



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114080231 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 22

(21) 申请号 202080049198.6

N · C · P · 萨克斯

(22) 申请日 2020.07.09

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

(30) 优先权数据

2019-128517 2019.07.10 JP

代理人 侯婧 苏萌

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.01.04

(51) Int. Cl.

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 35/545 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/026897 2020.07.09

G12N 5/0783 (2010.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/006316 JA 2021.01.14

G12N 5/10 (2006.01)

(71) 申请人 国立研究开发法人国立癌症研究中心

心

地址 日本东京

申请人 弘泰生物科技股份有限公司

(72) 发明人 富樫庸介 西川博嘉 山下和男

权利要求书2页 说明书16页 附图2页

(54) 发明名称

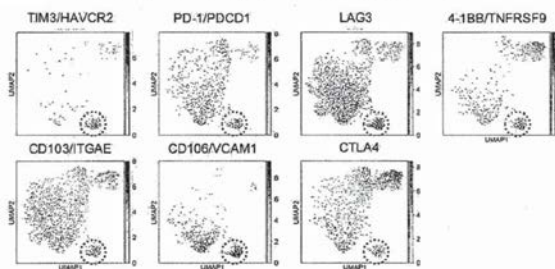
用于鉴定特异性攻击癌细胞的T细胞的特异性标记

(57) 摘要

本发明提供一种用于鉴定特异性攻击癌细胞的T细胞的特异性标记及其用途。在本发明中，提供一种用于鉴定攻击癌细胞的T细胞的具有高特异性的标记。在本发明中，可提供一种使用肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群或表达其表达的T细胞受体 (TCR) 的细胞，对受试者中的癌进行的治疗或预防。在本发明的另一个实施方式中，可提供一种细胞药物的制造方法。在本发明中还可提供一种将细胞亚群的量作为受试者对癌免疫疗法的应答性指标使用的方法。在本发明中还可提供一种获得肿瘤特异性TCR序列的方法。

CD106的肿瘤杀伤性T细胞特异性

可以比以往报告的表面标记更特异地选择肿瘤杀伤性T细胞



1. 一种用于治疗或预防受试者中的癌的组合物,包括肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述细胞亚群包括来自所述受试者的T细胞。
4. 根据权利要求1至3任一项所述的组合物,其特征在于与癌免疫疗法并用。
5. 根据权利要求1至4任一项所述的组合物,其中所述细胞亚群表达肿瘤特异性TCR。
6. 一种用于治疗或预防受试者中的癌的组合物,包括表达肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群表达的TCR或与其具有相同抗原特异性的TCR的细胞。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
8. 根据权利要求6或7所述的组合物,其中所述细胞包括来自所述受试者的T细胞。
9. 根据权利要求6至8任一项所述的组合物,其特征在于与癌免疫疗法并用。
10. 根据权利要求6至9任一项所述的组合物,其中所述细胞包含于所述细胞亚群,所述TCR为内源性TCR。
11. 根据权利要求6至9任一项所述的组合物,其中所述TCR由外部导入至所述细胞。
12. 根据权利要求6或7所述的组合物,其中所述细胞包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、T细胞或由其任一种分化的T细胞。
13. 一种用于治疗或预防受试者中的癌的细胞药物的制造方法,包括从T细胞群纯化CD106⁺T细胞群的工序。
14. 根据权利要求13所述的方法,其进一步包括纯化对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记呈阳性的细胞群的工序。
15. 根据权利要求13或14所述的方法,其中所述T细胞群是从浸润至肿瘤组织的T细胞分离的。
16. 根据权利要求15所述的方法,其进一步包括提供包括纯化的所述T细胞群的细胞药物的工序。
17. 根据权利要求16所述的方法,其进一步包括修改纯化的所述T细胞群的工序。
18. 根据权利要求13至15任一项所述的方法,其进一步包括将纯化的所述T细胞群所具有的TCR或具有与其相同抗原特异性的TCR导入至细胞的工序。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述细胞包括来自所述受试者的T细胞。
20. 根据权利要求18所述的方法,其中所述细胞包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、T细胞或由其任一种分化的T细胞。
21. 一种将受试者的CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量用作该受试者对癌免疫疗法的应答性的指标的方法。
22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述癌免疫疗法包括施与免疫检查点抑制剂。
23. 根据权利要求21或22所述的方法,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
24. 根据权利要求21至23任一项所述的方法,其中所述细胞亚群是肿瘤浸润T细胞亚

群。

25. 一种获得肿瘤特异性T细胞受体 (TCR) 序列的方法, 包括从肿瘤浸润T细胞分离CD106表达阳性的T细胞群的工序; 以及获得该T细胞群的T细胞的TCR序列的工序。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述分离工序进一步包括分离对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性的细胞群。

27. 根据权利要求25或26所述的方法, 其中获得所述TCR序列的工序包括对所述T细胞的核酸序列进行测序。

28. 根据权利要求25至27任一项所述的方法, 其进一步包括获得具有与所述T细胞群的T细胞的TCR相同抗原特异性的TCR序列的工序。

用于鉴定特异性攻击癌细胞的T细胞的特异性标记

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗或医药领域。具体而言,涉及一种识别特异性攻击癌细胞的T细胞的技术,可涉及癌的治疗。例如,本发明可涉及一种过继细胞疗法或用于过继细胞疗法的细胞的制备方法,癌免疫疗法的效果预测,肿瘤特异性序列的获得等。

背景技术

[0002] 在癌症治疗中,癌免疫疗法备受瞩目。特别是免疫检查点抑制剂例如抗PD-1抗体纳武利尤单抗(Nivolumab)与以往对于非小细胞肺癌的标准治疗多西他赛(docetaxel)相比,示出总生存期大大提升的结果,成为标准治疗。对于癌组织,T淋巴细胞等免疫细胞浸润,被认为与对癌细胞的防御反应相关联。但是,已知浸润的免疫细胞不是全部都攻击癌细胞。导入具有攻击肿瘤能力的免疫细胞(过继免疫疗法)以治疗癌症的研究正在进行。

发明内容

[0003] 问题解决方案

[0004] 本发明人发现,CD106阳性肿瘤浸润T细胞在肿瘤局部对癌细胞特异性攻击,CD106可作为用于鉴定攻击癌细胞的T细胞的具有高特异性的标记使用。本发明的一个实施方式可以涉及使用肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群治疗或预防受试者的癌症。本发明的一个实施方式可以涉及使用肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群表达的T细胞受体(TCR)或表达具有与其相同抗原特异性的TCR的细胞,治疗或预防受试者的癌症。本发明的另一个实施方式可以涉及包括从T细胞群纯化CD106⁺T细胞群的工序的细胞药物的制造方法。在本发明中,还可以提供一种将受试者的CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量作为受试者对癌免疫疗法的应答性指标使用的方法。在本发明中,还可提供一种获得肿瘤特异性TCR的序列的方法。

[0005] 例如,在本发明的优选实施方式中,提供以下项目。

[0006] (项目1)

[0007] 一种用于治疗或预防受试者中的癌的组合,包括肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群。

[0008] (项目2)

[0009] 根据上述项目所述的组合,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE(CD103)、TIGIT、ENTPD1(CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。

[0010] (项目3)

[0011] 根据上述项目任一项所述的组合,其中所述细胞亚群包括来自所述受试者的T细胞。

[0012] (项目4)

[0013] 根据上述项目任一项所述的组合,其特征在于与癌免疫疗法并用。

[0014] (项目5)

- [0015] 根据上述项目任一项所述的组合物,其中所述细胞亚群表达肿瘤特异性TCR。
- [0016] (项目6)
- [0017] 一种用于治疗或预防受试者中的癌的组合物,包括表达肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群表达的TCR或与其具有相同抗原特异性的TCR的细胞。
- [0018] (项目7)
- [0019] 根据上述项目任一项所述的组合物,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
- [0020] (项目8)
- [0021] 根据上述项目的任一项所述的组合物,其中所述细胞包括来自所述受试者的T细胞。
- [0022] (项目9)
- [0023] 根据上述项目任一项所述的组合物,其特征在于与癌免疫疗法并用。
- [0024] (项目10)
- [0025] 根据上述项目的任一项所述的组合物,其中所述细胞包含于所述细胞亚群,所述TCR为内源性TCR。
- [0026] (项目11)
- [0027] 根据上述项目任一项所述的组合物,其中所述TCR由外部导入至所述细胞。
- [0028] (项目12)
- [0029] 根据上述项目的任一项所述的组合物,其中所述细胞包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、T细胞或由其任一种分化的T细胞。
- [0030] (项目13)
- [0031] 根据上述项目的任一项所述的组合物,进一步包括药学上可接受的载体。
- [0032] (项目14)
- [0033] 一种治疗肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群在用于治疗或预防受试者中的癌的药物制造中的用途。
- [0034] (项目15)
- [0035] 根据上述项目任一项所述的用途,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
- [0036] (项目16)
- [0037] 根据上述项目任一项所述的用途,其中所述细胞亚群包括来自所述受试者的T细胞。
- [0038] (项目17)
- [0039] 根据上述项目任一项所述的用途,其特征在于所述药物与癌免疫疗法并用。
- [0040] (项目18)
- [0041] 根据上述项目任一项所述的用途,其中所述细胞亚群表达肿瘤特异性TCR。
- [0042] (项目19)
- [0043] 一种表达肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群表达的TCR或具有与其相同的抗原特异性的TCR的细胞在用于治疗或预防受试者中的癌的药物制造中的用途。

- [0044] (项目20)
- [0045] 根据上述项目任一项所述的用途,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
- [0046] (项目21)
- [0047] 根据上述项目任一项所述的用途,其中所述细胞包括来自所述受试者的T细胞。
- [0048] (项目22)
- [0049] 根据上述项目任一项所述的用途,其特征在於所述药物与癌免疫疗法并用。
- [0050] (项目23)
- [0051] 根据上述项目任一项所述的用途,其中所述细胞包含于所述细胞亚群,所述TCR为内源性TCR。
- [0052] (项目24)
- [0053] 根据上述项目任一项所述的用途,其中所述TCR由外部导入至所述细胞。
- [0054] (项目25)
- [0055] 根据上述项目任一项所述的用途,其中所述细胞包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、T细胞或由其任一种分化的T细胞。
- [0056] (项目26)
- [0057] 根据上述项目任一项所述的用途,其中所述药物进一步包括药学上可接受的载体。
- [0058] (项目27)
- [0059] 一种在受试者中治疗或预防癌的方法,包括以有效量向该受试者施与肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的工序。
- [0060] (项目28)
- [0061] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
- [0062] (项目29)
- [0063] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞亚群包括来自所述受试者的T细胞。
- [0064] (项目30)
- [0065] 根据上述项目任一项所述的方法,其特征在於与癌免疫疗法并用。
- [0066] (项目31)
- [0067] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞亚群表达肿瘤特异性TCR。
- [0068] (项目32)
- [0069] 一种在受试者中治疗或预防癌的方法,包括向该受试者以有效量施与肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群表达的TCR,或以有效量施与表达具有与其相同的抗原特异性的TCR的细胞的工序。
- [0070] (项目33)
- [0071] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
- [0072] (项目34)

- [0073] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞包括来自所述受试者的T细胞。
- [0074] (项目35)
- [0075] 根据上述项目任一项所述的方法,其进一步包括实施癌免疫疗法的工序。
- [0076] (项目36)
- [0077] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞包含于所述细胞亚群,所述TCR为内源性TCR。
- [0078] (项目37)
- [0079] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述TCR由外部导入至所述细胞。
- [0080] (项目38)
- [0081] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、T细胞或由其任一种分化的T细胞。
- [0082] (项目39)
- [0083] 一种治疗肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群,用于治疗或预防受试者中的癌。
- [0084] (项目40)
- [0085] 根据上述项目任一项所述的细胞亚群,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
- [0086] (项目41)
- [0087] 根据上述项目任一项所述的细胞亚群,其中所述细胞亚群包括来自所述受试者的T细胞。
- [0088] (项目42)
- [0089] 根据上述项目任一项所述的细胞亚群,其特征在于所述细胞亚群与癌症免疫疗法并用。
- [0090] (项目43)
- [0091] 根据上述项目任一项所述的细胞亚群,其中所述细胞亚群表达肿瘤特异性TCR。
- [0092] (项目44)
- [0093] 一种治疗表达肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群表达的TCR或具有与其相同抗原特异性的TCR的细胞,用于治疗或预防受试者中的癌。
- [0094] (项目45)
- [0095] 根据上述项目任一项所述的TCR或细胞,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
- [0096] (项目46)
- [0097] 根据上述项目任一项所述的TCR或细胞,其中所述细胞包括来自所述受试者的T细胞。
- [0098] (项目47)
- [0099] 根据上述项目任一项所述的TCR或细胞,其特征在于所述TCR或细胞与癌免疫疗法并用。

- [0100] (项目48)
- [0101] 根据上述项目任一项所述的TCR或细胞,其中所述细胞包含于所述细胞亚群,所述TCR为内源性TCR。
- [0102] (项目49)
- [0103] 根据上述项目任一项所述的TCR或细胞,其中所述TCR由外部导入至所述细胞。
- [0104] (项目50)
- [0105] 根据上述项目任一项所述的TCR或细胞,其中所述细胞包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、T细胞或由其任一种分化的T细胞。
- [0106] (项目51)
- [0107] 一种用于治疗或预防受试者中的癌的细胞药物的制造方法,包括从T细胞群纯化CD106⁺T细胞群的工序。
- [0108] (项目52)
- [0109] 根据上述项目任一项所述的方法,其进一步包括纯化对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记呈阳性的细胞群的工序。
- [0110] (项目53)
- [0111] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述T细胞群是从浸润至肿瘤组织的T细胞分离的。
- [0112] (项目54)
- [0113] 根据上述项目任一项所述的方法,其进一步包括提供包含纯化的所述T细胞群的细胞药物的工序。
- [0114] (项目55)
- [0115] 根据上述项目任一项所述的方法,其进一步包括修改纯化的所述T细胞群的工序。
- [0116] (项目56)
- [0117] 根据上述项目任一项所述的方法,其进一步包括将纯化的所述T细胞群所具有的TCR或具有与其相同抗原特异性的TCR导入至细胞的工序。
- [0118] (项目57)
- [0119] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞包括来自所述受试者的T细胞。
- [0120] (项目58)
- [0121] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、T细胞或由其任一种分化的T细胞。
- [0122] (项目59)
- [0123] 一种将受试者的CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量作为该受试者对癌免疫疗法的应答性的指标的方法。
- [0124] (项目60)
- [0125] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述癌免疫疗法包括施与免疫检查点抑制剂。
- [0126] (项目61)
- [0127] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-

- 1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
- [0128] (项目62)
- [0129] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞亚群是肿瘤浸润T细胞亚群。
- [0130] (项目63)
- [0131] 一种诊断受试者对癌免疫疗法的应答性的方法,包括
- [0132] 从该受试者获得CD106⁺T细胞群的工序,
- [0133] 测定该受试者的CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量的工序,及
- [0134] 基于该细胞亚群的量,诊断该受试者对癌免疫疗法的应答性的工序。
- [0135] (项目64)
- [0136] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述癌免疫疗法包括施与免疫检查点抑制剂。
- [0137] (项目65)
- [0138] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞亚群对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。
- [0139] (项目66)
- [0140] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述细胞亚群是肿瘤浸润T细胞亚群。
- [0141] (项目67)
- [0142] 一种获得肿瘤特异性T细胞受体 (TCR) 序列的方法,包括
- [0143] 从肿瘤浸润T细胞分离CD106表达阳性的T细胞群的工序,及
- [0144] 获得该T细胞群的T细胞的TCR序列的工序。
- [0145] (项目68)
- [0146] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述分离工序进一步包括分离对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、ITGAE (CD103)、TIGIT、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性的细胞群。
- [0147] (项目69)
- [0148] 根据上述项目任一项所述的方法,其中所述获得TCR序列的工序包括对所述T细胞的核酸序列进行测序。
- [0149] (项目70)
- [0150] 根据上述项目任一项所述的方法,进一步包括获得具有与所述T细胞群的T细胞的TCR相同的抗原特异性的TCR序列的工序。
- [0151] 在本发明中,除明确的组合外,可以进一步组合提供上述1或多个特征。根据需要,在阅读和理解以下详细描述后,本领域的技术人员将理解并认可本发明的进一步实施方式和优点。
- [0152] 发明的效果
- [0153] 可以提供一种特异性高的标记作为攻击肿瘤的T细胞的标记。因为CD106也是表面标记,可以用于细胞分离,可以容易地提取特异性地攻击肿瘤的T细胞。若能高效地增加这种T细胞,或分析T细胞受体序列进行人工制造,则可能获得副作用非常小且效果好的肿瘤特异性细胞疗法。

附图说明

[0154] [图1]图1是示出肿瘤浸润T细胞中各种标记的表达的图。在各面板中,上述标记表达呈阳性的细胞着色显示。根据表达模式对细胞进行聚类,圆圈内的部分对应肿瘤杀伤性T细胞。

[0155] [图2]图2是示出在用标记表达分选(sort)的细胞亚群中,进行自体肿瘤刺激时IFN γ 的分泌的图。在CD106阳性部分由于刺激产生IFN γ ,以及虽然在其他标记阳性部分由于刺激产生IFN γ ,但即使在其他标记阴性部分也产生IFN γ ,由此可知特异度比CD106差。

具体实施方式

[0156] 下文说明本发明。在本说明书全文中,单数形式的表现若无特殊说明,应理解为包括其复数形式的概念。因此,单数形式的冠词(例如,英语的“a”、“an”、“the”等)若无特殊说明,应理解为包括其复数形式的概念。另外,本说明书中使用的术语若无特别说明,应理解为该领域中通常使用的意义。因此,若没有进行其他定义,本说明书中使用的所有专业词汇和科学技术词汇具有与本说明所属领域的技术人员通常理解相同意义。在矛盾时,以本说明书(包括定义)优先。

[0157] (定义)

[0158] 在本说明书中,“约”若无特殊说明,指后接数值的 $\pm 10\%$ 。

[0159] 在本说明书中,“生物标记”是指作为正常生物学过程、病理学过程或对治疗介入的药理学应答的指标,被客观测定、评价的特性。

[0160] 在本说明书中,“癌”或“癌症”可互换使用,指异型性强、增殖速度比正常细胞快、可破坏性地浸润或转移至周围组织的恶性肿瘤或存在这种恶性肿瘤的状态。在本发明中,癌包括实体癌和血液肿瘤,但不限于此。

[0161] 在本说明书中,“癌免疫疗法”是指使用生物所具有的免疫机制等机体防御机制治疗癌的方法。

[0162] 在本说明书中,“细胞亚群”是指包含多种特性细胞的细胞群中的,具有一些共同特征的任意细胞的集合。关于特定名称是本技术领域众所周知的,可以使用相关术语表述特定的细胞亚群,也可以记述任意性质(例如细胞表面标记的表达)表述特定的细胞亚群。

[0163] 在本说明书中,与细胞相关的术语“相对量”可以与“比率”互换使用。例如,术语“相对量”和“比率”是指相对于形成特定细胞群(例如,CD8⁺T细胞群)的细胞数,形成预期的细胞亚群(例如,CD106⁺CD8⁺T细胞亚群)的细胞数。

[0164] 在本说明书中,“基准”是指用于确定本说明书记载的标记的量或水平增减的作为比较对象的量。在确定某个治疗前后的某个量或水平增减时,例如作为“基准”,可举例治疗前的该量或水平。

[0165] (细胞的划分、分离)

[0166] 用于细胞的划分、分离的样本可以通过常用方法从受试者适当采集。例如,可以从受试者的外周血、骨髓、肿瘤组织、造血组织、脾脏、正常组织、淋巴液等进行采集。通过分离浸润至肿瘤组织的免疫细胞,根据需要进一步筛选,可以获得攻击癌细胞。

[0167] 本领域技术人员可以使用常用方法测定受试者样品中的免疫细胞的组成。一般而言,可以使用流式细胞仪等测定定义样品中的目标细胞亚群的标记(例如CD4)呈阳性的细

胞数。一般使用流式细胞仪测定细胞群的组成,但也可以使用对含细胞的样品的免疫染色、使用抗体阵列的方法、含细胞的样品中的蛋白质表达分析(例如,蛋白质印迹、质谱、HPLC等)、含细胞的样品中的mRNA表达分析(例如,微阵列、下一代测序技术)等。在计算CD106⁺CD8⁺T细胞亚群等细胞亚群的细胞数时,可以从总细胞群实验性去除各细胞亚群以外的细胞求出。

[0168] 通过单细胞基因表达分析,检查每个细胞内的mRNA,检查是否存在编码感兴趣的蛋白质分子的mRNA,由此也可以识别细胞。单细胞基因表达分析例如可举例1)通过Quartz-Seq进行下一代测序的方法,2)使用Fluidigm C1 System或ICELL8 Single-Cell System分离细胞,用SMART-Seq v4制备文库(Library Preparation)的方法,3)用细胞分选机分离细胞,使用Ambion single Cell-to-CT试剂盒测量定量PCR的方法,4)CyTOF SYSTEM(Helios社)等。以防万一,从肿瘤浸润细胞计算细胞数,用细胞分选机等分离细胞,对于分离的各个细胞,例如使用Ambion Single Cell-to-CT试剂盒,可以使用定量PCR法的装置测量特定基因的表达量。基于其结果,可以检查各个细胞是否属于哪个亚群,如CD106⁺CD8⁺T细胞亚群等,计算属于各亚群的细胞数量。

[0169] 在本说明书中,关于某个标记的表达为“阳性”,或为“(标记)⁺细胞”,在使用单细胞测序技术进行确认时,可以通过检测出1个以上的读数进行确认,在使用FCM进行确认时,可以通过与同型对照的比较确定阳性。

[0170] (细胞)

[0171] 在本发明中,可以提供一种具有特定标记表达模式的细胞亚群。在一个实施方式中,可以提供一种CD106⁺细胞群所包含的细胞亚群。此类细胞亚群可以对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、ITGAE(CD103)、ENTPD1(CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。在本发明中,本发明中记载的细胞亚群可以作为用于过继细胞转移的细胞,作为用于从中获得肿瘤特异性TCR的细胞,作为将其量用作指标使用的细胞,和/或作为用于对其进行修改的细胞使用。细胞群可以使用肿瘤组织浸润细胞群或包含于其中的细胞亚群。作为特异性攻击肿瘤的T细胞的表面标记,以往可以利用PD-1或4-1BB标记,另外,在最近的报告中,最新的CD103或CD39备受瞩目。在本发明中,由单细胞测序技术的数据可知,作为表面标记,CD106的特异性最高,即使基于全面地比较已报告的标记,与这些标记相比也十分有用。

[0172] 在本发明中,细胞或细胞群可以是免疫细胞,或其先驱细胞,或其群。免疫细胞可举例树突细胞、巨噬细胞、淋巴细胞(例如,T细胞(例如,杀伤T细胞、辅助性T细胞、调节性T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤T细胞)、B细胞、NK(自然杀伤)细胞)、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞,以及其组合。在使用细胞治疗或预防癌治疗的情况下,优选细胞是T细胞。细胞或细胞群可以包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、外周细胞、初始T细胞、记忆T细胞、中央记忆型T细胞(TCM)、T记忆干细胞(TSCM)、或由其中任一种分化的T细胞。

[0173] 本发明中的T细胞可以是CD8阳性T细胞。细胞毒性T细胞(CTL)是淋巴T细胞的一种,识别并破坏对于宿主来说是异物的细胞(癌细胞等)。CTL从在表面表达CD8分子的T细胞分化而来。

[0174] 在本发明的一个实施方式中,可以提供一种包括肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所

包含的细胞亚群,用于治疗或预防受试者中的癌的组合物。或者可提供一种包括施与肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的工序,用于治疗或预防受试者中的癌的方法。

[0175] 细胞亚群可以对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、ITGAE (CD103)、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。细胞亚群可以包括来自作为治疗或预防对象的受试者的T细胞,另外,也可以包括来自与作为治疗或预防对象的受试者不同的受试者的T细胞。细胞亚群可以表达肿瘤特异性TCR。通过本发明提供的标记,可以鉴定表达肿瘤特异性TCR的细胞亚群。在本发明中,包括细胞的组合物或过继细胞转移疗法可以与癌免疫疗法并用。

[0176] 在本发明的一个实施方式中,可以提供一种表达肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群表达的TCR或具有与其相同抗原特异性的TCR的细胞。该细胞可以是肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞本身,或者也可以是表达肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群表达的TCR的不同细胞。此类细胞可以通过导入TCR,或筛选TCR而获得。肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群可以对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、ITGAE (CD103)、ENTPD1 (CD39)、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性。细胞包含于肿瘤组织浸润CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群,TCR为内源性TCR。

[0177] TCR可以通过外部导入至细胞。进行导入的对象细胞例如可以包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、外周T细胞、初始T细胞、记忆T细胞、中央记忆型T细胞(TCM)、T记忆干细胞(TSCM)、或由其中任一种分化的T细胞。TCR的导入可以通过在本说明的其他地方所述的方法或该领域技术人员在本领域所公知的方法进行。

[0178] (TCR的获得方法)

[0179] 免疫系统的机体防御机制很大程度上依赖于主要由T细胞、B细胞承担的特异性免疫。T细胞和B细胞可以不与自体细胞和分子反应,特异性地识别并攻击病毒、细菌等外来病原体。因此,T细胞和B细胞具有可通过在细胞表面上表达的受体分子,与自体抗原一起认识和识别来自其他生物的多种抗原的机制。在T细胞中,T细胞受体(T cell receptor,TCR)作为抗原受体起作用。通过来自这些抗原受体的刺激传达细胞内信号,炎症性细胞因子和趋化因子等的产生加剧,细胞增殖增强,各种免疫应答开始。

[0180] TCR通过识别与在抗原呈递细胞上表达的主要组织相容性基因复合体(major histocompatibility complex,MHC)的肽结合槽结合的肽(肽-MHC复合体(peptide-MHC complex),pMHC),在识别自体和非自体的同时,识别抗原肽(Cell 1994,76,287-299)。TCR是由2个TCR多肽链组成的异二聚体受体分子,存在一般T细胞所表达的 $\alpha\beta$ 型TCR和拥有特殊功能的 $\gamma\delta$ 型TCR。 α 和 β 链TCR分子与多个CD3分子(CD3 ϵ 链,CD3 γ 链,CD3 δ 链)形成复合体,传达抗原识别后的细胞内信号,使各种免疫应答开始。CD3分子存在于细胞膜,与TCR形成复合体,因此可以作为TCR的表达标记使用。伴随着病毒感染在细胞内增殖的病毒抗原或来自癌细胞的癌抗原等内源性抗原作为抗原肽被呈递在MHC I类分子上。另外,来自外来微生物的抗原通过内吞作用被抗原呈递细胞摄入,加工治疗后被呈递在MHC II类分子上。这些抗原分别通过CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞所表达的TCR被识别。众所周知,CD28、ICOS、OX40分子等共刺激分子对TCR分子介导的刺激十分重要。

[0181] TCR基因由在染色体组上不同区域编码的多个V区域(可变区(variable region),V)、J区域(连接区(joining region),J)、D区域(多样区(diversity region),D)和恒定区

域C区域(恒定区(constant region),C)组成。在T细胞的分化过程中,这些基因片段以各种组合进行基因重组, α 链和 γ 链TCR表达由V-J-C组成的基因, β 链和 δ 链TCR表达由V-D-J-C组成的基因。通过这些基因片段的重组,创造出多样性,同时通过在V和D或D和J基因片段之间插入或缺失1个以上的碱基,形成随机的氨基酸序列,可以制造出多样性更高的TCR基因序列。

[0182] TCR分子和pMHC复合体表面直接结合的区域(TCR足迹(footprint))由V区域内富有多多样性的互补决定区(complementarity determining region,CDR)CDR1、CDR2和CDR3区域组成。其中,CDR3区域包括V区域的一部分、由随机序列形成的V-D-J区域和J区域的一部分,形成最富有多多样性的抗原识别部位。另一方面,其他区域被称为FR(骨架区,framework region),发挥形成TCR分子骨架构造的作用。在胸腺中的T细胞分化成熟过程中, β 链TCR首先进行基因重组,与pT α 分子缔合,形成pre-TCR复合体分子。之后, α 链TCR重组,形成 $\alpha\beta$ TCR分子的同时,在未形成功能性 $\alpha\beta$ TCR的情况下,在另一个 α 链TCR基因等位基因中发生重组。已知经过胸腺中的正负选择,选择拥有适当亲和性的TCR,获得抗原特异性(Annual Review Immunology,1993,6,309-326)。

[0183] T细胞产生对特定抗原具有高特异性的1个种类的TCR。在生物体中存在许多抗原特异性T细胞,因此形成多样的TCR库(repertoire),可以有效地发挥对于各种病原体的防御机制。

[0184] 在本发明的一个实施方式中,可以提供一种获得肿瘤特异性T细胞受体(TCR)的序列的方法。虽期望不受理论束缚,但在本说明中,示出CD106表达阳性T细胞群所包含的细胞亚群特异性攻击癌,考虑通过分离这种细胞亚群,可分离肿瘤特异性TCR。在本发明中,可提供一种获得肿瘤特异性T细胞受体(TCR)序列的方法,包括从肿瘤浸润T细胞分离CD106表达阳性T细胞群的工序,和获得该T细胞群的T细胞的TCR序列的工序。

[0185] 上述分离工序可以进一步包括分离对本说明书公开的任意其他标记(例如选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、ITGAE(CD103)、ENTPD1、CTLA-4及其任意组合的细胞标记)进一步呈阳性的细胞群。

[0186] TCR序列的获得可以包括T细胞核酸序列的测序。只要能对核酸样本的序列进行测序,测序的方法不受限制,可以利用本技术领域公知的任意方法,但优选下一代测序技术(NGS)。下一代测序技术可举例焦磷酸测序(pyrosequencing)、合成法测序(Sequencing by Synthesis)、连接法测序、离子半导体测序等,但不限于此。TCR序列可以通过扩增子测序从不包含内含子的mRNA获得。此外,TCR序列可以对T细胞基因组序列进行测序而获得。或者,TCR序列也可以通过使用质谱或Edman降解等,直接确定TCR分子的氨基酸序列而获得。在本说明书中,“TCR序列”可以使用氨基酸序列和核酸序列的任一种。

[0187] (TCR的聚类)

[0188] 在本发明中,可以使用与有肿瘤特异性的TCR具有相同抗原特异性的TCR。例如,可以使用与CD106⁺T细胞群的TCR具有相同抗原特异性的TCR。“具有相同抗原特异性”可以通过2个TCR经下述聚类分析被分类到相同聚类而确定。在本发明中,在获得肿瘤特异性TCR时,可以获得与CD106⁺T细胞群等分离的T细胞群的T细胞的TCR具有相同抗原特异性的TCR序列。这可以通过对一个或多个TCR与分离的T细胞群的T细胞的TCR进行如下文所述的聚类分析来实现。这类分析手法在专利第6500144号公报中有详细记载,其内容作为参考被本说

说明书引用。

[0189] TCR的聚类分析可以通过包括下述步骤的分析方法进行：(i) 提供至少2个TCR特征量的步骤，该步骤不包括从该至少2个TCR的三维构造模型计算特征量，(ii) 基于该特征量，不特定抗原特异性或结合模式而对该TCR的抗原特异性或结合模式的分析进行机器学习的步骤，以及(iii) 进行该抗原特异性或结合模式的分类或确定异同的步骤。

[0190] 在其他实施方式中，TCR集合可以通过包括下述工序的方法进行分析：(a) 对该TCR集合的成员的至少一对提取特征量的步骤，该步骤不包括从该至少一对的三维构造模型计算特征量，(b) 通过使用该特征量的机器学习，算出关于该对的抗原特异性或结合模式间的距离，或判断该抗原特异性或结合模式是否一致的步骤，(c) 基于该距离，聚类该TCR集合的步骤，(d) 根据需要，基于该聚类的分类，进行分析的步骤。

[0191] 在其他实施方式中，TCR集合可以通过包括以下步骤的方法进行分析：(aa) 分别对成为该TCR集合的成员的至少一对的序列提取特征量的步骤，该步骤不包括从成为该至少一对的序列的免疫实体的三维构造模型计算特征量，(bb) 将该特征量投射到高维向量空间，此处，该成员的空间上的距离反映该成员的功能类似性的步骤，(cc) 基于该距离，对该免疫实体的集合进行聚类的步骤，(dd) 根据需要，基于该聚类的分类，进行分析的步骤。

[0192] 特征量可以包括选自序列信息、CDR1-3序列的长度、序列一致度、骨架区域的序列一致度、分子的总电荷/亲水性/疏水性/芳香族氨基酸的数量、各CDR、骨架区域的电荷/亲水性/疏水性/芳香族氨基酸的数量、各氨基酸的数量、重链-轻链的组合、体细胞变异数、变异的位置、氨基酸基序的存在/一致度、相对于参考序列集合的稀有性、和参考序列结合HLA的几率中的至少一种。

[0193] 通过机器学习的计算可以通过输入特征量，使用随机森林(random forest)或提升方法(Boosting)进行，聚类可以通过基于简单的基于结合距离的阈值的聚类、分层聚类、或非分层聚类进行。机器学习可以选自回归方法、神经网络法、支持向量机和随机森林等机器学习算法。

[0194] (制备细胞的方法)

[0195] 在本发明中，可以提供一种细胞，特别是作为药物使用的细胞的制备方法，虽期望不受理论束缚，但利用肿瘤中的CD106⁺CD8⁺T细胞群所包含的细胞表达肿瘤特异性TCR，可得到攻击肿瘤的细胞。这种细胞可用于癌的治疗或预防。

[0196] 在本发明的一个实施方式中，可以提供一种用于治疗或预防受试者中的癌的细胞药物的制造方法，包括从T细胞群纯化CD106⁺T细胞群的工序。该方法可以进一步包括纯化对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、ITGAE (CD103)、ENTPD1、CTLA-4及其任意组合的细胞标记呈阳性的细胞群的工序。T细胞群可以是浸润至肿瘤组织的T细胞分离的。

[0197] 可以提供一种包括纯化的T细胞群的细胞药物。可认为这种T细胞群具有肿瘤特异性TCR，作为细胞药物十分有用。根据需要，可以培养和/或增殖纯化的T细胞群，作为药物提供。纯化的T细胞群可以根据需要进一步进行修改。T细胞的修改可举例通过与CD106相互作用的整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 或 $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4)、CD3或IL-2、IL-4、IL-7的刺激。

[0198] 在本发明的一些实施方式中，可以提供一种包括将纯化的T细胞群所具有的TCR或具有与其相同抗原特异性的TCR导入至细胞的工序的方法。TCR的获得和/或导入可以通过本说明书其他地方所述的方法或本领域技术人员公知的其他方法进行。肿瘤特异性TCR可

以根据需要,修改获得的序列并导入。作为导入对象的细胞可以使用来自作为治疗或预防对象的受试者的T细胞,也可以使用其他任意免疫细胞。作为导入对象的细胞例如可以包括诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(ES细胞)、外周T细胞、中央记忆型T细胞(TCM)、T记忆干细胞(TSCM)、初始T细胞、记忆T细胞、或由其中任一种分化的T细胞。

[0199] (癌)

[0200] 在本发明中,作为对象的癌可举例肺癌、肾(肾细胞)癌、前列腺癌、胃癌、精巢癌、肝(脏)癌、皮肤癌、食道癌、黑色素瘤、胰脏癌、胰腺癌、骨肿瘤、骨肉瘤、大肠癌、骨与软组织肿瘤、胆道癌、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤)、尿路上皮癌、子宫癌(体部、颈部)、头颈癌、脑瘤、胸腺瘤、甲状腺癌、间皮瘤、肛门癌、阴茎癌、原发灶不明癌、卵巢癌、乳癌等,但不限于此。

[0201] (癌免疫疗法)

[0202] 在本说明书中,“癌免疫疗法”是指使用生物所具有的免疫功能治疗癌症的方法。癌免疫疗法大致分为强化对癌的免疫功能的癌免疫疗法,和抑制癌的免疫回避功能的癌免疫疗法。进一步,癌免疫疗法有激活体内免疫功能的主动免疫疗法,和使免疫机能在体外激活,或使增殖的免疫细胞返回体内的被动免疫疗法。作为癌免疫疗法的示例,可举例非特异性免疫刺激剂、细胞因子疗法、癌疫苗疗法、树突细胞疗法、过继免疫疗法、非特异性淋巴细胞疗法、癌抗原特异性T细胞疗法、抗体疗法、免疫检查点抑制疗法、CAR-T疗法等。在本发明中,可提供一种将特异性攻击肿瘤的细胞亚群的量作为受试者对癌免疫疗法的应答性指标使用的方法。

[0203] 在一个实施方式中,可提供一种将受试者的CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量作为受试者对癌免疫疗法的应答性指标使用的方法。癌免疫疗法可以包括施与免疫检查点抑制剂。细胞亚群可使用对选自LAG-3、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、ITGAE(CD103)、ENTPD1、CTLA-4及其任意组合的细胞标记进一步呈阳性的细胞亚群。细胞亚群可以使用任意部位的量,但可优选使用肿瘤浸润T细胞中细胞亚群的量。

[0204] 使用免疫检查点抑制剂的免疫检查点(抑制)疗法近年备受瞩目(Pardo II DM. The Blockade of immune checkpoints in cancer immuno therapy. Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22;12(4):252-64)。癌细胞在表面表达各种蛋白质,这与回避来自T细胞等免疫细胞的攻击相关,所以认为在一般状态下,仅靠生物体免疫功能无法排除癌组织。免疫检查点抑制剂通过抑制负责从这样的癌组织向免疫系统传达抑制性信号的配体-受体相互作用等,使生物体的免疫系统能够有效地消除癌症。本发明的一个实施方式是将CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量作为用于预测受试者对下述免疫检查点抑制剂的应答性的指标使用的方法。本发明的一个实施方式是向基于CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量选择的(应答性的)受试者施与下文所述的免疫检查点抑制剂的方法。在其他实施方式中,提供一种对发现基于CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量没有应答性的受试者中断或中止或避免免疫检查点抑制剂的方法。

[0205] 免疫检查点抑制剂的代表例是PD-1抑制剂。PD-1抑制剂可举例抗PD-1抗体纳武利尤单抗(Nivolumab;作为欧狄沃™销售)和帕博利珠单抗(Pembrolizumab;作为可瑞达™销售),但不限于此。抗PD-1抗体被认为是通过解除PD-1信号对T细胞激活的抑制而发挥其抗癌作用。通过PD-1(程序性死亡受体1,programmed death1)与PD-L1或PD-L2相互作用,以及

酪氨酸去磷酸酶之一的SHP-2被募集到PD-1细胞质结构域,使T细胞受体信号传导蛋白质ZAP70失活,从而抑制T细胞的激活(Okazaki,T.,Chikuma,S.,Iwai,Y.etal.:A rheostat for immune responses:the unique properties of PD-1and their advantages for clinical application.Nat.Immunol.,14,1212-1218(2013))。另外,认为PD-L1也与CD80相互作用,抑制T细胞激活(Butte,M.J.,Keir,M.E.,Phamduy,T.B.et al.:PD-L1interacts specifically with B7-1 to inhibit T cell proliferation.Immunity,27,111-122(2007))。认为PD-1在浸润至癌细胞的杀伤T细胞和自然杀伤细胞中高表达,由于肿瘤上的PD-L1,免疫应答减弱。该PD-1信号导致的免疫应答减弱被抗PD-1抗体抑制,可得到抗肿瘤免疫应答增强的效果。

[0206] 免疫检查点抑制剂的其他例为PD-L1抑制剂(例如,抗PD-L1抗体阿维鲁单抗(Avelumab)、度伐单抗(Durvalumab)或阿特珠单抗(Atezolizumab))。PD-L1抑制剂与PD-L1结合并阻断上述PD-1通路,产生抗肿瘤免疫应答。

[0207] 免疫检查点抑制剂的其他例可举例CTLA-4抑制剂(例如抗CTLA-4抗体伊匹单抗(Ipilimumab)或替西利姆单抗(Tremelimumab))。CTLA-4抑制剂以与PD-1抑制不同的路径激活T细胞,产生抗肿瘤免疫应答。T细胞通过表面的CD28与CD80或CD86相互作用被激活。但是,即使是暂且被激活的T细胞,表面表达的CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4,cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4)以比CD28更高的亲和性优先与CD80或CD86相互作用,由此抑制其激活。CTLA-4抑制剂通过抑制CTLA-4,防止CD28与CD80或CD86的相互作用被抑制,从而产生抗肿瘤免疫应答。

[0208] 在进一步的实施方式中,免疫检查点抑制剂可以将TIM-3、LAG-3、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)、或TIGIT等免疫检查点蛋白质作为靶标。

[0209] 认为上述免疫检查点抑制对自体组织的免疫应答,但在病毒等抗原于生物体内长期存在时,免疫检查点也会在T细胞中增加。关于肿瘤组织,因为成为在生物体内长期存在的抗原,认为其通过这些免疫检查点回避抗肿瘤免疫,而上述免疫检查点抑制剂使上述回避功能失效,起到抗肿瘤效果。

[0210] 在本发明的一个实施方式中,提供一种预测具有癌的受试者对癌免疫疗法的应答性的指标。对癌免疫疗法的应答可以基于RECIST v1.1(实体瘤新的疗效评价标准:RECIST改良版(1.1版),New response evaluation criteria in solid tumours:Revised RECIST guideline(version 1.1))确定。

[0211] 癌治疗的效果可以由肿瘤大小的变化等,判断为完全缓解(Complete Response:CR)、部分缓解(Partial Response:PR)、疾病进展(Progressive Disease:PD)、或疾病稳定(Stable Disease:SD)。

[0212] 在本说明书中,“缓解的患者”(Responder)是指对于癌治疗,示出完全缓解或部分缓解的受试者。在本说明书中,“未缓解的患者”(Non-Responder)是指对于癌治疗,示出疾病进展或疾病稳定的受试者。

[0213] 受试者对癌治疗的应答性,包括受试者是“缓解的患者”或受试者是“未缓解的患者”。因此,判断受试者对癌治疗的应答性包括判断受试者是缓解的患者还是未缓解的患者。

[0214] 本发明的一个方面是使用CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量,预测或判断受

试者是“缓解的患者”或受试者是“未缓解的患者”。判断时间优选在治疗开始前进行预测,但也可以在治疗开始后。因为判断现在进行的治疗是否适当在医疗上也十分有用。或者,也可以使用本发明的CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量,判断预后。例如,使用本发明的CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量,可以预测缓解的患者转变为未缓解,即复发。进一步,判断时间可以为实施癌免疫疗法后(例如,施与免疫检查点抑制剂后),随着时间推移分析细胞亚群组成,判断预后。

[0215] (免疫检查点抑制剂的辅助用途)

[0216] 在本发明的其他方面,本发明可以提供一种包括免疫检查点抑制剂的组合物,用于在CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量多的受试者中治疗癌症。向CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量多的受试者施与上述免疫检查点抑制剂,可认为攻击肿瘤的细胞多,因此可能是有利的。并且,CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群的量少的受试者可以判断为是未缓解的患者,可以判断不施与免疫检查点抑制剂,或中断、中止施与。

[0217] 本发明的组合物优选医药组合物,作为其有效成分包含的免疫检查点抑制剂例如可举例PD-1抑制剂。PD-1抑制剂可举例抗PD-1抗体纳武利尤单抗或帕博利珠单抗。组合物可以制成气雾剂、液剂、提取物、酞剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、软膏、粉剂、片剂、溶液、悬浮液、乳剂等任意剂型。组合物可以包含本技术领域公知的任意的药学上可接受的添加物和/或赋形剂。本发明的组合物可以通过本领域技术人员决定的任意适当路径施与,没有限制,但可以举例静脉注射、点滴、口服、非口服、经皮等。

[0218] (组合物)

[0219] 在本发明中,包括免疫检查点抑制剂或细胞的组合物可以适当地与其他的癌治疗组合使用。其他的癌治疗可以举例其他癌免疫疗法、放射治疗、化学疗法、温热疗法、外科手术等,但不限于此。包括免疫检查点抑制剂或细胞的组合物可以与1种或多种其他药剂组合施与。1种或多种其他药剂可以是任意的化学疗法药,或可以包括第2免疫检查点抑制剂。

[0220] 在本发明的一个实施方式中,提供一种包括免疫检查点抑制剂的组合物。一般而言,本发明的包括免疫检查点抑制剂的组合物以口服或非口服的形式施与全身或局部。本发明的包括免疫检查点抑制剂的组合物向根据本说明书所述的方法示出具有较多攻击肿瘤的细胞的受试者施与,从而可以起到明显的治疗效果。

[0221] 施与量根据年龄、体重、症状、治疗效果、施与方法、治疗时间等不同,但一般而言,例如成人每人每次0.1mg到100mg,1日1次至多次口服施与,或成人每人每次0.01mg至30mg,1日1次至多次非口服施与(优选静脉内施与),或1日1小时至24小时静脉内持续施与。当然,施与量根据各种条件而变动,因此有时比上述施与量少即可,也有时需要比上述施与量多。

[0222] 包括免疫检查点抑制剂的组合物或包括细胞的组合物在施与时,可以使用用于口服施与的内服用固型剂、内服用液剂、以及用于非口服施与的注射剂、外用剂、栓剂等剂型。用于口服施与的内服用固型剂包括片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂等。胶囊剂包括硬胶囊和软胶囊。

[0223] 本发明的组合物可以根据需要,将1种或多种活性成分(例如,针对细胞或免疫检查点蛋白的抗体)按原样,或与赋形剂(乳糖、甘露糖醇、葡萄糖、微晶纤维素、淀粉等)、粘合剂(羟丙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、偏硅酸铝镁等)、崩解剂(羧甲基纤维素钙等)、润滑剂(硬脂酸镁等)、稳定剂、助溶剂(谷氨酸、天冬氨酸)等混合,按照常用方法制剂化而使用。另

外,可以根据需要,用包衣剂(白糖、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯)包覆,另外也可以以两层以上包覆。进一步,也可以包含像明胶一样可以被吸收的物质制成的胶囊。

[0224] 用于非口服施与的注射剂包括在溶液、悬浮液、乳浊液以及使用时溶解或悬浮在溶剂中而使用的固型注射剂。注射剂是将一种或一种以上的活性物质溶解、悬浮或乳化在溶剂中而使用的。溶剂例如是使用注射用蒸馏水、生理盐水、植物油、丙二醇、聚乙二醇、乙醇等醇类及其组合。进一步,该注射剂可以包括稳定剂、助溶剂(谷氨酸、天冬氨酸、聚山梨酯80(注册商标)等)、悬浮剂、乳化剂、无痛剂、缓冲剂、防腐剂等。这些在最后工序中,通过灭菌或无菌操作法进行调制。另外,还可以制造无菌固型剂例如冻干产品,在其使用前溶解在无菌化或无菌注射用蒸馏水或其他溶剂中而使用。

[0225] 本说明书中引用的科学文献、专利、专利申请等参考文献,以与各自具体描述相同的程度作为参考,通过引用整体并入本文。

[0226] 上文为了易于理解本发明,示出优选实施方式对本发明进行了说明。下文基于实施例说明本发明,但上文的说明和下文的实施例仅以示例为目的,不限定本发明。因此,本发明的范围不限于本说明书中具体记载的实施方式和实施例,仅限于权利要求的范围。

[0227] 实施例

[0228] (实施例1:CD106表达对肿瘤杀伤性T细胞的特异性)

[0229] (材料和方法)

[0230] 从抗PD-1抗体疗效显著的黑色素瘤患者在抗PD-1抗体治疗开始前的手术标本获得肿瘤组织。通过加入胶原酶和DNase,在37°C的温度下搅拌30分钟,对肿瘤组织进行酶治疗,使细胞分离。使用BD FACSAria III,从肿瘤组织细胞和肿瘤浸润免疫细胞的细胞混合物中分选CD3阳性细胞,获得表达TCR的T细胞。

[0231] 对于每个获得的T细胞,使用10X Chromium的5Prime试剂盒和V(D)J富集试剂盒(enrichment kit),通过测序对候选标记的基因表达和TCR序列两者进行测定。测序仪使用HISEQ3000。

[0232] 使用Python的umap库,将获得的fastq文件制成UMAP图。将各基因的表达映射到获得的UMAP图上。

[0233] (结果)

[0234] 图1示出了结果。在图1的各面板中,所述标记表达呈阳性的细胞着色显示。根据表达模式,对细胞进行聚类,被圆形圈出的部分对应肿瘤杀伤性T细胞。可理解CD106(VCAM1)的阳性细胞表达对肿瘤杀伤性T细胞群具有高特异性。CD106可用作与其他表面标记相比具有更高特异性的肿瘤杀伤性T细胞选择标记。TCR序列可在具有9成以上β链的细胞和6至9成d链的细胞中获得。

[0235] (实施例2:CD106阳性细胞群的肿瘤攻击性)

[0236] (材料和方法)

[0237] 与实施例1同样地,分离肿瘤组织的细胞,使用BD FACSAria III从该混合物中分选CD3阳性细胞,获得表达TCR的T细胞作为肿瘤浸润T细胞。将肿瘤浸润T细胞与通过自体肿瘤建立的细胞株进行共培养,对于IFN γ 的分泌,与无刺激的情况进行比较。通过使用了抗IFN γ 抗体的细胞内染色测定IFN γ 的分泌。通过抗PD-1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG3抗体和

抗CD106抗体进行细胞染色。作为阴性对照,使用了针对抗CD106抗体的同型对照抗体。

[0238] (结果)

[0239] 图2示出了结果。在CD106阳性部分由于刺激分泌IFN γ ,以及虽然在其他标记阳性部分由于刺激分泌IFN γ ,但在其他标记阴性部分也分泌IFN γ ,由此可知其与CD106相比特异度差。

[0240] (实施例3:细胞的制备)

[0241] 获得患者的肿瘤组织,通过酶治疗分离细胞。通过流式细胞仪分离肿瘤浸润T细胞作为CD3阳性部分。从CD3阳性部分进一步分离出CD106阳性且CD8阳性部分。

[0242] 对所分离出的部分的细胞进行培养增殖,以作为细胞医药。

[0243] 对所分离出的部分的细胞的核酸序列进行测序,获得TCR序列。设计具有获得的TCR序列的载体,将其导入至其他细胞。根据需要,对导入的细胞进行培养增殖,以作为细胞药物。

[0244] (实施例4:预测癌免疫疗法的效果)

[0245] 获得接受了癌免疫疗法患者的肿瘤浸润T细胞的相关信息。

[0246] 获得肿瘤浸润T细胞中的CD106⁺T细胞群所包含的细胞亚群(CD106⁺T细胞亚群、CD106⁺CD8⁺T细胞亚群、LAG-3⁺CD106⁺CD8⁺T细胞亚群、PD-1⁺CD106⁺CD8⁺T细胞亚群、TIM3⁺CD106⁺CD8⁺T细胞亚群、4-1BB⁺CD106⁺CD8⁺T细胞亚群、TIGIT⁺CD106⁺CD8⁺T细胞亚群、ITGAE⁺CD106⁺CD8⁺T细胞亚群、ENTPD1⁺CD106⁺CD8⁺T细胞亚群、CTLA-4⁺CD106⁺CD8⁺T细胞亚群)的量。

[0247] 通过将接受了癌免疫疗法的患者的治疗效果(CR、PR、SD、PD)与细胞亚群的量比较,由此验证特定的细胞亚群量可以成为指标。

[0248] (注记)

[0249] 如上所述,使用本发明的优选实施方式,对本发明进行了示例说明,但本发明应仅根据权利要求对其范围进行解释。应理解,本说明书中引用的专利、专利申请及其他文献,以与其内容本身具体地记载在本说明书中相同的方式将其内容作为对本说明书的参考而整体援引。本申请主张2019年7月10日向日本专利局提交的日本专利申请2019-128517为基础的优先权,其公开的所有内容作为参考引用至本文。

[0250] 产业上利用可能性

[0251] 本发明可以用于医疗、医药品、医疗保健、生物学、生物化学等领域。

CD106的肿瘤杀伤性T细胞特异性

可以比以往报告的表面标记更特异性地选择肿瘤杀伤性T细胞

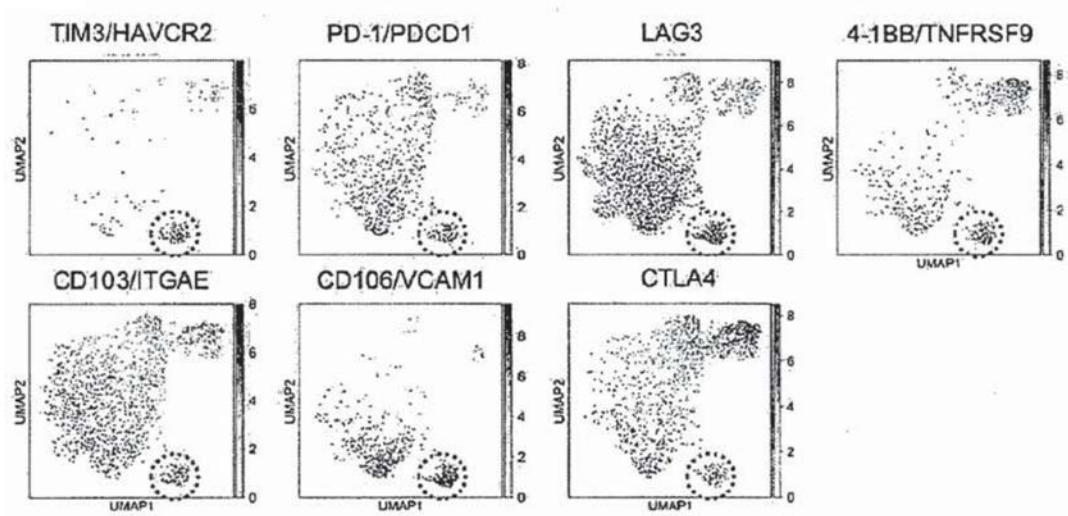


图1

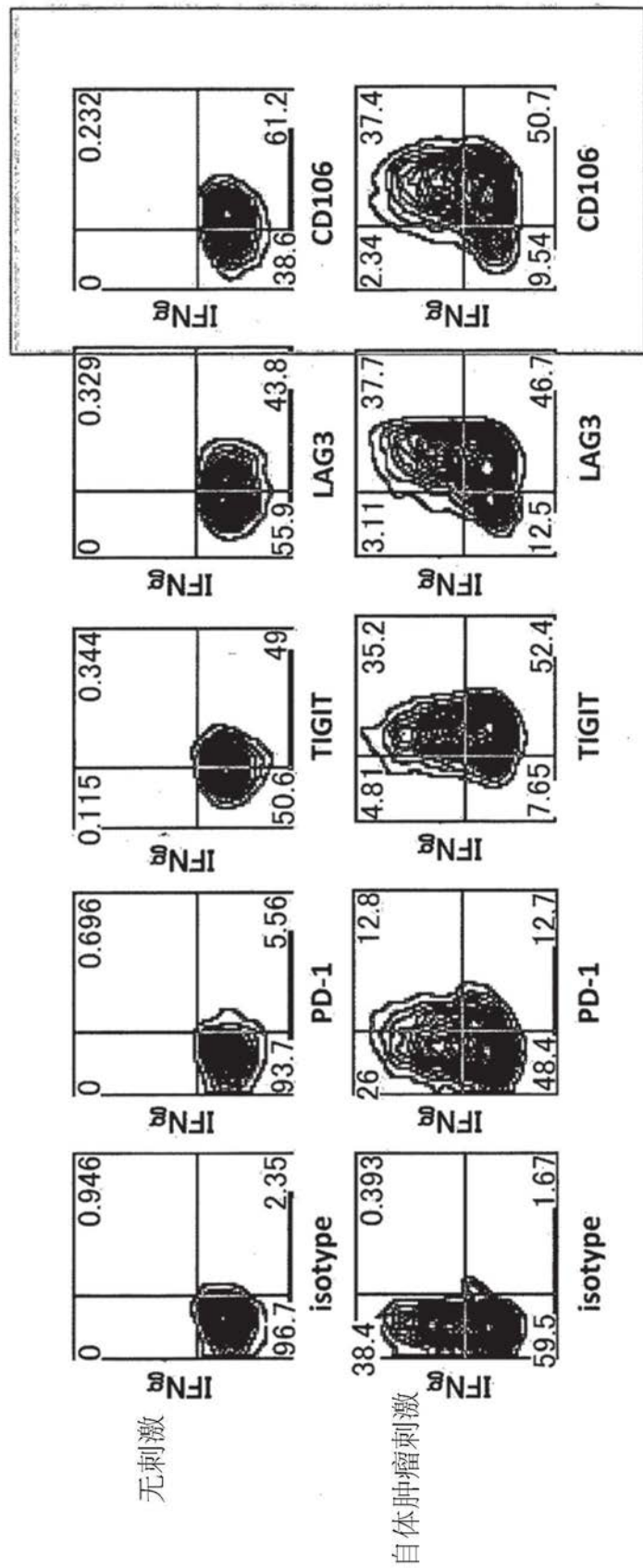


图2