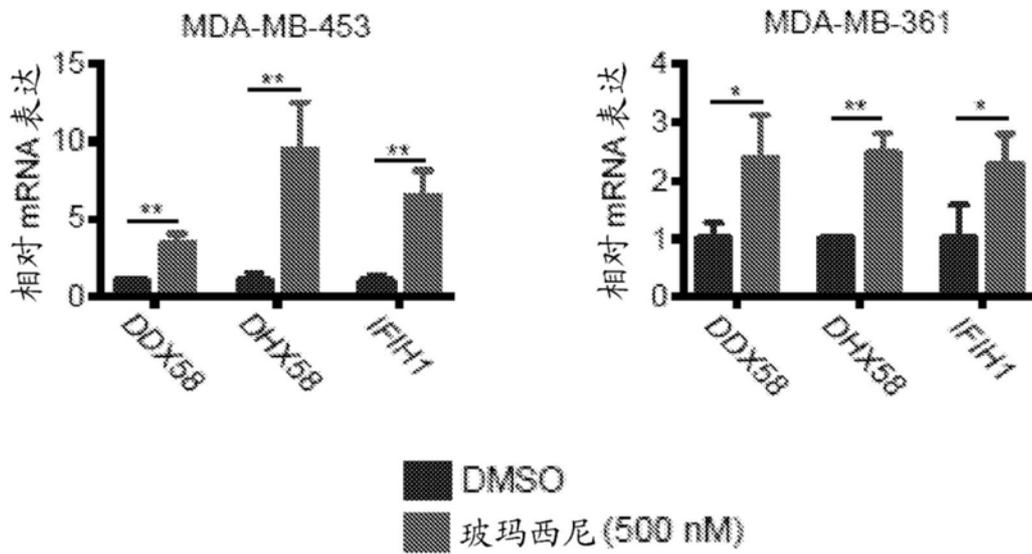


图8 (续)

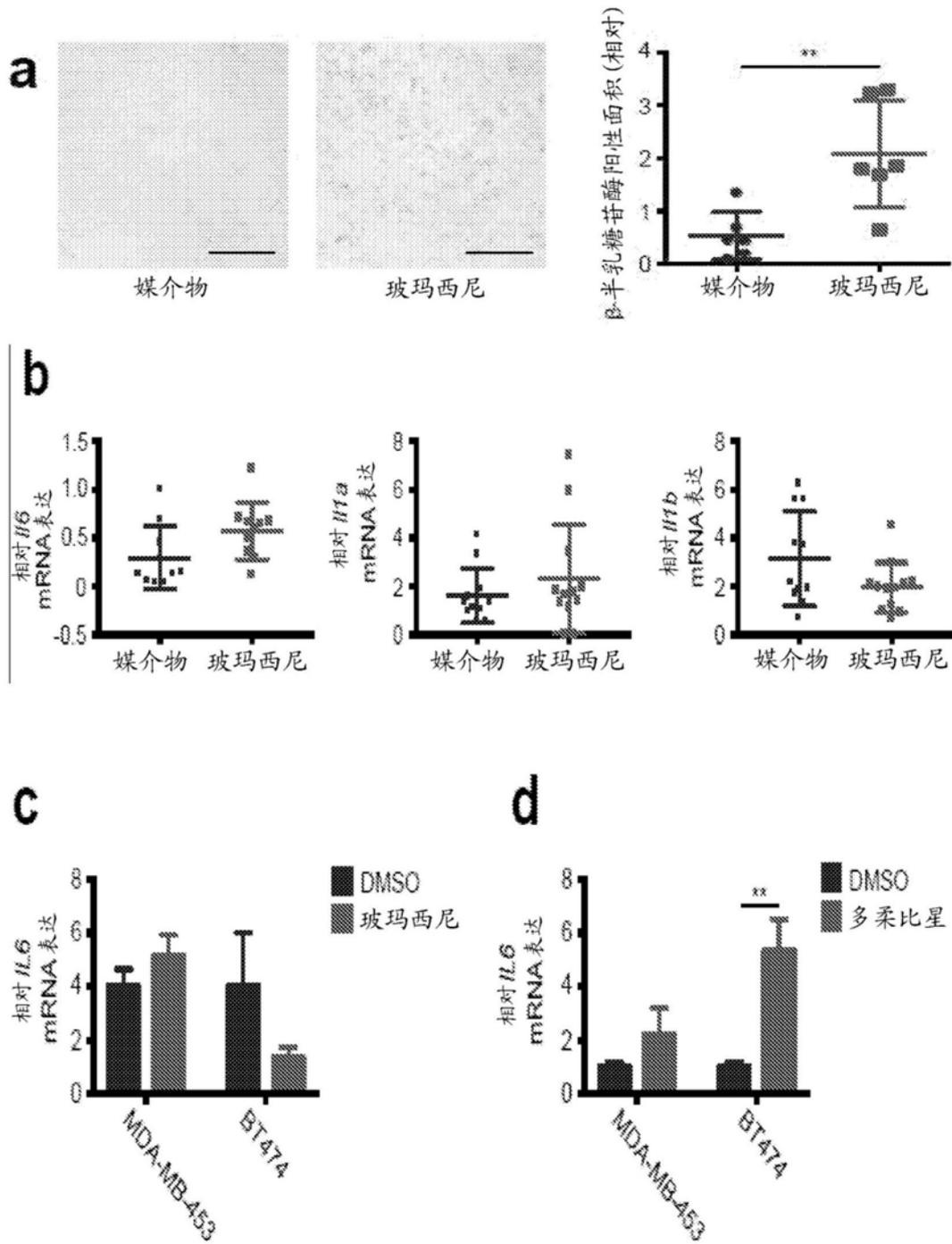


图9

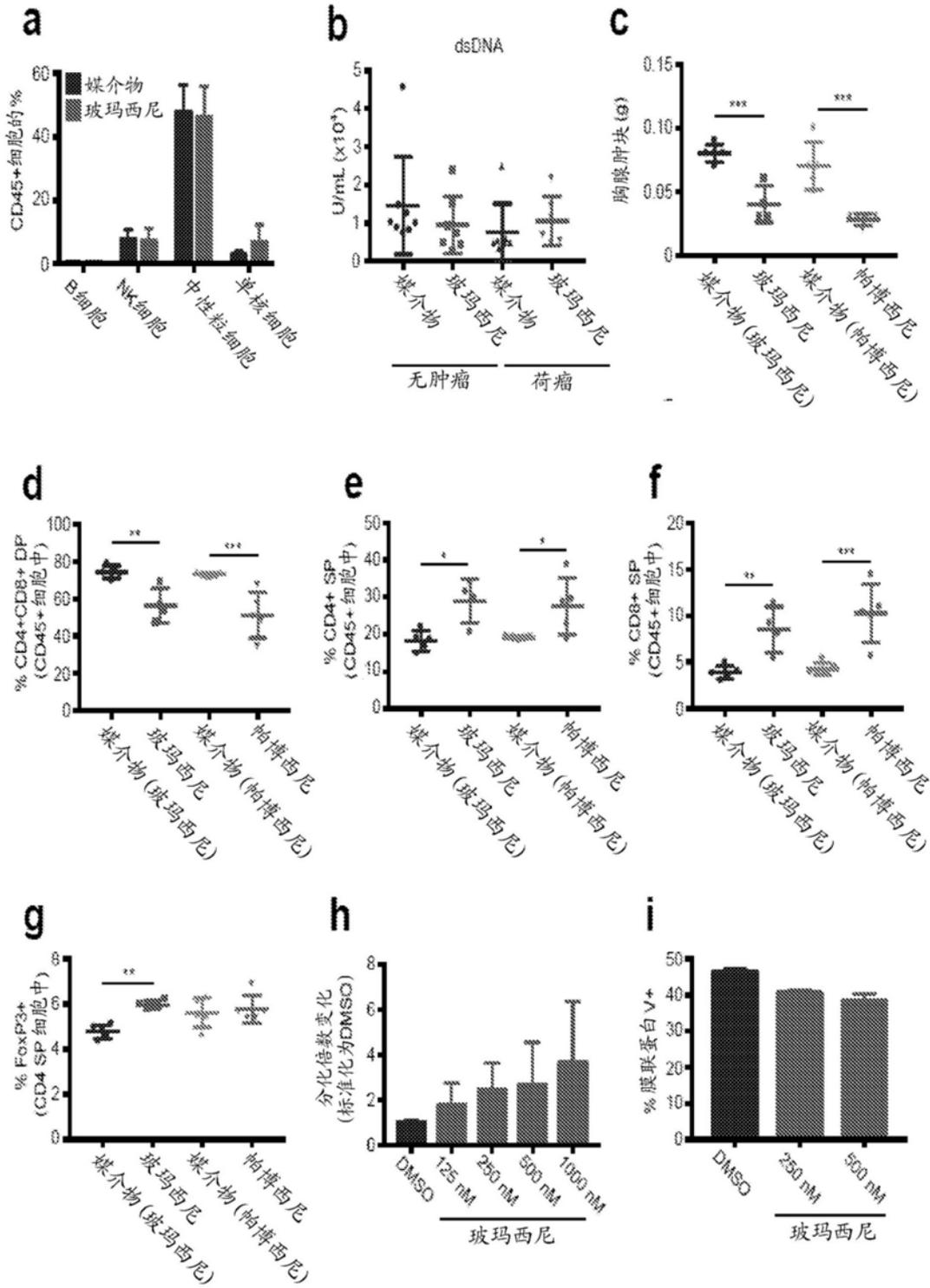


图10

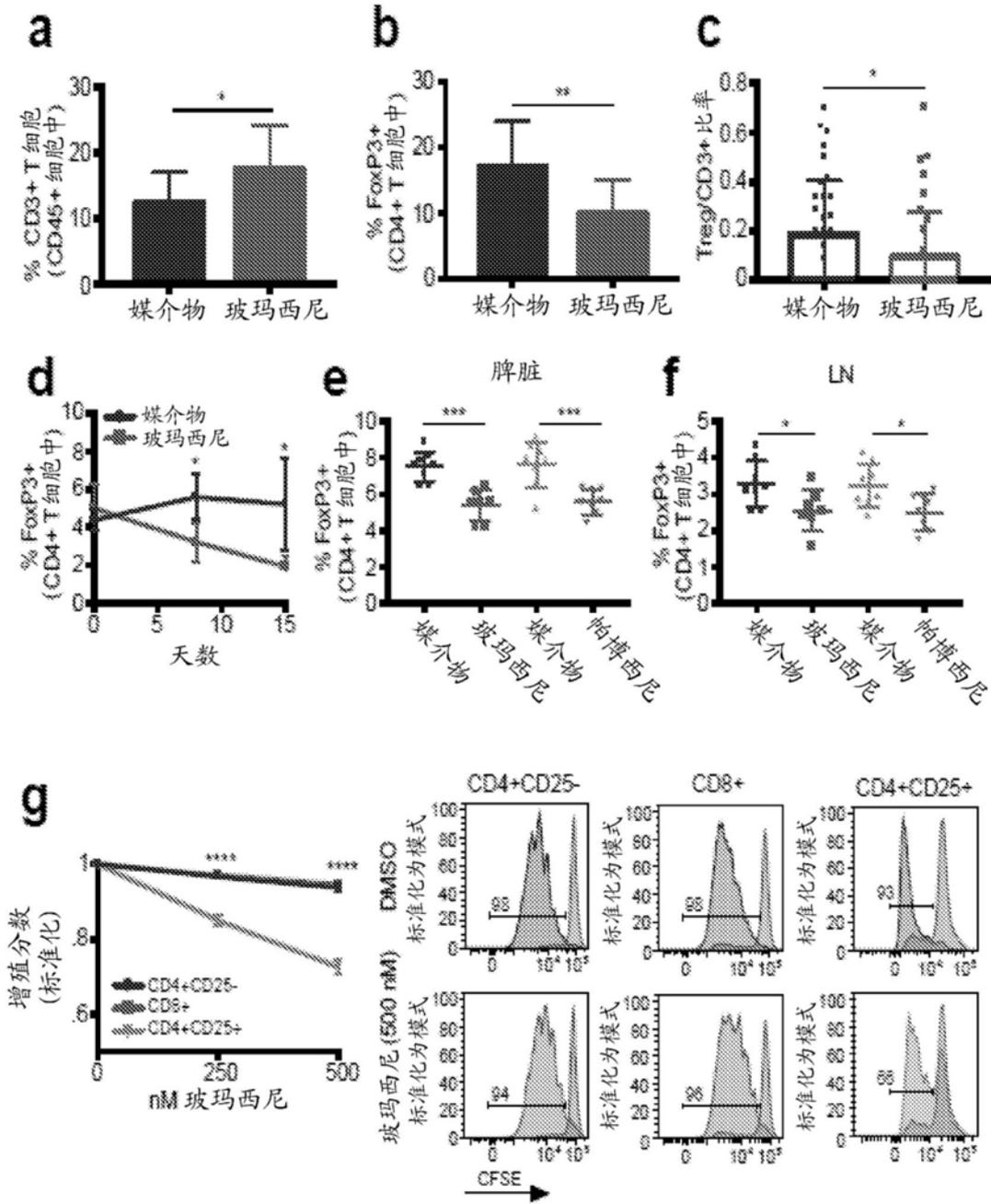


图11

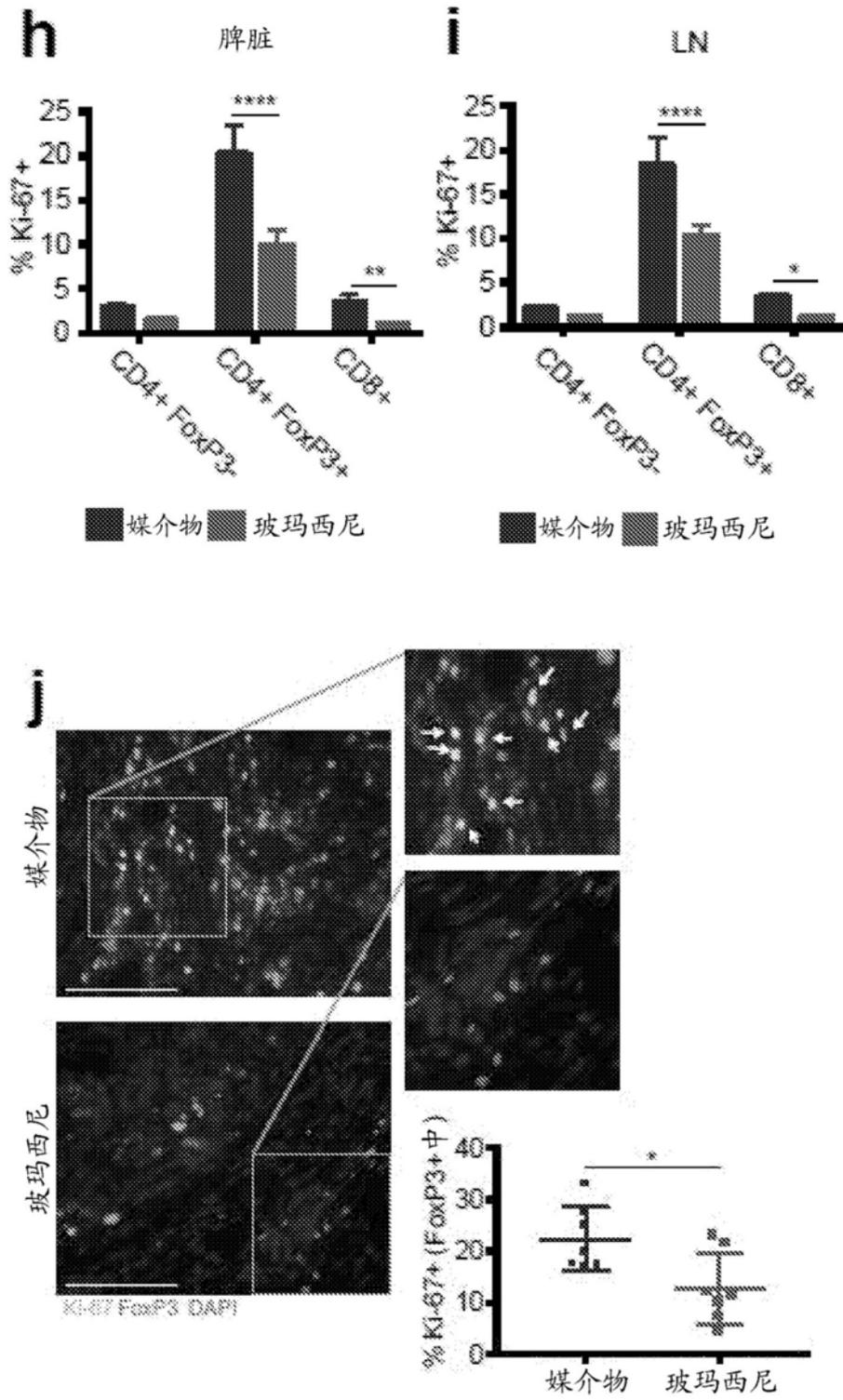
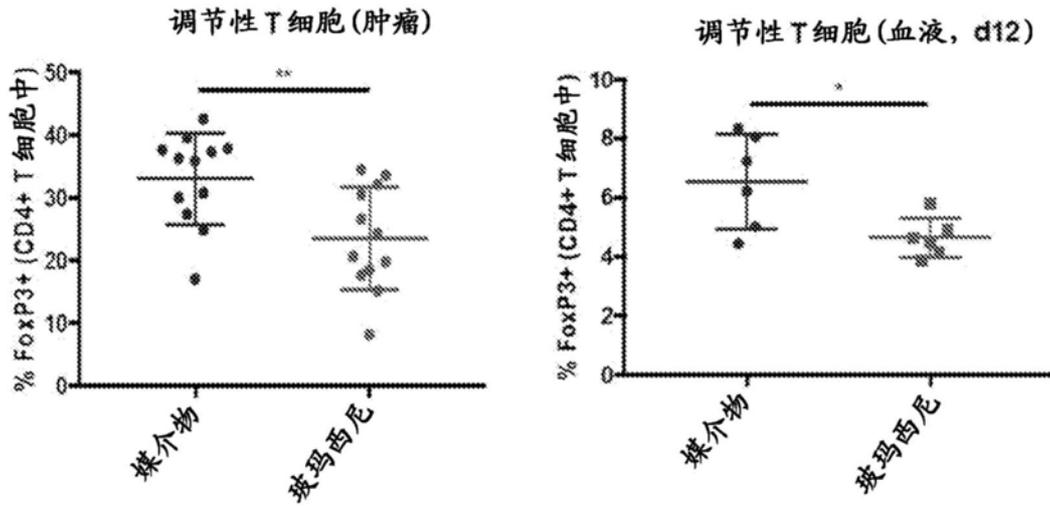
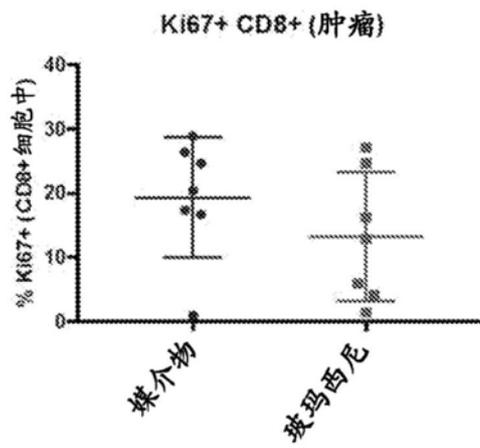


图11 (续)

K



L



M

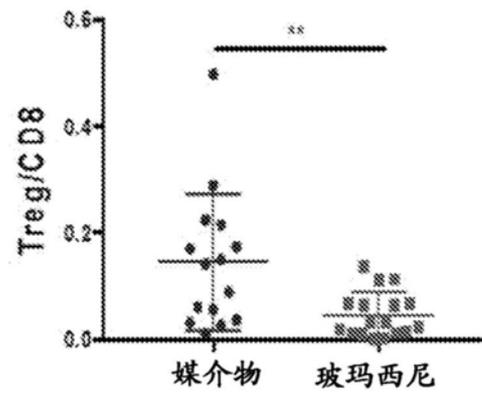
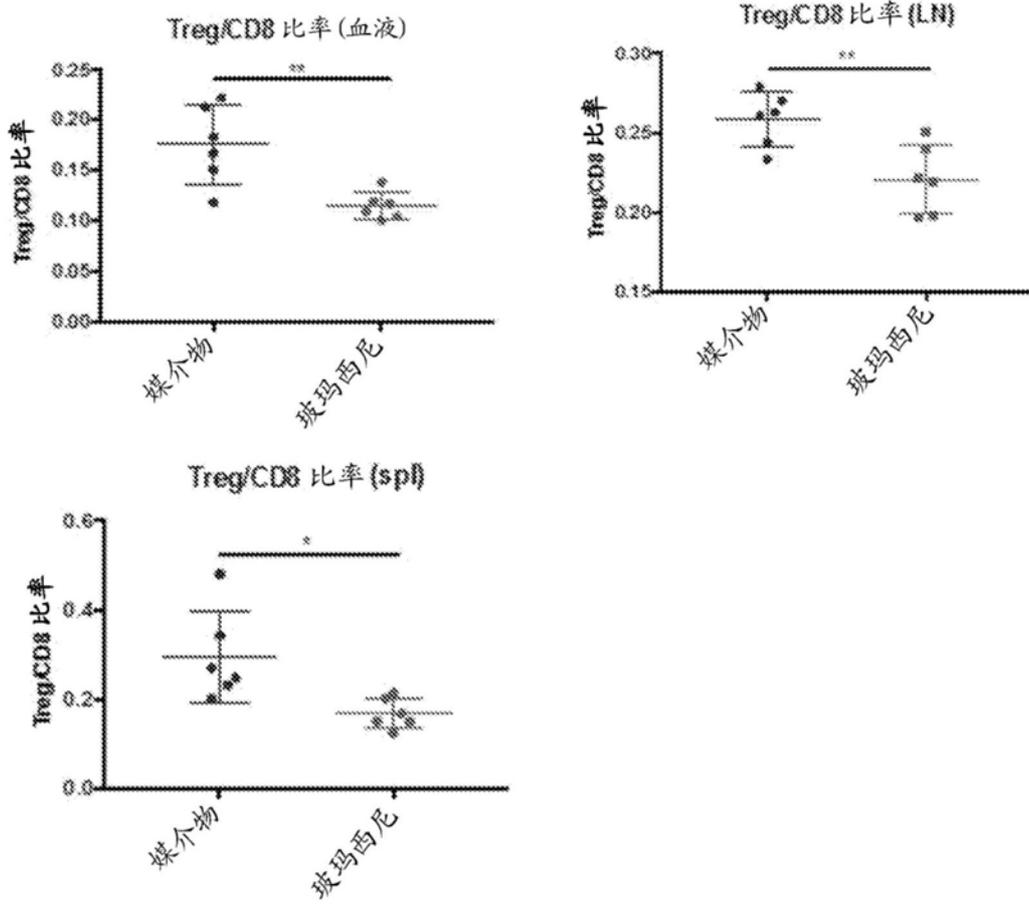


图11(续)

N



O

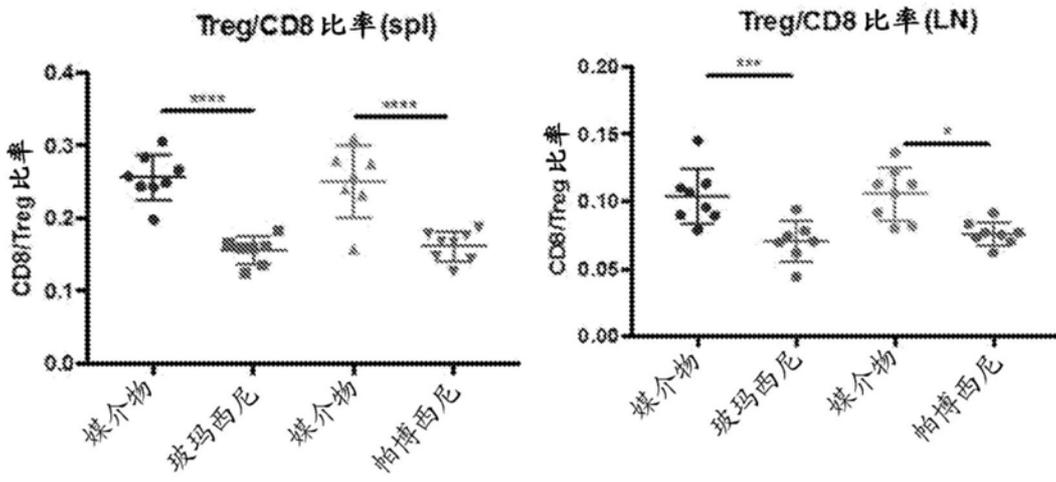
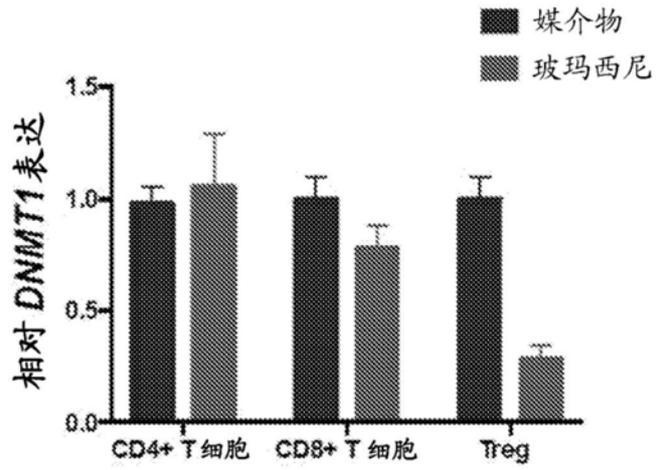
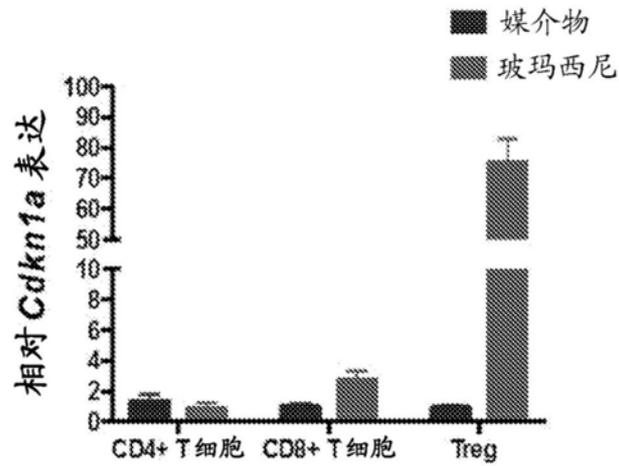


图11(续)

P



Q



R

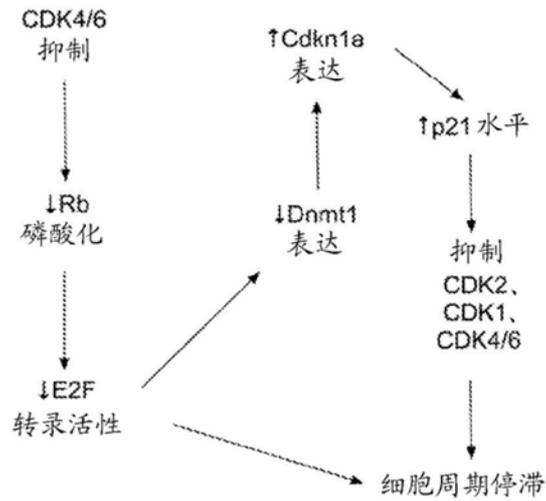


图11(续)

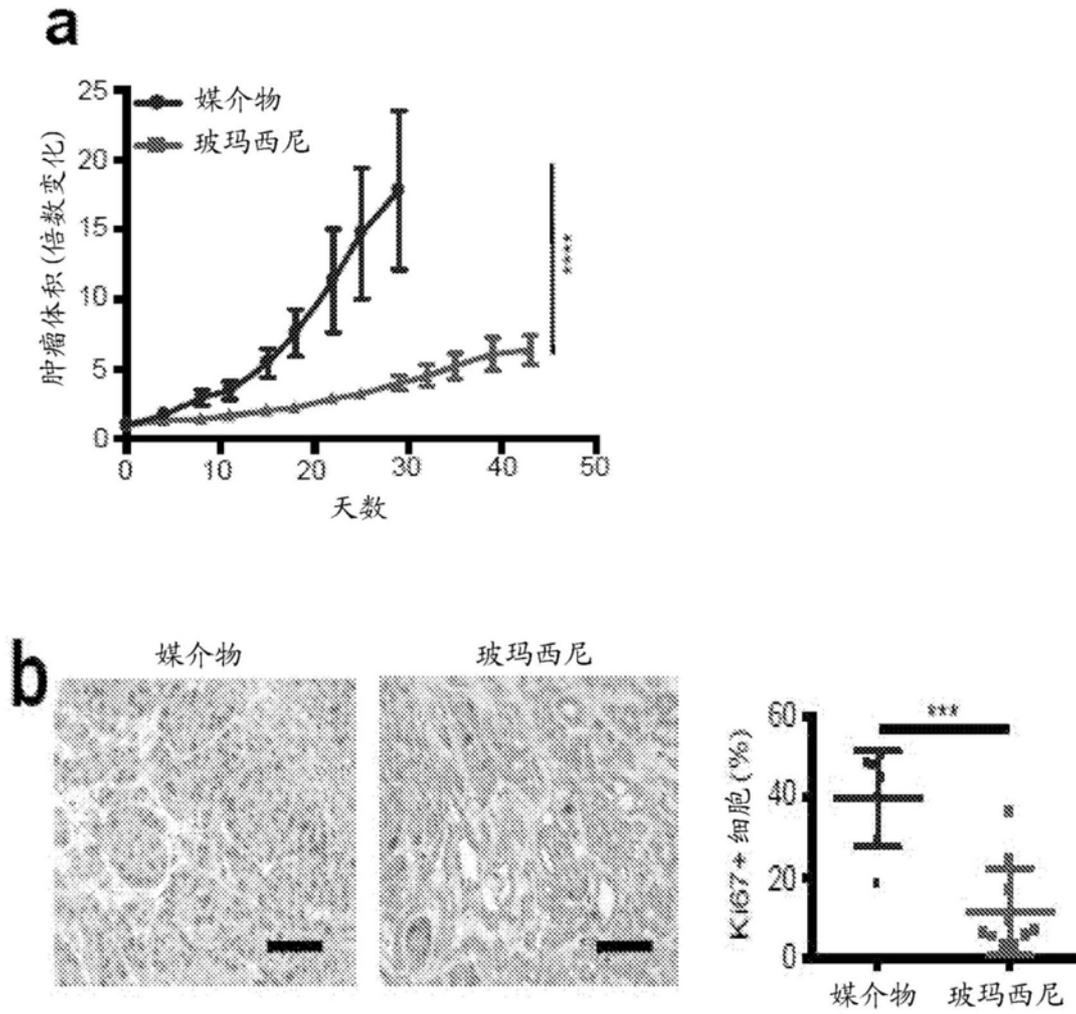


图12

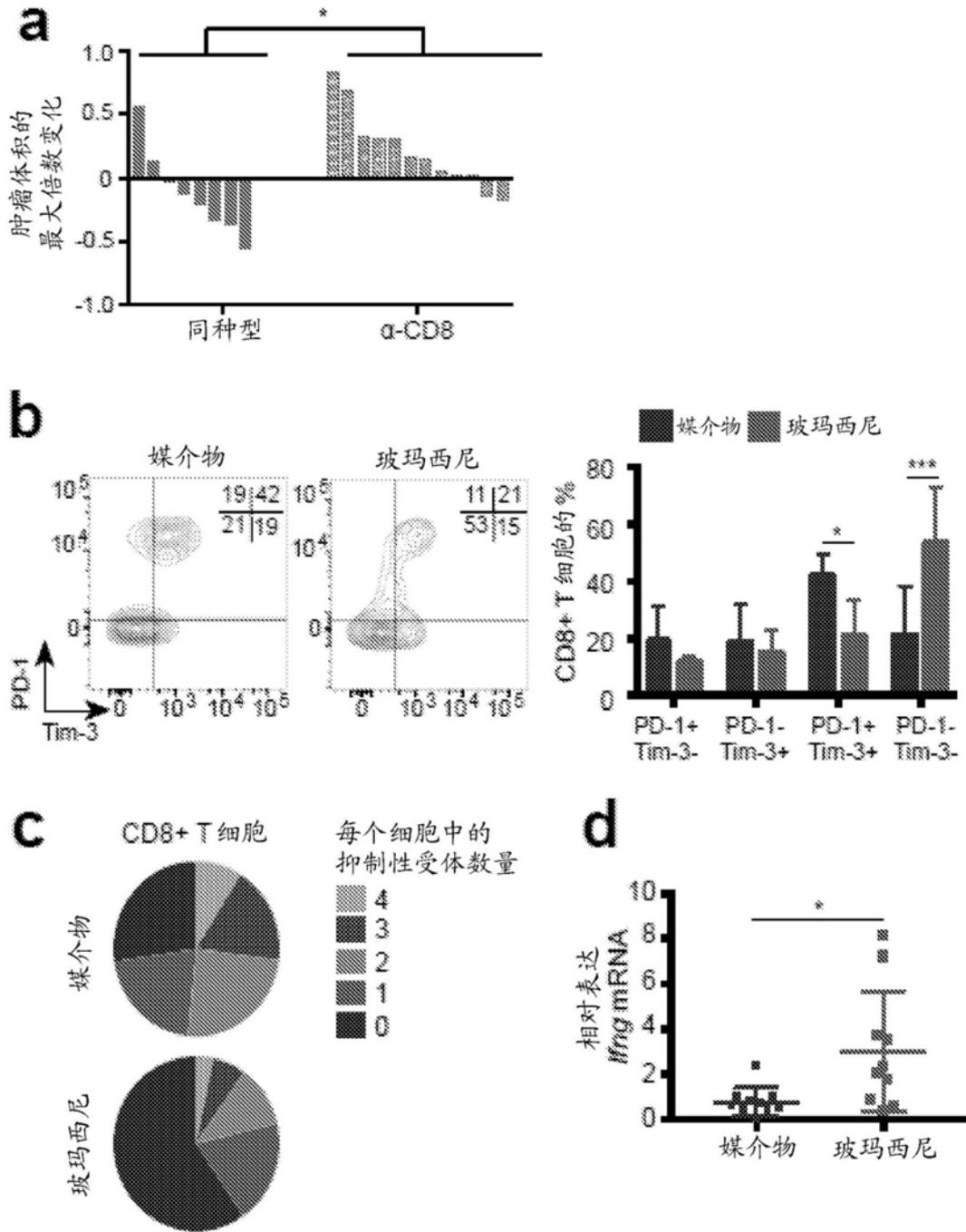


图13

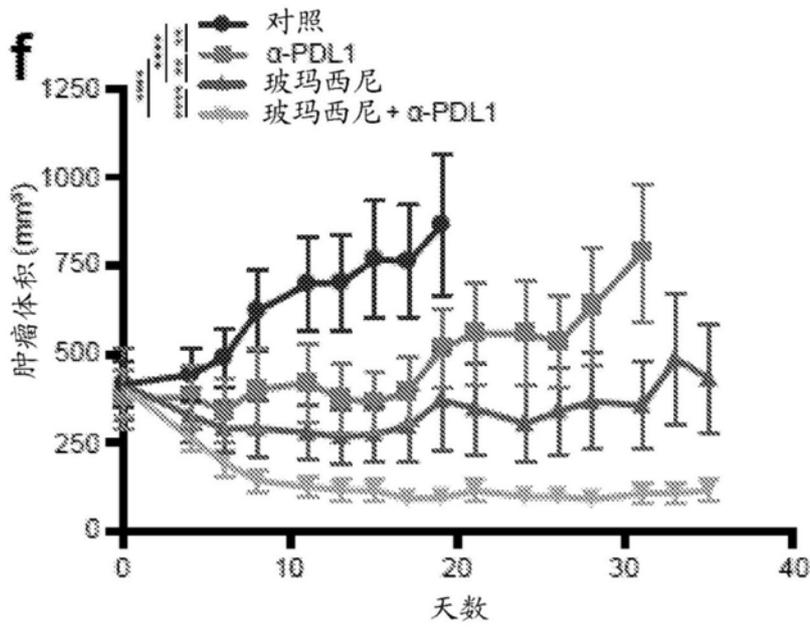
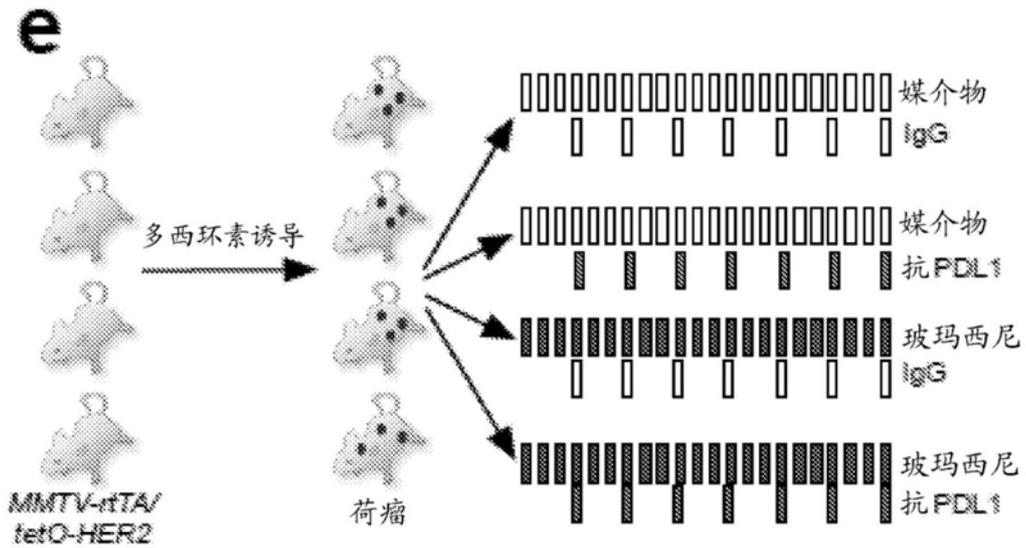


图13(续)

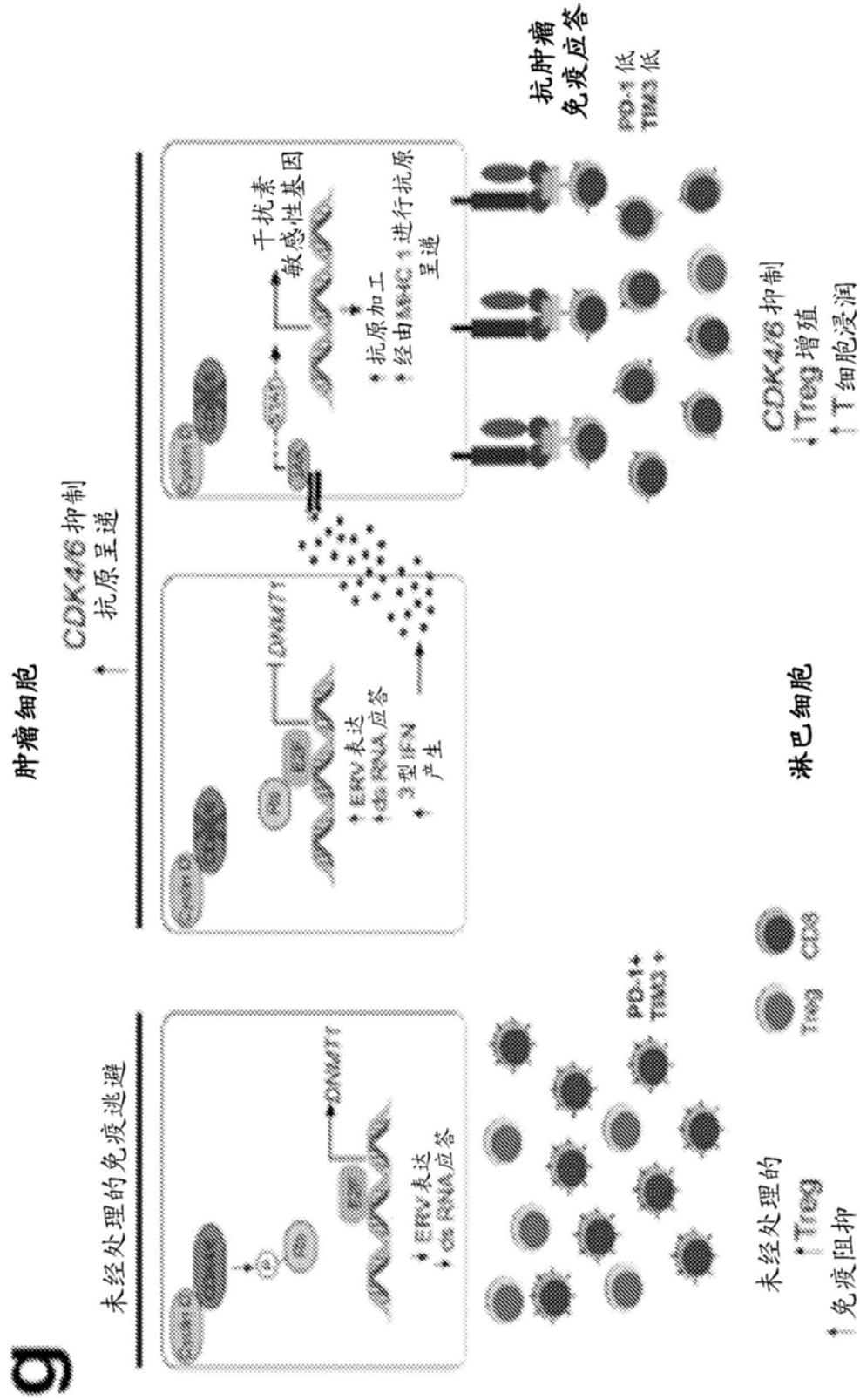


图13(续)

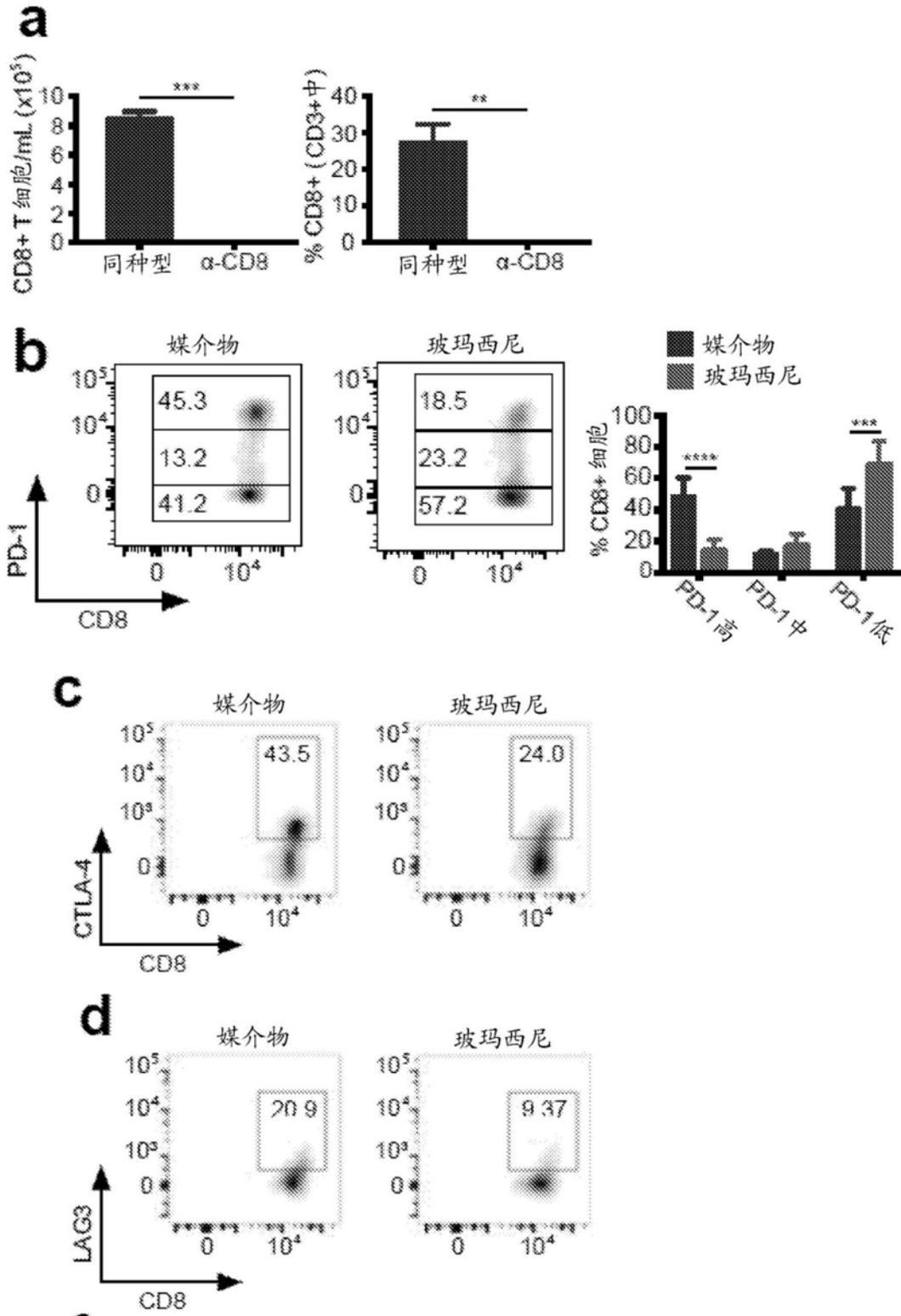


图14

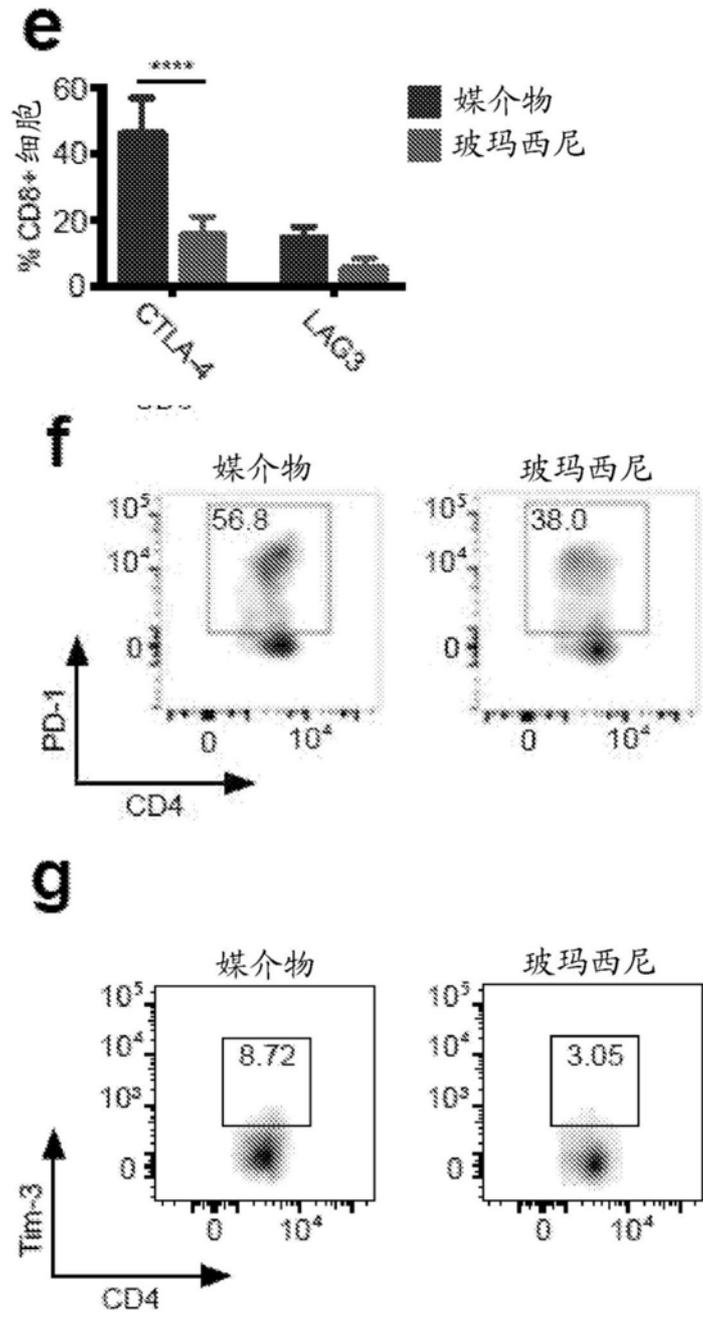


图14(续)

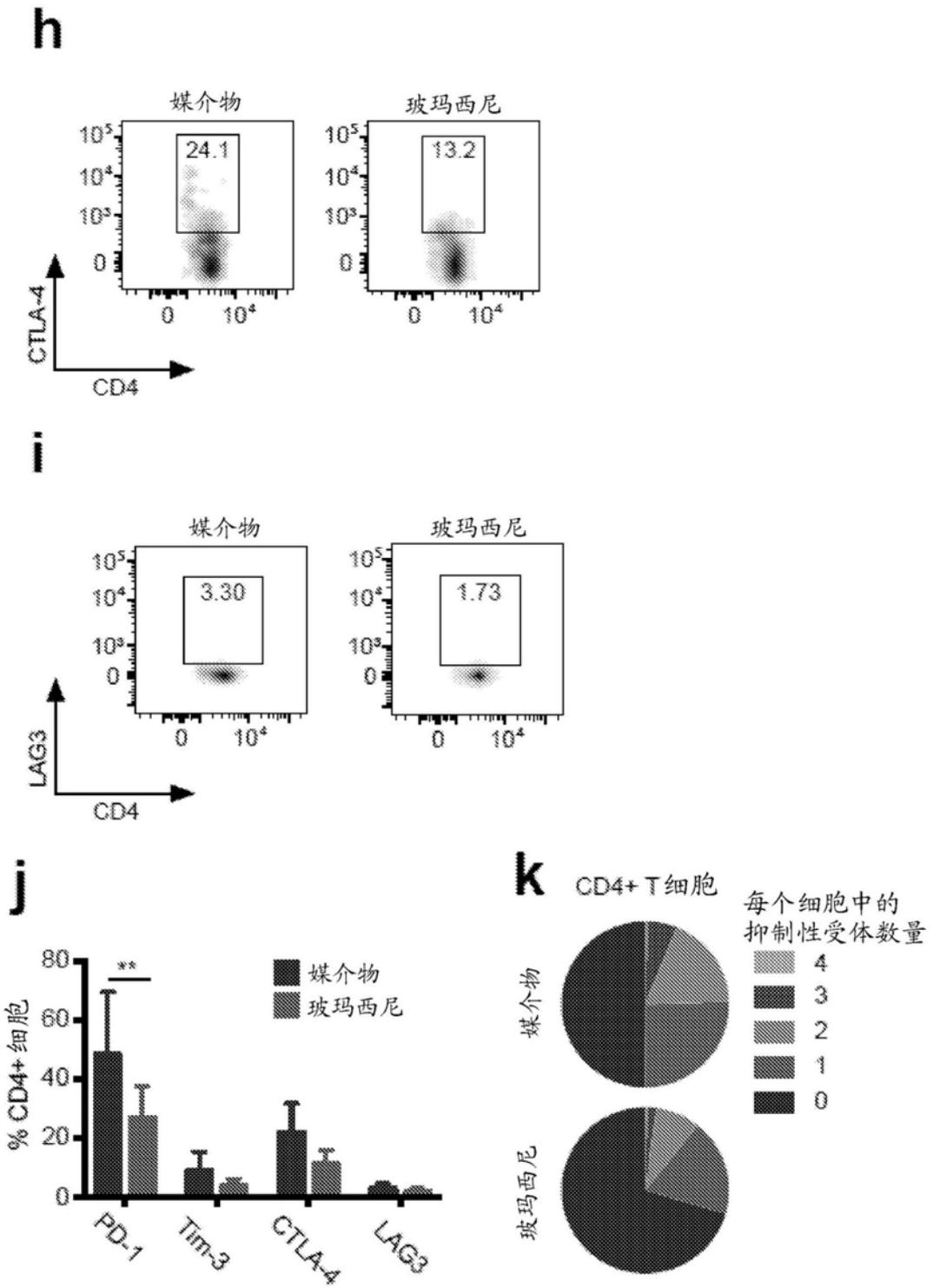


图14(续)

A

背景知识与基本原理

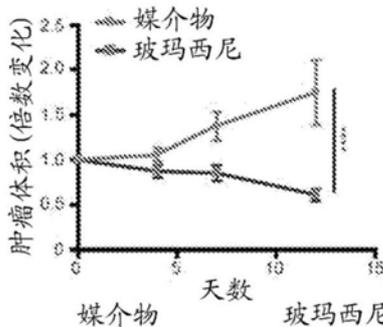
细胞周期蛋白D: 细胞周期蛋白依赖性激酶4和6 (CDK4/6) 轴是人类癌症中最频繁失调的通路之一。在临床试验中, CDK4/6 抑制剂已经显示出针对许多实体肿瘤(包括乳腺癌)的显著活性。

临床试验已经证实, CDK4/6 抑制可以导致肿瘤消退。已知 CDK4/6 抑制剂可阻断乳腺癌细胞增殖, 但不能直接诱导肿瘤细胞凋亡。因此, CDK4/6 抑制导致肿瘤消退的机制尚不清楚。

已经假定 CDK4/6 抑制将通过阻止抗肿瘤免疫细胞的增殖而阻碍抗肿瘤免疫力, 但是尚未很好地表征 CDK4/6 抑制剂对肿瘤微环境中的免疫细胞的影响。

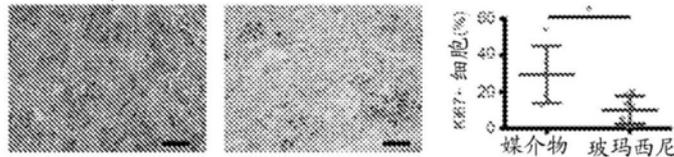
结果

CDK4/6 抑制触发 MMTV-rtTA/tetO-HER2 肿瘤的消退



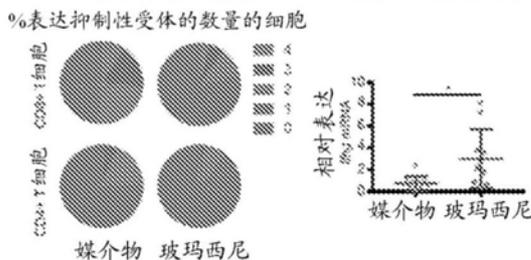
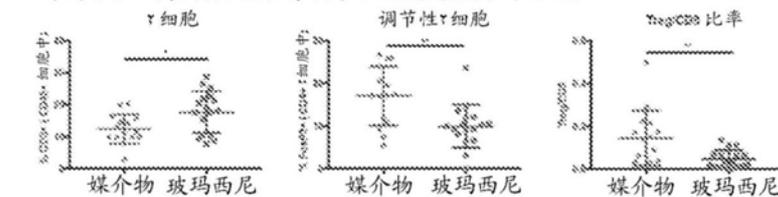
我们通过每天用 30 mg/kg 玻玛西尼治疗 MMTV-rtTA/tetO-HER2 小鼠(最近描述的管腔乳腺癌模型¹)来评估 CDK4/6 抑制在体内的作用。该治疗方案导致大体积肿瘤 (>500 mm³) 消退。

如通过 Ki67+ 细胞的百分比评定的, 玻玛西尼抑制肿瘤细胞增殖。鉴于已知 CDK4/6 抑制会导致细胞生长停滞, 但不会导致细胞凋亡, 我们决定探究肿瘤微环境可能促成对玻玛西尼的应答的可能性。



玻玛西尼的免疫调节作用

首先, 我们通过流式细胞术表征了玻玛西尼对肿瘤微环境的作用。在用玻玛西尼治疗的肿瘤中, B 细胞、NK 细胞、单核细胞和中性粒细胞的数量没有变化。然而, CD3+ γ 细胞的百分比增加, 而调节性 γ 细胞的分数下降。重要的是, 在用玻玛西尼治疗的肿瘤中 Treg/CD8 比率降低, 这表明出现了有利于抗肿瘤免疫力的改变。



此外, 我们注意到表达多种抑制性共受体 (PD1, CTLA4, TIM3, LAG3) 的 CD8+ T 细胞和 CD4+ T 细胞的分数降低。结合观察到从大体积肿瘤 mRNA 中测定的 IFN-γ 表达增加, 这表明用玻玛西尼治疗的肿瘤中 T 细胞活化增强。

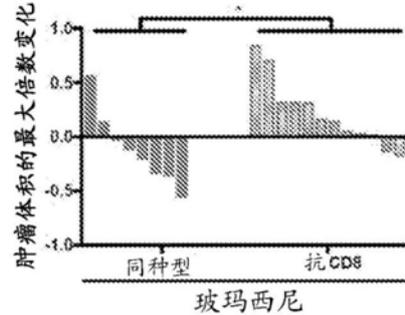
图15

B

结果

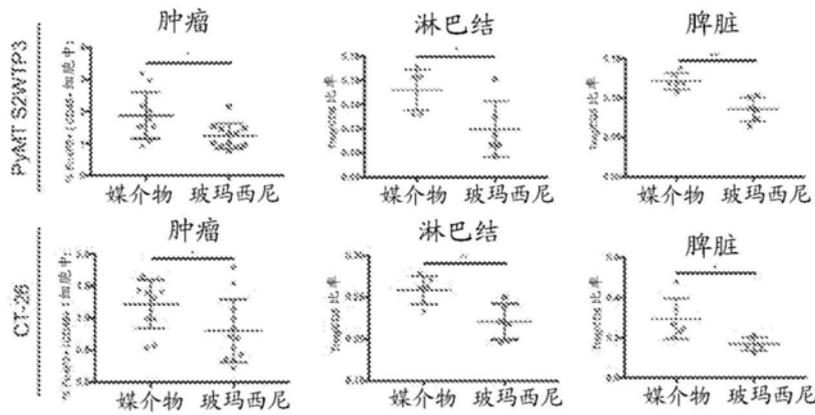
对玻玛西尼的应答部分取决于CD8+ T细胞

为了评估CD8+细胞毒性T细胞对于MMTV-*rtTA*/*Cre*-*NER2*肿瘤对玻玛西尼作出应答的必要性，我们评定了在存在或不存在CD8+ T细胞的情况下肿瘤体积的变化。在开始玻玛西尼治疗之前48小时和24小时注射抗CD8抗体(克隆YTS 169.4)或同种型抗体(克隆LTF-2)抗体，随后每5天注射一次。



在许多小鼠模型中也观察到使用玻玛西尼导致调节性T细胞减少

为了确定在其他小鼠品系和肿瘤类型中利用CDK4/6抑制减少调节性T细胞的普遍性，我们利用了PyMT S2WTP3可植入乳腺癌模型²和CT-26结肠直肠癌模型。玻玛西尼在两种模型中均显著抑制肿瘤生长(数据未示出)。



CDK4/6抑制后调节性T细胞的减少是肿瘤非依赖性的

为了确定观察到的调节性T细胞减少是否是肿瘤依赖性的，用SG m38k9玻玛西尼或帕博西尼将幼稚FVB小鼠治疗12天。引人注目的是，淋巴结和脾脏中的调节性T细胞的百分比下降。此外，CDK4/6抑制降低了调节性T细胞/CD8比率。鉴于CDK4/6抑制对调节性T细胞的作用是肿瘤非依赖性的，我们开始调查研究玻玛西尼对T细胞群的直接作用。

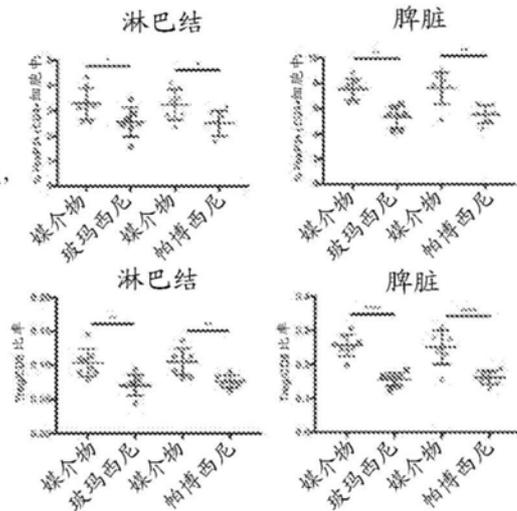


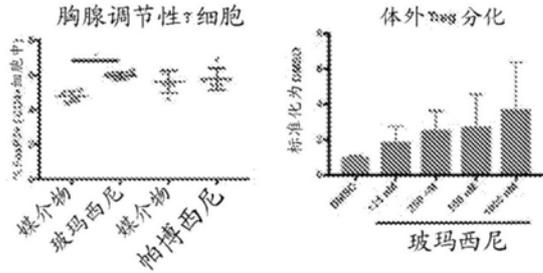
图15(续)

C

结果

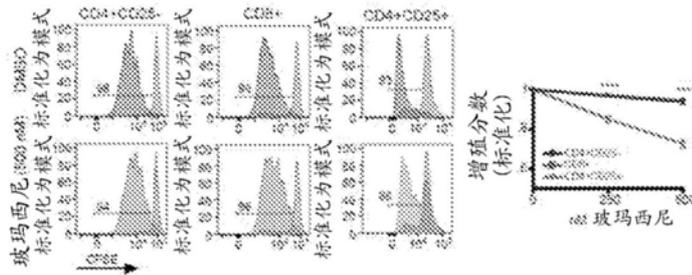
CDK4/6 抑制没有阻碍胸腺调节性T细胞和外周调节性T细胞的产生

为了探究 CDK4/6 抑制减少调节性T细胞的潜在机制,我们检查了其对于胸腺中的天然调节性T细胞产生的影响。在用玻玛西尼或帕博西尼治疗的幼稚FVB小鼠中,未观察到胸腺调节性T细胞缺陷。另外,在体外存在TGF-β的情况下,CDK4/6抑制没有阻止幼稚CD4+ T细胞向调节性T细胞分化。

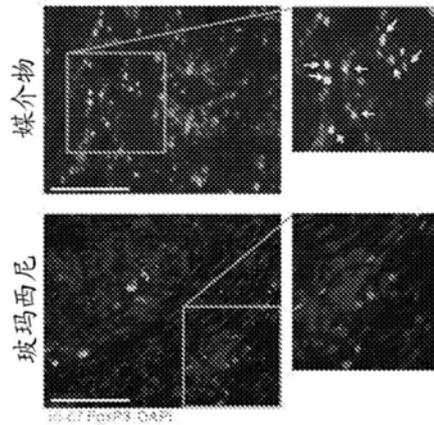
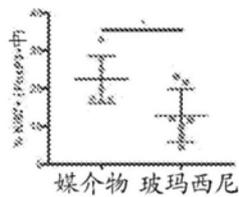


CDK4/6 抑制优先抑制调节性T细胞增殖

由于我们没有检测到天然或诱导型调节性T细胞的形成受到阻碍,所以接下来评估了CDK4/6抑制在体外和体内对T细胞增殖的影响。我们从幼稚FVB小鼠中分离了CD4+ CD25-细胞、CD4+ CD25+细胞和CD8+ T细胞,并评定了增殖响应于CD3/CD28和IL-2的情况。玻玛西尼以剂量依赖性方式优先抑制CD4+ CD25+调节性T细胞的增殖。



另外,MMTV-RTA/HER2肿瘤中K167的免疫荧光揭示,用玻玛西尼治疗的肿瘤中FoxP3+调节性T细胞的K167+细胞百分比降低。相反,CD8+ T细胞的K167+细胞百分比没有显著降低(数据未示出)。



我们目前正在调查研究优先抑制调节性T细胞增殖隐含的潜在分子机制。

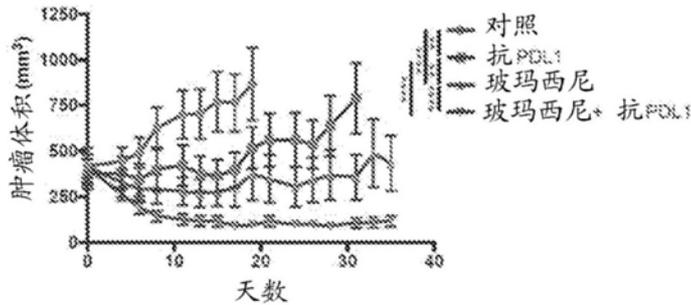
图15(续)

D

结果

CDK4/6 抑制增强 MMTV-rtTA/tetO-HER2 肿瘤对检查点阻断的应答

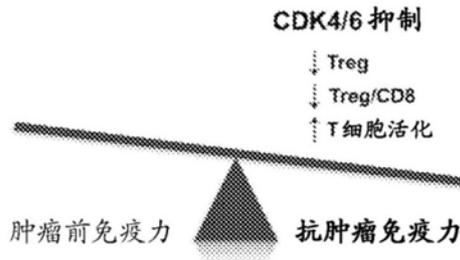
鉴于观察到的玻璃西尼的免疫调节作用，我们假设添加玻璃西尼可以增强对免疫检查点阻断（诸如抗 PDL1）的应答。先用媒介物或玻璃西尼治疗 MMTV-rtTA/tetO-HER2 小鼠3天，之后开始施用抗 PDL1 或同种型抗体。值得注意的是，向抗 PDL1 中添加玻璃西尼既增加了应答的深度，又增加了应答的持续时间。



结论

CDK4/6 抑制改变了平衡，有利于抗肿瘤免疫力

- CDK4/6 抑制减少了调节性T细胞并减小了Treg/CD8比率
 - 经由优先抑制调节性T细胞增殖的肿瘤非依赖性机制
 - 在多种肿瘤类型和小鼠品系中观察到的作用
- CDK4/6 抑制与T细胞活化增加相关联
- 对玻璃西尼的应答部分取决于CD8+ T细胞
- 添加 CDK4/6 抑制增强了对免疫检查点阻断的应答



致谢:

感谢Navroz Khan, Tyler Lanzowski, Anna McInerney 和波士顿儿童医院Heme/Onc/HSCJ 流式细胞术检测装置为实验提供的帮助。CY-26 细胞系是 Steve Eberhard (哈佛医学院, Boston, MA) 实验室的馈赠; PyMT S2WTP3 细胞系是 Andreas Möller (QIMR Berghofer Medical Research Institute, Brisbane, Australia) 的馈赠。这项工作得到了以下奖项的支持: 授予Molly DeCristis的兰德里癌症生物学研究奖学金 (Landry Cancer Biology Research Fellowship); 由丹娜-法伯 (Dana-Farber)/哈佛癌症中心乳腺癌SPORE项目 (NIH 2015 P50 CA) 提供给 Shom Goel 的生涯发展奖; 以及授予 Sandra McAtister 的DOD 希望时代 (DOD Era of Hope) W81XWH-14-1-0191, NIH (NCI) R01 CA166284, 美国青年科学家与工程师总统奖 (Presidential Early Career Award for Scientists and Engineers)。

参考文献:

- Goel S, Wang Q, Watt AC, Tolaney SM, Dillon DA, Li W, et al.: Overcoming therapeutic resistance in HER2-positive breast cancers with CDK4/6 inhibitors. *Cancer Cell* 29, 255-269 (2016).
- Wong, C.S., et al. Vascular normalization by loss of Siah2 results in increased chemotherapeutic efficacy. *Cancer Res* 72, 1684-1704 (2012).

图15 (续)