



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112867922 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

---

(21) 申请号 201980065103.7 福岛雅典

(22) 申请日 2019.10.01 (74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219  
代理人 鲁雯雯 金龙河

(30) 优先权数据  
2018-187856 2018.10.03 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.04.01 (51) Int.Cl.  
G01N 33/50 (2006.01)  
A61K 31/164 (2006.01)  
A61P 17/00 (2006.01)  
G01N 33/15 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2019/038721 2019.10.01

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/071354 JA 2020.04.09

(71) 申请人 国立大学法人长崎大学  
地址 日本长崎县  
申请人 公益财团法人神户医疗产业都市推  
进机构

(72) 发明人 田中义正 千住博明 迎宽 权利要求书1页 说明书28页 附图11页

---

(54) 发明名称

免疫检查点抑制剂的效果预测方法

(57) 摘要

本发明提供用于预测由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险的方法,实现安全且高效的癌症免疫疗法。对选自(a)从受试者分离出的外周血单核细胞中的 $V\delta 2^+ \gamma \delta T$ 细胞的细胞数或比例、(b)从受试者分离出的外周血单核细胞中的 $V\delta 2^+ \gamma \delta T$ 细胞的抗原刺激后的细胞数或比例、(c)从受试者分离出的外周血T细胞中的 $V\delta 2^+ \gamma \delta T$ 细胞的细胞数或比例、和(d)从受试者分离出的外周血T细胞中的 $V\delta 2^+ \gamma \delta T$ 细胞的抗原刺激后的细胞数或比例中的任意一种或两种以上进行测定,以上述细胞数或比例作为指标来预测重症间质性肺炎的发病风险。

1. 一种预测由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险的方法,其包括:  
对选自 (a) 从受试者分离出的外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数或比例、  
(b) 从受试者分离出的外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例、  
(c) 从受试者分离出的外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数或比例、和  
(d) 从受试者分离出的外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例中的  
任意一种或两种以上进行测定;以及  
基于所述细胞数或比例判断重症间质性肺炎的发病风险。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在所述细胞数或比例为临界值以上的情况下,预测为该受试者的重症间质性肺炎的发病风险高。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在抗原刺激后的细胞发生聚集的情况下,预测为该受试者的重症间质性肺炎的发病风险高。
4. 一种判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗的方法,其中,按照权利要求1~3所述的方法预测重症间质性肺炎的发病风险,基于所述预测判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其中,所述  $\gamma$   $\delta$ T细胞的抗原刺激使用选自IL-2、磷酸单酯化合物、焦磷酸单酯化合物、三磷酸单酯化合物、四磷酸单酯化合物、三磷酸二酯化合物、四磷酸二酯化合物、含氮型双磷酸化合物、烷基胺、烷基醇、烯基醇、异戊二烯基醇和人源肿瘤细胞中的任意一种或两种以上抗原来进行。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中,在所述抗原刺激的基础上,使用选自IL-18、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、干扰素  $\gamma$  和外周血条件培养基中的任意一种或两种以上来刺激  $\gamma$   $\delta$ T细胞。
7. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,细胞数或比例使用流式细胞术或细胞图像光度术来测定。
8. 一种用于判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗的试剂盒,其包含 (i) 抗CD3抗体和 (ii) 抗V $\delta$ 2抗体。
9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其中,还包含选自 (iii) 焦磷酸单酯衍生物或含氮双磷酸衍生物以及 (iv) IL-18中的一种或两种以上。

## 免疫检查点抑制剂的效果预测方法

[0001] 关联申请

[0002] 本说明书包含记载于作为本申请的优先权基础的日本特愿2018-187856号(2018年10月3日申请)的说明书中的内容。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及判定利用免疫检查点抑制剂的癌症免疫疗法是否适合的方法和用于上述方法的试剂盒。

### 背景技术

[0004] 作为下一代的癌症标准治疗方法,利用免疫检查点抑制剂的“癌症免疫疗法”备受期待。免疫检查点是对识别并排除癌细胞的天然免疫防御机制进行调控的分子。PD-1在免疫效应细胞上表达,与在抗原呈递细胞上表达的PD-L1、PD-L2结合,作为对免疫防御机制进行负调控的免疫检查点起作用。

[0005] 已知多数癌细胞具有通过控制T细胞的信号来逃避免疫防御机制的系统,在作为PD-1配体的PD-L1的表达与预后不良之间具有相关性(非专利文献1)。也在开发基于利用抗PD-1抗体等来抑制PD-1免疫检查点的抗癌剂,但是其作用机制方面不明之处较多,另外单独时的奏效率仅为5~30%左右。另一方面,也存在引起间质性肺炎等不良事件的例子,给药后的管理也很重要。

[0006] 也在寻找预测免疫检查点抑制剂的效果的生物标志物,有报道指出,免疫球蛋白、CD5L及凝溶胶蛋白的血中浓度能够用作判定抗PD-1抗体的效果的标志物(专利文献1)、以及特定的miRNA能够用于预测PD-1抑制剂的敏感性(专利文献2)。但是,判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗的方法尚未建立起来。

[0007] 从提高其奏效率、实现对合适的患者提供合适的医疗的精准医疗的角度来说,不论是从患者的安全还是医疗行政方面,都期望对是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗这一点进行预测、评价。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:W02010/001617

[0011] 专利文献2:日本特开2016-64989号

[0012] 非专利文献

[0013] 非专利文献1:Hamanishi J.et al.,Proc Natl Acad Sci U SA.2007 Feb 27; 104(9):3360-5.Epub 2007Feb 21.

### 发明内容

[0014] 发明所要解决的问题

[0015] 本发明的课题在于,通过预测由免疫检查点抑制剂引起的重症性间质性肺炎发病

的风险、诊断是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗,从而提高其奏效率、实现更安全且高效的癌症免疫疗法。

[0016] 用于解决问题的方法

[0017] 免疫检查点在免疫系统中在2个阶段起作用。其一是在Th0细胞最初识别抗原呈递细胞的抗原并分化为Th1细胞、Th2细胞、Th17细胞等时对其进行负调控的启动阶段中的作用。作为该启动阶段中的免疫检查点,已知有CTLA-4/CD80/CD86,决定T细胞是否识别某抗原。另一个是在免疫效应细胞杀伤肿瘤细胞、感染细胞的效应阶段中的作用。作为该阶段中的免疫检查点,已知有PD-1/PD-L1/PD-L2,决定T细胞是否杀伤肿瘤细胞、感染细胞。作为具有细胞杀伤活性的免疫效应细胞,已知有CD8阳性T细胞(杀伤细胞)、 $\gamma\delta$ T细胞、NK细胞等。NK细胞使 $\gamma\delta$ T细胞和CD8阳性T细胞增殖, $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞在杀伤靶细胞后将抗原呈递分子(MHC簇I及II)与抗原肽复合物呈递到细胞表面并与其反应,致敏 $\alpha\beta$ T细胞,获得抗原特异性,杀伤肿瘤细胞、感染细胞。

[0018] 发明人认为PD-1免疫检查点抑制剂的效果与患者的效应细胞的数量和其功能有关,并对接受抗PD-1抗体(纳武单抗)治疗的癌症患者的外周血中的效应细胞的数量、增殖能力及肿瘤细胞杀伤活性与不良事件和奏效率的关系进行了调查。并且发现,通过测定作为效应细胞的 $\gamma\delta$ T细胞( $V\delta 2^+$  $\gamma\delta$ T细胞)的外周血单核细胞中的细胞数或比例,能够预测由PD-1免疫检查点抑制剂导致的重症性间质性肺炎等不良事件的发病风险。已知作为效应细胞的 $\gamma\delta$ T细胞在受到刺激后表达HLA-DR、HLA-DQ、CD80、CD86等抗原呈递细胞关联分子、并且对 $\alpha\beta$ T细胞进行抗原呈递,暗示了在次要的启动阶段中起作用。据此发现,本发明的见解不仅能够适用于由PD-1免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎,而且能够适用于由在次要的启动阶段中起作用的CTLA-4抑制剂引起的重症间质性肺炎等,从而完成了本发明。

[0019] 即,本发明提供以下的[1]~[13]。

[0020] [1]一种预测由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险的方法,其包括:

[0021] 对选自(a)从受试者分离出的外周血单核细胞中的 $V\delta 2^+$  $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例、

[0022] (b)从受试者分离出的外周血单核细胞中的 $V\delta 2^+$  $\gamma\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例、

[0023] (c)从受试者分离出的外周血T细胞中的 $V\delta 2^+$  $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例、和

[0024] (d)从受试者分离出的外周血T细胞中的 $V\delta 2^+$  $\gamma\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例中的任意一种或两种以上进行测定;以及

[0025] 基于上述细胞数或比例判断重症间质性肺炎的发病风险。

[0026] 对于上述方法而言,能够将亚急性且伴有弥漫性肺泡损伤(diffuse alveolar damage:DAD)的间质性肺炎(重症间质性肺炎)与除此以外的(例如伴有机化性肺炎(organizing pneumonia:OP)的)间质性肺炎区分开而预测其发病。

[0027] [2]根据[1]所述的方法,其特征在于,上述细胞数或比例为临界值以上的情况下,预测为该受试者的重症间质性肺炎的发病风险高。

[0028] [3]根据[1]所述的方法,其特征在于,在抗原刺激后的细胞数或比例高、抗原刺激后的细胞发生聚集的情况下,预测为该受试者的重症间质性肺炎的发病风险高。

[0029] [4]一种判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗的方法,其中,按照权利要求1~3所述的方法预测重症间质性肺炎的发病风险,基于上述预测判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗。

[0030] [5]根据[1]~[4]中任一项所述的方法,其中,上述 $\gamma\delta$ T细胞的抗原刺激使用选自IL-2、磷酸单酯化合物、焦磷酸单酯化合物、三磷酸单酯化合物、四磷酸单酯化合物、三磷酸二酯化合物、四磷酸二酯化合物、含氮型双磷酸化合物、烷基胺、烷基醇、烯基醇、异戊二烯基醇和人源肿瘤细胞中的任意一种或两种以上抗原来进行。

[0031] [6]根据[5]所述的方法,其中,在上述抗原刺激的基础上,使用选自IL-18、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、干扰素 $\gamma$ 和外周血条件培养基中的任意一种或两种以上来刺激 $\gamma\delta$ T细胞。

[0032] [7]根据[1]~[6]中任一项所述的方法,其中,细胞数或比例使用流式细胞术或细胞图像光度术来测定。

[0033] [8]一种用于判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗的试剂盒,其包含(i)抗CD3抗体和(ii)抗V $\delta$ 2抗体。

[0034] [9]根据[8]所述的试剂盒,其中,还包含选自(iii)焦磷酸单酯衍生物或含氮双磷酸衍生物以及(iv)IL-18中的一种或两种以上。

[0035] [10]一种用于辅助由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险的诊断的方法,其包括:

[0036] 对选自(a)从受试者分离出的外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例、

[0037] (b)从受试者分离出的外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例、

[0038] (c)从受试者分离出的外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例、和

[0039] (d)从受试者分离出的外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例中的任意一种或两种以上进行测定;

[0040] 在此,基于上述细胞数或比例来确定重症间质性肺炎的发病风险。

[0041] [11]一种用于预测由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险、利用免疫检查点抑制剂进行治疗的方法,其包括:

[0042] 对选自(a)从受试者分离出的外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例、

[0043] (b)从受试者分离出的外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例、

[0044] (c)从受试者分离出的外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例、和

[0045] (d)从受试者分离出的外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例中的任意一种或两种以上进行测定;

[0046] 基于上述细胞数或比例预测重症间质性肺炎的发病风险;以及

[0047] 按照上述预测进行利用免疫检查点抑制剂的治疗(例如,排除发病风险高的受试者而进行免疫检查点抑制剂的给药、或对发病风险高的患者实施规定的措施而进行免疫检查点抑制剂的给药)。

[0048] [12]根据[1]~[7]、[10]和[11]中任一项所述的方法,其中,受试者为肺癌患者。

[0049] [13]一种药物组合物,其为含有免疫检查点抑制剂的药物组合物,其特征在于,其用于抑制重症间质性肺炎的发病、并治疗或预防肿瘤,对通过[1]~[7]中任一项所述的方法判断为重症间质性肺炎的发病风险低的受试者使用。

[0050] 上述[1]~[13]中,免疫检查点抑制剂优选为PD-1免疫检查点抑制剂。

[0051] 发明效果

[0052] 根据本发明,通过在给药前预测由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险、判断是否适合治疗,从而可实现对合适的患者提供合适的药物的精准医疗。本发明的方法可以使用从患者采集的少量外周血来实施,因此患者的负担小,并且通过使用流式细胞术等而能够迅速且简便地进行诊断。

## 附图说明

[0053] 图1示出用流式细胞术分析健康人外周血单核细胞中的 $\gamma\delta$ T细胞的比例而得的结果。

[0054] 图2示出用流式细胞术分析以PTA及IL-2进行增殖诱导时的健康人外周血单核细胞中的 $\gamma\delta$ T细胞的比例而得的结果(左:第0天、右:第11天)。(A)V $\delta$ 2型 $\gamma\delta$ T细胞的第0天的比例为5.57%的健康人、(B)V $\delta$ 2型 $\gamma\delta$ T细胞的第0天的比例为10.35%的健康人。

[0055] 图3示出用流式细胞术分析肺癌患者的 $\gamma\delta$ T细胞的比例而得的结果。

[0056] 图4示出用流式细胞术分析以PTA及IL-2进行增殖诱导时的肺癌患者的外周血单核细胞中的 $\gamma\delta$ T细胞的比例而得的结果(左:第0天、右:第11天)。(A)V $\delta$ 2型 $\gamma\delta$ T细胞的第0天的比例为4.14%的肺癌患者、(B)V $\delta$ 2型 $\gamma\delta$ T细胞的第0天的比例为2.91%的肺癌患者、(C)V $\delta$ 2型 $\gamma\delta$ T细胞的第0天的比例为0.89%的肺癌患者、(D)V $\delta$ 2型 $\gamma\delta$ T细胞的第0天的比例为0.78%的肺癌患者。

[0057] 图5示出用Zol/IL-2或Zol/IL-2/IL-18刺激健康人外周血单核细胞时的 $\gamma\delta$ T细胞的增殖(图中,左:对照(培养基)、中央:Zol/IL-2、右:Zol/IL-2/IL-18)。

[0058] 图6示出用IL-2或IL-2/IL-18刺激健康人外周血单核细胞的CD3阴性级分时的NK细胞的增殖(图中,上:IL-2、下:IL-2/IL-18)。

[0059] 图7示出通过混合培养确认由IL-2/IL-18带来的NK细胞增殖诱导能力与 $\gamma\delta$ T细胞的增殖诱导的关系的结果(图中,左: $\gamma\delta$ T细胞单独培养,中央:NK细胞单独培养,右:NK细胞与 $\gamma\delta$ T细胞的混合培养。NK细胞(红色)、 $\gamma\delta$ T细胞(绿色))。

[0060] 图8示出抗原刺激后的 $\gamma\delta$ T细胞的增殖诱导机制。

[0061] 图9示出利用PD1免疫检查点抑制剂的癌症免疫疗法和效果预测的概念。

## 具体实施方式

[0062] 1. 定义

[0063] “免疫检查点抑制剂”

[0064] 免疫检查点抑制剂是指:抑制CTLA-4/CD80/CD86信号转导系统、PD-1/PD-L1/PD-L2信号转导系统等免疫检查点,由此显示抗肿瘤效果、以及抑制病毒等的免疫逃逸而显示抗感染症效果的物质。

[0065] “PD-1 (Programmed Death-1, 程序性细胞死亡受体-1)”为在效应T细胞表面表达、通过与肿瘤细胞表面表达的PD-L1发生相互作用而对免疫防御机制进行负调控的所谓的免疫检查点。PD-1在细胞内区域具有2个ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, 免疫受体酪氨酸相关抑制基序) 结构, 认为通过在其C末端侧结合SHIP-2来转导免疫抑制信号。

[0066] “PD-1免疫检查点抑制剂”是指抑制PD-1介导的免疫检查点系统的物质。由此, “PD-1免疫检查点抑制剂”通过抑制肿瘤细胞的免疫逃逸机制来显示抗肿瘤效果, 另外通过抑制病毒、病原微生物的免疫逃逸来显示抗感染症效果。

[0067] 通常, T细胞依赖于T细胞受体 (TCR) 地识别呈递到抗原呈递细胞上的抗原肽/MHC簇I或MHC簇II复合物。但是, 在仅来自该TCR/抗原肽/MHC复合物的信号的情况下不会诱发完全免疫应答, 在T细胞的启动中, 除了需要TCR/抗原肽/MHC复合物的信号以外还需要CD28/CD80/CD86信号系统 (正的辅助刺激信号)。与此相对地, 若CTLA-4/CD80/CD86信号系统被激动, 则T细胞的活化受到负调控 (负的辅助刺激信号)。即, CD28、CTLA-4的辅助刺激信号规定T细胞对某抗原是否发生反应的最初阶段。另一方面, 在效应阶段, ICOS/ICOSL信号系统成为正的辅助刺激信号, PD-1/PD-L1/PD-L2信号系统成为负的辅助刺激信号。即, PD-1/PD-L1系统在决定T细胞是否杀灭靶细胞的阶段中作为负的信号系统起作用。

[0068] 作为PD-1免疫检查点抑制剂, 考虑了3个候补、即抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体。首先, 抗PD-1抗体切断PD-1与PD-L1的相互作用、以及PD-1与PD-L2的相互作用这两者。另一方面, 抗PD-L1抗体仅切断PD-1与PD-L1的相互作用, 抗PD-L2抗体仅切断PD-1与PD-L2的相互作用。

[0069] 已知PD-1在经活化的免疫效应T细胞中表达。已知PD-L1和PD-L2在预后不良的肿瘤细胞中表达, 但是PD-L2也在树突细胞中表达。因此, 抗PD-L1抗体抑制在活化T细胞上表达的PD-1与在肿瘤细胞上表达的PD-L1的相互作用、切断T细胞的免疫抑制, 由此可以期待特异性增强T细胞的抗肿瘤效果。另一方面, 抗PD-L2抗体抑制在活化T细胞上表达的PD-1与在肿瘤细胞上表达的PD-L2的相互作用, 因此除了切断T细胞的免疫抑制以外, 还抑制在T细胞上表达的PD-1与在树突细胞上表达的PD-L2的相互作用, 对T细胞的启动也可能造成影响。即, 抗PD-L2抗体、抗PD-1抗体除了显示出癌症特异性作用以外, 还有可能显示出其它的不同作用。从而, 理论上, 作为PD-1免疫检查点抑制剂, 抗PD-L1抗体是最特异性针对癌症的, 预测副作用也小, 但是关于实际作用, 还需要基于临床进行更详细的分析。

[0070] 目前销售或开发中的免疫检查点抑制剂中, 作为在效应阶段发挥作用的PD-1免疫检查点抑制剂, 可列举作为抗PD-1抗体的纳武单抗 (欧狄沃)、派姆单抗 (Keytruda)、匹地利珠单抗 (CT-011); 作为抗PD-L1抗体的阿特珠单抗 (MPDL3280A/RG-7446)、度伐鲁单抗 (MEDI4736)、阿维鲁单抗 (MSB0010718C)、MED10680/AMP-514。作为在其它阶段发挥作用的目前销售或开发中的免疫检查点抑制剂, 可列举作为抗CTLA-4抗体的伊匹单抗 (MDX-010)、曲美木单抗 (Tremelimumab) (CP675、206); 作为抗杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR) 抗体的利瑞鲁单抗 (Lirilumab) (IPH2102/BMS-986015)、作为抗CD137抗体的乌瑞鲁单抗 (urelumab) (BMS-663513)、PF-05082566、作为抗LAG3抗体的BMS-986016; 作为抗OX40抗体的MEDI6469等。

[0071] “间质性肺炎”

[0072] 间质性肺炎是肺间质成为炎症、纤维化病变的场所的疾病的总称,肺进行性地发生纤维化的疾病则被称为肺纤维症。间质性肺炎的原因很多,有由于职业/环境性或药剂等导致的、伴随胶原病或结节病等全身性疾病而发病的、原因不明的。作为一般倾向,急性发病表现为弥漫性肺泡损伤(diffuse alveolar damage:DAD)等临床影像,而慢性发病则表现出机化性肺炎(organizing pneumonia:OP)的临床影像。OP等通常较良好,大多通过药剂中止或肾上腺皮质激素(类固醇)的使用而改善,但DAD的治疗反应性欠佳、预后不良,即使恢复也会残留纤维化。

[0073] “重症间质性肺炎”

[0074] 本说明书中,重症间质性肺炎是指亚急性的伴有DAD的间质性肺炎,是指会引起急性加重、有致死危险的间质性肺炎的症状。根据本发明的方法,能够将伴有DAD的间质性肺炎与除此以外的(例如伴有OP的)间质性肺炎区别开地预测其发病。

[0075] “外周血单核细胞(PBMC)”

[0076] 单核细胞(Mononuclear Cells)是广泛分布于全身的结缔组织、血液中、淋巴组织的单核的间充质细胞群的总称,包括组织中的巨噬细胞、作为其前体细胞的单核细胞、淋巴细胞。本发明的“外周血单核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells:PBMC)”为存在于外周血的单核细胞,主要包括单核细胞和淋巴细胞。外周血单核细胞可以通过公知的方法或使用市售的试剂盒等来分离。

[0077] “肿瘤细胞杀伤活性”

[0078] “肿瘤细胞杀伤活性”是指造成肿瘤细胞死亡、功能障碍、增殖抑制的功能。NK细胞、肿瘤细胞表面的配体和 $\gamma\delta$ T细胞对细胞内IPP浓度高的肿瘤细胞显示高的细胞杀伤性,产生IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 等细胞因子,显示抗肿瘤细胞活性。作为具有肿瘤细胞杀伤活性的“效应T细胞”,已知有 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NK细胞。

[0079] “ $\alpha\beta$ T细胞”

[0080] “ $\alpha\beta$ T细胞”为具有由 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链这两种糖蛋白构成的T细胞受体的T细胞,占外周血淋巴细胞的大部分。 $\alpha\beta$ T细胞通过TCR/CD3复合物识别抗原肽/MHC复合物。因此,为了分析 $\alpha\beta$ T细胞,关于抗原肽的信息是必需的。虽然目前已经鉴定出T细胞所识别的抗原肽,但是推测在一种肿瘤中抗原肽种类较多,难以对其整体进行把握、分析。

[0081] “ $\gamma\delta$ T细胞”

[0082] “ $\gamma\delta$ T细胞”为在细胞表面具有由 $\gamma$ 链和 $\delta$ 链这两种糖蛋白构成的T细胞受体的T细胞。 $\gamma\delta$ T细胞通常与 $\alpha\beta$ T细胞相比非常少。外周血单核细胞的CD3阳性T细胞中存在约4%的 $\gamma\delta$ T细胞,其中的50~75%为在TCR可变区中表达“V $\gamma$ 2”(有时也被称为V $\gamma$ 9)及“V $\delta$ 2”的V $\gamma$ 2V $\delta$ 2T细胞(V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞)。

[0083] 几乎不了解活化 $\gamma\delta$ T细胞的抗原分子,但发明人曾报道:磷酸单乙酯等合成磷酸烷基酯为 $\gamma\delta$ T细胞的抗原(Tanaka Y et al.,PNAS USA91:8175-8179,1994);将作为类异戊二烯生物合成途径的起点的异戊烯基二磷酸(IPP)等焦磷酸单酯系代谢物作为抗原来识别,经IPP活化的 $\gamma\delta$ T细胞具有强抗肿瘤活性(Tanaka et al.,Nature,375:155-158,1995)。另外还报道了:在用含氮型双磷酸处理抗原呈递细胞(Miyagawa F et al.,J.Immunol 166:5508-5514,2001)、肿瘤细胞(Kato Y.et al.,J.Immunol167:5092-5098,2001)时, $\gamma\delta$ T细胞被活化。关于 $\gamma\delta$ T细胞的抗原识别机制的详细情况,不明之处较多,但可

进行分析。

[0084] “自然杀伤(NK)细胞”

[0085] 本发明的“NK细胞”为不属于T细胞也不属于B细胞的淋巴细胞,不受主要组织相容性(MHC)抗原约束地对肿瘤细胞、某些种类的病毒感染细胞、移植骨髓细胞等显示杀伤活性。在NK细胞的表面存在活化受体和抑制受体,所述活化受体与靶细胞表面的配体结合并诱导细胞杀伤活性,所述抑制受体识别自身MHC簇I分子并抑制来自活化受体的信号。由此,NK细胞通常接受基于MHC的负信号,在肿瘤细胞上的MHC脱落时发挥肿瘤细胞杀伤性。但是,在用人的NK细胞研究PD-1的表达时,难以确认其表达,难以进行分析。

[0086] 发明人发现,通过将IL-2和IL-18组合可以使NK细胞有效地增殖(W02016/021720)。NK细胞可通过CD56的表达来鉴定。IL-2及IL-18刺激后的NK细胞表达与抗原呈递细胞相关的HLA-DR、HLA-DQ、CD80,不仅破坏癌细胞还向T细胞呈递癌抗原,由此表明可活化免疫防御。

[0087] “杀伤T细胞(CTL)”

[0088] “杀伤T细胞(CTL)”也被称为细胞毒性T细胞(CTL:Cytotoxic T Lymphocyte),其识别并杀死对于宿主而言为异物的具有同种抗原、病毒抗原的细胞。CTL在细胞表面具有CD8抗原和由 $\alpha$ 链、 $\beta$ 链构成的T细胞受体。“CD8阳性T细胞”可通过从抗原呈递细胞接受MHC-簇I抗原和抗原肽的呈递而被活化、从而具有细胞杀伤活性。被活化的CTL放出穿孔素、颗粒酶、TNF或者刺激靶细胞的Fas抗原而诱导细胞凋亡,从而杀伤细胞。

[0089] 2.由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险

[0090] 免疫检查点抑制剂通过解除肿瘤细胞对效应T细胞的功能抑制、从而使其本来的功能恢复。但是,对于效应T细胞数极少的癌症患者而言,即使使效应细胞的功能恢复,也由于其绝对数不足而无法期待高效的抗肿瘤效果。本发明的特征在于,通过测定作为效应细胞的 $\gamma\delta$ T细胞的数量(比例)和功能,预测由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险。

[0091] 2.1样本(试样)

[0092] 本发明中使用的样本(试样)为从受试者、即正在研究使用或已经使用免疫检查点抑制剂的受试者分离出的外周血单核细胞。1次测定所需要的外周血至少为10ml,优选为10ml~20ml。

[0093] 外周血单核细胞可如下分离:将从受试者采集的外周血在根据需要加入适当量的抗凝固剂的情况下按照常规方法用PBS等生理缓冲液稀释后,供于密度梯度离心、比重离心等而进行分离。分离出的单核细胞在用Yssel培养基、Iscov培养基、RPMI1640培养基等人T细胞用培养基稀释后调整成一定的浓度,例如 $1 \times 10^4$ 个细胞/ml~ $1 \times 10^7$ 个细胞/ml,优选为 $5 \times 10^5$ 个细胞/ml~ $3 \times 10^6$ 个细胞/ml。

[0094] 2.2测定对象

[0095] (a) 外周血单核细胞中的 $V\delta 2^+$   $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例

[0096] “外周血单核细胞中的 $V\delta 2^+$   $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例”可以通过利用特异性表面标志物来测定。

[0097] 例如,T细胞在其表面具有CD3抗原, $\gamma\delta$ T细胞在表面还具有由 $\gamma$ 链及 $\delta$ 链这两种糖蛋白构成的受体。因此,可以通过对从受试者分离出的外周血单核细胞使用与CD3特异性结

合的抗体、以及与 $\gamma$ 链及 $\delta$ 链中的一者或两者特异性结合的抗体(例如抗V $\gamma$ 2抗体、抗V $\delta$ 1抗体、抗V $\delta$ 2抗体)来测定外周血单核细胞中的 $\gamma\delta$ T细胞的量。如上所述, $\gamma\delta$ T细胞的大部分为V $\gamma$ 2V $\delta$ 2T细胞(V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞),因此可以通过以V $\delta$ 2为指标来实质上检测V $\gamma$ 2V $\delta$ 2。即,在判定中,可以使用利用抗V $\delta$ 2抗体和作为T细胞抗原的CD3抗原检测到的CD3<sup>+</sup>V $\delta$ 2<sup>+</sup>细胞(V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞)作为表示 $\gamma\delta$ T细胞的数量、比例的指标。通过使用后述的流式细胞术或细胞图像分析法进行测定,能够简便且迅速地求出“外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例”。

[0098] 具体而言,在外周血采集后(第0天),对于一定数量的外周血单核细胞(在以下的临界值的情况下,为 $1 \times 10^7$ 个外周血单核细胞)测定细胞数或比例。由于受试者的免疫状态可能发生变化,因此优选在即将治疗前实施外周血采集。

[0099] (b) 外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例

[0100] “外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例”表示V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的增殖能力。

[0101] 所使用的抗原只要是可被 $\gamma\delta$ T细胞识别并将其活化的抗原就没有特别限定。可以使用例如IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、干扰素 $\gamma$ 等肽抗原;分枝杆菌、疟原虫等产生的(E)-4-羟基-3-甲基-2-丁烯基二磷酸(HMB-PP)、2-甲基-3-丁烯基二磷酸(2M3BPP)、包括磷酸单乙酯等合成磷酸烷基酯在内的磷酸单酯化合物、三磷酸单酯化合物、四磷酸单酯化合物、三磷酸二酯化合物、四磷酸二酯化合物;例如异戊烯基二磷酸(IPP)、焦磷酸单乙酯二钠、焦磷酸单甲酯二钠、焦磷酸单丙酯二钠等具有C1-5的烷基的焦磷酸单酯化合物或其盐所代表的焦磷酸衍生物(例如日本特开2003-128555号记载的化合物等);在含氮双磷酸酯的偕(geminal)碳原子上导入有烷基胺或烯基胺的双磷酸化合物或其酯或它们的盐所代表的含氮双磷酸化合物(例如W02016/098904、W02016/125757中记载的化合物(后述的PTA等));烷基胺、烷基醇、烯基醇、异戊二烯基醇等非肽抗原;以及人源肿瘤细胞、外周血条件培养基等。上述抗原只要能发挥功能,则也可以为其片段(碎片)。

[0102] 关于抗原刺激后的细胞数、比例,向包含分离出的外周血单核细胞的培养液中添加上述抗原,经过一定时间后,通过与前项(a)相同的方法进行测定。添加的抗原的量可根据所使用的抗原的 $\gamma\delta$ T细胞活化能力来适宜决定。抗原添加后至测定为止的时间也可根据所使用的抗原来适宜决定,通常为0.5小时以上,优选为12小时~14天左右。

[0103] 例如,在IL-2的情况下,例如以达到 $10 \sim 1000$  IU/ml、优选 $20 \sim 200$  IU/ml的方式进行添加,在 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 气氛下进行温育,在3天~14天后、优选7天~11天后测定 $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例。

[0104] 在焦磷酸单酯衍生物的情况下,例如以达到 $10$  pM~ $500$   $\mu$ M、优选 $100$  pM~ $100$   $\mu$ M的方式进行添加,在 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 气氛下进行温育,在3天~14天后、优选7天~11天后测定 $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例。

[0105] 在PTA之类的含氮型双磷酸衍生物的情况下,例如以达到 $1$  nM~ $500$   $\mu$ M、优选 $10$  nM~ $5$   $\mu$ M(例如 $1$   $\mu$ M的PTA)的方式进行添加,在 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 气氛下进行温育,在3天~14天后、优选7天~11天后测定 $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例。

[0106] (c) 外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例

[0107] “外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例”可以通过使用T细胞特异性抗

CD3抗体和抗V $\delta$ 2抗体来求出。关于测定,可以使用后述的流式细胞术或细胞图像分析法来求出。

[0108] (d) 抗原刺激后的外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数或比例

[0109] “外周血T细胞中的抗原刺激后的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数或比例”表示V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的增殖能力。抗原刺激及抗原刺激后的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数或比例的测定方法可以基于(b)中记载的方法来实现。

[0110] 本发明中,可以以上述(a)~(d)中的任一者为指标,但是,如后所述,在CD3-V $\delta$ 2-细胞多的受试者中,优选将外周血T细胞作为试样。

[0111] 另外,通常在健康人中 $\gamma$   $\delta$ T细胞的大部分为V $\delta$ 2<sup>+</sup>细胞,但在癌症患者中V $\delta$ 1有时会较多。即使是来自这样的患者的试样,进行抗原刺激时V $\delta$ 2<sup>+</sup>细胞也进行增殖、V $\delta$ 1变为检测灵敏度以下,因此可以将V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞作为表示 $\gamma$   $\delta$ T细胞的数量、比例的指标来进行评价。因此,在V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞较多的受试者中,优选以抗原刺激后的试样中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数、比例作为指标。

[0112] 2.3细胞数或比例的测定

[0113] • 流式细胞术

[0114] 关于外周血单核细胞或外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数或比例的测定方法,可以使用对各细胞的表面抗原为特异性的抗体通过流式细胞术来进行测定。流式细胞术为如下细胞测定方法:将悬浮于流体的细胞1个1个地导入传感区,在该单个细胞流中测定荧光、散射光,由此能够在短时间内对大量细胞1个1个地进行定量分析。

[0115] V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数或比例可以通过使用T细胞标志物CD3和 $\gamma$   $\delta$ T细胞标志物V $\delta$ 2等的双色荧光直方图简便地进行测定。具体而言,在通过使用CD3抗体和抗体V $\delta$ 2抗体的双色荧光直方图对外周血单核细胞进行分析时,CD3<sup>+</sup>V $\delta$ 2-相当于 $\alpha$   $\gamma$  T细胞(G1),CD3<sup>+</sup>V $\delta$ 2<sup>+</sup>相当于 $\gamma$   $\delta$ T细胞(G2),除此以外,还可以检测CD3-V $\delta$ 2-的细胞(G3)。G2/G1+G2+G3相当于外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的比例,G2/G1+G2相当于外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数和比例。

[0116] • 细胞图像光度术(细胞图像分析法)

[0117] 关于外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数或比例的测定方法,也可以使用对各细胞的表面抗原为特异性的抗体并利用细胞图像光度术进行测定。细胞图像光度术为如下细胞测定方法:对多孔板、载玻片上的细胞进行激光扫描而得到其荧光图像、散射光或透射光图像,进行图像处理,由此能够在短时间内对大量细胞1个1个地进行定量分析。

[0118] 与流式细胞术同样地,外周血单核细胞或外周血T细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数和比例也可以通过使用T细胞标志物CD3和V $\delta$ 2的散射光像、双色荧光像来简便地进行测定。

[0119] 2.4预测和判定方法

[0120] (1) 基于外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的数量、比例的预测

[0121] (a) 外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞数或比例、和/或(b) 外周血单核细胞中的V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$   $\delta$ T细胞的抗原刺激后的细胞数或比例为规定的临界值以上的情况下,可以预测为由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险高。然后,可以基于其发病风险来判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗。

[0122] 临界值可以根据所使用的免疫检查点抑制剂、以及外周血单核细胞数及细胞的培养时间来适宜决定。

[0123] (a) 细胞数的临界值在外周血单核细胞为 $1 \times 10^7$ 个时,通常为 $0.5 \times 10^5 \sim 15 \times 10^5$ 的范围,优选为 $0.5 \times 10^5 \sim 14 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 13 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 12 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 11 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 9 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 的范围,更优选为 $1 \times 10^5 \sim 15 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 14 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 13 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 12 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 11 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 9 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 的范围,尤其优选为 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 的范围。

[0124] 细胞比例的临界值通常为0.5~15%的范围,优选为0.5~14%、0.5~13%、0.5~12%、0.5~11%、0.5~10%、0.5~9%、0.5~8%、0.5~7%、0.5~6%、0.5~5%、0.6~5%、0.7~5%、0.8~5%、0.9~5%、1.0~5%、0.6~4%、0.7~4%、0.8~4%、0.9~4%、1.0~4%的范围,更优选为0.6~3%、0.7~3%、0.8~3%的范围、0.9~3%,尤其优选为1~3%的范围。

[0125] (b) 给予抗原刺激时的细胞数的临界值根据所给予的抗原刺激而不同,超过上述值的数十倍,优选为100倍~2000倍。例如在使用PTA和IL-2的抗原刺激的情况下,细胞数增加到200倍~3000倍,细胞比例超过98%。在重症间质性肺炎的发病风险高的受试者的情况下, $V\delta 2^+ \gamma \delta T$ 细胞的反应性高,若利用焦磷酸衍生物、双磷酸化合物给予抗原刺激则细胞会发生聚集,因此还能进行目视判定。例如使 $1 \mu M$ 的PTA作用于外周血单核细胞,对第1天的细胞聚集进行目视判定。

[0126] (2) 基于外周血T细胞中的 $V\delta 2^+ T$ 细胞的数量、比例的预测

[0127] (c) 外周血T细胞中的 $V\delta 2^+ \gamma \delta T$ 细胞的细胞数或比例、和/或(d) 外周血T细胞中的 $V\delta 2^+ \gamma \delta T$ 细胞的抗原刺激后的细胞数或比例为规定的临界值以上的情况下,可以预测为由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险高。然后,可以基于其发病风险来判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗。

[0128] 通常,可以根据上述外周血单核细胞中的 $V\delta 2^+ \gamma \delta T$ 细胞的细胞数或比例来预测受试者的应答,但是在CD3- $V\delta 2^-$ 的细胞(G3)多的受试者的情况下,优选以将其去除的外周血T细胞中的 $V\delta 2^+ \gamma \delta T$ 细胞的细胞数、比例为对象进行诊断。

[0129] 临界值可根据所使用的免疫检查点抑制剂、以及外周血T细胞数及培养时间来适宜决定。

[0130] (c) 细胞数的临界值在T细胞为 $1 \times 10^7$ 个时,通常为 $1 \times 10^5 \sim 20 \times 10^5$ 的范围,优选为 $1 \times 10^5 \sim 19 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 18 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 17 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 16 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 15 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 14 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 13 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 12 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 11 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 9 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 的范围,更优选为 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 的范围,尤其优选为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 的范围。

[0131] 细胞比例的临界值通常为1~20%的范围,优选为1~19%、1~18%、1~17%、1~16%、1~15%、1~14%、1~13%、1~12%、1~11%、1~10%、1~9%、1~8%、1~7%、1~6%、1~5%、1~4%、1~3%的范围,更优选为2~5%、2~4%的范围,尤其优选为2~3%的范围。

[0132] (b) 给予抗原刺激时的细胞数的临界值根据所给予的抗原刺激而不同,超过上述

值的数十倍,优选为100倍~2000倍。例如,在使用PTA和IL-2的抗原刺激的情况下,细胞数增加到200倍~3000倍,细胞比例超过98%。

[0133] 在重症间质性肺炎的发病风险高的受试者的情况下, $V\delta 2^+$   $\gamma$   $\delta$ T细胞的反应性高,若利用焦磷酸衍生物、双磷酸化合物给予抗原刺激则细胞会发生聚集,因此也能够进行目视判定。例如使1 $\mu$ M的PTA作用于外周血单核细胞,对第1天的细胞聚集进行目视判定。

[0134] 2.5其它方法

[0135] 除了上述方法以外,还可以根据所使用的免疫检查点抑制剂、治疗目的对下述(e)~(i)的指标进行适宜组合来判定是否适合治疗。

[0136] (e) 抗原刺激后的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的PD-1表达量、

[0137] (f) 抗原刺激后的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的肿瘤细胞杀伤活性、

[0138] (g) 从受试者分离出的外周血单核细胞中的NK细胞的细胞数或比例、

[0139] (h) 从受试者分离出的外周血单核细胞中的NK细胞的增殖刺激后的细胞数或比例、

[0140] (i) 上述增殖刺激后的NK细胞的肿瘤细胞杀伤活性。

[0141] 需要说明的是,如上所述,对于 $\gamma$   $\delta$ T细胞,可以以 $V\delta 2^+$   $\gamma$   $\delta$ T细胞求出上述指标。

[0142] (e) 抗原刺激后的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的PD-1表达量

[0143] “抗原刺激后的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的PD-1表达量”为对免疫检查点抑制剂的应答性的指标。因此,通过与重症间质性肺炎的发病风险一起评价对免疫检查点抑制剂的应答性,能够进行更精准的治疗。

[0144] 所使用的抗原只要是可被 $\gamma$   $\delta$ T细胞识别并将其活化的抗原就没有特别限定,可以使用与上述(b)中记载的抗原相同的抗原。另外,抗原的添加量、抗原添加后至测定为止的时间也如上述(b)所记载。PD-1的表达量可以通过使用上述的流式细胞术、细胞图像光度术来简便地进行定量分析。

[0145] (f) 抗原刺激后的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的肿瘤细胞杀伤活性

[0146] “抗原刺激后的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的肿瘤细胞杀伤活性”为是否对免疫检查点抑制剂产生应答、 $\gamma$   $\delta$ T细胞是否实际发挥肿瘤细胞杀伤活性的指标。因此,通过与重症间质性肺炎的发病风险一起评价对免疫检查点抑制剂发生应答的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的肿瘤细胞杀伤活性,能够进行更精准的治疗。

[0147] 所使用的抗原只要为可被 $\gamma$   $\delta$ T细胞识别并将其活化的抗原就没有特别限定,可以使用与上述(b)中记载的抗原相同的抗原。另外,抗原的添加量、抗原添加后至测定为止的时间也如上述(b)所记载。

[0148] 在通常的肿瘤细胞的情况下,为了测定细胞杀伤活性,优选利用含氮双磷酸(N-BP)等进行刺激以提高 $\gamma$   $\delta$ T细胞的肿瘤细胞杀伤性。例如,首先对肿瘤细胞进行N-BP处理,在处理结束前15分钟进行三吡啶衍生物脉冲。洗涤癌细胞后,使 $\gamma$   $\delta$ T细胞进行作用而诱发细胞杀伤性。40分钟后,通过后述方法测定肿瘤细胞杀伤活性。

[0149] 也有使用容易受到 $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞杀伤性的肿瘤细胞的方法。例如,Daudi伯基特淋巴瘤细胞在不给予N-BP刺激时也会受到 $\gamma$   $\delta$ T细胞的细胞杀伤性。在Daudi细胞中强制表达PD-L1时,可以更简便地测定抗PD-L1抗体的效果。即,使 $\gamma$   $\delta$ T细胞作用于Daudi/PD-L1细胞时,通过PD-1/PD-L1相互作用而受到免疫抑制。但是,若向其中添加抗PD-L1抗体则PD-1/

PD-L1相互作用被切断,因此细胞杀伤性上升。通过使用该系统,能够在体外容易地评价免疫检查点抑制剂的肿瘤细胞杀伤活性。

[0150] 肿瘤细胞杀伤活性可以利用β射线放射活性测定法、γ射线放射活性测定法、乳酸脱氢酶(LDH)活性测定法和时间分辨荧光法、非RI系细胞杀伤测定法(WO2015/152111)等,使用培养癌细胞株通过公知的方法来实施。

[0151] • β射线放射活性测定法

[0152] 将靶细胞(肿瘤细胞)用<sup>3</sup>H-脯氨酸(Proline)标记,与效应细胞(γδT细胞或NK细胞)进行混合培养,测定由于效应细胞的细胞杀伤而由靶细胞放出的<sup>3</sup>H-脯氨酸量(β射线)。靶细胞与效应细胞的混合比(E/T比)、培养时间可根据所使用的细胞来适宜设定,例如以E/T比=0.5~2左右进行调整。

[0153] 计算以下式表示的细胞杀伤活性(%),评价细胞杀伤活性。

[0154] 细胞杀伤活性(%) = (E/T比) - 仅靶细胞的放出量 / 将靶细胞全部杀伤时的放出量 - 仅靶细胞的放出量

[0155] • γ射线放射活性测定法

[0156] 将靶细胞(肿瘤细胞)用<sup>51</sup>Cr标记,与效应细胞(γδT细胞或NK细胞)进行混合培养,测定由于效应细胞的细胞杀伤而由靶细胞放出的<sup>3</sup>H-脯氨酸量(β射线)。与β射线放射活性测定法同样地,靶细胞与效应细胞的混合比(E/T比)、培养时间可根据所使用的细胞来适宜设定,通过计算细胞杀伤活性(%)来评价细胞杀伤活性。

[0157] • 时间分辨荧光法

[0158] 将靶细胞(肿瘤细胞)用铕(Eu)标记,与效应细胞(γδT细胞或NK细胞)进行混合培养,测定由于效应细胞的细胞杀伤而由靶细胞放出的<sup>3</sup>Eu量(荧光)。与β射线放射活性测定法、γ射线放射活性测定法同样地,靶细胞与效应细胞的混合比(E/T比)、培养时间可根据所使用的细胞来适宜设定,通过计算细胞杀伤活性(%)来评价细胞杀伤活性。

[0159] • 乳酸脱氢酶(LDH)活性测定法

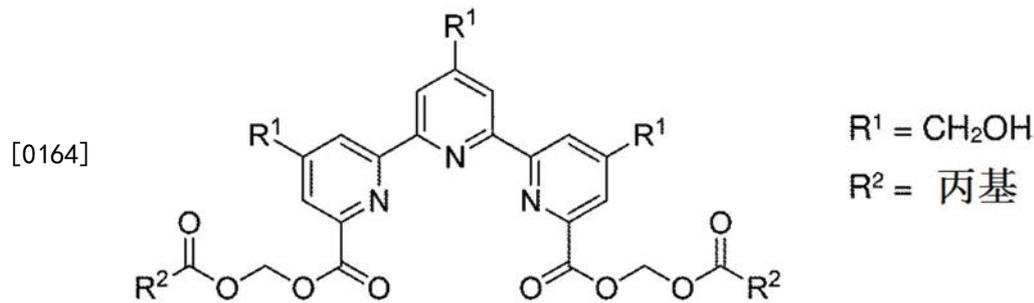
[0160] 乳酸脱氢酶(LDH)为存在于细胞质的酶,若细胞被杀伤则会被释放到培养基中。使在LDH所催化的乳酸脱氢反应中生成的NADH与ITN(四唑鎓盐)反应,通过所生成的甲臞色素(490nm的吸光度量)来定量该放出的LDH。因为不使用RI而安全性高。与其它方法同样地,靶细胞与效应细胞的混合比(E/T比)、培养时间可根据所使用的细胞来适宜设定,通过计算细胞杀伤活性(%)来评价细胞杀伤活性。

[0161] • 利用螯合前体的非RI测定法

[0162] 在发明人开发的利用非RI系统的细胞杀伤能力快速测定法中,用螯合剂前体对肿瘤细胞进行处理。具体而言,首先用以丁酰氧基甲基保护的三吡啶衍生物处理肿瘤细胞。由于其为脂溶性,因此被摄入细胞中,因酯酶而受到水解,在细胞内积累具有负电荷的螯合剂。在此,若使免疫效应细胞进行作用则肿瘤细胞被杀伤,膜结构被稍微破坏。于是螯合剂快速泄露到培养上清中。在此,回收少量培养上清,添加作为镧系金属的铈则形成螯合物,照射激发光则发出时间分辨荧光。若测定该时间分辨荧光,可以通过非RI方式对细胞杀伤性进行定量。

[0163] 时间分辨荧光的优点是,在照射激发光后,与通常的荧光性化合物仅发出约2μ秒荧光的情况相比可发出100μ秒左右的长时间荧光,因此与背景的差异变大,测定的可靠性

提高。本测定法中使用的三吡啶二羧酸的烷氧基甲基衍生物中的下述化合物可以在大部分肿瘤细胞株中得到高的最大标记量和20%以下的自然漏出量。



[0165] 肿瘤细胞杀伤活性的测定中使用的肿瘤细胞株没有特别限定。作为肿瘤细胞,可列举例如:作为人骨髓性肿瘤或白血病细胞株的K562、HL60、EB1、CCRF-CEM、HEL-92.1.7、HSB、Jurkat、HuT-78、KG-1A、HNT-34、MOLT-4、MV4-11、NB-4、REH、RPMI-1788、TF-1、THP-1、TK6、U937;作为人肺癌细胞株的A-427、A-549、Calu-1、Calu-6、CLS-54、DMS-79、GCT、HEL-299、H-Messo-1、H-Messo-1A、LCLC-97TM1、LX-1、LX-289、MRC-5、MST0-211H、NCI-H146、NCI-H209、NCI-H69、NCI-H82、NCI-H128、SCLC-21H、SCLC-22H、SK-LU-1、SK-MES-1、SV-80;作为人肝癌细胞株的Chang-Liver、Hep-G2、HuH-7、PLC-PRF-5、SK-HEP-1;作为人乳腺癌细胞株的BT-20、BT-474、BT-549、COLO-824、HBL-100、MA-CLS-2、MCF-7、MDA-MB-231、MX-1、SK-BR-3、T-47D、ZR-75-1;作为人卵巢癌细胞株的HEY;作为人胃癌细胞株的AGS、CLS-145、HGC-27、MKN1、MKN28、KATO-III;作为人胰腺癌细胞株的AsPC-1、Capan-1、Capan-2、DAN-G、FAMPAC、FAMPAC-A、PA-CLS52、Panc-1;作为人肾癌细胞株的293 (HEK-293)、769-P、786-0、A-498、A-704、ACHN、CaKi-2、RC-124、RC-131、RC-134、RC-138、RC-142、RCC-AB (KTCTL-21)、RCC-ER (KTCTL-13)、RCC-EK (KTCTL-135)、RCC-EW (KTCTL-2)、RCC-AL4、RCC-FG1 (KTCTL-26)、RCC-FG2 (KTCTL-26A)、RCC-GH、RCC-GS (KTCTL-185)、RCC-HB (KTCTL-48)、RCC-JW (KTCTL-195)、RCC-KL、RCC-KP (KTCTL-53)、RCC-LR (KTCTL-120)、RCC-MF (KTCTL-1M)、RCC-MH (KTCTL-129)、RCC-OF1 (KTCTL-54)、RCC-GW、RCC-PR、RCC-WK (KTCTL-87)、SK-NEP-1、WT-CLS1;作为人骨肉瘤细胞株的CADO-ES1、HOS (TE-85)、KHOS-240S、KHOS-312H、KHOS-NP、MG-63、MHH-ES1、MNNG-HOS、RD-ES、SaOS-2、SK-ES-1、SW-1353、TM-791、U-20S;作为人大肠癌细胞株的CW2、DLD-1、Colo320;作为人恶性黑色素瘤细胞株的C32TG、G361;作为人前列腺细胞株的PC-3、DU-145、LNCaP,但不限于这些。尤其是在NK细胞的情况下,优选作为其肿瘤细胞杀伤活性试验的标准细胞株使用的K562细胞,在 $\gamma$   $\delta$ T细胞的情况下,优选来自U937组织细胞的白血病细胞。

[0166] 为了提高免疫检查点抑制剂的奏效率,还进行了与其它免疫疗法的联用疗法的开发。例如,据报道基于纳武单抗(人型抗PD-1单克隆抗体)与伊匹单抗(人型抗CTLA-4单克隆抗体)联用的奏效率为6成。另外,发明人报道了通过将IL-18与抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CDLA-4抗体联用,从而确认到抗肿瘤效果的协同提高(WO2010/001617)。预测免疫检查点抑制剂在这样的联用疗法中的奏效率的情况下,可以在联用的抗体、细胞因子的存在下观察肿瘤细胞杀伤活性。

[0167] (g) 外周血单核细胞中的NK细胞的细胞数或比例

[0168] “外周血单核细胞中的NK细胞的细胞数或比例”可以通过利用对外周血单核细胞和NK细胞分别为特异性的表面标志物来进行测定。如上所述,NK细胞具有肿瘤细胞杀伤活

性。因此,通过与重症间质性肺炎的发病风险一起评价NK细胞的数量、比例,能够进行更精准的治疗。

[0169] NK细胞在其表面具有CD56抗原。因此,通过使用抗CD3抗体和抗CD56抗体,能够测定外周血单核细胞中的NK细胞的量。测定时,通过使用后述的流式细胞术或细胞图像分析法能够简便且迅速地求出“外周血单核细胞中的NK细胞的细胞数或比例”。

[0170] (h) 外周血单核细胞中的NK细胞的增殖刺激后的细胞数或比例

[0171] “外周血单核细胞中的NK细胞的增殖刺激后的细胞数或比例”表示NK细胞的增殖能力。因此,通过与重症间质性肺炎的发病风险一起评价具有肿瘤细胞杀伤活性的NK细胞的增殖能力,能够进行更精准的治疗。

[0172] 所使用的增殖刺激因子只要是能够对NK细胞的增殖进行刺激的物质就没有特别限定。例如,可列举IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、干扰素 $\gamma$ 和外周血条件培养基等。上述增殖刺激因子只要可发挥作用则也可以为其片段(碎片)。

[0173] 关于增殖刺激后的细胞数、比例,向包含经分离的外周血单核细胞的培养液中添加上述增殖刺激因子,经过一定时间后通过与前项(b)同样的方法进行测定。所添加的增殖刺激因子的量可根据所使用的增殖刺激因子的NK细胞增殖刺激能力来适宜决定。添加增殖刺激因子后至测定为止的时间也可根据所使用的增殖刺激因子适宜决定,通常为0.5小时以上、优选为12小时~14天左右。

[0174] 在IL-2的情况下,例如以达到10~1000IU/ml、优选20~200IU/ml的方式进行添加,在37℃、5%CO<sub>2</sub>气氛下进行温育,在3天~14天后、优选7天~11天后测定NK细胞的细胞数或比例。

[0175] 在干扰素 $\gamma$ 的情况下,例如以达到1~10000IU/ml、优选10~1000IU/ml的方式进行添加,在37℃、5%CO<sub>2</sub>气氛下进行温育,在1天~14天后、优选3天~10天后测定NK细胞的细胞数或比例。

[0176] 在IL-18的情况下,例如以达到1~1000IU/ml、优选20~300IU/ml的方式进行添加,在37℃、5%CO<sub>2</sub>气氛下进行温育,在1天~14天后、优选3天~10天后测定NK细胞的细胞数或比例。

[0177] (i) 增殖刺激后的NK细胞的肿瘤细胞杀伤活性

[0178] “增殖刺激后的NK细胞的肿瘤细胞杀伤活性”为是否对免疫检查点抑制剂产生应答、NK细胞是否实际发挥肿瘤细胞杀伤活性的指标。因此,通过与重症间质性肺炎的发病风险一起评价NK细胞的肿瘤细胞杀伤活性,由此能够进行更精准的治疗。

[0179] 所使用的抗原只要能够对NK细胞的增殖进行刺激就没有特别限定,可以使用与上述(h)中记载的增殖刺激因子相同的物质。另外,增殖刺激因子的添加量、添加增殖刺激因子后至测定为止的时间也如上述(h)所记载。

[0180] 肿瘤细胞杀伤活性可以利用 $\beta$ 射线放射活性测定法、 $\gamma$ 射线放射活性测定法、乳酸脱氢酶(LDH)活性测定法、和时间分辨荧光法、非RI系细胞杀伤测定法(WO2015/152111)等、使用培养癌细胞株通过公知的方法来实现。肿瘤细胞杀伤活性的测定方法将在下项中进行详细说明。

[0181] 3. 诊断用试剂和试剂盒

[0182] 本发明还提供上述免疫检查点抑制剂的效果预测用试剂及试剂盒。

[0183] 本发明的试剂盒以 (i) 抗CD3抗体及 (ii) 抗V $\delta$ 2抗体作为必需构成要素,可以包含用于判定(诊断)的指导书。

[0184] 本发明的试剂盒可以还包含 (iii) 焦磷酸单酯衍生物或含氮双磷酸衍生物、和/或 (iv) IL-18。

[0185] 在本发明的试剂盒中,抗体可以适宜地进行了标记或固定化。另外,只要能够用于目标抗原分子的检测则也可以为抗体片段(碎片)。作为抗体片段,可列举例如F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、scFv、rIgG、Fc。

[0186] 除了上述构成要素以外,本发明的试剂盒还包含上述流式细胞术或细胞图像光度术、肿瘤细胞杀伤活性测定所需要的各种试剂(例如抗CD4抗体、抗CD8抗体)、二抗、底物溶液、肿瘤细胞株(例如K562细胞株等)、培养基(例如Yessel培养基等)。另外,上述(i)~(iv)、其它构成要素可以分别单独地以判定(诊断)用试剂形式来提供。

[0187] 4. 伴随诊断和治疗策略

[0188] 本发明的预测由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险的方法、按照上述方法判定是否适合利用免疫检查点抑制剂进行治疗的方法(诊断方法)、试剂(诊断药)和试剂盒(诊断用试剂盒)可以用于在给药前预测免疫检查点抑制剂的效果、副作用的临床检查、所谓的伴随诊断。

[0189] 作为对象的免疫检查点抑制剂可列举例如:上述那样的作为抗PD-1抗体的纳武单抗(欧狄沃)、派姆单抗(MK-3475);作为抗PD-L1抗体的匹地利珠单抗(CT-011)、MPDL3280A/RG-7446、MEDI4736、MSB0010718C、MED10680/AMP-514;抗PD-L2抗体;作为抗CTLA-4抗体的伊匹单抗(MDX-010)、曲美木单抗(CP675、206);作为抗杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)抗体的利瑞鲁单抗(IPH2102/BMS-986015);作为抗CD137抗体的乌瑞鲁单抗(BMS-663513)、PF-05082566;作为抗LAG3抗体的BMS-986016;作为抗OX40抗体的MEDI6469等,但不限于这些。

[0190] 通过使用本发明的预测方法(诊断方法)、试剂(诊断药)和试剂盒(诊断用试剂盒)来预测由免疫检查点抑制剂引起的重症性间质性肺炎的发病风险,由此可以确定是否适合对受试者(患者)进行给药。然后,基于其结果提供给药免疫检查点抑制剂之类的、利用免疫检查点抑制剂的一系列治疗策略。这样的免疫检查点抑制剂的治疗方法也为本发明的对象。

[0191] 作为成为上述治疗方法的对象的疾病,是可成为免疫检查点抑制剂的对象(癌症、感染症等)。作为癌症,可列举例如骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性白血病、急性白血病、小儿实体癌、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾癌、尿道癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管新生、脊椎肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、鳞状上皮癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发肿瘤等。尤其可优选用于表达PD-L1的转移癌、肺癌。

[0192] 作为感染症,可列举例如HIV感染(AIDS)、肝炎、疱疹、疟疾、登革热、利什曼病、流感、赤痢、肺炎、结核、败血症、李斯特菌病等。尤其可优选用于产生严重免疫缺陷的HIV感

染。

[0193] 除了上述以外,还能够用于诊断在阿尔茨海默型痴呆(Kuti Baruchl, et al. Nature Medicine. 2016; 22 (2) :135-7)、脑淀粉样血管病、唐氏综合征、老年性黄斑变性、路易体痴呆、帕金森病、多系统萎缩、蛋白病、额颞叶变性、嗜银颗粒性痴呆、肌萎缩性侧索硬化症、糖尿病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)等中是否适合给药。

[0194] 5. 以重症间质性肺炎的发病风险低的受试者为对象的含有免疫检查点抑制剂的药物组合物

[0195] 根据本发明,提供免疫检查点抑制剂的新用途,其预测由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险、并以判断为该风险低的受试者为对象。本发明还提供一种药物组合物,其为含有这样的免疫检查点抑制剂的药物组合物,其特征在于,其用于抑制重症间质性肺炎的发病、治疗或预防肿瘤,对通过上述方法被判断为重症间质性肺炎的发病风险低的受试者使用。

[0196] 6. 其他

[0197] 本发明的方法以及试剂和试剂盒除了可以用于在使用免疫检查点抑制剂之前的阶段诊断是否适合给药以外,还可以用于治疗开始后的风险预测、以及在HIV感染症等病毒感染症、原虫感染症、细菌感染症等的免疫检查点抑制剂治疗中诊断是否适合给药。

[0198] 实施例

[0199] 通过实施例具体地说明本发明,但是本发明不受这些实施例限定。

[0200] 实施例1:健康人及肺癌患者的外周血中的 $\gamma\delta$ T细胞及NK细胞的比较

[0201] 在使用免疫检查点抑制剂的癌症免疫疗法中,重要的是包括作为效应细胞的T细胞的数量和PD-1表达在内的免疫状态。说到底,对于癌症患者中免疫系统疲劳、肿瘤细胞杀伤性T细胞几乎不存在或者极少的病例而言,即使给药免疫检查点抑制剂也无法期待肿瘤细胞杀伤性。

[0202] 假设“如果肿瘤细胞在对肿瘤特异性免疫效应细胞诱导免疫耐受时经由PD-1免疫检查点,则不论是 $\alpha\beta$ T细胞还是 $\gamma\delta$ T细胞,其作用机制都相同”,可认为对 $\alpha\beta$ T细胞的免疫耐受诱导和对 $\gamma\delta$ T细胞的免疫耐受诱导是同时发生的。即,如果能够判断 $\gamma\delta$ T细胞的免疫耐受状态,则也可以推测 $\alpha\beta$ T细胞的免疫耐受状态。因此,本实施例中,作为对上述假设的验证,研究了健康人和癌症患者中的、V $\gamma$ 2V $\delta$ 2的 $\gamma\delta$ T细胞的数量和抗原反应性(需要说明的是,健康成人中, $\gamma\delta$ T细胞的一半以上为V $\gamma$ 2V $\delta$ 2,若以V $\delta$ 2为指标,实质上可检测V $\gamma$ 2V $\delta$ 2)。

[0203] 1. 材料及方法

[0204] (1) V $\gamma$ 2V $\delta$ 2T细胞及NK细胞的数量或比例

[0205] 按照以下步骤,用双色流式细胞术分析外周血单核细胞(PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell)中的 $\gamma\delta$ T细胞的数量或比例。

[0206] 从肺癌患者采集外周血(10ml),按照常规方法制备PBMC级分,悬浮于50 $\mu$ l的PBS/2%FCS。将各3 $\mu$ l的抗体加入到孔中,在冰上放置30分钟后,用2%FCS/PBS洗涤3次,用流式细胞术(FACSCalibur<sup>TM</sup>、BD BIOSCIENCES)进行分析。

[0207] 利用使用抗CD3抗体和抗V $\delta$ 2抗体的双色流式细胞术,可以求出PBMC中的 $\gamma\delta$ T细胞(V $\delta$ 2阳性细胞)的数量及比例。

[0208] 利用使用抗CD3抗体和抗CD56抗体的双色流式细胞术,可以求出PBMC中的NK细胞

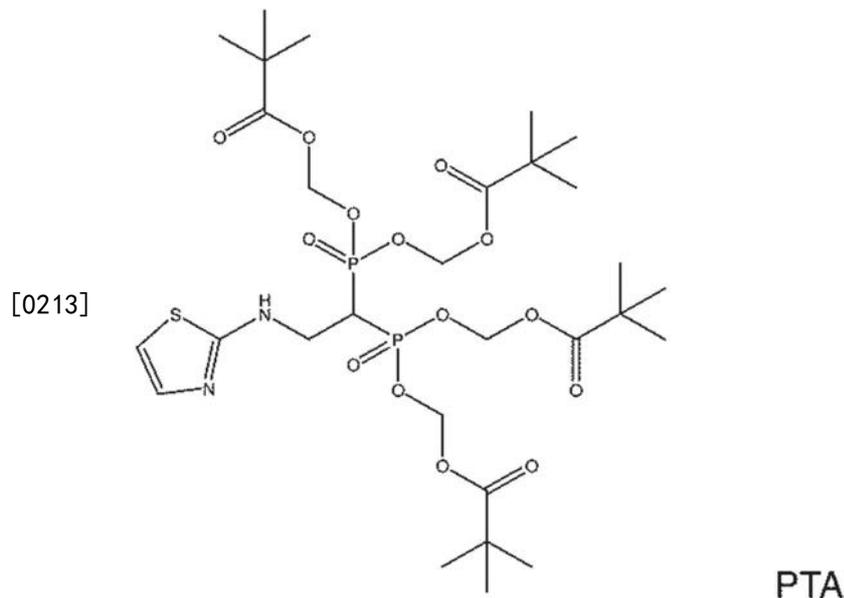
(CD56阳性细胞)的数量及比例。

[0209] CD3为T细胞的表面标志物,CD56为NK细胞的表面标志物。在这里,为了检测 $\gamma\delta$ T细胞而使用V $\delta$ 2。健康人的 $\gamma\delta$ T细胞的大部分为V $\delta$ 2阳性细胞,即使是V $\delta$ 1阳性细胞多的试样,在后述的抗原刺激后V $\delta$ 2阳性细胞也会增殖、V $\delta$ 1阳性细胞则达到检测灵敏度以下,因此可以将V $\delta$ 2阳性细胞作为 $\gamma\delta$ T细胞来评价。

[0210] (2) V $\gamma$  2V $\delta$ 2T细胞的抗原刺激(增殖诱导)

[0211] 将1mM的PTA储备溶液(DMSO中)3 $\mu$ l加入到PMBC(3ml)中,使终浓度为1 $\mu$ M。将V $\delta$ 2阳性细胞悬浮液转移到24孔板的2个孔(1.5ml/孔,2个孔)中。将IL-2、IL-18加入到2个孔中,分别以终浓度达到100U/ml、100ng/ml的方式进行添加,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下进行温育。从第1天起,对于PBMC,每天向培养基中添加IL-2或IL-2/IL-18。

[0212] \*PTA为具有下述结构的含氮型双磷酸(WO2016/125757、和Medicinal Chemistry,2007,85-99),通过抑制FPPS合成而活化 $\gamma\delta$ T细胞。



[0214] 关于利用Zol1(唑来膦酸)/IL-2/IL-18的刺激,将PTA(1 $\mu$ M)替换为Zol1(1 $\mu$ M)并同样地进行。

[0215] (3) 抗原刺激后的V $\gamma$  2V $\delta$ 2T细胞的数量或比例

[0216] 在第11天回收细胞,按照(1)用双色流式细胞术分析 $\gamma\delta$ T细胞的数量或比例。

[0217] (4) NK细胞的利用IL-2/IL-18进行的刺激

[0218] 从PMBC中,按照常规方法使用MACS(r)珠标记抗CD3抗体纯化NK细胞。具体而言,将PMBC(3ml)转移到15ml的锥形管中,在1700rpm、4 $^{\circ}$ C条件下离心5分钟。接着,吸除上清,使细胞颗粒分散,再悬浮于80 $\mu$ l的PBS/0.5%BSA/2mM EDTA中。将20 $\mu$ l的MACS(r)珠标记抗CD3抗体(Mylteny Biotec)加入到细胞悬浮液中,在4 $^{\circ}$ C下温育15分钟。15分钟后,加入2ml的PBS/0.5%BSA/2mM EDTA,使细胞再悬浮。接着,在300xg、4 $^{\circ}$ C的条件下离心10分钟,吸除上清。使细胞颗粒分散,再悬浮于1ml的PBS/0.5%BSA/2mM EDTA中。将细胞悬浮液上样到用PBS/0.5%BSA/2mM EDTA平衡化的LD柱(由磁性球体构成)。用1ml的PBS/0.5%BSA/2mM EDTA洗脱CD3阴性细胞2次。在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心5分钟,弃掉上清,用抽吸器吸除。接着,使细胞颗粒分散,将CD3阴性细胞再悬浮于1.5ml的YM-AB培养基中。

[0219] 将NK细胞悬浮液转移到24孔板(1.5ml/孔,1个孔),将IL-2及IL-18加入到孔中,使终浓度分别为100IU/ml及100ng/ml,在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下温育。从第0天起的10天间,每天向培养基中添加IL-2/IL-18。

[0220] (5) 增殖刺激后的NK细胞的数量或比例

[0221] 在第11天回收细胞,按照(1),用双色流式细胞术分析NK细胞的数量或比例。

[0222] 2. 结果

[0223] (1) 健康人的 $\gamma\delta$ T细胞的比例

[0224] 用流式细胞术分析12名健康人的 $\gamma\delta$ T细胞的比例,如以往所报道那样,平均为外周血单核细胞的3%至4%左右,也存在超过10%的供体。另一方面,低于2%的供体较少,为2例,没有低于1%的供体(图1)。

[0225] (2) 健康人的 $\gamma\delta$ T细胞的反应性

[0226] 然后,对健康人的 $\gamma\delta$ T细胞的反应性进行了研究。使PTA作用于V $\delta$ 2 $\gamma\delta$ T细胞的比例为5.57%的健康人的外周血单核细胞,与IL-2一起培养11天时, $\gamma\delta$ T细胞的比例升至98.39%。另外,此时,细胞数达到1000倍以上(图2(A))。

[0227] 同样使PTA作用于V $\delta$ 2 $\gamma\delta$ T细胞的比例为10.35%的健康人的外周血单核细胞,与IL-2一起培养11天, $\gamma\delta$ T细胞的比例升至98.99%,细胞数达到1000倍以上。由此,通过PTA/IL-2刺激,健康人的 $\gamma\delta$ T细胞在培养第11天显示出接近99%的纯度和1000倍以上的增殖性(图2(B))。

[0228] (3) 肺癌患者的 $\gamma\delta$ T细胞的比例

[0229] 将肺癌患者的 $\gamma\delta$ 型T细胞的比例示于表1。可知可明确区分为 $\gamma\delta$ T细胞少的病例(LC02,LC05,LC09,LC10)和 $\gamma\delta$ T细胞多的病例(LC03,LC04,LC07,LC08)。

[0230] [表1]

[0231] 肺癌患者的 $\gamma\delta$ 型T细胞

[0232]

患者	V $\delta$ 2/CD3 (%)	V $\delta$ 2/淋巴细胞 (%)	V $\delta$ 2/淋巴细胞/1x10 <sup>7</sup> PBMC
LC01	1.89	1.43	1.43x10 <sup>5</sup>
LC02	1.46	0.79	0.79x10 <sup>5</sup>
LC03	14.63	10.40	10.40x10 <sup>5</sup>
LC04	3.76	2.91	2.91x10 <sup>5</sup>
LC05	1.00	0.73	0.73x10 <sup>5</sup>
LC06	1.55	1.01	1.01x10 <sup>5</sup>
LC07	10.43	4.14	4.14x10 <sup>5</sup>
LC08	2.98	1.95	1.95x10 <sup>5</sup>
LC09	0.99	0.78	0.78x10 <sup>5</sup>
LC10	1.23	0.89	0.89x10 <sup>5</sup>
LC11	0.06	0.03	0.03x10 <sup>5</sup>
LC12	0.82	0.53	0.53x10 <sup>5</sup>

[0233] 对肺癌患者的外周血单核细胞中的 $\gamma\delta$ T细胞的比例进行了研究,12个病例中,9个病例的 $\gamma\delta$ T细胞的比例为2%以下,显著减少。另外,从发生减少的病例的详细情况来看,6个病例为低于1%。这显示出因肺癌而使 $\gamma\delta$ T细胞被抑制、形成免疫耐受的可能性。另外,与

该  $\gamma$   $\delta$ T 细胞同样地,肺癌特异性  $\alpha$  $\beta$ T 细胞也遭受免疫抑制时,免疫效应细胞本身的数量变得极少,推测即使在免疫检查点切断免疫抑制信号,或许也无法恢复充分的免疫效应作用(图 3)。

[0234] (4) 肺癌患者的  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的反应性

[0235] 然后,选择肺癌患者中的、 $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例与健康人为同等程度的病例,研究  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的增殖诱导能力。使 PTA 作用于  $V\delta 2$   $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例为 4.14% 的肺癌患者的外周血单核细胞,与 IL-2 一起培养 11 天, $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例升至 98.59%。另外,此时细胞数达到 1000 倍以上。即,明确了数值接近健康人的肺癌患者具有与健康人同等程度的  $\gamma$   $\delta$ T 细胞增殖诱导能力(图 4(A))。

[0236] 同样研究了  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例为 2% 以上的肺癌患者的外周血  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的增殖诱导能力。其结果是,使 PTA 作用于  $V\delta 2$   $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例为 2.91% 的肺癌患者的外周血单核细胞,与 IL-2 一起培养 11 天, $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例升至 99.74%,细胞数达到 1000 倍以上。明确了该病例也具有与健康人同等程度的  $\gamma$   $\delta$ T 细胞增殖诱导能力(图 4(B))。

[0237] 然后,研究了  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例低于 1% 的肺癌患者的外周血  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的增殖诱导能力。使 PTA 作用于  $V\delta 2$   $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例为 0.89% 的肺癌患者的外周血单核细胞,与 IL-2 一起培养 11 天, $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例仅升至 84.21%。即,明确了  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例明显低于健康人的肺癌患者与健康人相比, $\gamma$   $\delta$ T 细胞增殖诱导能力低(图 4(C))。

[0238] 同样研究了  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例低于 1% 的其它肺癌患者的外周血  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的增殖诱导能力。其结果是,使 PTA 作用于  $V\delta 2$   $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例为 0.78% 的肺癌患者的外周血单核细胞,与 IL-2 一起培养 11 天, $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例仅升至 90.57% (图 4(D))。

[0239] 由此,外周血中的  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例低(低于 1%)的患者发生  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的免疫耐受的可能性高。如果这是由肿瘤细胞所建立的某些免疫效应 T 细胞免疫耐受诱导系统导致的,则也同时发生肿瘤抗原肽特异性  $\alpha$  $\beta$ T 细胞的免疫耐受的可能性高。即,存在如下可能性:若测定外周血中的  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例,则能够判断肿瘤抗原肽特异性  $\alpha$  $\beta$ T 细胞的免疫耐受状态。因此想到了研究外周血单核细胞中的  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例来作为判断免疫检查点抑制剂的敏感性的基准之一, $\gamma$   $\delta$ T 细胞的比例有可能成为免疫检查点抑制剂的替代标志物。

[0240] (5)  $\gamma$   $\delta$ T 细胞与 NK 细胞的关系

[0241] 对  $\gamma$   $\delta$ T 细胞与 NK 细胞的关系进行了研究。首先,对健康人的外周血单核细胞进行纯化,按照以往报道(Sigie T. et al., Cancer Immunol Immunother. 2013 Apr; 62(4): 677-87. Epub 2012 Nov 15.) 用作为含氮双膦酸(N-BP)之一的 Zol (Zoledronic acid: 唑来膦酸)/IL-2 或 Zol/IL-2/IL-18 进行刺激,研究  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的增殖诱导。

[0242] 其结果是,与作为  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的刺激因子的 Zol 和作为增殖因子的 IL-2 的混合刺激相比,在添加了具有细胞保护作用的 IL-18 的刺激中可观察到明确的增殖优势性(图 5)。研究这种情况是如何发生的,结果明确了,如果从该实验体系中去除 NK 细胞则  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的增殖诱导受到抑制。即,明确了在进行人  $\gamma$   $\delta$ T 细胞的增殖诱导时, NK 细胞发挥了重要作用(图中未示出)。

[0243] 将用 Zol/IL-2/IL-18 增殖诱导后的结果示于表 2。可知:与增殖诱导前同样地,可明确区分为  $\gamma$   $\delta$ T 细胞少的病例(LC02, LC05, LC09, LC10) 和  $\gamma$   $\delta$ T 细胞多的病例(LC03, LC04, LC07, LC08)。

[0244] [表2]

[0245] 肺癌患者的增殖诱导后  $\gamma\delta$  型T细胞 (Zol/IL-2/IL-18刺激)

患者	V $\delta$ 2/CD3 (%)	V $\delta$ 2/淋巴细胞 (%)	V $\delta$ 2/淋巴细胞/ $1 \times 10^7$ PBMC
LC01	97.30	93.99	$3.00 \times 10^8$
LC02	99.26	93.88	$1.30 \times 10^8$
LC03	99.39	97.43	$4.00 \times 10^8$
LC04	99.15	97.14	$14.52 \times 10^8$
LC05	97.82	93.71	$1.05 \times 10^8$
LC06	90.09	59.18	$1.90 \times 10^8$
LC07	99.02	95.53	$4.88 \times 10^8$
LC08	98.45	93.18	$6.50 \times 10^8$
LC09	90.57	88.14	$1.92 \times 10^8$
LC10	95.39	60.00	$1.84 \times 10^8$

[0247] (6) NK细胞与IL-18的关系

[0248] 然后,对NK细胞与IL-18的关系进行了研究。NK细胞通过IL-2刺激而受到增殖诱导,对向其中添加IL-18时如何变化进行了研究。首先,从人外周血单核细胞中去除CD3阳性细胞,用IL-2或IL-2/IL-18对CD3-细胞级分进行刺激。

[0249] 其结果是,在IL-2/IL-18刺激组中观察到明确的NK细胞增殖诱导优势性(图6)。即,明确了IL-2/IL-18刺激使NK细胞受到强烈的增殖诱导。将IL-2/IL-18刺激前的结果示于表3,将刺激后的结果示于表4。

[0250] [表3]

[0251] 健康人的增殖诱导前的NK细胞

健康成人	NK/淋巴细胞	NK/淋巴细胞/ $1 \times 10^7$ PBMC
HD03	10.46	$10.46 \times 10^5$
HD04	18.18	$18.18 \times 10^5$
HD05	18.12	$18.12 \times 10^5$
HD06	13.18	$13.18 \times 10^5$
HD07	28.42	$28.42 \times 10^5$
HD08	14.06	$14.06 \times 10^5$
HD09	4.42	$4.42 \times 10^5$
HD10	23.58	$23.58 \times 10^5$
HD11	18.61	$18.61 \times 10^5$

[0253] [表4]

[0254] 健康人的增殖诱导前的NK细胞 (IL-2/IL-18刺激)

健康成人	NK/淋巴细胞	NK/淋巴细胞/ $1 \times 10^7$ PBMC
HD06	96.57	$1.56 \times 10^8$
HD07	99.07	$5.77 \times 10^8$
HD08	98.43	$5.44 \times 10^8$

HD09	96.22	2.00x10e8
HD10	95.37	0.83x10e8
HD11	85.02	0.63x10e8

[0256] 接着,对该由IL-2/IL-18带来的NK细胞增殖诱导能力如何与 $\gamma$   $\delta$ T细胞的增殖诱导相关联这一点进行了研究。首先,按照以往报道(参照Li et al., PLoS One. 2013Dec 20; 8 (12), Fig. 2),用绿色色素标记 $\gamma$   $\delta$ T细胞,将通过IL-2/IL-18刺激而进行了增殖诱导的NK细胞用红色色素标记,进行混合培养。其结果是,明确了 $\gamma$   $\delta$ T细胞和NK细胞相互作用而形成了细胞块(图7)。

### [0257] 3. 考察

[0258] 根据上述结果推测,唑来膦酸、PTA之类的N-BP所引起的 $\gamma$   $\delta$ T细胞增殖诱导机制是基于 $\gamma$   $\delta$ T细胞与NK细胞的相互作用(图8)。即,N-BP被摄入作为CD14阳性的巨噬细胞时,嗜乳脂蛋白3A1 (BTN3A1)的胞外区域发生变化,其被 $\gamma$   $\delta$ T细胞以依赖于 $\gamma$   $\delta$ T细胞受体方式识别。于是,从 $\gamma$   $\delta$ T细胞受体向 $\gamma$   $\delta$ T细胞内诱导信号,转录因子被募集到IL-2的启动子区域,由此观察到若干量的IL-2的产生。另一方面,承受N-BP应激的巨噬细胞中,胱天蛋白酶I被炎性小体依赖性地活化,水解IL-18前体,产生成熟型IL-18并释放到细胞外。在此,NK细胞因IL-2/IL-18而受到增殖诱导。另一方面,IL-18也作用于 $\gamma$   $\delta$ T细胞时,进行LFA-1、ICAM-1的表达诱导。介由这些粘附分子,NK细胞与 $\gamma$   $\delta$ T细胞发生强相互作用,引起 $\gamma$   $\delta$ T细胞的爆炸式增殖诱导。根据以上可预测,如果首先研究 $\gamma$   $\delta$ T细胞的数量(比例)与增殖诱导性、继而研究NK细胞的数量(比例)与增殖诱导性,则能够预测免疫检查点抑制剂的敏感性。

[0259] 如图9所示,癌细胞表达PD-L1分子时,经活化的 $\gamma$   $\delta$ T细胞表达PD-1分子,因此通过PD-1与PD-L1的相互作用而对 $\gamma$   $\delta$ T细胞诱导负的辅助刺激信号,抑制肿瘤细胞杀伤性。在此,若使抗PD-L1抗体进行作用则PD-1与PD-L1的相互作用被切断,负的辅助刺激信号被解除,因此 $\gamma$   $\delta$ T细胞能够高效地杀伤癌细胞。但是,在 $\gamma$   $\delta$ T细胞发生耗竭现象(exhaustion)时, $\gamma$   $\delta$ T细胞的功能本身被不可逆地抑制,因此即使利用PD-1免疫检查点抑制剂切断PD-1与PD-L1的相互作用, $\gamma$   $\delta$ T细胞的肿瘤细胞杀伤性也不会恢复。本实施例的结果表明,通过评价外周血中的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的数量(比例)和功能,从而能够判断免疫耐受状态、预测免疫检查点抑制剂的效果。

### [0260] 实施例2:纳武单抗(抗PD-1抗体)的奏效性

[0261] 由实施例1的结果可确认,在预测PD-1免疫检查点抑制剂的抗肿瘤效果时,免疫效应T细胞的功能和增殖性、以及NK细胞的增殖性可能至关重要。即,作为免疫效应T细胞,存在 $\alpha$  $\beta$ T细胞和 $\gamma$   $\delta$ T细胞,但是若这些免疫耐受诱导系统相同,则如果明确了 $\gamma$   $\delta$ T细胞的状态就能够预测 $\alpha$  $\beta$ T细胞的免疫耐受状态。

[0262] 因此,本实施例中,对于纳武单抗(抗PD-1抗体制剂)治疗后的患者,研究了外周血单核细胞中的 $\gamma$   $\delta$ T细胞的比例、 $\gamma$   $\delta$ T细胞的抗原刺激所带来的增殖诱导性、增殖诱导后的PD-1的表达量与奏效性及不良事件的相关关系。

### [0263] 1. 试验设计

[0264] [设施数]多设施共同试验(长崎大学医院、长崎原爆医院)

[0265] [对象]肺癌患者

[0266] [选择基准]

- [0267] 通过计算机断层摄影从组织学上确认为肺癌的患者 (any T, any N, and M1, stage IV)、
- [0268] 采用体力活动状态 (PS) 为0、年龄20~75岁、主要组织功能可维持、符合该机构的试验基准、接受试验性质的说明后自愿提交参加本试验的书面同意书者。
- [0269] [排除基准]
- [0270] 符合下述中任一者的患者被排除在对象之外。
- [0271] 1) 对本剂的成分有过敏史的患者
- [0272] 2) 孕妇及可能怀孕的患者、或哺乳中的患者
- [0273] 3) 其它的被研究负责人判断为不合作为研究对象的患者
- [0274] [主要终点]
- [0275] 第一主要终点为给药了纳武单抗的肺癌患者的、奏效率 (ORR) 与外周血淋巴细胞门中及CD3阳性细胞中的V $\delta$ 2T细胞的比例的相关关系。
- [0276] 第二主要终点为肺癌患者中的奏效率 (ORR) 与抗原刺激后的表达PD-1的V $\delta$ 2T细胞的比例的相关关系。
- [0277] [次要终点]
- [0278] 第一次要终点为给药了纳武单抗的肺癌患者的、奏效率 (ORR) 与外周血单核细胞中的NK细胞的比例的相关关系。
- [0279] 第二主要终点为肺癌患者中的奏效率 (ORR) 与IL-2/IL-18刺激后的NK细胞的增殖的比例的相关关系。
- [0280] [样本收集]
- [0281] 由得到同意的预定给药抗PD-1抗体纳武单抗的病例, 在给药前及给药3个月后, 进行10ml外周血的肝素采血。此时, 随着住院时的常规采血而进行采血, 不进行用于该采血的新的穿刺。
- [0282] [研究评价项目]
- [0283] (A) 肿瘤体积的测定及奏效率 (RECIST)
- [0284] 肿瘤体积使用MRI来进行测定。测定按照指南来实施, 奏效率 (ORR: Objective Response Rate) 使用超声波检查和临床评价按照RECIST指南逐一地进行评价。
- [0285] (B) 抗PD-1抗体纳武单抗给药前及给药后的、外周血单核细胞中的V $\gamma$ 2V $\delta$ 2T细胞及CD56阳性NK细胞的数量和比例的研究
- [0286] 通过FICOLL浓度梯度离心法纯化外周血单核细胞 (PBMC) (参照实施例1), 悬浮于7ml的YM-AB培养基。在悬浮于YM-AB培养基的PBMC中, 取1ml进行流式细胞术分析。具体而言, 将各0.1ml细胞悬浮液播种到96孔圆底平板的9个孔中, 在1700rpm、4℃下离心2分钟。去除上清, 对细胞颗粒进行涡旋搅拌。向其中添加46 $\mu$ l的2%FCS/PBS和以下各物质。
- [0287] (i) 2%FCS/PBS (4 $\mu$ l)
- [0288] (ii) PE标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l) +2%FCS/PBS (2 $\mu$ l)
- [0289] (iii) 2%FCS/PBS (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)
- [0290] (iv) PE标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD4抗体 (2 $\mu$ l)
- [0291] (v) PE标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD8抗体 (2 $\mu$ l)
- [0292] (vi) PE标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 1抗体 (2 $\mu$ l)

[0293] (vii) PE标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)

[0294] (viii) PE标记抗CD25抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD4抗体 (2 $\mu$ l)

[0295] (ix) PE标记抗CD56抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l)

[0296] 添加抗体后,将平板在冰上温育15分钟,添加100 $\mu$ l的2%FCS/PBS。然后将平板在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心2分钟,去除上清。将该操作进行共计3次,最后添加200 $\mu$ l的2%FCS/PBS,从70 $\mu$ m的滤膜通过,用流式细胞术进行分析。基于该分析结果进行V $\gamma$  2V $\delta$ 2T细胞的比例和数量、以及细胞表面标志物的研究。

[0297] (C) PTA刺激所带来的抗PD-1抗体纳武单抗给药前及给药后的外周血V $\delta$ 2T细胞的增殖诱导性的研究

[0298] 对于悬浮于YM-AB培养基的PBMC中的3ml,进行 $\gamma$   $\delta$ T细胞的增殖试验。向3ml的PBMC悬浮液中加入1mM的PTA,播种于24孔板的2个孔(1.5ml/孔,2个孔)中,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下进行温育(第0天)。

[0299] 在一个孔中添加IL-2 (100U/ml),在另一个孔中添加IL-2 (100U/ml) +IL-18 (100ng/ml)的最终浓度(第1天)。进一步添加IL-2或IL-2+IL-18(第2天-第9天)。在第10天测定细胞数,研究V $\gamma$  2V $\delta$ 2T细胞的增殖诱导性。

[0300] (D) 抗PD-1抗体纳武单抗给药前及给药后的外周血IL-2/IL-18诱导性NK细胞的增殖诱导性的研究

[0301] 对于悬浮于YM-AB培养基的PBMC中的剩余的3ml,进行NK细胞增殖试验。将加入了细胞悬浮液的15ml的锥形管在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心5分钟。接着,吸除上清,使细胞颗粒分散,再悬浮于80 $\mu$ l的PBS/0.5%BSA/2mM EDTA。向其中加入20 $\mu$ l的MACS(注册商标)珠(Myteny Biotec)标记抗CD3抗体20 $\mu$ l,在4 $^{\circ}$ C下温育15分钟。向其中加入2ml的PBS/0.5%BSA/2mM EDTA,轻柔地悬浮细胞。接着,将该细胞悬浮液在300xg、4 $^{\circ}$ C的条件下离心10分钟而去掉上清。使细胞颗粒分散,添加1ml的PBS/0.5%BSA/2mM EDTA,使细胞充分地悬浮。将细胞悬浮液上样到用PBS/0.5%BSA/2mM EDTA平衡化的LD柱(由磁性球体构成)。用1ml的PBS/0.5%BSA/2mM EDTA洗脱CD3阴性细胞2次。在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心5分钟,弃掉上清,用抽吸器吸除。接着,使细胞颗粒分散,将CD3-细胞悬浮于1.5ml的YM-AB培养基。将其播种于24孔板,添加IL-2及IL-18,使终浓度分别为100U/ml及100ng/ml,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下进行温育(第0天)。每天向培养基中加入IL-2及IL-18(第2天-第9天)。在第10天测定细胞数,研究NK细胞的增殖诱导性。

[0302] (E) 增殖诱导后的V $\delta$ 2T细胞的包括PD-1在内的表面标志物分析(方法:参照上述(F))

[0303] 在第10天回收利用PTA进行了增殖诱导的V $\gamma$  2V $\delta$ 2T细胞,利用流式细胞术对细胞表面标志物进行研究。具体而言,将各0.1ml细胞悬浮液播种到96孔圆底平板的7个孔中,在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心2分钟。去除上清,对细胞颗粒进行涡旋搅拌。向其中添加46 $\mu$ l的2%FCS/PBS和以下各物质。

[0304] (i) 2%FCS/PBS (4 $\mu$ l)

[0305] (ii) PE标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l) +2%FCS/PBS (2 $\mu$ l)

[0306] (iii) 2%FCS/PBS (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)

[0307] (iv) PE标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)

- [0308] (v) PE标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD4抗体 (2 $\mu$ l)
- [0309] (vi) PE标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD8抗体 (2 $\mu$ l)
- [0310] (vii) PE标记抗CD56抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)
- [0311] (viii) 2%PE标记抗NKG2D抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)
- [0312] (ix) PE标记抗DNAM-1抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)
- [0313] (x) PE标记抗FasL (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)
- [0314] (xi) PE标记抗TRAIL抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)
- [0315] (xii) PE标记抗CD16抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)
- [0316] (xiii) 无标记抗PD-1抗体 (2 $\mu$ l) +RPE标记抗小鼠IgG抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗V $\delta$ 2抗体 (2 $\mu$ l)
- [0317] 添加抗体后,将平板在冰上温育15分钟,添加100 $\mu$ l的2%FCS/PBS。然后将平板在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心2分钟,去除上清。将该操作进行共计3次,最后添加200 $\mu$ l的2%FCS/PBS,从70 $\mu$ m的滤膜通过,用流式细胞术进行分析。基于该分析结果进行V $\gamma$  2V $\delta$ 2T细胞的比例和个数、以及细胞表面标志物的研究。
- [0318] (F) 增殖诱导后的NK细胞的表面标志物分析
- [0319] 在第10天回收细胞,利用流式细胞术对细胞表面标志物进行研究。具体而言,将各0.1ml细胞悬浮液播种到96孔圆底平板的7个孔中,在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心2分钟。去除上清,对细胞颗粒进行涡旋搅拌。向其中加入46 $\mu$ l的2%FCS/PBS和以下各物质。
- [0320] (i) 2%FCS/PBS (4 $\mu$ l)
- [0321] (ii) PE标记抗CD56抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD3抗体 (2 $\mu$ l)
- [0322] (iii) PE标记抗NKG2D抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD56抗体 (2 $\mu$ l)
- [0323] (iv) PE标记抗DNAM-1抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD56抗体 (2 $\mu$ l)
- [0324] (v) PE标记抗FasL (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD56抗体 (2 $\mu$ l)
- [0325] (vi) PE标记抗TRAIL抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD56抗体 (2 $\mu$ l)
- [0326] (vii) PE标记抗CD16抗体 (2 $\mu$ l) +FITC标记抗CD56抗体 (2 $\mu$ l)
- [0327] 添加抗体后,将平板在冰上温育15分钟,添加100 $\mu$ l的2%FCS/PBS。然后将平板在1700rpm、4 $^{\circ}$ C下离心2分钟,去除上清。将该操作进行共计3次,最后添加200 $\mu$ l的2%FCS/PBS,从70 $\mu$ m的滤膜通过,用流式细胞术对V $\gamma$  2V $\delta$ 2T细胞的细胞表面标志物进行分析。基于该分析结果进行NK细胞的比例和个数、以及细胞表面标志物的研究。
- [0328] (G) PD-1免疫检查点抑制剂对增殖诱导后的V $\delta$ 2T细胞的有用性的研究
- [0329] 进行增殖诱导后的V $\gamma$  2V $\delta$ 2T细胞的细胞杀伤性测试。作为靶细胞,使用强制表达人PD-L1的人Daudi伯基特淋巴瘤来源的细胞株Daudi/hPD-L1,作为PD-1免疫检查点抑制剂,使用小鼠抗人PD-L1抗体27A2。
- [0330] 首先,将Daudi/hPD-L1悬浮于30ml的RPMI1640培养基,在75cm<sup>2</sup>烧瓶中在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下进行培养。测定细胞数,将1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞转移到4个15ml锥形管中。将细胞悬浮液在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心5分钟,吸除上清,使细胞颗粒分散。在管1及2中,使细胞悬浮于1ml的RPMI1640培养基,制备1 $\times$ 10<sup>6</sup>个/ml的细胞悬浮液。向管3及4中添加100nM的PTA溶液1ml,充分悬浮。在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>气氛下温育1小时45分钟。向管4中加入2 $\mu$ l的1mg/ml的小鼠抗人PD-L1单克隆抗体27A2,使最终浓度为0.5 $\mu$ g/ml。再将这些管在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>气氛下温

育15分钟。然后,向管1中加入2.5 $\mu$ l的DMSO,向管2~4中加入三吡啶衍生物Ch46(双(丁酰氧基甲基)4'-(羟甲基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6'-二羧酸酯:参照W02015/152111实施例8)2.5 $\mu$ l,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>气氛下温育15分钟。接着,将这些管在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心5分钟,去除上清。对细胞颗粒进行轻敲,添加2ml的RPMI1640培养基而充分悬浮细胞后,将该操作重复3次,洗涤细胞。用5ml的RPMI1640培养基悬浮细胞,将该细胞悬浮液2ml转移到新的15ml锥形管中,添加6ml的RPMI1640培养基,将细胞的最终浓度设为5 $\times$ 10<sup>4</sup>个/ml=5 $\times$ 10<sup>3</sup>个/100 $\mu$ l。将RPMI1640培养基中的1 $\times$ 10<sup>7</sup>的V $\gamma$ 2V $\delta$ 2T细胞转移到15ml的锥形管中。在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心5分钟,吸除上清,添加到5ml的RPMI1640培养基中并充分悬浮细胞后,按照以下方式进行系列稀释,由此制备细胞悬浮液。

[0331] 5ml (V $\gamma$ 2V $\delta$ 2T细胞):2 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml:40:1 (E/T比)

[0332] 2ml (2 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml)+2ml (RPMI):1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml:20:1 (E/T比)

[0333] 2ml (1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml)+2ml (RPMI):5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml:10:1 (E/T比)

[0334] 2ml (5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml)+2ml (RPMI):2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml:5:1 (E/T比)

[0335] 2ml (2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml)+2ml (RPMI):1.25 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml:2.5:1 (E/T比)

[0336] 2ml (1.25 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml)+2ml (RPMI):6.25 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml:1.25:1 (E/T比)

[0337] 2ml (6.25 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml)+2ml (RPMI):3.125 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml:0.625:1 (E/T比)

[0338] 2ml (RPMI):0/ml:0:1 (E/T比)

[0339] 接着,在圆底96孔板中,向3个孔中分别添加100 $\mu$ l的V $\gamma$ 2V $\delta$ 2T细胞悬浮液(试验用)、100 $\mu$ l的RPMI1640培养基(自然漏出测定用)、或90 $\mu$ l的RPMI1640培养基(最大漏出测定用)。向其中添加100 $\mu$ l的Daudi/hPD-L1细胞,在500rpm、室温下离心2分钟,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>气氛下温育15分钟后,向最大漏出测定用孔中添加10 $\mu$ l的0.125%毛地黄皂苷(19%DMSO中(MiliQ溶液)),充分吹打。将平板进一步在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>气氛下温育20分钟以上,在1700rpm、4 $^{\circ}$ C的条件下离心2分钟。然后,将25 $\mu$ l上清转移到新的圆底96孔板,与250 $\mu$ l的Eu溶液充分混合。将其中的200 $\mu$ l转移到新的荧光测定用平板中,测定时间分辨荧光。基于这些结果研究增殖培养后的V $\gamma$ 2V $\delta$ 2T细胞所显示的对表达PD-L1的肿瘤细胞株的抗肿瘤效果中的PD-1免疫检查点抑制剂的影响。

[0340] (H) 增殖诱导后的NK细胞和PD-1免疫检查点抑制剂的有用性的研究

[0341] 进行增殖诱导后的NK细胞的细胞杀伤性测试。作为靶细胞,使用人骨髓瘤来源的细胞株K562细胞株,使用NK细胞代替V $\gamma$ 2V $\delta$ 2T细胞,除此以外通过与上述(G)相同的步骤测定时间分辨荧光,基于其结果研究增殖培养后的NK细胞所显示的对K562细胞株的抗肿瘤效果。

[0342] [统计分析]

[0343] 对于纳武单抗给药前及给药后,关于上述评价项目中记载的生物标志物求出汇总统计量(例数、平均、标准偏差、最小值、四分位距、中央值、最大值等)。根据纳武单抗是否奏效而分为2组,求出各生物标志物的汇总统计量。由这些结果来研究外周血单核细胞中的 $\gamma$  $\delta$ T细胞的比例、 $\gamma$  $\delta$ T细胞的抗原刺激所带来的增殖诱导性、增殖诱导后的PD-1的表达量与奏效性的相关关系。进一步,对 $\gamma$ NK细胞的比例及增殖诱导能力与奏效性的相关关系进行研究。接着,为了推定针对纳武单抗奏效的临界值,制作基于各生物标志物的ROC曲线。另外,在考虑到对于纳武单抗奏效而言有多因子的参与的情况下,通过基于各生物标志物的

Logistic模型求出多因子ROC曲线,推定多因子下的临界值。

[0344] [结果]

[0345] 将结果示于下表。

[0346] [表5]

[0347]

治疗前染色 第0天

患者	第0天 (PBMC)										第0天 (CD3 <sup>+</sup> -细胞)						
	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /全部	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> D3	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> /全部	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> D3	CD3 <sup>+</sup> Vd1 <sup>+</sup> /全部	CD3 <sup>+</sup> Vd1 <sup>+</sup> D3	CD3 <sup>+</sup> Vd2 <sup>+</sup> /全部	CD3 <sup>+</sup> Vd2 <sup>+</sup> D3	CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /全部	CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> D3	CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> /全部	CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> D3	CD56 <sup>+</sup> +CD3 <sup>+</sup> /全部	CD56 <sup>+</sup> +CD3 <sup>+</sup> D3	CD56 <sup>+</sup> +CD1 <sup>+</sup> 6- /全部	CD56 <sup>+</sup> +CD1 <sup>+</sup> 6- D3	CD56 <sup>+</sup> +CD1 <sup>+</sup> 6- /全部
TR01	43.9	36.5	20.0	54.60	25.84	0.31	79.9	0.39	6.08	10.4	33.7	23.58	9.39	46.9	44.5	2.24	95.21
TR02	37.2	24.2	19.5	60.59	29.68	0.11	71.8	0.15	3.74	6.54	37.3	14.92	6.80	37.3	32.7	5.19	86.30
TR03	13.6	8.4	8.16	61.87	36.82	0.23	21.2	1.07	0.56	4.19	9.5	30.56	7.56	9.48	8.94	0.27	97.07
TR04	48.2	9.4	8.59	83.65	14.27	0.66	58.9	1.11	1.20	27.1	23.5	53.56	5.30	16.1	9.86	2.80	77.88
TR05	29.8	28.6	10.1	51.03	20.00	1.14	58.9	1.90	0.74	4.43	26.4	14.37	12.6	31.8	30.2	1.58	95.03
TR06	16.6	10.1	2.33	62.17	9.24	2.33	27.3	7.86	0.08	1.45	16.2	8.22	40.7	61.5	60.2	0.42	99.31
TR07	30.7	20.9	9.10	59.50	18.76	1.17	52.0	2.20	0.94	8.10	24.1	25.16	15.6	32.7	29.0	4.28	87.14
TR08	36.6	12.7	10.2	74.24	21.66	0.017	44.9	0.04	2.30	4.35	26.8	13.96	26.2	43.5	34.3	1.07	96.97
TR09	40.6	12.7	11.7	76.17	21.75	0.40	52.8	0.75	0.96	7.42	31.2	19.21	27.6	38.1	38.4	1.38	96.53
TR10	27.4	34.8	31.4	44.05	52.42	1.06	61.2	1.70	0.97	4.99	20.6	19.50	12.1	33.6	32.9	1.38	95.97
TR11	41.4	18.5	17.4	69.12	29.00	0.24	59.9	0.40	2.76	13.1	28.3	31.64	19.80	53.1	49.5	2.73	94.77
TR12	23.6	18.7	16.1	55.79	37.27	1.88	41.3	4.35	2.19	7.61	17.2	30.67	38.7	67.2	65.5	0.90	98.64
TR13	48.5	23.7	23.0	67.17	32.08	0.81	71.2	1.12	0.47	9.20	40.1	18.66	15.3	55.7	53.6	2.13	96.18
平均	33.70		14.43	63.07	26.83	0.80		1.77	1.77	8.38		23.39	18.28	40.54	37.66		93.62

[0348] 13名受试者中,在TR01、TR02、TR03和TR07中确认到间质性肺炎的发病。其中,TR01和TR02为DAD(弥漫性肺泡损伤),与另外2例(OP(机化性肺炎))不同,导致了急性加重,即使

中止给药仍有1例死亡。TR01及TR02与TR03及TR07不同,相对于外周血单核细胞的 $\gamma\delta$ T细胞的比例( $CD3^+V\delta^+$ /全部)及相对于T细胞的 $V\delta^+$ 细胞的比例( $V\delta^+/CD3^+$ )高,统计分析的结果是确认到数据的完全分离。

[0349] 根据以上结果,认为通过以相对于外周血单核细胞的 $V\delta^+$  $\gamma\delta$ T细胞的细胞数或比例为指标能够将伴有DAD的间质性肺炎与除此以外的间质性肺炎区分开,能够预测其发病风险。由此,能够在给药前辨别有发生严重不良事件的风险的患者,在给药前从治疗对象中排除或进行事前处置等,能够实现利用免疫检查点抑制剂的安全治疗。需要说明的是,这里以外周血单核细胞为基础进行了评价,但是在 $CD3^-V\delta^-$ 细胞多的试样的情况下,可以以相对于外周血T细胞的 $V\delta^+$ 细胞的细胞数或比例为指标。

[0350] 产业上的可利用性

[0351] 本发明通过在给药前预测由免疫检查点抑制剂引起的重症间质性肺炎的发病风险、判定是否适合治疗,从而对实现精准医疗而言是有用的。

[0352] 本说明书中引用的全部出版物、专利及专利申请均作为参考而直接纳入本说明书中。

健康人外周血单核细胞中的  $\gamma \delta$  型T细胞的比例

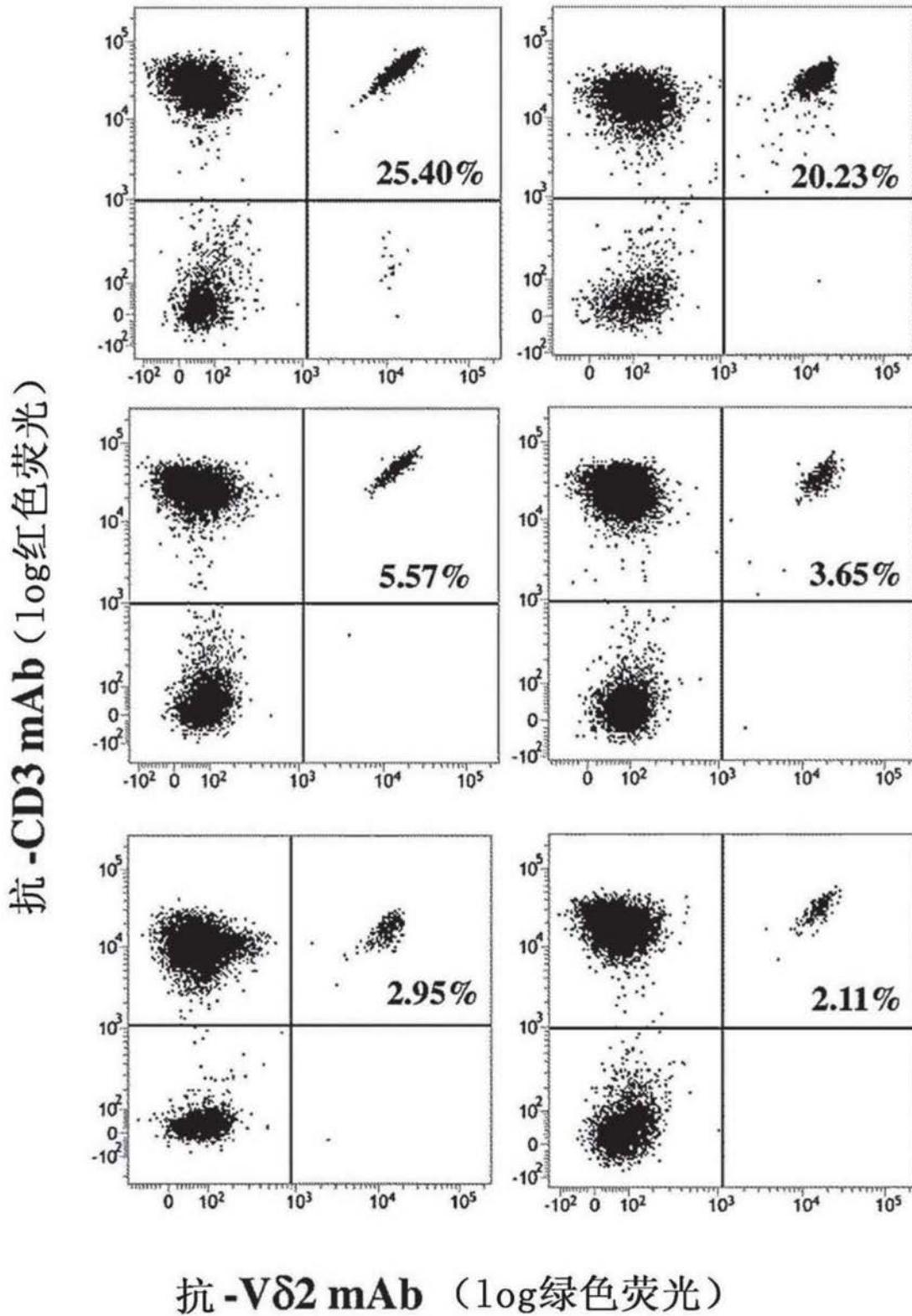


图1A

健康人外周血单核细胞中的  $\gamma \delta$  型T细胞的比例

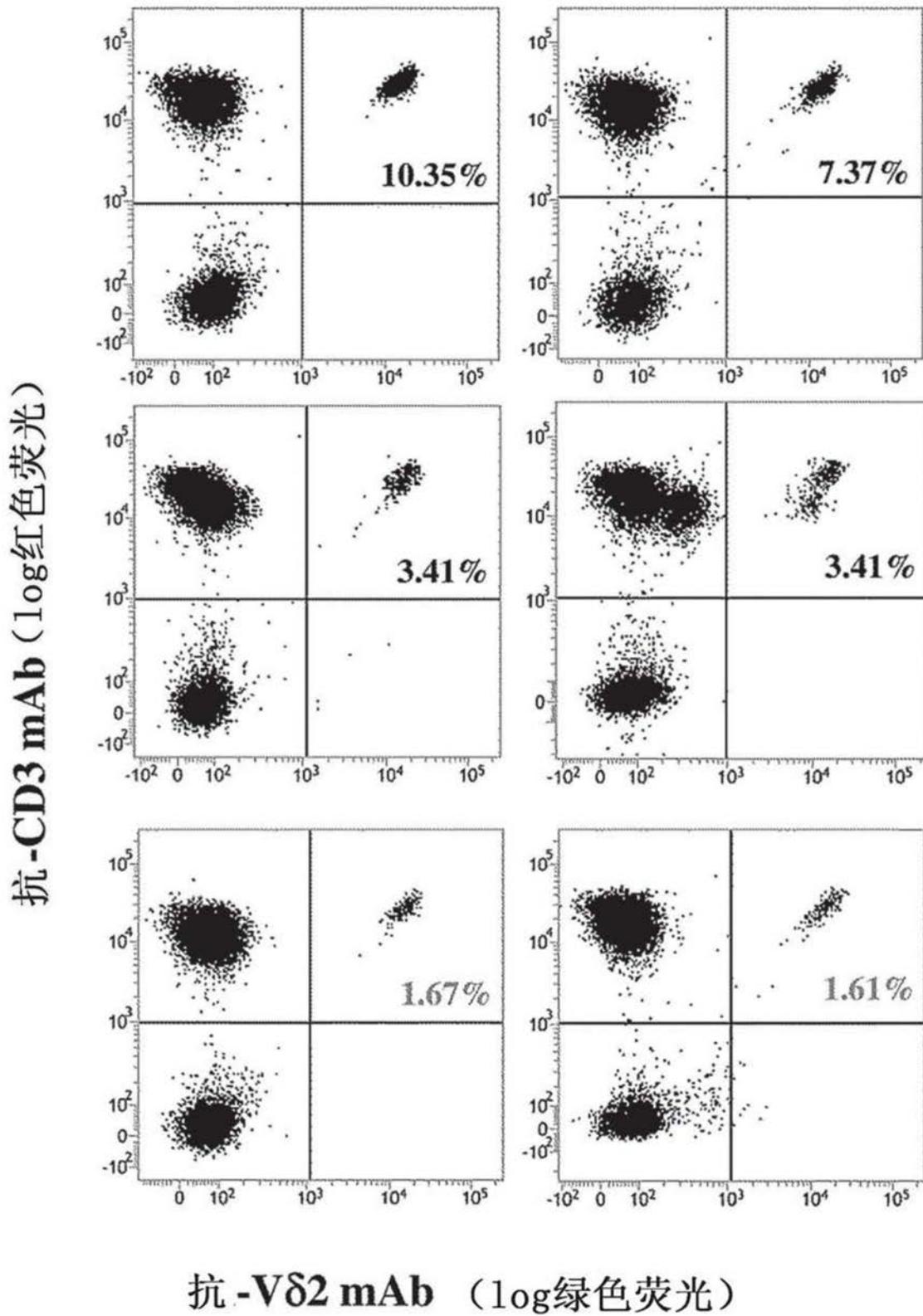


图1B

健康人外周血  $\gamma$   $\delta$  型T细胞的增殖诱导

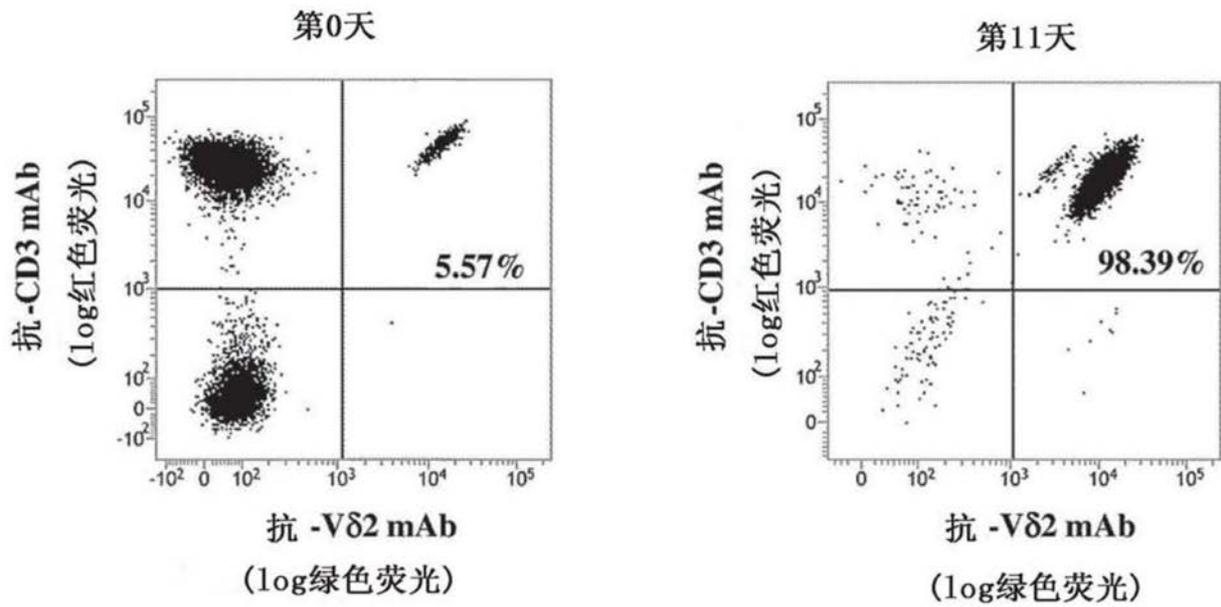


图2A

健康人外周血  $\gamma$   $\delta$  型T细胞的增殖诱导

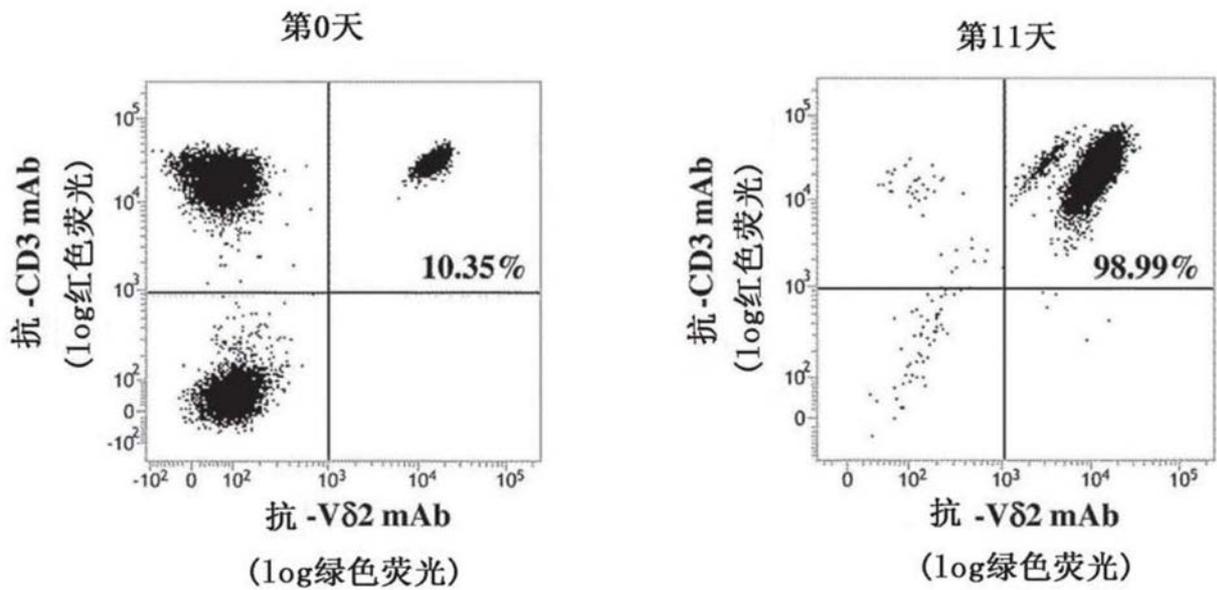


图2B

肺癌患者中  $\gamma \delta$  型T细胞的比例低

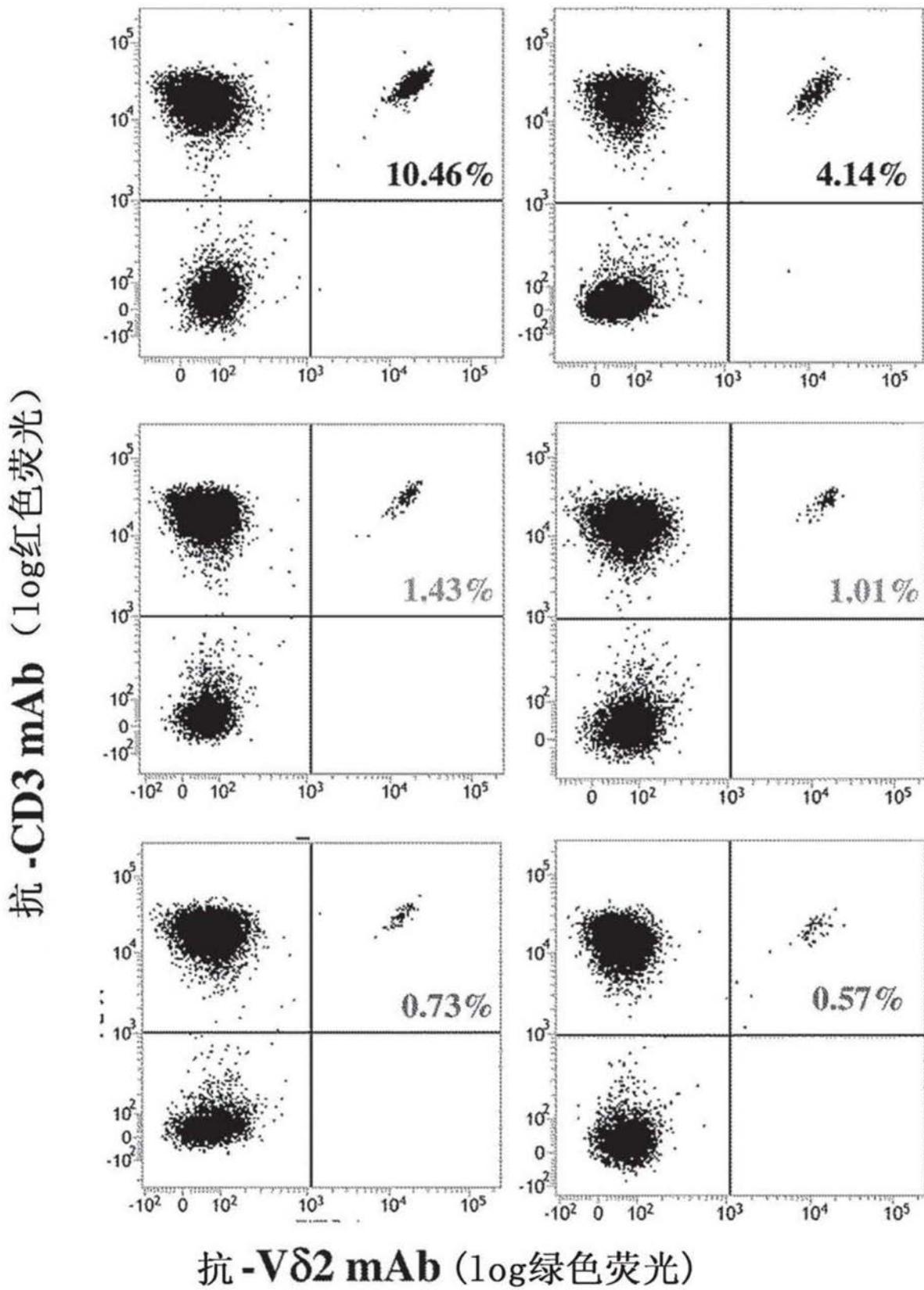


图3A

肺癌患者中  $\gamma \delta$  型T细胞的比例低

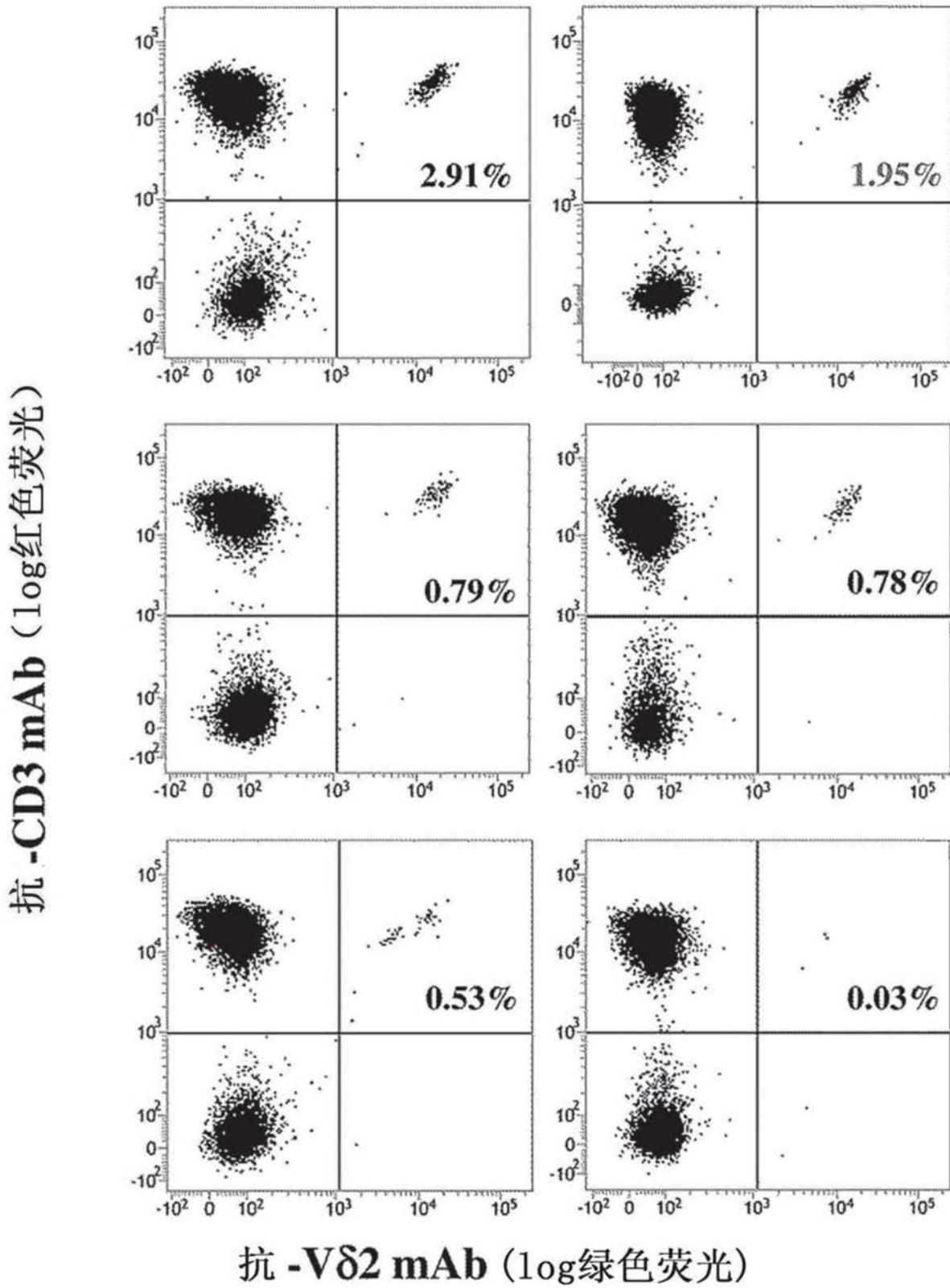


图3B

肺癌患者外周血  $\gamma$   $\delta$  型T细胞的增殖诱导

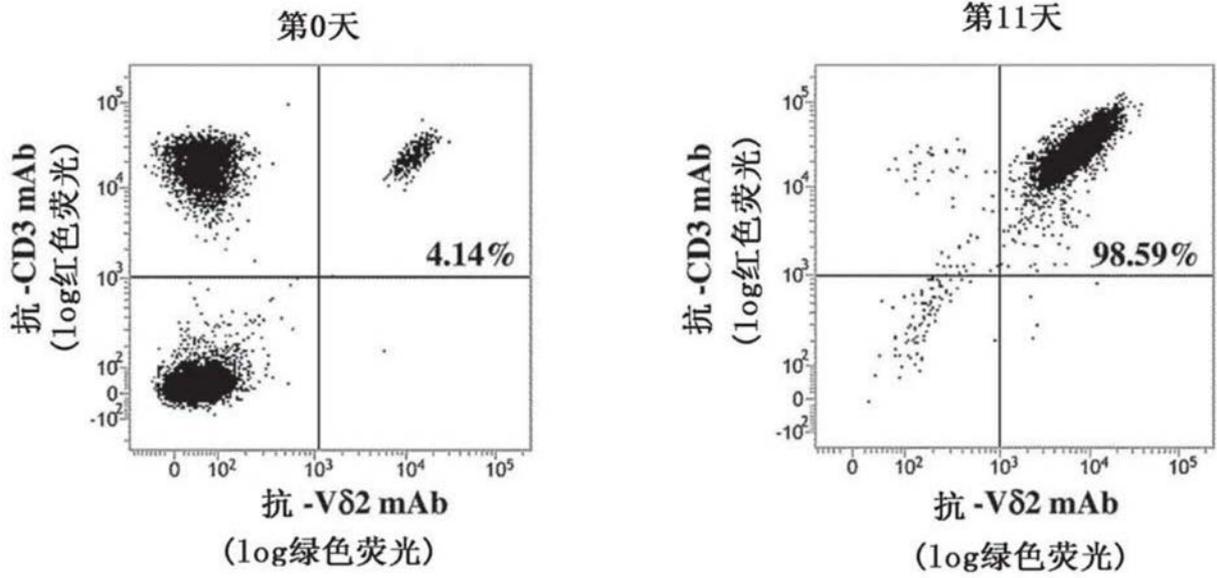


图4A

肺癌患者外周血  $\gamma$   $\delta$  型T细胞的增殖诱导

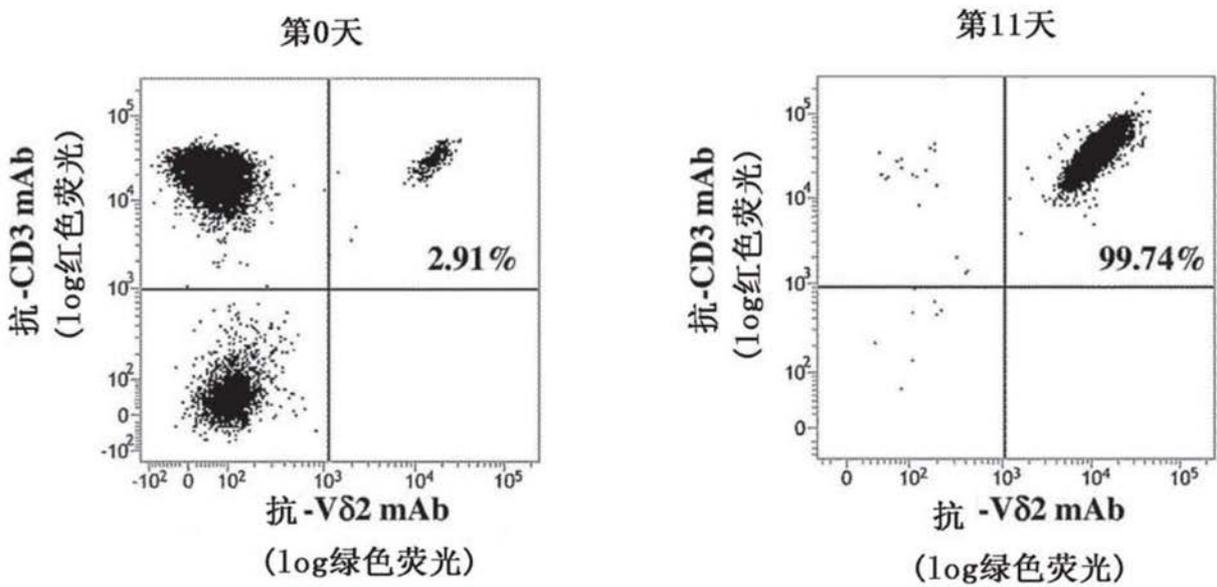


图4B

肺癌患者外周血  $\gamma$   $\delta$  型T细胞的增殖诱导

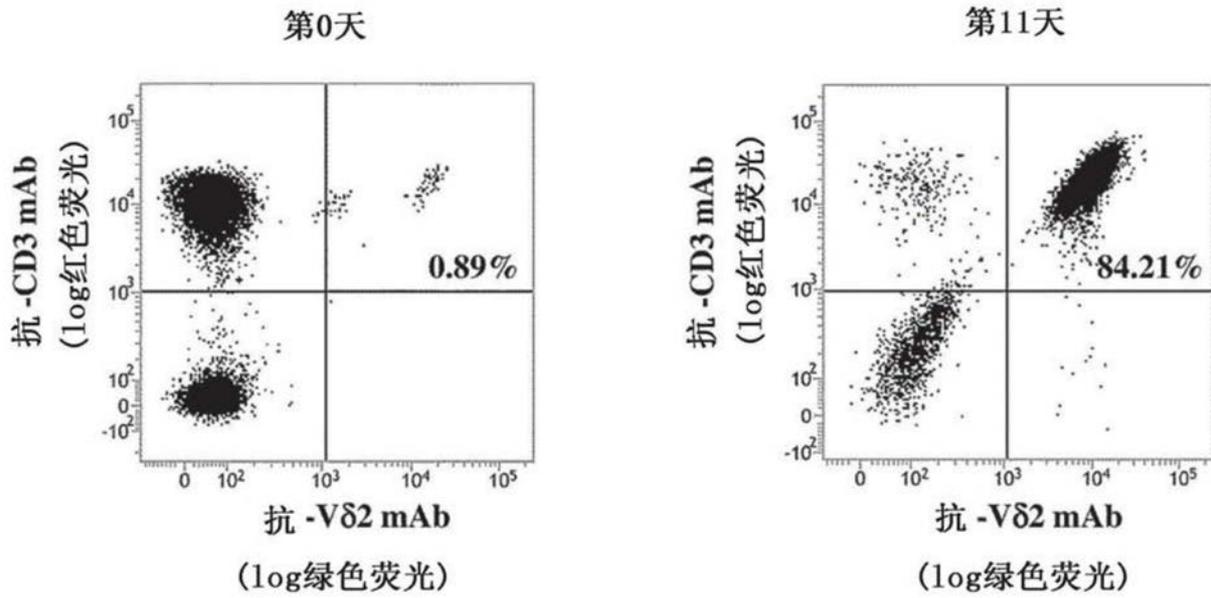


图4C

肺癌患者外周血  $\gamma$   $\delta$  型T细胞的增殖诱导

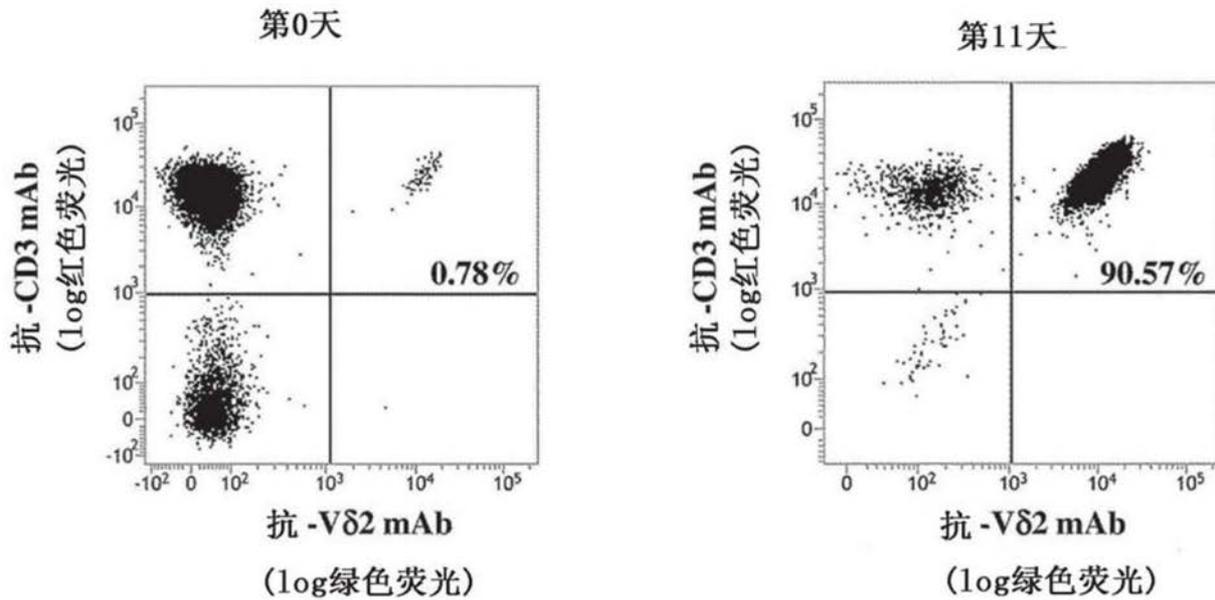


图4D

对于人，ZOL/IL-2/IL-18在体外对  $\gamma \delta$  型T细胞进行增殖诱导

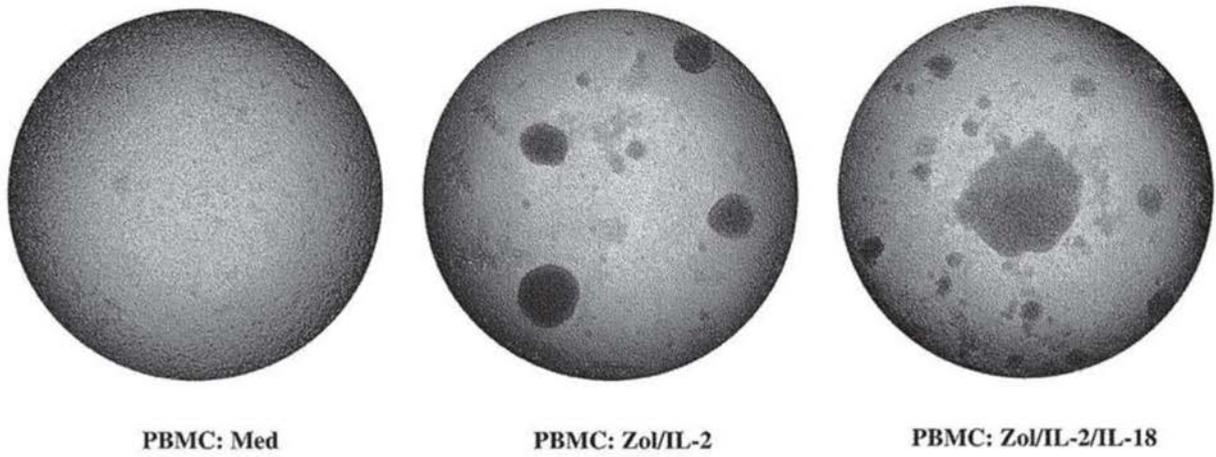


图5

IL-18在IL-2依赖性NK细胞增殖中的作用

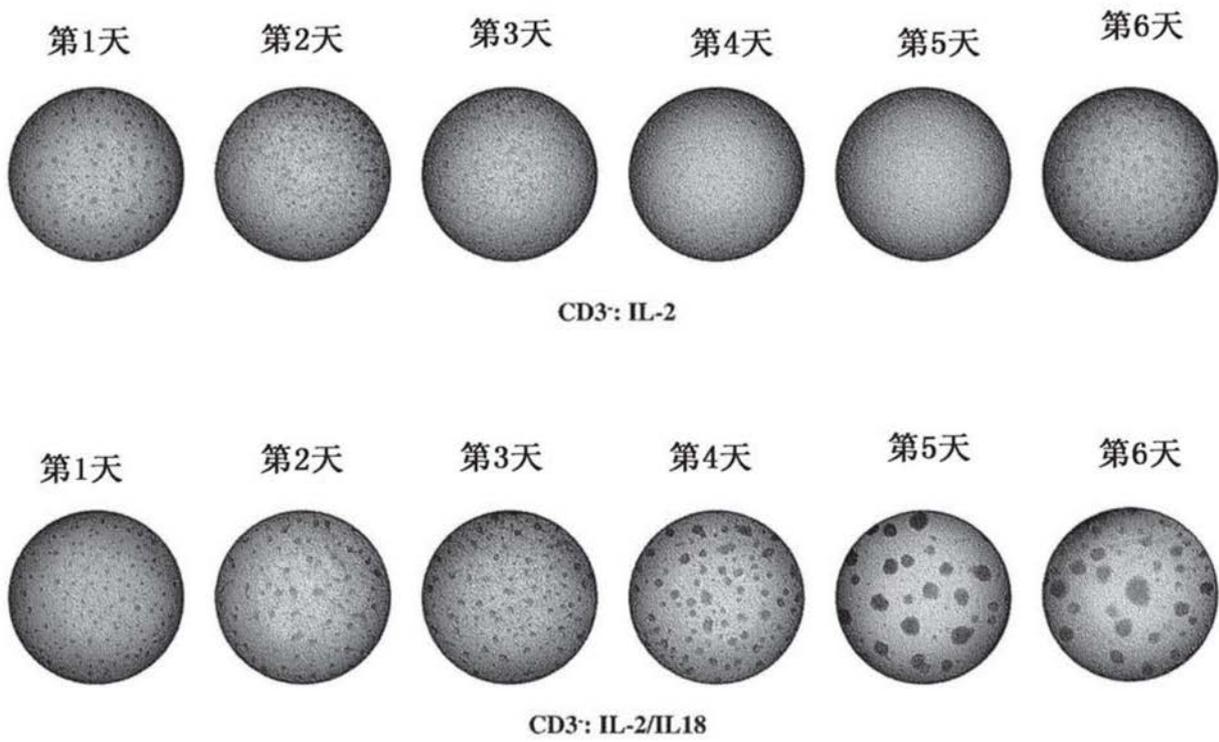


图6

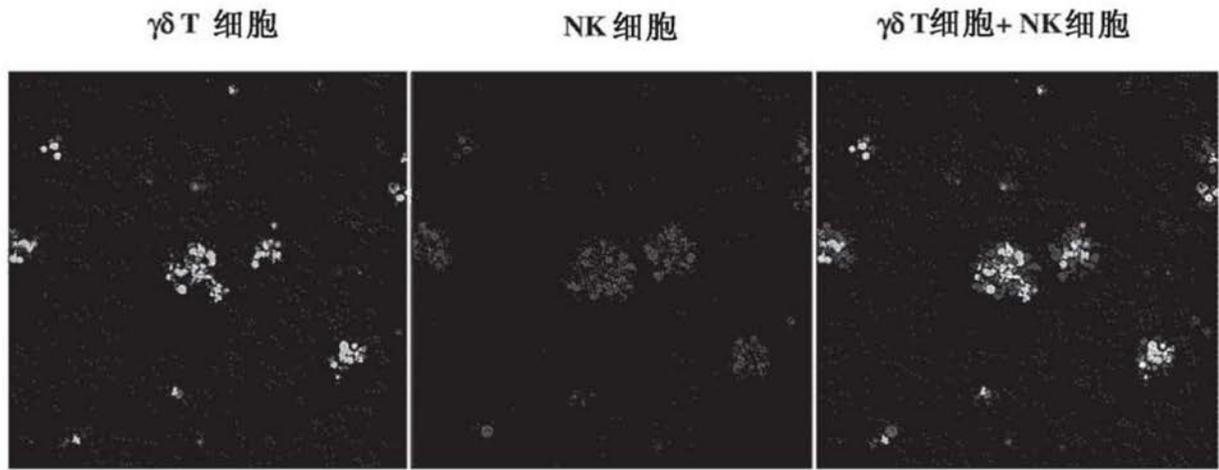


图7

IL-18依赖性  $\gamma\delta$  型T细胞增殖机制

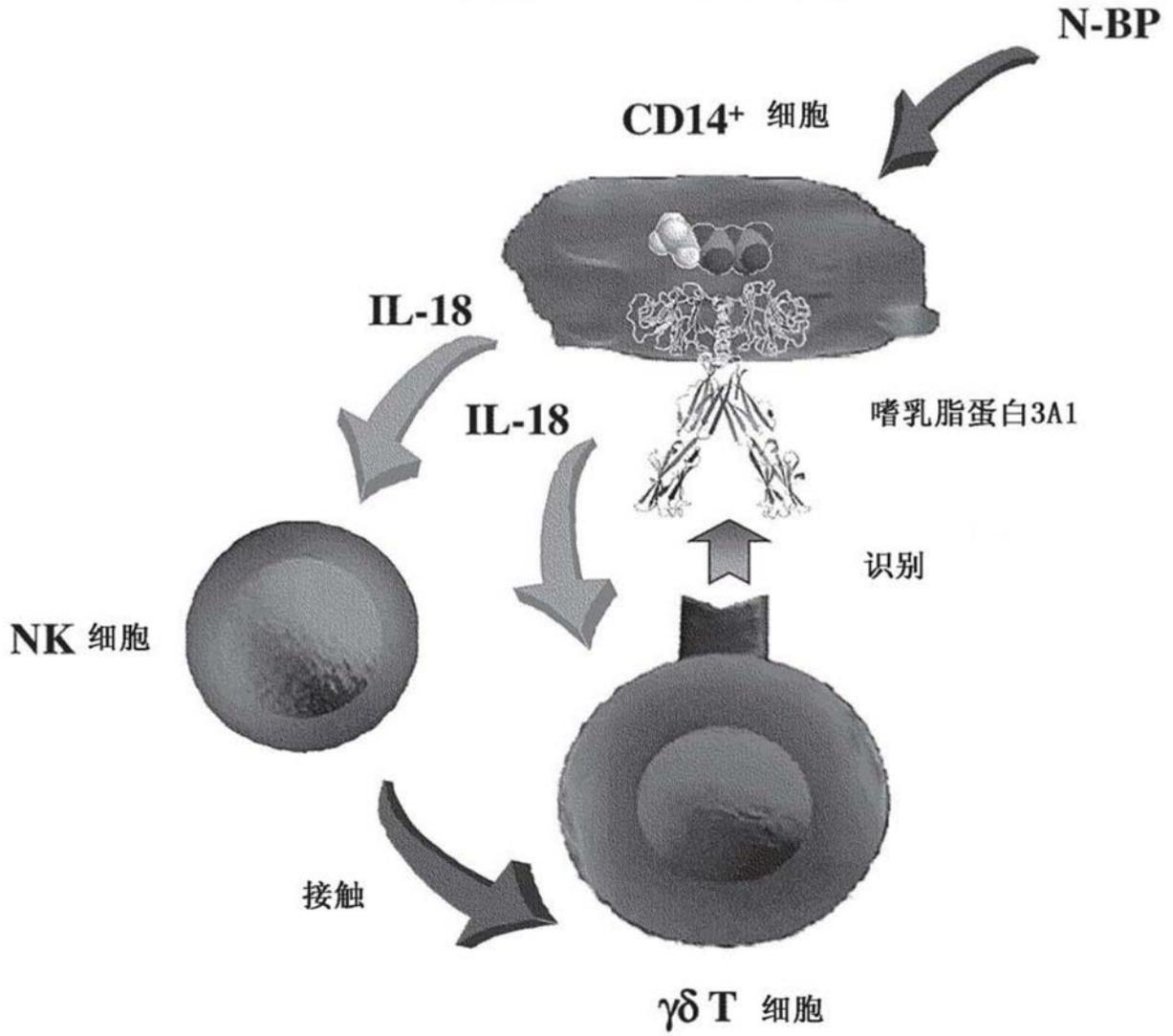


图8

利用PD-1免疫检查点抑制剂的癌症免疫疗法

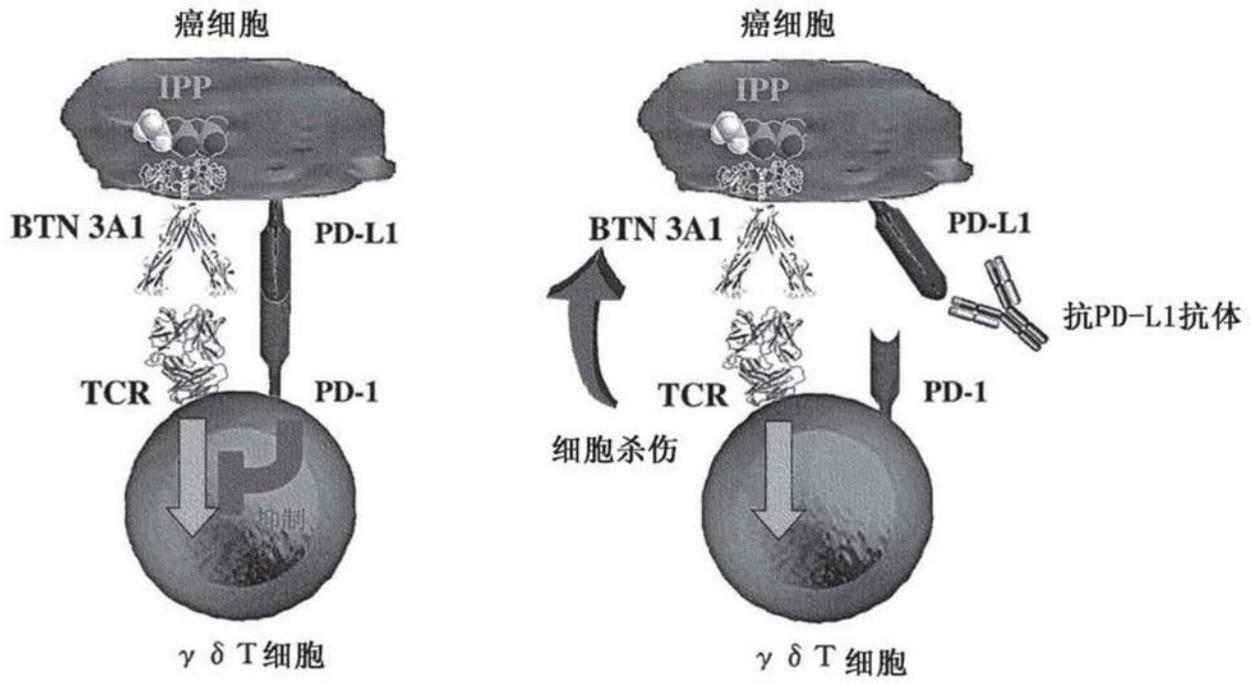


图9