



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112111575 A

(43) 申请公布日 2020.12.22

(21) 申请号 202011004230.7

(22) 申请日 2020.09.22

(71) 申请人 任国胜

地址 400010 重庆市渝中区友谊路1号重医
附一院5号楼A栋20楼

申请人 李洪忠

(72) 发明人 任国胜 李洪忠 伍昱燊 李琴
杜琪

(74) 专利代理机构 北京领科知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 11690

代理人 张丹 王立红

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

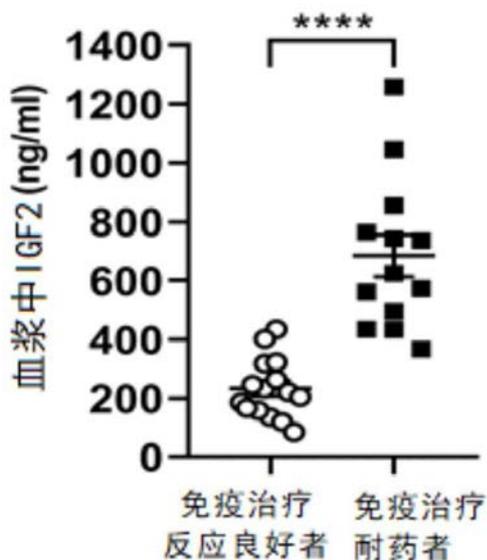
权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

胰岛素样生长因子2在恶性肿瘤预后和治疗
选择中的应用

(57) 摘要

胰岛素样生长因子2在恶性肿瘤预后和治疗
选择中的应用。本发明公开了一种胰岛素样生长
因子2(insulin-like growth factor 2,IGF2)
在恶性肿瘤的预后和治疗选择中的应用。发明人
通过实验研究发现,IGF2高表达与肿瘤患者不良
预后密切相关,还可用于提前判断肿瘤患者免疫
治疗疗效;抑制IGF2信号传导可显著抑制肿瘤生
长,逆转免疫治疗耐药。本发明有利于在临床实
践中指导临床医生准确预测恶性肿瘤患者预后,
判断恶性肿瘤免疫治疗的优势人群,精准判断病
情变化,也有利于指导围绕此靶点开展的药物研
发,并能依据其表达水平开展有效的靶向治疗,
尤其是针对免疫治疗耐药患者开展的联合治疗,
将为此类患者带来福音,可产生良好的社会效益
和经济效益。



1. 一种检测IGF2基因的产品在制备用于评估恶性肿瘤的预后、评估恶性肿瘤的免疫治疗疗效、评估恶性肿瘤的免疫治疗耐药风险、评估恶性肿瘤的治疗方案选择的工具中的应用。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述检测IGF2基因的产品包括检测IGF2基因的表达水平的试剂。

3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述试剂包括能够定量IGF2基因mRNA的试剂;和/或,所述试剂包括能够定量IGF2蛋白的抗体或其片段。

4. 如权利要求2或3所述的应用,其特征在于,所述检测IGF2基因的产品为试剂盒、芯片、试纸或高通量测序平台。

5. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,用于所述IGF2基因检测的样本为受试者的肿瘤组织、血液或血浆。

6. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述恶性肿瘤包括乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、肝癌、食管癌、甲状腺癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、白血病、鼻咽癌、黑色素瘤。

7. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述治疗方案选择包括选择免疫治疗联合IGF2信号通路抑制剂和/或IGF2基因表达抑制剂。

8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述免疫治疗包括:施用单克隆抗体、施用免疫检查点抑制剂、施用癌症疫苗、进行非特异性免疫治疗、进行CAR-T细胞疗法。

9. 一种IGF2信号通路抑制剂和/或IGF2基因表达抑制剂在制备治疗恶性肿瘤、提高恶性肿瘤的免疫治疗疗效、提高恶性肿瘤对免疫治疗的敏感性、降低恶性肿瘤的免疫治疗耐药性的药物中的应用。

10. 如权利要求9所述的应用,其特征在于,所述免疫治疗包括:施用单克隆抗体、施用免疫检查点抑制剂、施用癌症疫苗、进行非特异性免疫治疗、进行CAR-T细胞疗法;

所述免疫检查点抑制剂包括针对PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4、CD160、VISTA的免疫检查点抑制剂。

11. 如权利要求10所述的应用,其特征在于,所述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体;所述IGF2信号通路抑制剂为linsitinib。

12. 一种药物组合物,其包含免疫治疗活性成分以及IGF2信号通路抑制剂和/或IGF2基因表达抑制剂。

13. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在于,所述免疫治疗活性成分包括免疫检查点抑制剂,所述免疫检查点抑制剂包括针对PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4、CD160、VISTA的免疫检查点抑制剂。

14. 如权利要求13所述的药物组合物,其特征在于,所述免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

15. 如权利要求12-14任一项所述的药物组合物,其特征在于,所述IGF2信号通路抑制剂为linsitinib。

胰岛素样生长因子2在恶性肿瘤预后和治疗选择中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及一种胰岛素样生长因子2 (insulin-like growth factor 2,IGF2)在恶性肿瘤(如乳腺癌)的预后和治疗选择中的应用。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是威胁人类健康的常见疾病,寻找安全可靠的预后及治疗疗效判断标志物及有效治疗靶点一直是医学界尤其是肿瘤领域工作者亟待解决的关键问题[1]。当前应用于肿瘤诊断、预后及治疗疗效判断的标志物种类很多,方法多样,判断标准不一,尚缺乏检测方便、结果可靠的有效标志物。

[0003] 目前临床上常用的肿瘤诊断及治疗标志物如下:①诊断标志物如癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)、前列腺特异性抗原(PSA)和甲状腺球蛋白(Tg)等。CEA表达可见于正常组织和良性肿瘤中,对肿瘤的疗效判断、病情发展监测和预后评估是一个较好的肿瘤标志物,但特异性及灵敏度不高[2]。AFP主要用于原发性肝细胞癌或性腺外某些生殖细胞肿瘤(如内胚窦瘤)的诊断和鉴别诊断[3]。PSA是前列腺及其肿瘤的特异性标记[4]。Tg是一种确认转移性甲状腺癌还是非转移性甲状腺癌的可靠标记[5]。②肿瘤细胞增生标志物,如Ki-67及PCNA(增殖细胞核抗原)。高Ki-67及PCNA标记指数病人无病生存率及总生存率明显下降[6,7]。③癌基因、生长因子与受体,如c-erbB-2,几种肿瘤系统有c-erbB-2的过表达扩增,报道最多的是乳腺癌,c-erbB-2过表达见于25-30%的原发性乳腺癌病例。淋巴结阳性的乳腺癌c-erbB-2蛋白的过表达是预后不良的重要因素[8]。另外如生长因子及受体表皮生长因子受体(EGFR),EGFR的表达与肿瘤进展有关。大约30%的乳腺癌表达EGFR,EGFR阳性病人的预后明显差于EGFR阴性病人[9]。④预测治疗反应的标志物,如ER和PR,免疫组化法检测ER、PR变化与乳腺癌病人预后密切相关,亦与其他公认的预后因素,如肿瘤分级、倍体性及分期有关[10]。此外,耐药相关蛋白如P糖蛋白(P-gp)等可见于高度固有耐药的肿瘤,可用于判断对传统化疗耐药反应[11]。如上综述所见,有些标志物限定于特定肿瘤的诊断与治疗反应判断,尚无法开发成有效的治疗靶点。有些标志物可以作为治疗的有效靶点,如c-erbB-2和EGFR,已开发出针对性的靶向药物,但也受限于其在癌组织中的表达水平,仍有很多患者无法使用。因此,寻找潜在可开发的诊疗靶点仍是一项重要挑战。

[0004] 目前,随着肿瘤基础研究尤其是肿瘤免疫学研究的深入,靶向肿瘤免疫检查点分子如程序性死亡受体1(programmed cell death 1,PD-1)及其配体PD-L1和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4,CTLA4)等的免疫检查点抑制剂(immune checkpoint blockade,ICB)疗法革新了现有肿瘤治疗方法,已逐渐成为治疗黑色素瘤、肺癌、结肠癌、肾癌及乳腺癌等恶性肿瘤的有效手段,是目前肿瘤研究领域的热点。但目前只有少数患者对现有免疫治疗有效,如免疫治疗效果相对理想的黑色素瘤,抗PD-1疗法的反应率也只有30-40%[12,13]。因此,寻找免疫治疗耐药的潜在机制,并针对性地开发有效逆转方法是目前肿瘤免疫治疗面临的难点。

[0005] 参考文献:

- [0006] 1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018, 68(6):394-424.
- [0007] 2. Nicholson BD, Shinkins B, Pathiraja I, Roberts NW, James TJ, Mallett S, Perera R, Primrose JN, Mant D: Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2015(12):CD011134.
- [0008] 3. Sauzay C, Petit A, Bourgeois AM, Barbare JC, Chauffert B, Galmiche A, Houessinon A: Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2016, 463:39-44.
- [0009] 4. Sadi MV: PSA screening for prostate cancer. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 2017, 63(8):722-725.
- [0010] 5. Nixon AM, Provatopoulou X, Kalogera E, Zografos GN, Gounaris A: Circulating thyroid cancer biomarkers: Current limitations and future prospects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2017, 87(2):117-126.
- [0011] 6. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN: Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep* 2015, 11(3):1566-1572.
- [0012] 7. Lv Q, Zhang J, Yi Y, Huang Y, Wang Y, Zhang W: Proliferating Cell Nuclear Antigen Has an Association with Prognosis and Risks Factors of Cancer Patients: a Systematic Review. *Mol Neurobiol* 2016, 53(9):6209-6217.
- [0013] 8. Wesola M, Jelen M: A Comparison of IHC and FISH Cytogenetic Methods in the Evaluation of HER2 Status in Breast Cancer. *Adv Clin Exp Med* 2015, 24(5):899-903.
- [0014] 9. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L: Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 2018, 12(1):3-20.
- [0015] 10. Yip CH, Rhodes A: Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncol* 2014, 10(14):2293-2301.
- [0016] 11. Yano K, Tomono T, Ogihara T: Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators. *Biol Pharm Bull* 2018, 41(1):11-19.
- [0017] 12. Ribas A, Wolchok JD: Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 2018, 359(6382):1350-1355.
- [0018] 13. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A: Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017, 168(4):707-723.

发明内容

[0019] 发明人通过大量实验研究发现, 癌组织中胰岛素样生长因子2 (insulin-like growth factor 2, IGF2) 表达与肿瘤组织中低T细胞浸润密切相关, IGF2高表达与肿瘤患者不良预后密切相关, 还可用于提前判断肿瘤患者免疫治疗疗效。抑制成纤维细胞中IGF2表达或通过特异性阻断剂抑制IGF2信号通路后发现, 抑制IGF2信号传导可显著抑制肿瘤

生长,逆转免疫治疗耐药,提示IGF2是一个潜在有效的治疗靶点。

[0020] 本发明提供一种检测IGF2基因的产品在制备用于评估恶性肿瘤的预后、评估恶性肿瘤的免疫治疗疗效、评估恶性肿瘤的免疫治疗耐药风险、评估恶性肿瘤的治疗方案选择的工具中的应用。

[0021] 具体地,上述检测IGF2基因的产品包括检测IGF2基因的表达水平的试剂。

[0022] 在本发明的一个实施方式中,上述试剂包括能够定量IGF2基因mRNA的试剂。

[0023] 具体地,上述能够定量IGF2基因mRNA的试剂可包括特异性扩增IGF2基因的引物和/或特异性识别IGF2基因的探针。

[0024] 在本发明的一个实施方式中,上述试剂包括能够定量IGF2蛋白的试剂。

[0025] 具体地,上述能够定量IGF2蛋白的试剂可包括能够特异性结合IGF2蛋白的物质(例如抗体或其片段)。

[0026] 在本发明的一个实施方式中,上述检测IGF2基因的产品可以为试剂盒、芯片、试纸等,其包含能够定量IGF2基因mRNA的试剂(例如特异性扩增IGF2基因的引物和/或特异性识别IGF2基因的探针)和/或能够定量IGF2蛋白的试剂(例如能够特异性结合IGF2蛋白的物质(例如抗体或其片段))。

[0027] 在本发明的另一个实施方式中,上述检测IGF2基因的产品可以为高通量测序平台,其使用能够定量IGF2基因mRNA的试剂(例如特异性扩增IGF2基因的引物和/或特异性识别IGF2基因的探针)和/或能够定量IGF2蛋白的试剂(例如能够特异性结合IGF2蛋白的物质(例如抗体或其片段))对IGF2基因进行检测。

[0028] 本发明的检测IGF2基因的产品可基于使用核酸分子的已知方法来发挥其功能:如聚合酶链式反应(PCR)、Southern印迹杂交、Northern印迹杂交、点杂交、荧光原位杂交(FISH)、DNA微阵列、高通量测序平台等,特别是PCR方法,例如实时荧光定量PCR法。

[0029] 本发明的检测IGF2蛋白的产品可基于使用抗体的已知方法来发挥其功能:例如,可以采用ELISA、放射免疫测定法、免疫组织化学法、免疫荧光技术、Western印迹等。

[0030] 具体地,用于上述IGF2基因的检测的样本,可以使用例如自活检受试者获得的组织样品或流体,例如,组织、血液、血浆、血清、淋巴液、尿液、浆膜腔液、脊髓液、滑液、房水、泪液、唾液等或其级分或经过处理的材料。在本发明的一个实施例中,该样本为肿瘤组织。在本发明的另一个实施例中,该样本为血液(全血)或血浆。

[0031] 具体地,上述恶性肿瘤包括,但不限于,乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、肝癌、食管癌、甲状腺癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴瘤、白血病、鼻咽癌、黑色素瘤等。在本发明的一个实施例中,上述恶性肿瘤为乳腺癌。

[0032] 具体地,上述治疗方案选择包括选择免疫治疗联合IGF2信号通路抑制剂和/或IGF2基因表达抑制剂。

[0033] 具体地,上述免疫治疗包括:施用单克隆抗体、施用免疫检查点抑制剂、施用癌症疫苗、进行非特异性免疫治疗、进行嵌合抗原受体(CAR)-T细胞疗法等。

[0034] 在本发明的一个实施方式中,上述免疫治疗包括施用免疫检查点抑制剂,例如,单独施用免疫检查点抑制剂,或施用免疫检查点抑制剂与化学疗法、放射疗法、靶向治疗、中医中药治疗、基因治疗、内分泌治疗、高温治疗、激光治疗、冷冻治疗等肿瘤治疗手段中的一种或多种联合。

[0035] 具体地,上述免疫检查点抑制剂可以为,例如,针对PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4、CD160、VISTA等的免疫检查点抑制剂,特别是抗PD-1抗体(例如抗PD-1单克隆抗体)、抗PD-L1抗体(例如抗PD-L1单克隆抗体)。

[0036] 本发明还提供一种用于评估恶性肿瘤的预后、评估恶性肿瘤的免疫治疗疗效、评估恶性肿瘤的免疫治疗耐药风险、评估恶性肿瘤的治疗方案选择的工具,其包括检测IGF2基因的产品。

[0037] 具体地,上述检测IGF2基因的产品、恶性肿瘤具有本发明上述相应定义。

[0038] 具体地,上述工具可以为试剂盒、芯片、试纸,其包含上述检测IGF2基因的产品,也可以为高通量测序平台,其使用上述检测IGF2基因的产品对IGF2基因进行检测。

[0039] 本发明还提供一种IGF2信号通路抑制剂和/或IGF2基因表达抑制剂在制备杀伤肿瘤细胞、降低肿瘤生长速率、治疗恶性肿瘤的药物中的应用。

[0040] 具体地,在上述应用中,所述药物还包含免疫治疗活性成分,例如,单克隆抗体、免疫检查点抑制剂、癌症疫苗、非特异性免疫治疗药物、CAR-T细胞。

[0041] 在本发明的一个实施方式中,上述免疫治疗活性成分包括免疫检查点抑制剂,例如,针对PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4、CD160、VISTA等的免疫检查点抑制剂,特别是抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体。

[0042] 具体地,上述IGF2信号通路抑制剂可以为任何已知可抑制IGF2信号通路的试剂,例如linsitinib。

[0043] 本发明还提供一种IGF2信号通路抑制剂和/或IGF2基因表达抑制剂在制备提高恶性肿瘤的免疫治疗疗效、提高恶性肿瘤对免疫治疗的敏感性、降低恶性肿瘤的免疫治疗耐药性的药物中的应用。

[0044] 具体地,上述免疫治疗包括:施用单克隆抗体、施用免疫检查点抑制剂、施用癌症疫苗、进行非特异性免疫治疗、进行嵌合抗原受体(CAR)-T细胞疗法等。

[0045] 在本发明的一个实施方式中,上述免疫治疗包括施用免疫检查点抑制剂,例如,单独施用免疫检查点抑制剂,或施用免疫检查点抑制剂与化学疗法、放射疗法、靶向治疗、中医中药治疗、基因治疗、内分泌治疗、高温治疗、激光治疗、冷冻治疗等肿瘤治疗手段中的一种或多种联合。

[0046] 具体地,上述免疫检查点抑制剂可以为,例如,针对PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4、CD160、VISTA等的免疫检查点抑制剂,特别是抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体。

[0047] 本发明还提供一种药物组合物,其包含免疫治疗活性成分以及IGF2信号通路抑制剂和/或IGF2基因表达抑制剂中。

[0048] 具体地,上述免疫治疗活性成分包括免疫检查点抑制剂,例如,针对PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4、CD160、VISTA等的免疫检查点抑制剂,特别是抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体。

[0049] 具体地,上述IGF2信号通路抑制剂可以为任何已知可抑制IGF2信号通路的试剂,例如linsitinib。

[0050] 在本发明的一个实施例中,上述药物组合物包含抗PD-1抗体和linsitinib。

[0051] 本发明还提供一种IGF2作为靶点在体外筛选恶性肿瘤治疗药物中的用途。

[0052] 具体地,上述恶性肿瘤治疗药物具有以下作用中的一种或多种:抑制 IGF2转录和/或翻译、抑制IGF2信号通路、提高恶性肿瘤的免疫治疗疗效、提高恶性肿瘤对免疫治疗的敏感性、降低恶性肿瘤的免疫治疗耐药性。

[0053] 本发明还提供一种体外筛选恶性肿瘤治疗药物的方法,其包括以下步骤:以IGF2作为药物作用靶点,筛选出IGF2表达抑制剂、IGF2信号通路抑制剂作为候选药物。

[0054] 具体地,上述方法还包括对候选药物进行试验能否提高恶性肿瘤的免疫治疗疗效、提高恶性肿瘤对免疫治疗的敏感性、降低恶性肿瘤的免疫治疗耐药性,筛选出恶性肿瘤治疗药物。

[0055] 本发明还提供一种评估恶性肿瘤的预后的方法,其包括检测有此需要的受试者中IGF2基因表达水平的步骤。

[0056] 具体地,上述方法可包括如下步骤:

[0057] (1) 获取受试者样本;

[0058] (2) 检测受试者样本中的IGF2基因表达水平;

[0059] (3) 将测得的IGF2基因的表达水平与受试者的肿瘤预后关联起来。

[0060] 具体地,上述样本可以使用例如自活检受试者获得的组织样品或流体,例如,组织、血液、血浆、血清、淋巴液、尿液、浆膜腔液、脊髓液、滑液、房水、泪液、唾液等或其级分或经过处理的材料。在本发明的一个实施例中,该样本为肿瘤组织。在本发明的另一个实施例中,该样本为血液或血浆。

[0061] 具体地,上述恶性肿瘤包括,但不限于,乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、肝癌、食管癌、甲状腺癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴癌、白血病、鼻咽癌、黑色素瘤等。在本发明的一个实施例中,上述恶性肿瘤为乳腺癌。

[0062] 具体地,上述受试者已通过手术、化学疗法、放射疗法等或其任意组合进行治疗。

[0063] 具体地,IGF2基因表达水平高(例如,血浆中IGF2蛋白大于,例如,410、450、500、600、700、800、900、1000ng/ml),则该受试者预后不良的风险高;IGF2基因表达水平低(例如,血浆中IGF2蛋白小于,例如,410、400、350、300、250、200、150、100ng/ml),则该受试者预后不良的风险低。具体的预后情况,还需临床医生结合该受试者的其他检测指标综合评估。

[0064] 本发明还提供一种评估恶性肿瘤的免疫治疗疗效、评估恶性肿瘤的免疫治疗耐药风险的方法,其包括检测有此需要的受试者中IGF2基因表达水平的步骤。

[0065] 具体地,上述方法可包括如下步骤:

[0066] (1) 获取受试者样本;

[0067] (2) 检测受试者样本中的IGF2基因表达水平;

[0068] (3) 将测得的IGF2基因的表达水平与受试者的免疫治疗疗效、耐药风险关联起来。

[0069] 具体地,上述样本可以使用例如自活检受试者获得的组织样品或流体,例如,组织、血液、血浆、血清、淋巴液、尿液、浆膜腔液、脊髓液、滑液、房水、泪液、唾液等或其级分或经过处理的材料。在本发明的一个实施例中,该样本为肿瘤组织。在本发明的另一个实施例中,该样本为血液或血浆。

[0070] 具体地,上述恶性肿瘤包括,但不限于,乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、肝癌、食

管癌、甲状腺癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴癌、白血病、鼻咽癌、黑色素瘤等。在本发明的一个实施例中，上述肿瘤为乳腺癌。

[0071] 具体地，IGF2基因表达水平高（例如，血浆中IGF2蛋白大于，例如，400、450、500、550、600、650、700、750、800、900、1000、1100、1200ng/ml），则该受试者的免疫治疗疗效不佳、对免疫治疗耐药的风险高；IGF2基因表达水平低（例如，血浆中IGF2蛋白小于，例如，400、350、300、250、200、150、100、50ng/ml），则该受试者对免疫治疗反应良好的概率高。具体的免疫治疗疗效和耐药情况，还需临床医生结合该受试者的其他检测指标综合评估。

[0072] 本发明还提供一种选择用于恶性肿瘤的治疗方案的方法，其包括检测有此需要的受试者中IGF2基因表达水平的步骤。

[0073] 具体地，上述治疗方案选择包括选择免疫治疗联合IGF2信号通路抑制剂、IGF2基因表达抑制剂。

[0074] 具体地，上述免疫治疗包括：施用单克隆抗体、施用免疫检查点抑制剂、施用癌症疫苗、进行非特异性免疫治疗、进行嵌合抗原受体（CAR）-T细胞疗法等。

[0075] 在本发明的一个实施方式中，上述免疫治疗包括施用免疫检查点抑制剂。

[0076] 具体地，上述免疫检查点抑制剂可以为，例如，针对PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4、CD160、VISTA等的免疫检查点抑制剂，特别是抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体。

[0077] 具体地，上述方法可包括如下步骤：

[0078] (1) 获取受试者样本；

[0079] (2) 检测受试者样本中的IGF2基因表达水平；

[0080] (3) 将测得的IGF2基因的表达水平与受试者的治疗方案选择关联起来。

[0081] 具体地，上述样本可以使用例如自活检受试者获得的组织样品或流体，例如，组织、血液、血浆、血清、淋巴液、尿液、浆膜腔液、脊髓液、滑液、房水、泪液、唾液等或其级分或经过处理的材料。在本发明的一个实施例中，该样本为肿瘤组织。在本发明的另一个实施例中，该样本为血液或血浆。

[0082] 具体地，上述恶性肿瘤包括，但不限于，乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、肝癌、食管癌、甲状腺癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、淋巴癌、白血病、鼻咽癌、黑色素瘤等。在本发明的一个实施例中，上述肿瘤为乳腺癌。

[0083] 具体地，IGF2基因表达水平高（例如，血浆中IGF2蛋白大于，例如，400、450、500、550、600、650、700、750、800、900、1000、1100、1200ng/ml），则可以对受试者选择免疫治疗联合IGF2通路抑制剂的治疗方案。具体的治疗方案选择，还需临床医生结合该受试者的具体情况综合评估。

[0084] 本发明还提供一种恶性肿瘤的治疗方法，其包括向有此需要的受试者施用IGF2信号通路抑制剂和/或IGF2基因表达抑制剂的步骤。

[0085] 具体地，上述方法还包括进行免疫治疗的步骤。

[0086] 本发明还提供一种恶性肿瘤的治疗方法，其包括抑制有此需要的受试者中IGF2基因表达和进行免疫治疗的步骤。

[0087] 具体地，上述抑制IGF2基因表达可以通过例如基因敲除、敲低、施用IGF2基因表达抑制剂或IGF2信号通路抑制剂等来实现。本发明有利于在临床实践中指导临床医生准

确预测恶性肿瘤患者预后,在广大人群中筛选出预后不良患者,及时发现病情变化,指导临床用药,避免过度检查,减少身体不必要的损伤,避免经济的浪费。本发明有利于指导临床医师判断恶性肿瘤免疫治疗的优势人群,做到有的放矢,同时精准判断病情变化。本发明有利于指导围绕此靶点开展的药物研发,并能依据其表达水平开展有效的靶向治疗,尤其是针对免疫治疗耐药患者开展的联合治疗,将为此类患者带来福音,可产生良好的社会效益和经济效益。

附图说明

[0088] 图1所示为实施例1的实验结果,其中,A:人乳腺癌组织样本中IGF2表达水平,低表达vs高表达;B:癌组织样本中不同IGF2表达水平乳腺癌患者总体生存率(OS)比较。

[0089] 图2所示为实施例2的实验结果,其中,A:人乳腺癌患者血浆中IGF2表达水平,预后良好vs预后不良;B:血浆不同IGF2表达水平乳腺癌患者总体生存率(OS)比较。

[0090] 图3所示为实施例3的实验结果,其中,接受免疫治疗(anti-PD-1)乳腺癌患者血浆中IGF2表达水平,治疗反应良好者vs治疗耐药者。

图4所示为干预3T3成纤维细胞中IGF2基因表达对4T1乳腺癌小鼠模型中肿瘤生长及免疫治疗效果的影响结果。

图5所示为使用IGF2信号通路抑制剂linsitinib对4T1乳腺癌小鼠模型中肿瘤生长及免疫治疗效果的影响结果。

具体实施方式

[0091] 除非另有定义,本发明中所使用的所有科学和技术术语具有与本发明涉及技术领域的人员通常理解的相同的含义。

[0092] “恶性肿瘤”是指以不可控制的恶性细胞生长和扩散,以及组织浸润为特征,并经药理检验确定符合国家卫生部公布的“疾病和死因分类”标准归属于恶性肿瘤之列的疾病,例如,但不限于,淋巴瘤、母细胞瘤、髓母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、肉瘤、脂肪肉瘤、滑膜细胞肉瘤、神经内分泌肿瘤、类癌肿瘤、胃泌素瘤、胰岛细胞癌、间皮瘤、神经鞘瘤、听神经瘤、脑膜瘤、腺癌、黑素瘤、白血病或淋巴样恶性肿瘤、鳞状细胞癌、上皮鳞状细胞癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、腺癌肺癌、肺鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌、肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、转移性乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、梅克尔细胞癌、食管癌、胆道肿瘤、头颈部癌和血液恶性肿瘤。恶性肿瘤的治疗方法包括手术、化学疗法、放射疗法、免疫治疗、靶向治疗、中医中药治疗、基因治疗、内分泌治疗、高温治疗、激光治疗、冷冻治疗等手段。

[0093] “免疫治疗(immunotherapy)”是指针对机体低下或亢进的免疫状态,人为地增强或抑制机体的免疫功能以达到治疗疾病目的的治疗方法。肿瘤的免疫治疗旨在激活人体免疫系统,依靠自身免疫机能杀灭癌细胞和肿瘤组织。根据治疗所用的制剂,免疫治疗可分为分子治疗、细胞治疗和免疫调节剂治疗。其中,分子治疗是指给机体输入分子制剂,以调节机体的特异性免疫应答,该分子制剂例如,但不限于,抗体(包括多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体等),分子疫苗(包括重组载体疫苗、合成肽疫苗和DNA疫苗等),细胞

因子(包括(1)外源性细胞因子;(2)细胞因子拮抗疗法,通过抑制细胞因子的产生、阻止细胞因子与相应受体结合或阻断结合后的信号转导,来阻止细胞因子发挥生物学效应)。目前,用于恶性肿瘤的免疫治疗主要包括使用单克隆抗体、免疫检查点抑制剂、癌症疫苗、非特异性免疫疗法(使用细胞因子、白细胞介素、干扰素等)、嵌合抗原受体(CAR)-T细胞疗法等。其中,免疫检查点抑制剂可以为,例如,针对PD-1、PD-L1、CTLA-4、BTLA、TIM-3、LAG-3、TIGIT、LAIR1、2B4、CD160、VISTA等的免疫检查点抑制剂,特别是抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体。

[0094] 在本发明中,“表达水平”是指样品中由IGF2基因产物的可测量的量,其中基因产物可以是转录产物或翻译产物。因此,表达水平与核酸基因产物(如mRNA或cDNA)或多肽基因产物有关。

[0095] 在本发明中,“IGF2基因”包括IGF2基因本身以及IGF2基因的任何功能等同物的多核苷酸,例如与目前国际公共核酸序列数据库GeneBank中IGF2基因DNA序列具有70%以上(例如80%以上,90%以上,95%以上,96%以上,97%以上,98%以上,99%以上,99.5%以上)同源性,且编码相同功能蛋白质的DNA序列。

[0096] 在本发明中,“预后”是指肿瘤患者在通过手术处理等抑制或缓解肿瘤后的过程或结果。在本说明书中,预后可以通过手术处理抑制或缓解肿瘤后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20年或更久时的生机状态。预后可以通过检查生物标志物即IGF2基因或IGF2蛋白来预测。预后预测可以这样进行:根据生物标志物的有或无,或者升高或降低,确定患者的预后是良好还是不良,或者确定良好预后或不良预后的概率。

[0097] 在本发明中,“预后良好”是指在通过手术处理等为患者抑制或缓解肿瘤之后,患者长时期(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20年或更长)没有危急状况。预后良好最优选的状态是长期无肿瘤的存活。

[0098] 在本发明中,“预后不良”是指患者在通过手术处理等抑制或缓解肿瘤后的短时期(例如0.5、1、2、3、4、5年或更短)内发生致命状况。

[0099] 预测预后是指预测患者状况的过程或结果,并不意味着能以100%的准确度预测患者状况的过程或结果。预测预后是指确定某些过程或结果的可能性是否增加,而并不意味着通过与某些过程或结果不发生的情况比较来确定发生某些过程或结果的可能性。如本发明而言,本发明中IGF2基因或IGF2蛋白的水平升高或降低的患者中,与不显示该特征的患者相比,更有可能观察到特定过程或结果。

[0100] 术语“受试者”指的是服从本文描述方法的任何动物或其细胞,不论是体外或原位。在一些非限制性实施方式中,受试者为哺乳动物,如人类或非人类哺乳动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猫、犬、猴子、黑猩猩等),特别是人类。

[0101] 下面结合具体的实施例进一步说明本发明,本发明的实施例仅用于解释本发明,并不意味着限制本发明的保护范围。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0102] 实施例1免疫组化检测IGF2作为判断乳腺癌患者预后情况的肿瘤学标记物

[0103] 1、取样并制作石蜡切片

[0104] 收集肿瘤患者癌组织,常规制作组织石蜡包块及切片。

[0105] 2、免疫组化检测癌组织IGF2表达

- [0106] (1) 石蜡切片脱蜡至水;
- [0107] (2) 3% H₂O₂ 室温孵育5-10分钟,以消除内源性过氧化物酶的活性;
- [0108] (3) 蒸馏水冲洗,PBS浸泡5分钟x2;
- [0109] (4) 柠檬酸抗原修复;
- [0110] (5) 5-10% 正常山羊血清 (PBS稀释) 封闭,室温孵育10分钟;
- [0111] (6) 滴加IGF2一抗工作液,37℃孵育1-2小时或4℃过夜;
- [0112] (7) PBS冲洗,5分钟x3次;
- [0113] (8) 滴加适量生物素标记二抗工作液,37℃孵育10-30分钟;
- [0114] (9) PBS冲洗,5分钟x3次;
- [0115] (10) 滴加适量的辣根酶或碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液,37℃ 孵育10-30分钟;
- [0116] (11) PBS冲洗,5分钟x3次;
- [0117] (12) DAB显色剂显色3-15分钟;
- [0118] (13) 自来水充分冲洗,复染,脱水,透明,封片;
- [0119] (14) 光学显微镜镜下观察IGF2表达,计数IGF2阳性细胞数。

[0120] 3、结果判读

[0121] 通过在光学显微镜下对组织切片分别按染色程度(0~3分分别为阴性着色、淡黄色、浅褐色、深褐色)、阳性范围(1~4分分别为0~25%、26~50%、51~75%、76~100%)进行评分,最终得到总分(染色程度×阳性范围,0-12分)进行评价。根据免疫组化评分结果,(1) IGF2的免疫组化评分小于6分,判定为IGF2低表达;(2) IGF2的免疫组化评分大于等于6分,判定为IGF2高表达。IGF2高表达提示患者预后不良。结果如图1所示。

[0122] 实施例2 ELISA法检测血液中 IGF2 作为判断乳腺癌患者预后情况的肿瘤学标记物

[0123] 1、取样

[0124] 收集乳腺癌患者治疗前全血2ml,用以EDTA为抗凝剂的真空采血管储存。

[0125] 2、ELISA法检测血浆中 IGF2 水平

- [0126] (1) 按照IGF2 ELISA说明书要求配置各种试剂、工作液及样品;
- [0127] (2) 向孔板对应孔加入200μl标准品及样品,塑料薄膜密封孔板,室温孵育2h;
- [0128] (3) 弃掉液体,洗涤液洗涤每孔,共洗涤四次;
- [0129] (4) 每孔加入200μl结合物后,封口膜密封,室温孵育1h;
- [0130] (5) 弃掉液体,洗涤液洗涤每孔,共洗涤四次;
- [0131] (6) 每孔加入200μl底物溶液,封口膜密封,避光室温孵育20min;
- [0132] (7) 每孔加入50μl反应终止液,30min内酶标仪450nm处上机检测。

[0133] 3、结果判读

[0134] 结果如图2所示,根据ELISA结果,(1) IGF2水平低于410ng/ml,判定为低水平IGF2;(2) IGF2水平大于等于410ng/ml,判定为高水平IGF2。高水平IGF2提示患者预后不良。

[0135] 此外,目前常规的免疫荧光染色PCR及流式细胞技术等方法均可用癌组织或血浆中IGF2水平的检测及判断,都具备可操作性。进一步的,综合考虑操作难易程度、检测手段普及性、效能价格比,推荐使用免疫组化法作为癌组织中IGF2检测的首要选择,ELISA法作

为血浆中IGF2检测的首要选择。

[0136] 实施例3ELISA法检测血液中IGF2作为判断乳腺癌患者免疫治疗疗效及是否符合与IGF2通路抑制剂联合应用的肿瘤学标记物

[0137] 1、取样

[0138] 收集准备接受免疫治疗(anti-PD-1单克隆抗体)的乳腺癌患者治疗前全血2ml,用以EDTA为抗凝剂的真空采血管储存。

[0139] 2、ELISA法检测血浆中IGF2水平

[0140] (1)按照IGF2 ELISA说明书要求配置各种试剂、工作液及样品;

[0141] (2)向孔板对应孔加入200 μ l标准品及样品,塑料薄膜密封孔板,室温孵育2h;

[0142] (3)弃掉液体,洗涤液洗涤每孔,共洗涤四次;

[0143] (4)每孔加入200 μ l结合物后,封口膜密封,室温孵育1h;

[0144] (5)弃掉液体,洗涤液洗涤每孔,共洗涤四次;

[0145] (6)每孔加入200 μ l底物溶液,封口膜密封,避光室温孵育20min;

[0146] (7)每孔加入50 μ l反应终止液,30min内酶标仪450nm处上机检测。

[0147] 3、结果判读

[0148] 结果如图3所示,根据ELISA结果及乳腺癌患者治疗情况进行分析,(1)免疫治疗耐药者,其血浆IGF2表达水平普遍高于400ng/ml,均值为684ng/ml;(2)免疫治疗反应良好者,血浆IGF2表达水平普遍低于400 ng/ml,均值为233ng/ml。提示IGF2表达水平在400ng/ml以上患者治疗方案可选择免疫治疗联合IGF2通路抑制剂。

[0149] 实施例4干预3T3成纤维细胞中IGF2基因表达对4T1乳腺癌小鼠模型中肿瘤生长及免疫治疗效果的影响

[0150] 将4T1乳腺癌细胞与不同处理的3T3成纤维细胞(转染阴性对照 scramble shRNA质粒的对照组sctr1或转染IGF2 shRNA质粒的IGF2基因敲低组shigf2)按照1:3比例接种到Balb/c小鼠乳腺处,7d后分别给予对照溶剂或anti-PD-1抗体治疗,检测并记录各组肿瘤生长体积。

[0151] 结果如图4所示,相较于对照组,敲低IGF2基因可抑制肿瘤生长,特别是将其与或anti-PD-1抗体治疗联合,可显著抑制肿瘤生长,甚至可减小肿瘤体积。

[0152] 实施例5使用IGF2信号通路抑制剂linsitinib对4T1乳腺癌小鼠模型中肿瘤生长及免疫治疗效果的影响

[0153] 将4T1乳腺癌细胞接种到Balb/c小鼠乳腺处,7d后分别给予不同药物处理,检测并记录各组肿瘤生长体积。

[0154] 结果如图5所示,相较于对照组,IGF2信号通路抑制剂linsitinib可抑制肿瘤生长,特别是将其与或anti-PD-1抗体治疗联合,可显著抑制肿瘤生长,使肿瘤体积几乎无增长。

[0155] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0156] 本发明中描述的前述实施例和方法可以基于本领域技术人员的能力、经验和偏好而有所不同。

[0157] 本发明中仅按一定顺序列出方法的步骤并不构成对方法步骤顺序的任何限制。

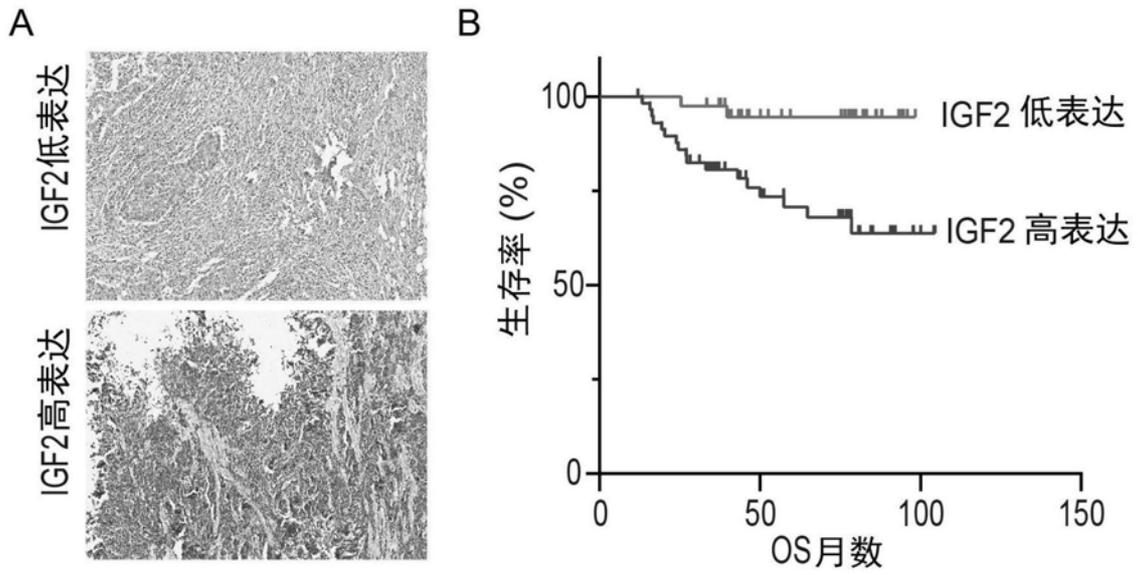


图1

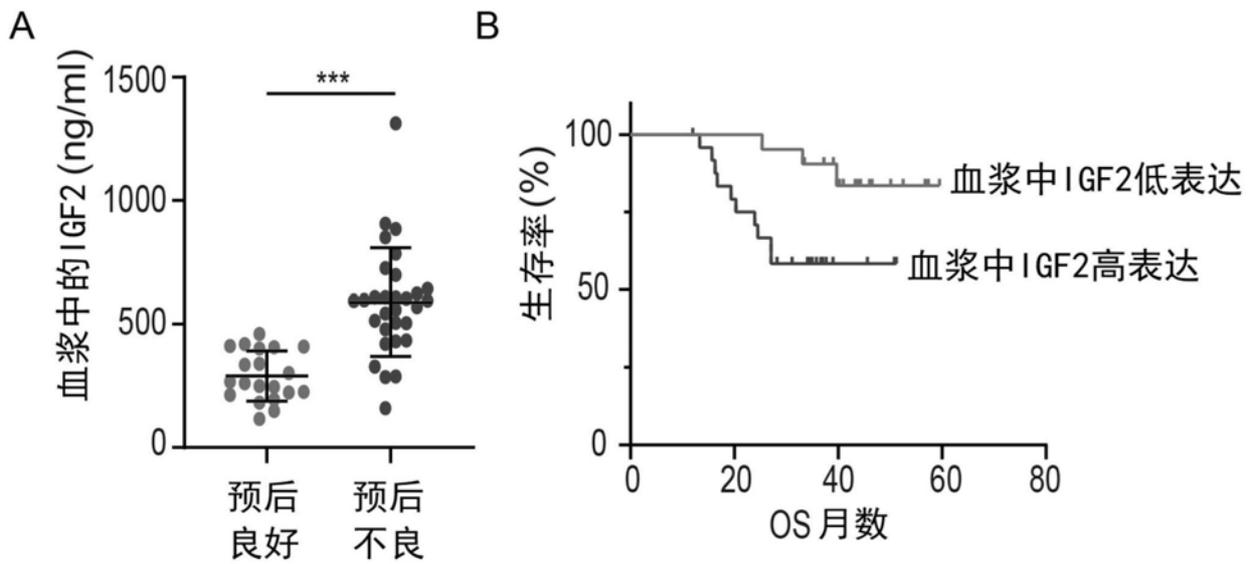


图2

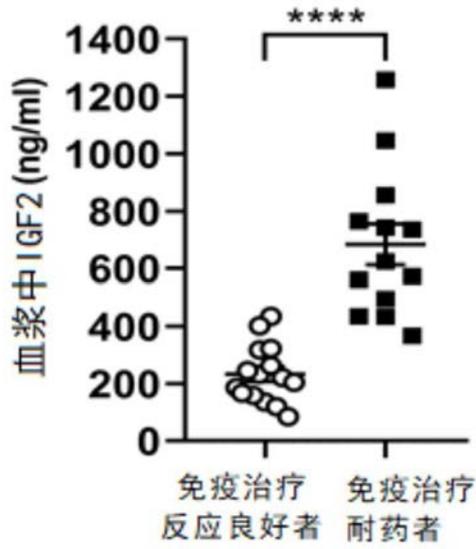


图3

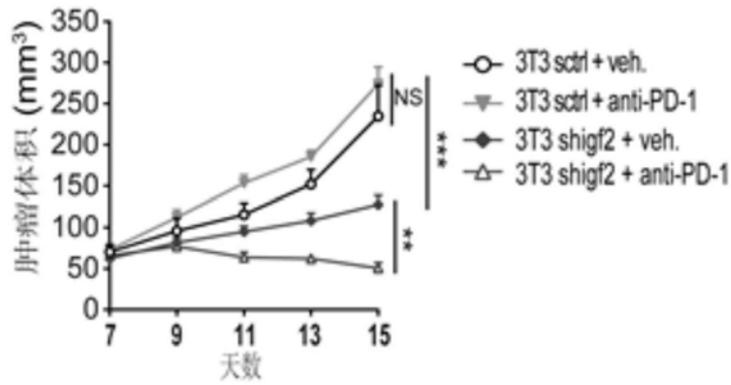


图4

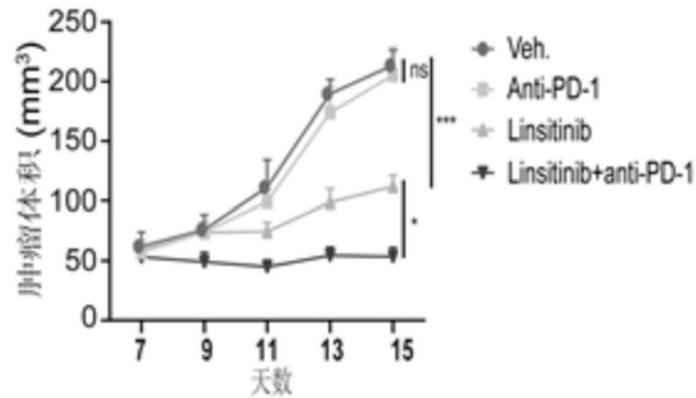


图5