



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110546269 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201880017953.5

(22)申请日 2018.03.14

(30)优先权数据

2017-050105 2017.03.15 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/010028 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/168949 JA 2018.09.20

(71)申请人 学校法人兵庫医科大学

地址 日本兵库县西宫市武库川町1番1号

申请人 组库创世纪株式会社

(72)发明人 松本成司 铃木隆二

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

代理人 李雪 陈万青

(51)Int.Cl.

G12Q 1/02(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书3页 说明书50页
序列表12页 附图20页

(54)发明名称

癌症免疫疗法的新生物标志物

(57)摘要

本发明提供一种在开始癌症免疫疗法之前预测有效患者的技术。本发明提供一种使用受试者的T细胞受体(TCR)多样性作为对上述受试者的癌症免疫疗法的响应性的指标的方法。本发明还提供一种组合物,其是包含免疫检查点抑制剂的组合物,用于对T细胞的TCR多样性高的受试者治疗癌症。本发明还涉及利用这种TCR多样性的伴随药物。

1. 一种方法,其特征在于,使用受试者的T细胞的T细胞受体多样性、即TCR多样性作为所述受试者对癌症免疫疗法的响应性的指标。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述T细胞为CD8⁺,并且一种以上的T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述T细胞为CD8⁺,并且一种以上的T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述T细胞为CD8⁺,并且选自PD-1、CD28、CD154 (CD40L)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、CD27、CD152 (CTLA-4)、CD366 (TIM-3)、CD223 (LAG-3)、CD272 (BTLA)、CD226 (DNAM-1)、TIGIT及CD367 (GITR)中的一种以上的细胞表面标志物为阳性。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述T细胞为CD8⁺PD-1⁺T细胞。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其特征在于,所述T细胞为所述受试者的外周血中的T细胞。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其特征在于,所述癌症免疫疗法包括免疫检查点抑制剂的给药。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述免疫检查点抑制剂为PD-1抑制剂。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述PD-1抑制剂为纳武单抗或派姆单抗。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其特征在于,所述TCR多样性以香农指数、辛普森指数、反向辛普森指数、标准化香农指数、Unique50指数、DE30指数、DE80指数或DE50指数表示。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其特征在于,所述TCR多样性以DE50指数表示。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其特征在于,所述TCR为TCR α 。

13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于,已标准化为下表记载的任一个读段数的所述受试者的DE50指数为与所述表中记载的所述读段数对应的阈值以上时,表示所述受试者为见效患者,或者小于所述阈值时,表示所述受试者为未见效患者,

[表45]

标准化读段数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
%DE50	17.14	11.04	5.80	2.58	0.96	0.39	0.18

。

14. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其特征在于,所述TCR为TCR β 。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于,已标准化为下表记载的任一个读段数的所述受试者的DE50指数为与所述表中记载的所述读段数对应的阈值以上时,表示所述受试者为见效患者,或者当小于所述阈值时,表示所述受试者为未见效患者,

[表46]

标准化读段数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
%DE50	19.05	11.63	3.64	1.55	0.58	0.25	0.11

。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其特征在于,还包括:

从所述受试者的外周血样品中分离CD8⁺PD-1⁺T细胞的工序;以及
确定所述CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR多样性的工序。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其特征在于,所述TCR多样性通过包括大规模高效率TCR库分析的方法来确定。

18. 一种组合物,其是包含免疫检查点抑制剂的组合物,用于对T细胞的TCR多样性高的受试者治疗癌症。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其特征在于,所述T细胞为CD8⁺,并且一种以上的T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性。

20. 根据权利要求18所述的组合物,其特征在于,所述T细胞为CD8⁺,并且一种以上的T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性。

21. 根据权利要求18所述的组合物,其特征在于,所述T细胞为CD8⁺,并且选自PD-1、CD28、CD154 (CD40L)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、CD27、CD152 (CTLA-4)、CD366 (TIM-3)、CD223 (LAG-3)、CD272 (BTLA)、CD226 (DNAM-1)、TIGIT及CD367 (GITR)中的一种以上的细胞表面标志物为阳性。

22. 根据权利要求18所述的组合物,其特征在于,所述T细胞为CD8⁺PD-1⁺T细胞。

23. 根据权利要求18至22中任一项所述的组合物,其特征在于,所述T细胞为所述受试者的外周血中的T细胞。

24. 根据权利要求18至23中任一项所述的组合物,其特征在于,所述免疫检查点抑制剂为PD-1抑制剂。

25. 根据权利要求24所述的组合物,其特征在于,所述PD-1抑制剂为纳武单抗或派姆单抗。

26. 根据权利要求18至25中任一项所述的组合物,其特征在于,所述受试者的T细胞的TCR多样性由香农指数、辛普森指数、反向辛普森指数、标准化香农指数、Unique50指数、DE30指数、DE80指数或DE50指数表示。

27. 根据权利要求18至26中任一项所述的组合物,其特征在于,所述受试者的T细胞的TCR多样性由DE50指数表示。

28. 根据权利要求18至27中任一项所述的组合物,其特征在于,所述TCR为TCR α 。

29. 根据权利要求28所述的组合物,其特征在于,已标准化为下表记载的任一个读段数的所述受试者的DE50指数为与所述表中记载的所述读段数对应的阈值以上,

[表47]

标准化读段数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
%DE50	17.14	11.04	5.80	2.58	0.96	0.39	0.18

。

30. 根据权利要求18至27中任一项所述的组合物,其特征在于,所述TCR为TCR β 。

31. 根据权利要求30所述的组合物,其特征在于,已标准化为下表中记载的任一个读段数的所述受试者的DE50指数为与所述表中记载的所述读段数对应的阈值以上,

[表48]

标准化读段数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
%DE50	19.05	11.63	3.64	1.55	0.58	0.25	0.11

。

32. 根据权利要求18至31中任一项所述的组合物,其特征在于,所述受试者的TCR多样性通过包括大规模高效率TCR库分析的方法来确定。

33. 一种用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法,其特征在于,包括:

体外测定所述受试者的T细胞的TCR多样性的工序;以及

在所述TCR多样性高的情况下判定所述受试者对癌症免疫疗法的响应性好、或者在所述TCR多样性低的情况下判定所述受试者对癌症免疫疗法的响应性差的工序。

34. 一种用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法,其特征在于,包括:

从所述受试者获得外周血样品的工序;

通过包括大规模高效率TCR库分析的方法测定所述受试者的外周血中的T细胞的TCR多样性的工序;以及

在所述TCR多样性高的情况下判定所述受试者对癌症免疫疗法的响应性好、或者在所述TCR多样性低的情况下判定所述受试者对癌症免疫疗法的响应性差的工序。

35. 一种用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性并治疗所述受试者的癌症的方法,其特征在于,包括:

从所述受试者获得外周血样品的工序;

测定所述受试者的外周血中的T细胞的TCR多样性的工序;以及

当所述TCR多样性高于基准值时对所述受试者施用癌症免疫疗法的工序。

36. 一种方法,其特征在于,使用通过包括大规模高效率库分析的方法所确定的库的多样性作为受试者对疗法的响应性的指标。

37. 根据权利要求36所述的方法,其特征在于,所述疗法为与免疫应答相关的疗法。

38. 根据权利要求36或37所述的方法,其特征在于,所述库分析为TCR库分析。

39. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中,表示所述受试者的TCR多样性的多样性指数为阈值以上是所述受试者为见效患者的指标,或者所述多样性指数小于阈值是所述受试者为未见效患者的指标,

所述阈值基于ROC分析而确定,或者基于灵敏度而确定,或者基于特异性而确定。

40. 根据权利要求1至17或权利要求39中任一项所述的方法,其中,表示所述受试者的TCR多样性的多样性指数为阈值以上是所述受试者为见效患者的指标,或者所述多样性指数小于阈值是所述受试者为未见效患者的指标,

所述阈值是对在计算所述受试者的多样性指数中所使用的读段数进行标准化而得到的值。

癌症免疫疗法的新型生物标志物

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症免疫疗法的领域。更详细而言,涉及对癌症免疫疗法的受试者的响应性的预测以及利用基于预测的癌症免疫疗法的治疗。在另一方面,本发明涉及大规模高效率库分析的新型用途。更详细而言,本发明涉及使用通过大规模高效率库分析获得的多样性指数对癌症免疫疗法的受试者响应性进行预测。

背景技术

[0002] 作为针对癌症的治疗,癌症免疫疗法备受瞩目。尤其是,对于诸如作为抗PD-1抗体的纳武单抗(Nivolumab)免疫检查点抑制剂而言,相对于多西他塞(Docetaxel,是针对非小细胞肺癌的现有标准疗法)在总生存期间方面显示出大幅提高的结果,成为标准疗法。

[0003] 但是,在接受了免疫检查点抑制剂的患者中,存在着呈现出癌症的进行停止或者癌症得以缓解这样的显著效果的患者,而另一方面,在抗PD-1抗体临床试验中存在3个月以内病情恶化的“无效组”。但是,能有效地判定无效组的方法尚属未知。

发明内容

[0004] 用于解决问题的手段

[0005] 在本发明的一个实施方式中,提供了使用T细胞的T细胞受体(TCR)多样性作为对癌症免疫疗法的响应性的指标的方法。通常,癌症免疫疗法利用生物防御机制,因此对疗法的响应存在个体差异。因此,已寻找能够在治疗之前判定该个体差异的生物标志物(例如,T细胞中的表达特定表面标志物的细胞的比例、在肿瘤中表达的表面蛋白质等)。但是,被认为攻击肿瘤的细胞的组成(例如,CD8⁺PD-1⁺细胞的比例等)因在对癌症免疫疗法的见效患者与未见效患者之间不存在差异(图4),而不能用作生物标志物。本发明的发明人们惊奇地发现受试者的T细胞的TCR多样性能够用于预测受试者对疗法的应答。例如,就肺癌患者而言,对抗PD-1抗体(Nivolumab)有效的患者为20~30%。含有免疫检查点抑制剂的癌症免疫疗法大多价格昂贵,若能够在开始利用抗PD-1抗体等进行治疗之前预测有效患者,则可实现更有效的治疗,可避免医疗费用的浪费,并且有助于降低飙升的社会保障费用。因此,本发明提供用于预测对癌症免疫疗法的响应性的新型生物标志物。

[0006] 在本发明的一个实施方式中,癌症免疫疗法包括免疫检查点抑制剂的给药。免疫检查点抑制剂可以为PD-1抑制剂。PD-1抑制剂可以为包含纳武单抗或派姆单抗(Pembrolizumab)的抗PD-1抗体。本发明的一个实施方式提供一种方法,使用T细胞的T细胞受体(TCR)多样性作为对免疫检查点抑制剂的响应性的指标。

[0007] 作为TCR多样性,能利用多个指标,例如为香农(Shannon)指数、辛普森(Simpson)指数、反向辛普森指数、标准化香农指数、DE指数(例如,DE50指数、DE30指数、DE80指数)或Unique指数(例如,Unique 30指数、Unique50指数、Unique 80指数)等。在本发明的优选实施方式中,TCR多样性为DE指数。在本发明的更优选的实施方式中,TCR多样性为DE50指数。

[0008] 在本发明的一个实施方式中,TCR多样性为受试者的T细胞的TCR多样性。在一个实

施方式中,作为T细胞,可使用T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性的T细胞。或者在另一个实施方式中,作为T细胞,可使用T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性的T细胞。作为T细胞,利用选自CD8、PD-1、CD28、CD154 (CD40L)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、CD27、CD152 (CTLA-4)、CD366 (TIM-3)、CD223 (LAG-3)、CD272 (BTLA)、CD226 (DNAM-1)、TIGIT及CD367 (GITR)中的一种以上的细胞表面标志物为阳性的T细胞的TCR多样性。在一个实施方式中,优选T细胞为CD8⁺。在进一步的实施方式中,T细胞为CD8⁺,并且T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性。在进一步的实施方式中,T细胞为CD8⁺,并且T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性。在进一步的实施方式中,T细胞为CD8⁺,且T细胞抑制性细胞表面标志物及T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性。在一个实施方式中,T细胞为CD8⁺,且选自PD-1、CD28、CD154 (CD40L)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、CD27、CD152 (CTLA-4)、CD366 (TIM-3)、CD223 (LAG-3)、CD272 (BTLA)、CD226 (DNAM-1)、TIGIT及CD367 (GITR)中的一种以上的细胞表面标志物为阳性。在一个实施方式中,T细胞选自CD8⁺PD1⁺、CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40⁺、CD8⁺TIGIT⁺及CD8⁺CTLA4⁺T细胞。优选T细胞为CD8⁺PD-1⁺T细胞。T细胞可以为外周血中的T细胞。

[0009] TCR多样性可为TCR α 的多样性或TCR β 的多样性。在本发明一个实施方式中,这种TCR多样性高表示受试者为见效患者。

[0010] 本发明的另一个实施方式包括对TCR多样性高的受试者施用癌症免疫疗法。在一个实施方式中,提供一种组合物,其是包含免疫检查点抑制剂的组合物,用于对T细胞的TCR多样性高的受试者治疗癌症。在进一步的实施方式中,提供一种组合物,其是包含免疫检查点抑制剂的组合物,用于对外周血中的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR多样性高的受试者治疗癌症。

[0011] 在一些实施方式中,当受试者的TCR多样性高于阈值时,表示受试者为癌症免疫疗法的见效患者。在另一个实施方式中,当受试者的TCR多样性低于阈值时,表示受试者为癌症免疫疗法的未见效患者。在利用DE指数的情况下,利用对读段数进行了标准化的DE指数,或者通过与对读段数进行了调节的阈值进行比较,来表示受试者为癌症免疫疗法的见效患者。在一个实施方式中,当相对于受试者的TCR α 的30000读段标准化的DE50指数为0.39%以上时,表示受试者为见效患者。在另一个实施方式中,当相对于受试者的TCR β 的30000读段标准化的DE50指数为0.24%以上时,表示受试者为见效患者。通过相对于任意的读段数标准化的DE50指数与对应于上述读段数的阈值之间的比较,表示受试者为见效患者或为未见效患者。本说明书中提供了读段数与阈值之间的组合的示例。

[0012] 在一些实施方式中,基于ROC分析来确定阈值。在一些实施方式中,基于特异性来确定阈值,例如,将高于非响应的最大值的值设定为阈值。在一些实施方式中,基于灵敏度来确定阈值,例如,将低于见效者的最低线的值设定为阈值。在本发明中,也可包括确定这些阈值的工序,另外,可利用如此所确定的阈值。

[0013] 本发明一个实施方式为包括从受试者分离T细胞的工序以及测定T细胞的TCR多样性的工序的方法,分离选自CD8、PD-1、CD28、CD154 (CD40L)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、CD27、CD152 (CTLA-4)、CD366 (TIM-3)、CD223 (LAG-3)、CD272 (BTLA)、CD226 (DNAM-1)、TIGIT及CD367 (GITR)中的一种以上的细胞表面标志物为阳性的T细胞。在一个实施方式中,优选T细胞为CD8⁺。在进一步的实施方式中,T细胞为CD8⁺,且T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性。在一个实施方式中,T细胞选自CD8⁺PD1⁺、CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40

⁺、CD8⁺TIGIT⁺及CD8⁺CTLA4⁺T细胞所组成的组。在进一步的实施方式中，T细胞为CD8⁺，且T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性。特别优选为包括从受试者的外周血样品分离CD8⁺PD-1⁺T细胞的工序以及测定CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR多样性的工序的方法。

[0014] 优选利用大规模高效率TCR库分析，因为其能够鉴定低频率(1/10000~1/100000或在其以下)的基因。本发明一个实施方式包括通过包括大规模高效率TCR库分析的方法来确定TCR多样性的工序。本发明一个实施方式为一种方法，其使用通过大规模高效率TCR库分析所确定的TCR多样性作为受试者的医疗状态、特别是对疗法的响应性的指标。

[0015] 本发明一个实施方式为用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法，上述方法包括：在体外(in vitro)测定受试者的T细胞的TCR多样性的工序；以及当TCR多样性高时判定受试者对癌症免疫疗法的响应性好的工序。或者当TCR多样性低时，还可判定受试者对癌症免疫疗法的响应性差。T细胞可以为CD8⁺PD-1⁺。此外，T细胞可以来源于受试者的外周血。

[0016] 本发明的另一个实施方式涉及用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法，上述方法包括：从受试者获得外周血样品的工序；通过包括大规模高效率TCR库分析的方法测定受试者的外周血中的T细胞的TCR多样性的工序；以及，在TCR多样性高的情况下判定受试者对癌症免疫疗法的响应性好的工序。或者，在TCR多样性低的情况下还可判定受试者对癌症免疫疗法的响应性差。T细胞可以为CD8⁺PD-1⁺。

[0017] 在本发明的进一步的实施方式中，提供用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性并治疗受试者的癌症的方法，上述方法包括：从受试者获得外周血样品的工序；测定受试者的外周血中的T细胞的TCR多样性的工序；以及，当TCR多样性高于基准值时对受试者施用癌症免疫疗法的工序。T细胞可以为CD8⁺PD-1⁺。

[0018] 本发明还提供一种技术，其利用通过大规模高效率库分析所获得的多样性指数来预测受试者对癌症免疫疗法的响应性。

[0019] 例如，本发明提供以下方案。

[0020] 方案1：一种方法，其使用受试者的T细胞的T细胞受体(TCR)多样性作为上述受试者对癌症免疫疗法的响应性的指标。

[0021] 方案2：如上述方案所述的方法，其中，上述T细胞为CD8⁺，且一种以上的T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性。

[0022] 方案3：如上述方案中任一项所述的方法，其中，上述T细胞为CD8⁺，且一种以上的T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性。

[0023] 方案4：如上述方案中任一项所述的方法，其中，上述T细胞为CD8⁺，且选自PD-1、CD28、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、CD27、CD152(CTLA-4)、CD366(TIM-3)、CD223(LAG-3)、CD272(BTLA)、CD226(DNAM-1)、TIGIT及CD367(GITR)中的一种以上的细胞表面标志物为阳性。

[0024] 方案5：如上述方案中任一项所述的方法，其中，上述T细胞为CD8⁺PD-1⁺T细胞。

[0025] 方案6：如上述方案中任一项所述的方法，其中，上述T细胞为上述受试者的外周血中的T细胞。

[0026] 方案7：如上述方案中任一项所述的方法，其中，上述癌症免疫疗法包括免疫检查点抑制剂的给药。

[0027] 方案8:如上述方案中任一项所述的方法,其中,上述免疫检查点抑制剂为PD-1抑制剂。

[0028] 方案9:如上述方案中任一项所述的方法,其中,上述PD-1抑制剂为纳武单抗或派姆单抗。

[0029] 方案10:如上述方案中任一项所述的方法,其中,上述TCR多样性由香农指数、辛普森指数、反向辛普森指数、标准化香农指数、Unique50指数、DE30指数、DE80指数或DE50指数表示。

[0030] 方案11:如上述方案中任一项所述的方法,其中,上述TCR多样性由DE50指数表示。

[0031] 方案12:如上述方案中任一项所述的方法,其中,上述TCR为TCR α 。

[0032] 方案13:如上述方案中任一项所述的方法,其中,当标准化为下表中记载的任一个读段数的上述受试者的DE50指数为与该表中记载的该读段数对应的阈值以上时,表示该受试者为见效患者,或者当小于该阈值时,表示该受试者为未见效患者。

[0033] 表1A

标准化读段数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
%DE50	17.14	11.04	5.80	2.58	0.96	0.39	0.18

[0035] 方案14:如上述方案中任一项所述的方法,其中,上述TCR为TCR β 。

[0036] 方案15:如上述方案中任一项所述的方法,其中,当标准化为下表中列出的任一个读段数的上述受试者的DE50指数为与该表中列出的该读段数对应的阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,或者当小于该阈值时,表示上述受试者为未见效患者。

[0037] 表1B

标准化读段数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
%DE50	19.05	11.63	3.64	1.55	0.58	0.25	0.11

[0039] 方案16:如上述方案中任一项所述的方法,其中,还包括:

[0040] 从上述受试者的外周血样品中分离CD8⁺PD-1⁺T细胞的工序;以及

[0041] 确定上述CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR多样性的工序。

[0042] 方案17:如上述方案中任一项所述的方法,其中,上述TCR多样性通过包括大规模高效率TCR库分析的方法来确定。

[0043] 方案18:一种组合物,其是包含免疫检查点抑制剂的组合物,用于对T细胞的TCR多样性高的受试者治疗癌症。

[0044] 方案18A:如上述方案所述的组合物,具有上述方案的任一个或多个中记载的特征。

[0045] 方案19:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述T细胞为CD8⁺,且一种以上的T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性。

[0046] 方案20:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述T细胞为CD8⁺,且一种以上的T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性。

[0047] 方案21:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述T细胞为CD8⁺,且选自PD-1、CD28、CD154 (CD40L)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、CD27、CD152 (CTLA-4)、CD366 (TIM-3)、CD223 (LAG-3)、CD272 (BTLA)、CD226 (DNAM-1)、TIGIT及CD367 (GITR) 中的一种以上的细胞表面标志物为阳性。

[0048] 方案22:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述T细胞为CD8⁺PD-1⁺T细胞。

[0049] 方案23:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述T细胞为上述受试者的外周血中的T细胞。

[0050] 方案24:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述免疫检查点抑制剂为PD-1抑制剂。

[0051] 方案25:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述PD-1抑制剂为纳武单抗或派姆单抗。

[0052] 方案26:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述受试者的T细胞的TCR多样性由香农指数、辛普森指数、反向辛普森指数、标准化香农指数、Unique50指数、DE30指数、DE80指数或DE50指数表示。

[0053] 方案27:如上述方案所述的组合物,其中,上述受试者的T细胞的TCR多样性由DE50指数表示。

[0054] 方案28:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述TCR为TCR α 。

[0055] 方案29:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,标准化为下表中记载的任一个读段数的上述受试者的DE50指数为与该表中记载的该读段数对应的阈值以上。

[0056] 表1C

标准化读段数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
%DE50	17.14	11.04	5.80	2.58	0.96	0.39	0.18

[0058] 方案30:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述TCR为TCR β 。

[0059] 方案31:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,标准化为下表中记载的任一个读段数的上述受试者的DE50指数为与该表中记载的该读段数对应的阈值以上。

[0060] 表1D

标准化读段数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
%DE50	19.05	11.63	3.64	1.55	0.58	0.25	0.11

[0062] 方案32:如上述方案中任一项所述的组合物,其中,上述受试者的TCR多样性通过包括大规模高效率TCR库分析的方法来确定。

[0063] 方案33:一种用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法,上述方法包括:

[0064] 在体外(in vitro)测定上述受试者的T细胞的TCR多样性的工序;以及

[0065] 在上述TCR多样性高的情况下,判定上述受试者对癌症免疫疗法的响应性好,或者在上述TCR多样性低的情况下,判定上述受试者对癌症免疫疗法的响应性差的工序。

[0066] 方案33A:如上述方案所述的方法,具有上述方案的任一个或多个中所记载的特征。

[0067] 方案34:一种用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法,包括:

[0068] 从上述受试者获得外周血样品的工序;

[0069] 通过包括大规模高效率TCR库分析的方法测定上述受试者的外周血中的T细胞的TCR多样性的工序;以及

[0070] 在上述TCR多样性高的情况下,判定上述受试者对癌症免疫疗法的响应性好,或者在上述TCR多样性低的情况下,判定上述受试者对癌症免疫疗法的响应性差的工序。

[0071] 方案34A:如上述方案所述的方法,具有上述方案的任一个或多个中记载的特征。

[0072] 方案35:一种用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性并治疗上述受试者的癌症的方法,包括:

[0073] 从上述受试者获得外周血样品的工序;

[0074] 测定上述受试者的外周血中的T细胞的TCR多样性的工序;以及

[0075] 当上述TCR多样性高于基准值时对上述受试者施用癌症免疫疗法的工序。

[0076] 方案35A:如上述方案所述的方法,具有上述方案的任一个或多个中记载的特征。

[0077] 方案36:一种方法,其使用通过包括大规模高效率库分析的方法所确定的库的多样性作为受试者对治疗的响应性的指标。

[0078] 方案36A:如上述方案所述的方法,具有上述方案的任一个或多个中记载的特征。

[0079] 方案37:如上述方案中任一项所述的方法,其中,上述治疗为与免疫应答相关的治疗。

[0080] 方案38:如上述方案中任一项所述的方法,其中,上述库分析为TCR库分析。

[0081] 方案39:一种方法,为上述任一方案所述的方法,表示上述受试者的TCR多样性的多样性指数为阈值以上是上述受试者为见效患者的指标,或者上述多样性指数小于阈值是上述受试者为未见效患者的指标,

[0082] 上述阈值基于ROC分析而确定,或者基于灵敏度而确定,或者基于特异性来确定。

[0083] 方案40:一种方法,为上述任一方案所述的方法,表示上述受试者的TCR多样性的多样性指数为阈值以上是上述受试者为见效患者的指标,或者上述多样性指数小于阈值是上述受试者为未见效患者的指标,

[0084] 上述阈值是对在计算上述受试者的多样性指数中所使用的读段数进行标准化而得到的。

[0085] 在本发明中,对于上述一个或多个特征,除了所明示的组合之外,还可进一步组合而提供。对于本发明的进而其他实施方式及优点,只要根据需要阅读以下详细说明而理解,则属于本领域技术人员明知。

[0086] 发明的效果

[0087] 在本发明中,对于进行易于采样的外周血细胞的TCR库分析所获得的多样性指标,可作用于预测癌症免疫疗法效果的生物标志物。由此,可进行伴随治疗(companion therapy)、个别改善,并能够降低社会保险费用,并且对于个体而言可接受确实的治疗。

附图说明

[0088] [图1]图1为示出用于预测接受利用抗PD-1抗体的治疗的患者的治疗效果的、TCR库分析的示例性顺序的图。

[0089] [图2A]图2A为示出接受了利用抗PD-1抗体的治疗的患者#1及患者#2的、治疗开始前及治疗开始后的基于CT影像诊断的临床评价的图。

[0090] [图2B]图2B为示出接受了利用抗PD-1抗体的治疗的患者#3的治疗开始前及治疗开始后的基于CT影像诊断的临床评价、以及患者#4的治疗开始前及治疗开始后的基于FDG-PET影像诊断的临床评价的图。

[0091] [图3]图3为示出对患者#1的FACS分析的结果的图。

[0092] [图4]图4为示出抗PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的PD1阳性细胞的比较的

图。示出了抗PD-1抗体治疗见效患者(Responder, n=6)与未见效患者(Non-Responder, n=6)的治疗前的CD8⁺T细胞中的PD1⁺细胞的比例(左)、以及CD8⁺PD1⁺细胞在外周血细胞的淋巴细胞级分中所占的比例(右)。PD1⁺细胞在CD8⁺T细胞中所占的比例在两组中几乎不存在差异。

[0093] [图5]图5为示出治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的TCR α 的多样性指标的比较的图。在抗PD-1抗体治疗患者(n=12)的治疗前,从患者的全血分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells),并通过FACS分选仪对CD8⁺PD1⁺细胞进行分级分离。从CD8⁺PD1⁺细胞提取RNA,并进行大规模高效率TCR库分析以计算其多样性指数(TCR α)。利用香农指数(A)、标准化香农指数(B)、辛普森指数(C)、反向辛普森指数(D)及DE50指数(E)的多样性指数,在PD-1抗体见效患者(Responder, n=6)与未见效患者(Non-Responder, n=6)之间进行了比较。在所有的多样性指数中,PD-1抗体治疗见效患者与未见效患者相比表现出较高的多样性。

[0094] [图6]图6为示出治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的TCR β 的多样性指标的比较的图。从抗PD-1抗体治疗患者的治疗前的CD8⁺PD1⁺细胞提取RNA,进行大规模高效率TCR库分析以计算其多样性指数(TCR β)。利用香农指数(A)、标准化香农指数(B)、辛普森指数(C)、反向辛普森指数(D)及DE50指数(E)的多样性指数,在PD-1抗体见效患者(Responder, n=6)与未见效患者(Non-Responder, n=6)之间进行了比较。其结果,在所有的多样性指数中,PD-1抗体治疗见效患者与未见效患者相比表现出较高的多样性。

[0095] [图7]图7为在利用实施例1中所使用的每个患者的TCR α 及TCR β 的各个多样性指数作为指标的情况下,对使阈值发生多种改变时的灵敏度与1-特异性进行绘图而得到的ROC曲线。上排使用了TCR α 的多样性指数,下排使用了TCR β 的多样性指数。

[0096] [图8]图8为示出与针对TCR α 的各个多样性指数(香农指数、标准化香农指数、辛普森指数、反向辛普森指数、DE30指数、DE50指数、DE80指数、Unique30指数、Unique50指数及Unique80指数)的读段数相对应的变化的图。通过从实施例1中获得的数据对各种读段数进行随机重采样,来计算与各读段数对应的多样性指数,并对每个受试者针对100次的随机重采样的中间值进行绘图。每个点表示本说明书实施例1的每个受试者(n=12)。横轴为重采样读段数(对数),纵轴为多样性指数的值。对于DE指数,纵轴也以对数轴表示。对于每个个体,在各个指数中利用相同颜色来表示。

[0097] [图9]图9为示出针对TCR β 的各个多样性指数(香农指数、标准化香农指数、辛普森指数、反向辛普森指数、DE30指数、DE50指数、DE80指数、Unique30指数、Unique50指数及Unique80指数)的与读段数相应的变化的图。通过从实施例1中获得的数据对各读段数进行随机重采样,来计算与各读段数对应的多样性指数,并对每个受试者针对100次的随机重采样的中间值进行绘图。每个点表示本说明书实施例1的每个受试者(n=12)。横轴为重采样读段数(对数),纵轴为多样性指数的值。对于DE指数而言,纵轴也以对数轴表示。对于每个个体,在各个指数中利用相同的颜色表示。

[0098] [图10A]图10为示出治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的TCR α 的、标准化为30000读段的多样性指标的比较的图。在抗PD-1抗体治疗患者(n=12)的治疗之前,从患者全血中分离外周血单个核细胞,并通过FACS分选仪对CD8⁺PD1⁺细胞进行分级分离。从CD8⁺PD1⁺细胞提取RNA,通过实施大规模高效率TCR库分析来计算其多样性指数(TCR α)。利用

香农指数(A)、标准化香农指数(B)、辛普森指数(C)、反向辛普森指数(D)、DE30指数(E)、DE50指数(F)、DE80指数(G)、Unique30指数(H)、Unique50指数(I)及Unique80指数(J)的多样性指数,在PD-1抗体见效患者(Responder, n=6)与未见效患者(Non-Responder, n=6)之间进行比较。在标准化为30000读段的所有的多样性指数中,PD-1抗体治疗见效患者与未见效患者相比表现出较高的多样性。

[0099] [图10B]图10为示出治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的TCR α 的、标准化为30000读段的多样性指标的比較的图。在抗PD-1抗体治疗患者(n=12)的治疗之前,从患者全血分离外周血单个核细胞,并通过FACS分选仪对CD8⁺PD-1⁺细胞进行分级分离。从CD8⁺PD-1⁺细胞提取RNA,通过实施大规模高效率TCR库分析来计算其多样性指数(TCR α)。利用香农指数(A)、标准化香农指数(B)、辛普森指数(C)、反向辛普森指数(D)、DE30指数(E)、DE50指数(F)、DE80指数(G)、Unique30指数(H)、Unique50指数(I)及Unique80指数(J)的多样性指数,在PD-1抗体见效患者(Responder, n=6)与未见效患者(Non-Responder, n=6)之间进行比较。在标准化为30000读段的所有的多样性指数中,PD-1抗体治疗见效患者与未见效患者相比表现出较高的多样性。

[0100] [图11A]图11为示出治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的TCR β 的、标准化为30000读段的多样性指标的比較的图。在抗PD-1抗体治疗患者(n=12)的治疗之前,从患者全血分离外周血单个核细胞,并通过FACS分选仪对CD8⁺PD-1⁺细胞进行分级分离。从CD8⁺PD-1⁺细胞提取RNA,通过实施大规模高效率TCR库分析来计算其多样性指数(TCR α)。利用香农指数(A)、标准化香农指数(B)、辛普森指数(C)、反向辛普森指数(D)、DE30指数(E)、DE50指数(F)、DE80指数(G)、Unique30指数(H)、Unique50指数(I)及Unique80指数(J)的多样性指数,在PD-1抗体见效患者(Responder, n=6)与未见效患者(Non-Responder, n=6)之间进行比较。在标准化为30000读段的所有的多样性指数中,PD-1抗体治疗见效患者与未见效患者相比表现出较高的多样性。

[0101] [图11B]图11为示出治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的TCR β 的、标准化为30000读段的多样性指标的比較的图。在抗PD-1抗体治疗患者(n=12)的治疗之前,从患者全血分离外周血单个核细胞,并通过FACS分选仪对CD8⁺PD-1⁺细胞进行分级分离。从CD8⁺PD-1⁺细胞提取RNA,通过实施大规模高效率TCR库分析来计算其多样性指数(TCR α)。利用香农指数(A)、标准化香农指数(B)、辛普森指数(C)、反向辛普森指数(D)、DE30指数(E)、DE50指数(F)、DE80指数(G)、Unique30指数(H)、Unique50指数(I)及Unique80指数(J)的多样性指数,在PD-1抗体见效患者(Responder, n=6)与未见效患者(Non-Responder, n=6)之间进行比较。在标准化为30000读段的所有的多样性指数中,PD-1抗体治疗见效患者与未见效患者相比表现出较高的多样性。

[0102] [图12]图12为示出针对TCR α 的各个多样性指数(香农指数、标准化香农指数、辛普森指数、反向辛普森指数、DE30指数、DE50指数、DE80指数、Unique30指数、Unique50指数及Unique80指数)的基于ROC分析的阈值根据读段数而变化的图。横轴表示重采样读段数(对数轴),纵轴表示各指数的值。对于DE指数的阈值,纵轴也以对数轴表示。可以理解的是,DE指数的阈值在两个对数轴中与读段数具有线性关系。

[0103] [图13]图13为示出针对TCR β 的各个多样性指数(香农指数、标准化香农指数、辛普森指数、反向辛普森指数、DE30指数、DE50指数、DE80指数、Unique30指数、Unique50指数及

Unique80指数)的基于ROC分析的阈值根据读段数而变化的图。横轴表示重采样读段数(对数轴),纵轴表示各指数的值。对于DE指数的阈值,纵轴也以对数轴表示。可以理解的是,DE指数的阈值在两个对数轴中与读段数具有线性关系。

[0104] [图14]图14为示出TCR α 及TCR β 的DE50指数的阈值的推定值变化的图,由取决于读段数两个对数轴中的线性回归而获得。

[0105] [图15]图15为示出T细胞级分之间的读段数的相关分析的图。X轴表示CD8 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 级分中的各个TCR β 克隆的读段数,Y轴表示各细胞级分(CD8 $^{+}$ 4-1BB $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ TIM3 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ OX40 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ TIGIT $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ CTLA4 $^{+}$)中的读段数。点表示每个TCR β 克隆。R表示Pearson的相关系数。

[0106] [图16]图16示出来自治疗见效者PBMC的通过FACS分选分离的CD8 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 4-1BB $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ TIM3 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ OX40 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ TIGIT $^{+}$ 及CD8 $^{+}$ CTLA4 $^{+}$ 级分中的TCR α 链的香农指数、标准化香农指数、反向辛普森指数、%DE50指数进行计算所得的值(中间)。还示出了治疗见效患者(n=6、左)及未见效患者(n=6、右)的CD8 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 的多样性指数。治疗见效患者的CD8 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 细胞显著高于未见效患者,同时CD8 $^{+}$ 4-1BB $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ TIM3 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ OX40 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ TIGIT $^{+}$ 及CD8 $^{+}$ CTLA4 $^{+}$ 级分显示出了与CD8 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 细胞相同程度的多样性。

[0107] [图17]图17示出来自治疗见效者PBMC的通过FACS分选分离的CD8 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 4-1BB $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ TIM3 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ OX40 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ TIGIT $^{+}$ 及CD8 $^{+}$ CTLA4 $^{+}$ 级分中的TCR β 链的香农指数、标准化香农指数、反向辛普森指数、%DE50指数进行计算所得的值(中间)。还示出了治疗见效患者(n=6、左)及未见效患者(n=6、右)的CD8 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 中的多样性指数。与TCR α 链相同地,各个T细胞级分显示出与CD8 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 细胞相同程度的多样性。

具体实施方式

[0108] 以下,示出最优选实施方式说明本发明。在本说明书全文中,应该理解,除非另外特别说明,单数形式的表述包括其复数形式的概念。因此,应该理解,除非另外特别说明,单数形式的冠词(例如,英语中的“a”、“an”、“the”等)还包括其复数形式的概念。并且,应该理解,除非另外特别说明,本说明书中所使用的术语以本领域中常规使用的含义使用。因此,除非另外定义,本说明书中使用的所有专业术语及科学技术术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。若发生矛盾,则本说明书(包括定义)优先。

[0109] 以下适当说明本说明书中特别使用的术语的定义和/或基本技术内容。

[0110] (癌症免疫疗法)

[0111] 在本说明书中,“癌症免疫疗法”是指利用生物所具有的免疫机制来治疗癌症的方法。癌症免疫疗法大致分为:通过增强对癌症的免疫功能而进行的癌症免疫疗法、以及通过抑制癌症的免疫逃避功能而进行的癌症免疫疗法。此外,癌症免疫疗法包括:激活体内的免疫功能的主动免疫疗法、以及通过将在体外使免疫功能激活或增殖的免疫细胞返回体内而进行的被动免疫疗法。

[0112] 已发现能够根据本发明描述的方法将TCR库的多样性作为指标来预测对这种癌症免疫疗法治疗效果的响应性。

[0113] 作为癌症免疫疗法的示例,可例举非特异性免疫增效剂、细胞因子疗法、癌症疫苗疗法、树突细胞疗法、过继免疫疗法、非特异性淋巴细胞疗法、癌症抗原特异性T细胞疗法、抗体疗法、免疫检查点抑制疗法、CAR-T疗法等。

[0114] 近年来,利用免疫检查点抑制剂的免疫检查点(抑制)疗法备受瞩目(Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22; 12(4):252-64.)。癌症细胞在表面表达各种蛋白质,但这导致逃避由T细胞等免疫细胞进行的攻击,因此认为在通常状态下仅仅以生物体的免疫功能无法消除癌症组织。免疫检查点抑制剂通过抑制配体-受体相互作用等(负责从这种癌症组织向免疫功能的抑制信号的传导),由此可以基于生物体免疫功能有效地消除癌症。本发明一个实施方式为一种方法,其使用T细胞(例如,CD8⁺PD-1⁺T细胞)的T细胞受体(TCR)多样性作为指标来如下文中描述的预测受试者对免疫检查点抑制剂的响应性。本发明的另一个实施方式为向基于T细胞受体(TCR)多样性所选择的(响应性的)受试者施用如下文所示的免疫检查点抑制剂的方法。在另一个实施方式中,提供对响应性受试者(基于T细胞受体(TCR)多样性已判断为并非响应性)中断或中止或避免施用免疫检查点抑制剂的方法。

[0115] 免疫检查点抑制剂的典型示例为PD-1抑制剂。作为PD-1抑制剂,可例举为抗PD-1抗体的纳武单抗(Nivolumab;以OPDIVOTM的形式销售)及派姆单抗(Pembrolizumab;以KEYTRUDATM的形式销售),但不限于此。在一个优选实施方式中,可选择纳武单抗作为这样的抑制剂。虽然不希望受理论束缚,但优选利用纳武单抗的疗法的原因之一在于:在实施例中表明在利用由本发明的大规模高效率TCR库分析所计算的多样性指数时,可清楚地识别响应性的受试者与非响应性受试者,判明特别是通过使用DE50指数的特定阈值,可明确地区分响应性与非响应性。理所当然地认为,对于其他PD-1抑制剂也可相同程度地利用多样性指数。

[0116] 认为抗PD-1抗体通过解除由PD-1信号产生的T细胞活性化的抑制来起到抗癌症效果。认为当PD-1(programmed death 1)与PD-L1或PD-L2相互作用时,SHP-2(为酪氨酸去磷酸化酶的一种)被吸收至PD-1的细胞质结构域中,使ZAP70(为T细胞受体信号传递蛋白质)失活,由此抑制T细胞的活性化(Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y. et al.: A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. Nat. Immunol., 14, 1212-1218 (2013))。另外,还认为PD-L1还与CD80相互作用以抑制T细胞活性化(Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B. et al.: PD-L1 interacts specifically with B7-1 to inhibit T cell proliferation. Immunity, 27, 111-122 (2007))。

[0117] 认为PD-1在浸润于癌症组织中的杀伤T细胞及自然杀伤细胞中高度表达,在肿瘤上的PD-L1的作用下免疫应答减弱。当通过抗PD-1抗体来抑制上述由PD-1信号导致的免疫应答的减弱时,能够获得抗肿瘤免疫应答的增强效果。

[0118] 作为免疫检查点抑制剂的其他示例,可以例举PD-L1抑制剂(例如,作为抗PD-L1抗体的阿维鲁单抗(Avelumab)、德瓦鲁单抗(Durvalumab)或阿特珠单抗(Atezolizumab))。

[0119] PD-L1抑制剂通过结合于PD-L1侧来抑制上述PD-1路径,并产生抗肿瘤免疫应答。

[0120] 作为免疫检查点抑制剂的其他示例,可以例举CTLA-4抑制剂(例如,为抗CTLA-4抗体的易普利姆玛(Ipilimumab)或替西木单抗(Tremelimumab))。

[0121] CTLA-4抑制剂以不同于PD-1抑制的路径来使T细胞活性化,并产生抗肿瘤免疫应答。T细胞通过表面的CD28与CD80或CD86相互作用来进行活性化。但是,认为即使为暂时被活性化的T细胞,在表面表达的CTLA-4(细胞毒性T-1淋巴细胞相关抗原4, cytotoxic T-

lymphocyte-associated antigen 4),也以高于CD20的亲和性与CD80或CD86优先进行相互作用,由此抑制活性化。CTLA-4抑制剂通过抑制CTLA-4来防止CD20与CD80或CD86之间的相互作用被抑制,由此产生抗肿瘤免疫应答。

[0122] 在进一步的实施方式中,免疫检查点抑制剂还可将TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3,T细胞免疫球蛋白和粘液蛋白-3)、LAG-3 (lymphocyte activation gene-3,淋巴细胞活化基因-3)、B7-H3、B7-H4、B7-H5 (VISTA)或TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain,具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体)等的免疫检查点蛋白质作为靶标。

[0123] 虽然认为如上所述的免疫检查点抑制对自身组织的免疫应答,但是在病毒等抗原长期存在于生物体内时,在T细胞中免疫检查点也增加。认为就肿瘤组织而言,也成为长期存在于生物体内的抗原,因此通过这些免疫检查点来逃避抗肿瘤免疫,如上所述的免疫检查点抑制剂使这种逃避功能无效化,并发挥抗肿瘤效果。

[0124] 在本发明一个实施方式中提供患有癌症的受试者的对癌症免疫疗法的响应性的预测指标。

[0125] 在本发明中,作为成为对象的癌症,可例举肺癌、非小细胞肺癌、肾(肾细胞)癌、前列腺癌、胃癌、睾丸癌、肝(脏)癌、皮肤癌、食道癌、黑色素瘤、胰腺癌、胰腺癌、骨肉瘤、骨肉瘤、结直肠癌、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)、膀胱癌、喉癌、子宫癌(体部-颈部)、头颈癌、卵巢癌、乳腺癌等,但不限于此。在本发明一个实施方式中提供使用患有肺癌的受试者的TCR多样性作为受试者对癌症免疫疗法的响应性的指标的方法。

[0126] (TCR多样性)

[0127] 基于免疫系统的生物防御机制较大地依赖于主要由T细胞或B细胞提供的特异性免疫。T细胞或B细胞不与自身细胞或分子反应,而是特异性地识别病毒或细菌等外来性病原体来进行攻击。因此,T细胞或B细胞具有如下机制,即,可通过在细胞表面上所表达的受体分子来识别并辨别自身抗原及来源于其他生物的多种抗原。在T细胞中,T细胞受体(T cell receptor,TCR)充当抗原受体。通过来自这些抗原受体的刺激来传递细胞内信号,加剧炎症性细胞因子或趋化因子等的产生,增强细胞增殖,并引发各种免疫应答。

[0128] TCR通过识别与在抗原呈递细胞上表达的主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex,MHC)的肽结合槽相结合的肽(peptide-MHC complex,pMHC),从而在辨别自身与非自身的同时,识别抗原肽(Cell 1994,76,287-299)。TCR为由两个TCR多肽链组成的异二聚体受体分子,并且存在一般的T细胞表达的 $\alpha\beta$ 型TCR及具有特殊功能性 $\gamma\delta$ 型TCR。 α 链及 β 链TCR分子与多个CD3分子(CD3 ζ 链、CD3 ϵ 链、CD3 γ 链、CD3 δ 链)形成复合物,并传递抗原识别后的细胞内信号,以引发各种免疫应答。随着病毒感染,在细胞内增殖的病毒抗原或来自癌症细胞的癌症抗原等内源性抗原,作为抗原肽呈递在MHC I类分子上。并且,来自外来微生物的抗原通过内噬作用被吸收至抗原呈递细胞中,接受加工之后呈递于MHC II类分子上。这些抗原分别通过CD8⁺T细胞或者CD4⁺T细胞表达的TCR来识别。还已知在通过TCR分子的刺激中,CD28、ICOS、OX40分子等共刺激分子是重要的。

[0129] TCR基因由在基因组上编码成不同区的多个V区(可变区,V)、J区(连接区,J)、D区(多变区,D)及C区(恒定区,C)构成。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 链及 γ 链TCR表达由V-J-C形成的基因, β 链及 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来创建多样性, 并通过在V与D或者D与J基因片段之间插入或缺失1个以上的碱基来形成随机氨基酸序列, 以创建多样性更高的TCR基因序列。

[0130] TCR分子与pMHC复合物表面直接结合的区域(TCR足印)包括V区内的富于多样性的互补决定区(complementarity determining region, CDR) CDR1、CDR2及CDR3。其中, CDR3区包括V区的一部分、通过随机序列形成的V-D-J区和J区的一部分, 以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 (framework region, 框架区), 并发挥形成作为TCR分子骨架的结构的作用。在胸腺中的T细胞的分化成熟过程中, β 链TCR最先基因重组, 与pTa分子缔合以形成pre-TCR复合物分子。接着, α 链TCR重组以形成 $\alpha\beta$ TCR分子, 并且当未形成功能性 $\alpha\beta$ TCR时, 在另一 α 链TCR基因等位基因引起重组。已知接受胸腺中的阳性/阴性的选择, 从而选择具有适当亲和性的TCR, 获得抗原特异性 (Annual Review Immunology, 1993, 6, 309-326)。

[0131] T细胞产生对特定抗原具有高特异性的1种TCR。生物体中存在多个抗原特异性T细胞, 从而形成各种TCR库(repertoire), 并且可有效地起到对各种病原体的防御机制。

[0132] 在本说明书中, “TCR多样性”是指某受试者的T细胞受体的库(repertoire)的多样性, 本领域技术人员可使用该领域公知的各种方法进行测定。表示TCR多样性的指数称为“TCR多样性指数”。作为TCR多样性指数, 可利用该领域中公知的任意指数, 可将例如香农-韦弗指数(Shannon-Weaver index)、辛普森指数(Simpson index)、反向辛普森指数(Inverse Simpson index)、标准化香农-韦弗指数(Normalized Shannon-Weaver index)、DE指数(例如, DE50指数、DE30指数或DE80指数)或Unique指数(例如, Unique50指数、Unique30指数、Unique80指数)等多样性指数适用于或用于TCR。

[0133] 一种方法为: 对于试样中的T细胞使用多少各个V链, 利用特定的VB链特异性抗体, 通过流式细胞术分析表达各个VB链的T细胞的比例(FACS分析)。

[0134] 除此之外, 基于自人体基因组序列获得的TCR基因的信息, 研究通过分子生物学技术的TCR库分析。有如下方法, 即, 从细胞试样提取RNA, 合成互补DNA之后, 将TCR基因进行PCR扩增以进行定量的方法。

[0135] 对于从细胞试样的核酸的提取, 可采用诸如RNeasy Plus Universal Mini Kit (QIAGEN)等的本技术领域中公知的工具进行。可利用RNeasy Plus Universal Mini Kit (QIAGEN)从溶解于TRIzol LS试剂中的细胞中进行总RNA的提取及纯化。

[0136] 对于由所提取的RNA合成互补DNA, 可利用Superscript III™ (Invitrogen)等本技术领域中公知的任意逆转录酶来进行。

[0137] 对于TCR基因的PCR扩增, 本领域技术人员可以采用本技术领域中公知的任意聚合酶来适当进行。但是, 在TCR基因这样的变化大的基因的扩增中, 若能够以“非偏向性”扩增, 则为了准确的测定而具有有利的效果。

[0138] 作为用于PCR扩增的引物, 采用了设计多个各个TCR V链特异性引物、通过实时PCR法等分别进行定量的方法, 或者将这些特异性引物同时扩增的方法(Multiple PCR, 多重PCR)法。但是, 即使在对各V链利用内源性控制进行定量的情况下, 如果利用的引物多时也无法正确地分析。此外, 在多重PCR法中存在引物之间的扩增效率之差引起PCR扩增时的偏向性的缺点。为了克服上述多重PCR法的缺点, 鹤田等人报道了衔接子连接(Adaptor-

ligation) PCR法,即,在TCR基因的双链互补DNA的5'末端添加了衔接子之后,通过共同的衔接子引物和C区特异性引物来扩增所有 γ β TCR基因(Journal of Immunological Methods, 1994,169,17-23)。此外,开发出也应用于 $\alpha\beta$ TCR基因的扩增、通过对各个V链特异的寡核苷酸探针进行定量的反向点杂交(Reverse dot blot)法(Journal of Immunological Methods,1997,201,145-15。)或微孔板杂交试验(Microplate hybridization assay)法(Human Immunology,1997,56,57-69)。

[0139] 在本发明的优选实施方式中,如W02015/075939 (Repertoire Genesis Inc.)中所记载,利用由一种正向引物和一种反向引物组成的一组引物在不改变存在频率的情况下扩增包含所有的同型或亚型基因的TCR基因,确定TCR多样性。如下文中的引物设计对非偏向性的扩增有利。

[0140] 着眼于TCR或者BCR基因的基因结构,无需在具有高度多样性的V区中设定引物,通过在其5'末端添加衔接子序列,扩增包含所有V区的基因。上述衔接子为在碱基序列上任意的长度及序列,20碱基对左右为最佳,但可利用从10碱基至100碱基的序列。通过限制酶来除去添加于3'末端的衔接子,通过与20碱基对的衔接子相同序列的衔接子引物以及对为共通序列的C区特异性的反向引物来进行扩增,以扩增所有TCR基因。

[0141] 通过逆转录酶从TCR或BCR基因信使RNA合成互补链DNA,接着合成双链互补DNA。通过逆转录反应或双链合成反应,合成包含不同长度的V区的双链互补DNA,通过DNA连接酶反应,在这些基因的5'末端部添加由20碱基对和10碱基对组成的衔接子。

[0142] 可在TCR的 α 链、 β 链、 γ 链、 δ 链的C区设定反向引物以扩增这些基因。设定于C区的反向引物与TCR的各个C β 、C α 、C γ 、C δ 的序列相一致,且在其他C区序列设定具有不引发的程度的错配(mismatch)的引物。考虑碱基序列、碱基组成、DNA解链温度(T_m)、自身互补序列的有无,最佳地制备C区的反向引物,以便C区的反向引物可与衔接子引物扩增。在除去于C区序列的等位基因序列之间不同的碱基序列之外的区域设定引物,从而可均匀地扩增所有的等位基因。为了提高扩增反应的特异性,进行多个步骤的巢式PCR(nested PCR)。

[0143] 任何引物对于不包含在等位基因序列之间不同的序列的序列,引物候选序列的长度(碱基数)无特别限定,为10~100碱基数,优选为15~50碱基数,更优选为20~30碱基数。

[0144] 利用这种非偏向性的扩增有利于低频率(1/10000~1/100000或为其以下)的基因的鉴定,为优选。

[0145] 通过对以如上所述的方法进行了扩增的TCR基因进行测序,根据所获得的读段数据能够确定TCR多样性。

[0146] 从人体试样对TCR基因进行PCR扩增,利用下一代序列分析技术,由此通过以往的获得小规模且V链使用频率等受限的信息的TCR库分析,能够实现取得克隆水平的更详细的基因信息并进行分析的大规模高效率TCR库分析。

[0147] 对于测序方法,只要能够确定核酸试样的序列即可,没有限定,可利用本技术领域中公知的任意的的方法,但优选采用下一代测序(NGS,next generation sequencing)。作为下一代测序,可以例举焦磷酸测序、边合成边测序(合成测序)、连接(ligation)法测序、离子半导体测序等,但不限于此。

[0148] 通过将所获得的读段数据匹配到包含V、D、J基因的参照序列,可导出独特的读段数,确定TCR多样性。

[0149] 在一个实施方式中,针对每个V、D、J基因区准备所使用的参照数据库。典型地,使用由IMGT公开的每个区、每个等位基因的核酸序列数据组,但不仅限于此,只要是向各序列分配惟一的ID的数据组即可利用。

[0150] 将所获得的读段数据(包含根据需要进行了修整等的适当处理的数据)作为输入序列组,以检索与每个基因区的参照数据库的同源性,记录最接近的参照等位基因以及与其序列的比对。此处,在同源性检索中,除C以外使用错配允许性高的算法。例如,使用通常的BLAST作为同源性检索程序时,对每个区进行设定,如窗口尺寸的缩短、错配处罚的降低、空隙处罚的降低。在最接近参照等位基因的选择中,以同源性得分、校准长度、核心长度(连续一致的碱基序列的长度)、一致碱基数作为指标,根据规定的优选顺序适用于此。对于本发明中使用的V及J已确定的输入序列,以参照V上的CDR3开头及参照J上的CDR3末尾作为记号,提取CDR3序列。通过这些翻译成氨基酸序列,用于D区的分类。在能够准备D区的参照数据库的情况下,将同源性检索结果与氨基酸序列转译结果的组合作为分类结果。

[0151] 通过上述内容,对输入组合中的各序列指定V、D、J的各等位基因。接着,通过计算在整个输入组合中V、D、J的各出现频率、或者其组合的出现频率,来导出TCR库。根据分类所要求的准确性,以等位基因单位或基因名单位计算出现频率。后者可通过将各等位基因转换为基因名来实现。

[0152] 向读段数据指定V区、J区和C区之后,合计匹配的读段,对于独特读段(不具有相同序列的读段),计算在试样中所检测的读段数及总读段数中所占的比例(频率)。

[0153] 使用样品数、读段种类、读段数等数据,利用ESTIMATES或者R(vegan)等统计分析软件,计算多样性指数或者相似性指数。在优选实施方式中,利用TCR库分析软件(Repertoire Genesis Inc.)。

[0154] 可由如上所得的各独特读段的读段数数据求得多样性指数。例如,香农-韦弗指数(Shannon-Weaver index)(也简称为香农指数)、辛普森指数(Simpson index)、标准化香农-韦弗指数(Normalized Shannon-Weaver index)及DE50指数可根据以下数学式计算。N:总读段数, n_i :第i个独特读段的读段数,S:独特读段数, S_{50} :占总读段50%的最佳独特读段的数量。

[0155] [数学式1]

[0156] 辛普森指数(Simpson's index) $(1-\lambda)$

$$[0157] \quad 1-\lambda = 1 - \sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \right)$$

[0158] [数学式2]

[0159] 香农-韦弗指数(Shannon-Weaver index) (H')

$$[0160] \quad H' = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

[0161] [数学式3]

[0162] 标准化香农指数(Normalized Shannon-Weaver index) (H')

$$[0163] \quad H' = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} / \ln N$$

[0164] [数学式4]

[0165] DE50 (D)

$$[0166] \quad D = \frac{S_{50}}{S}$$

[0167] [数学式5]

[0168] Unique50 (U)

[0169] $U = S_{50}$

[0170] 作为其他的多样性的指标,还可使用反向辛普森指数 ($1/\lambda$)、森下的 β 指数、McIntosh的均衡度指数、McNaughton的优势度指数、元村的 $1/\alpha$ 、Fisher的多样性指数、Sheldon的 e^H 、Pielou的均衡度指数、Preston的 $1/\sigma^2$ 、森下的繁荣指数 $N\beta$ 、Pielou的 $H' N$ 等。包括DE50指数的DE指数也可由比例或百分比(%)记载,本领域技术人员可清楚且适当地理解所记载的数值的含义,通过换算阈值等来实施本发明。对于DE指数,可作为占总读段的任意比例(1~99%)的最佳独特读段的数/独特读段数来计算,可用作本发明中的多样性指标。

[0171] 作为DE指数,除了DE50指数以外,可利用基于 S_x ($x=0\sim 100$ 的任意数)的DEX指数代替 S_{50} (占总读段50%的最佳(top)独特读段的数)。还可使用例如利用 S_{30} (占总读段30%的最佳独特读段的数)及 S_{80} (占总读段80%的最佳独特读段的数)的DE30指数及DE80指数。另外,DE指数可利用对读段数进行了标准化的值(例如,对80000个读段、30000个读段、10000个读段等进行了标准化)。

[0172] 另外,还可使用为DE指数的分子的、直接利用 S_x 的Unique X指数。作为Unique指数,例如可例举Unique30、Unique50或Unique80指数等。

[0173] (大规模高效率TCR库分析)

[0174] 在本发明的优选实施方式中,利用大规模高效率TCR库分析来测定TCR多样性。在本说明书中,“大规模高效率库分析”是指记载于W02015/075939(该文献的公开内容根据需要通过引用整体并入本说明书中),对象为TCR的情况下,称为“大规模高效率TCR库分析”。大规模高效率库分析为利用数据库对受试者的库(Repertoire)(T细胞受体(TCR)或B细胞受体(BCR)的可变区)定量地进行分析的方法,该方法包括如下工序:工序(1),提供从上述受试者非偏向性地扩增的、包含T细胞受体(TCR)或B细胞受体(BCR)的核酸序列的核酸试样;工序(2),确定包含在上述核酸试样中的该核酸序列;以及工序(3),基于所确定的该核酸序列,计算各基因的出现频率或其组合,并导出该受试者的库,上述工序(1)包括:

[0175] 工序(1-1),将来自靶细胞的RNA试样作为模板,合成互补DNA;

[0176] 工序(1-2),将上述互补DNA作为模板,合成双链互补DNA;

[0177] 工序(1-3),向上述双链互补DNA添加共通衔接子引物序列,合成衔接子添加的双链互补DNA;

[0178] 工序(1-4),该工序利用上述添加有衔接子的双链互补DNA、由上述共通衔接子引物序列形成的共通衔接子引物以及第一TCR或BCR的C区特异性引物进行第一PCR扩增反应,

其中,上述第一TCR或BCR的C区特异性引物被设计成:对作为上述TCR或BCR的目的的C区具有充分的特异性,且包含与其他基因序列无同源性的序列,且在进行扩增时在下游在亚型之间包含不一致碱基;

[0179] 工序(1-5),为利用工序(1-4)的PCR扩增产物、上述共通衔接子引物、以及第二TCR或BCR的C区特异性引物来进行第二PCR扩增反应的工序,上述第二TCR或BCR的C区特异性引物被设计成:在上述第一TCR的C区特异性引物的序列的下游的序列中具有与上述TCR或BCR的C区完全匹配的序列,但包含与其他基因序列无同源性的序列,并且,被扩增时在下游在亚型间包含不一致碱基;以及

[0180] 工序(1-6),该工序利用工序(1-5)的PCR扩增产物、添加共通衔接子引物(其中上述共通衔接子的核酸序列中包含第一添加的衔接子核酸序列)、以及添加有衔接子的第三TCR的C区特异性引物(其中第二衔接子核酸序列及分子鉴定(MID Tag)序列添加到第三TCR或BCR的C区特异性序列),进行第三PCR扩增反应,其中,上述第三TCR的C区特异性引物被设计成:在上述第二TCR或BCR的C区特异性引物的序列的下游的序列中具有与上述TCR或BCR的C区完全匹配的序列,但包含与其他基因序列无同源性的序列,并且,被扩增时下游亚型间中包含不一致碱基。上述第一添加衔接子核酸序列为适合于向DNA捕捉珠的结合及emPCR反应的序列,上述第二添加衔接子核酸序列为适合于emPCR反应的序列,上述分子鉴定(MID Tag)序列为用于赋予独特性以能够鉴定扩增产物的序列。上述方法的具体内容记载于W02015/075939,本领域技术人员可适当参考该文献及本说明书的实施例等来进行分析。

[0181] 在本发明一个实施方式中,提供利用T细胞的亚群的TCR多样性的方法。在一个实施方式中,作为T细胞,可使用T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性的T细胞。或者,在另一个实施方式中,作为T细胞,可使用T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性的T细胞。例如,可使用选自CD8、PD-1、CD28、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、CD27、CD152(CTLA-4)、CD366(TIM-3)、CD223(LAG-3)、CD272(BTLA)、CD226(DNAM-1)、TIGIT及CD367(GITR)中的一种以上的细胞表面标志物为阳性的T细胞的亚群的TCR多样性。在一个实施方式中,T细胞选自CD8⁺PD1⁺、CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40⁺、CD8⁺TIGIT⁺及CD8⁺CTLA4⁺T细胞。

[0182] 在本说明书中,“T细胞刺激性细胞表面标志物”是指传递使T细胞激活的信号的细胞表面分子。作为“T细胞刺激性细胞表面标志物”的示例,列举有CD28、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)或CD27等,但不限于于此。

[0183] 在本说明书中,“T细胞抑制性细胞表面标志物”是指传递用于抑制T细胞的信号的细胞表面分子。作为“T细胞抑制性细胞表面标志物”的示例,列举有PD-1、CD152(CTLA-4)、CD366(TIM-3)、CD223(LAG-3)、CD272(BTLA)、CD226(DNAM-1)、TIGIT或CD367(GITR)等,但不限于于此。

[0184] 虽不受理论限制,但认为表达这种细胞表面标志物的T细胞亚群的TCR多样性高的原因在于:其亚群中确实存在具有识别癌症组织的表面抗原的TCR,因此通过基于免疫检查点抑制剂进行治疗,容易受益。

[0185] T细胞的亚群例如为CD8⁺T细胞的群。优选为CD8⁺,且为表达一种以上的免疫检查点分子的T细胞亚群,例如,为CD8⁺且选自PD-1、CD28、CD154(CD40L)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、CD27、CD152(CTLA-4)、CD366(TIM-3)、CD223(LAG-3)、CD272(BTLA)、

CD226 (DNAM-1)、TIGIT及CD367 (GITR) 中的一种以上的细胞表面标志物为阳性的T细胞的亚群。在一个实施方式中,T细胞为CD8⁺。在一些实施方式中,可采用T细胞刺激性细胞表面标志物为阳性的T细胞的亚群的TCR多样性、T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性的T细胞的亚群的TCR多样性、或者T细胞刺激性细胞表面标志物及T细胞抑制性细胞表面标志物为阳性的T细胞的亚群的TCR多样性。在一些情况下,T细胞的亚群可以为PD-1⁺T细胞的群。TCR的多样性可按照每个T细胞的亚群确定,在本发明的优选实施方式中,T细胞的亚群为CD8⁺PD-1⁺T细胞的群。在对于适当亚群的TCR多样性用作受试者的医疗状态的指标的情况下,有时可用作更准确的指标。

[0186] 分离T细胞的亚群的方法在本技术领域中公知的,可以使用适当的细胞分选仪(例如,BD FACS Aria III细胞分选仪(BD Bioscience))进行。本领域技术人员可适当利用针对细胞表面标志物(用于区别待分离的亚群)的标记抗体。利用从已分离的亚群中提取的核酸试样以如上所述的方法进行TCR库分析时,可确定对特定的T细胞亚群的TCR多样性。

[0187] 在利用不分级分离特定细胞的方法调查PBMC中的TCR多样性的报告(<https://meetinglibrary.asco.org/record/126066/abstract>)中,报告了如下内容:在不分级分离特定细胞的情况下,无法通过TCR分析显著地严格区别对抗PD-1抗体的见效患者与未见效患者。如本说明书中所证实的那样,特定的细胞集群中的TCR多样性可用于区别对癌症免疫疗法的见效患者与未见效患者这一发现是本领域技术人员无法预料到的。

[0188] T细胞可使用从任何组织取得的T细胞。作为T细胞,例如可从外周血、肿瘤部位、正常组织、骨髓或胸腺等中取得。在优选实施方式中,确定受试者的外周血中的T细胞的TCR多样性。从外周血采取T细胞为非侵入性,并且简单。

[0189] 用于测定TCR的TCR链为 α 链、 β 链、 γ 链和/或 δ 链。在一个实施方式中,使用TCR α 的多样性。在另一个实施方式中使用TCR β 。

[0190] (诊断)

[0191] 对癌症免疫疗法的应答可基于RECIST v1.1 (New response evaluation criteria in solid tumours (新版实体瘤治疗反应评价标准): Revised RECIST guideline (修订后的RECIST指南) (version1.1)) 来确定。

[0192] 癌症治疗的效果可根据肿瘤的尺寸变化等而判定为完全见效 (Complete Response: CR)、部分见效 (Partial Response: PR)、进行疾病 (Progressive Disease: PD) 或稳定疾病 (Stable Disease: SD)。

[0193] 在本说明书中,“见效患者” (Responder) 是指对癌症治疗呈现出完全见效或部分见效的受试者。在本说明书中,“未见效患者” (Non-Responder) 是指对于癌症治疗呈现出进行疾病或稳定疾病的受试者。

[0194] 受试者对癌症治疗的响应性包括受试者为“见效患者”或受试者为“未见效患者”。因此,受试者对癌症治疗的响应性的判定包括判断受试者为见效患者还是未见效患者。

[0195] 本发明的一个方案利用TCR多样性来预测或判定受试者为“见效患者”或受试者为“未见效患者”。判定时期优选为在治疗开始前进行预测,但也可为治疗开始后。其原因在于,判定目前进行中的治疗是否适当也具有医疗上的有用性。或者,也可利用本发明的TCR多样性判定预后。例如,利用本发明的TCR多样性,预测见效患者变为未见效,即复发。此外,作为判定的时期,可在进行了癌症免疫疗法之后(例如,免疫检查点抑制剂的给药后),随时

间经过进行库分析,根据多样性指标判定预后。

[0196] (优选实施方式)

[0197] 以下,说明本发明的优选实施方式。应理解,以下提供的实施方式是为了更好地理解本发明而提供的,本发明的范围不限于以下记载。因此,不言而喻,本领域技术人员可参考本说明书中的记载在本发明的范围内进行适当变更。并且,本发明的以下实施方式可单独使用或者组合使用。

[0198] (响应性的指标)

[0199] 本发明的一个方案中提供一种方法,其使用受试者的T细胞的T细胞受体 (TCR) 多样性作为上述受试者对癌症免疫疗法的响应性、或上述响应性的诊断的指标。此处,TCR多样性被提供作为多样性指数。T细胞可以为外周血中的CD8⁺PD-1⁺。

[0200] 在一方案中,本发明提供用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法,上述方法包括:在体外 (in vitro) 测定上述受试者的T细胞的TCR多样性的工序;以及在上述TCR多样性高的情况下判定上述受试者对癌症免疫疗法的响应性好的工序。或者,在TCR多样性低的情况下,可判定受试者对癌症免疫疗法的响应性差。T细胞可以为外周血中的CD8⁺PD-1⁺ T细胞。

[0201] 进而在其他方案中,本发明提供用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法,其中,包括:从上述受试者获得外周血样品的工序;通过包括大规模高效率TCR库分析的方法测定上述受试者的外周血中的T细胞的TCR多样性的工序;以及在上述TCR多样性高的情况下,判定上述受试者对癌症免疫疗法的响应性好的工序。或者,在TCR多样性低的情况下,可判定受试者对癌症免疫疗法的响应性差。T细胞可以为外周血中的CD8⁺PD-1⁺ T细胞。

[0202] 虽然不希望受理论束缚,但本发明的发明人们发现,受试者的TCR多样性的高度,即多样性指数为较高的值时,与对癌症免疫疗法的更好的响应性相关。尤其是,对于CD8⁺PD-1⁺ T细胞的TCR多样性而言,作为对利用免疫检查点抑制剂、尤其是PD-1抑制剂 (例如,纳武单抗或派姆单抗) 进行的治疗的响应性的有利指标是有用的。

[0203] 利用受试者的香农-韦弗指数 (Shannon-Weaver index)、反向辛普森指数 (Inverse Simpson index)、辛普森指数 (Simpson index)、标准化香农-韦弗指数 (Normalized Shannon-Weaver index)、DEX指数 (X为0~100,例如,DE30指数、DE50指数、DE80指数等)、和/或Unique X (X为0~100,例如,Unique30指数、Unique50指数、Unique80指数等),可将它们的较高值用作对癌症免疫疗法的更好的响应性的指标。

[0204] 虽不受理论限制,但根据本发明的实施例的结果认为:在攻击癌症的CD8⁺ T细胞 (杀伤性T细胞、或细胞毒性T细胞 (CTL)) 群中,不存在具有识别癌症组织表面抗原的TCR、或识别癌症组织表面抗原的TCR较少的情况下,即使抑制了免疫检查点,也几乎无法获得抗肿瘤效果。在TCR多样性高的受试者中,确实存在具有识别癌症组织表面抗原的TCR,因此可认为通过基于免疫检查点抑制剂进行治疗,容易受益。

[0205] 此外,已知癌症由多个细胞群构成,而不是均一的细胞群。认为这些多样化的癌症细胞在每个细胞表达不同的癌症抗原。因此,由本发明的实施例的结果可以预测在抑制癌症细胞时需要识别更多样化的抗原的免疫细胞,并且认为在具有多种T细胞的患者中易于发挥出由免疫检查点抑制药所产生的效果。

[0206] 在本发明一个实施方式中,基于受试者的TCR的香农-韦弗指数 (Shannon-Weaver

index)、反向辛普森指数(Inverse Simpson index)、辛普森指数(Simpson index)、标准化香农-韦弗指数(Normalized Shannon-Weaver index)、DEX指数(X为0~100、例如,DE30指数、DE50指数、DE80指数等)、和/或Unique X(X为0~100、例如,Unique30指数、Unique50指数、Unique80指数等)的值,来确定该受试者对本说明书中记载的任意癌症免疫疗法为见效患者,或确定不是见效患者,或确定是未见效患者,或确定不是未见效患者。

[0207] 在本发明一个实施方式中,可将本说明书中记载的基于多项分析的数值用作阈值。本说明书中记载的阈值仅为示例,本领域技术人员可基于进一步的受试者群中的判定结果来确定并利用进一步的阈值。在本说明书中,还公开了确定阈值的方法,本发明的方法可包括确定阈值的工序,还可使用根据这种方法预先确定的阈值。

[0208] 对于多样性指数的阈值,可通过计算规定数量的见效患者与未见效患者的多样性指数并确定用于鉴别见效患者与未见效患者的数值来设定。作为进行鉴别的数值的确定方法,可列举:利用见效患者群的最小值的方法(将见效患者判定为确实地见效、灵敏度为100%)、利用未见效患者群的最大值的方法(不将未见效患者判定为见效患者、特异性为100%)、或者利用ROC分析的方法(将通过灵敏度和特异性的均衡性进行判定的有效性最大化)。

[0209] 作为其他方法,通过根据非见效组或见效组的数值求出基准范围(基准值),从而基于超过该基准范围的异常值进行鉴别。基准范围例如可以为平均值±标准偏差(SD)或平均值±2SD等范围,其基准范围的上限或下限可设为基准值。在部分情况下,根据非见效组的数值来计算平均值+SD或平均值+2SD等,由此确定阈值。在部分情况下,可根据见效组的数值来计算平均值-SD或平均值-2SD等,由此确定阈值。

[0210] 在多样性指标或阈值受到读段数的影响的情况下,可以举出:进行读段数的标准化处理来设定阈值,或者算出因重采样(再样本化)而不同的读段数中的阈值,使用根据读段数与阈值的回归分析等而获得的预测式(例如,当设定读段数为X、阈值为Y时,可由通式 $Y = aX^b$ 等表示),设定阈值。

[0211] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的香农-韦弗指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验(forward-looking or backward looking clinical trial)来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约3.2~4.4的范围、优选在约3.3~约4.2的范围内进行设定,作为具体的阈值,可以为例如,约3.3、约3.4、约3.5、约3.6、约3.7、约3.8、约3.9、约4.0、约4.1、约4.2等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0212] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的反向辛普森指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约9~约19的范围设定,优选可在约10~约18的范围设定,作为具体的阈值,例如,可以为约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0213] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的辛普森指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约0.86~约0.96的范围设定,优选可在约0.88~约0.94的范围设定,作为具体的阈值,例如可以为约0.86、约0.87、约0.88、约0.89、约0.90、约

0.91、约0.92、约0.93、约0.94、约0.95、约0.96等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0214] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的标准化香农-韦弗指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约0.41~约0.51的范围设定,优选可在约0.42~约0.49的范围设定,作为具体的阈值,例如,可以为约0.42、约0.43、约0.44、约0.45、约0.46、约0.47、约0.48、约0.49等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0215] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的DE50指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约0.0007~约0.0015的范围设定,优选可在约0.0008~约0.0014、约0.0009~约0.0013、约0.0010~约0.0011等的范围内适当地确定,作为具体的阈值,例如,可列举为约0.0007、约0.0008、约0.0009、约0.0010、约0.0011、约0.0012、约0.0013、约0.0014、约0.0015等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0216] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR β 的香农-韦弗指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约3.2~约4.3的范围设定,优选可在约3.4~约4.1的范围设定,作为具体的数值,例如,可列举为约3.4、约3.5、约3.6、约3.7、约3.8、约3.9、约4.0、约4.1等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0217] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR β 的反向辛普森指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,阈值可在约8~32的范围设定,优选可在约10~约30的范围设定,作为具体的数值,例如,可列举为约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0218] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR β 的辛普森指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约0.90~约0.96的范围设定,优选可在约0.92~约0.95的范围设定,作为具体的阈值,例如,可以为约0.90、约0.91、约0.92、约0.93、约0.94、约0.95、约0.96等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0219] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的标准化香农-韦弗指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,阈值可在约0.37~约0.48的范围设定,优选可在约0.38~约0.47的范围设定,作为具体的数值,例如,可列举为约0.38、约0.39、约0.40、约0.41、约0.42、约0.43、约0.44、约0.45、约0.46、约0.47等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0220] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的DE50指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,阈值可在约0.0004~约0.0012的范围设定,优选可在约0.0005~约0.0012的范围设定,作为具体的数值,例如可列举为约0.0005、约0.0006、约0.0007、约0.0008、约0.0009、约0.0010、约0.0011、约0.0012等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0221] 因此,本发明的用于诊断受试者对癌症免疫疗法响应性的方法可包括确认特定阈值的工序,该阈值用于判定上述受试者对癌症免疫疗法的响应性好。对于这种确认方法,可通过进行如实施例等中例示的临床试验、计算多样性指数、根据需要进行统计学处理来确认。

[0222] 对于测定并计算受试者的TCR多样性而得到的如上所述的指数的值,可适当地四舍五入(例如,若为DE50,对小数点以下5位进行四舍五入等),并进行与阈值的比较。考虑到检测限,有效数字可采用2位或1位。

[0223] 此外,可采用根据ROC分析计算的阈值以及来自本说明书的实施例的结果的见效患者组的平均值-SD、平均值-2SD以上作为的数值下限。例如,关于本说明书的实施例中的一部分多样性指数的、见效患者组的平均值-SD如下所示。

[0224] TCR α 的香农-韦弗指数:3.37

[0225] TCR α 的反向辛普森指数:9.83

[0226] TCR α 的标准化香农-韦弗指数:0.422

[0227] TCR α 的DE50指数:0.0013605

[0228] TCR β 的香农-韦弗指数:3.69

[0229] TCR β 的反向辛普森指数:15.84

[0230] TCR β 的标准化香农-韦弗指数:0.433

[0231] TCR β 的DE50指数:0.0009545

[0232] 另外,见效患者组的平均值-2SD如下所示。

[0233] TCR α 的香农-韦弗指数:2.66

[0234] TCR α 的反向辛普森指数:-4.19

[0235] TCR α 的标准化香农-韦弗指数:0.366

[0236] TCR α 的DE50指数:0.0007697

[0237] TCR β 的香农-韦弗指数:3.03

[0238] TCR β 的反向辛普森指数:1.43

[0239] TCR β 的标准化香农-韦弗指数:0.385

[0240] TCR β 的DE50指数:0.0005064

[0241] 阈值(临界值)的设定可采用ROC分析(接受者工作特征分析(Receiver Operating Characteristic analysis))来进行。利用通过ROC分析所确定的临界值,例如,可进行抗PD-1抗体治疗患者的治疗前的效果预测。

[0242] 在ROC分析中,制作ROC曲线,即,以改变临界值时的阳性率作为灵敏度并作为纵轴,并以假阳性率(1-特异性)作为横轴进行制图。设定临界值时,具有如下方法:将与ROC曲线的左上角之间的距离最小的点设为临界值的方法;以及计算距离ROC曲线中的曲线下面积(AUC)成为0.500的斜线最远的点,即(灵敏度+特异性-1),将成为其最大值的点(Youden指数)设为临界值的方法。本说明书中记载的各多样性指标的ROC曲线在图7中示出。基于本说明书的实施例1由Youden指数所计算的临界值在表12中示出,可使用如此例示的数值来作为阈值。

[0243] 在本说明书中,“灵敏度”是指将应判定为阳性的情况准确地判定为阳性的概率,并存在灵敏度高时假阴性减少的关系。当灵敏度高时,对排除诊断(rule out)有用。

[0244] 在本说明书中,“特异性”是指将阴性的情况准确地判定为阴性的概率,并存在特异性高时假阳性减少的关系。当特异性高时,对确定诊断有用。

[0245] 例如,作为TCR α 的香农-韦弗指数的临界值,可使用约3.7;作为TCR α 的反向辛普森指数的临界值,可使用约13;作为TCR α 的标准化香农-韦弗指数的临界值,可使用约0.43;作为TCR α 的DE50指数的临界值,可使用约0.0012;作为TCR β 的香农-韦弗指数的临界值,可使用约3.8;作为TCR β 的反向辛普森指数的临界值,可使用约17;作为TCR β 的标准化香农-韦弗指数的临界值,可使用约0.42;作为TCR β 的DE50指数的临界值,可使用约0.0007。

[0246] 但是,不限于所例示的这些数值,本领域技术人员可基于ROC分析并根据需要的灵敏度和/或特异性来调节阈值。并且,不限于本说明书的实施例中所例示的内容,可使用进一步的有关受试者的信息来进行ROC分析,确定临界值。

[0247] 在一个实施方式中,可预测到在小于这些临界值时则无法期待由抗PD-1抗体产生的高治疗效果。

[0248] 对于多样性指标,可能存在因所取样的量而受到影响的情况。即,一部分TCR多样性指标根据测序的读段数而变动。在利用这种多样性指标的情况下,通过进行与特定读段数对应的标准化,可实现更准确的响应性的评价。对于香农、辛普森、反向辛普森指数而言,认为与读段数无关,几乎为恒定的数值,特别是在为实际的分析水平的1万读段以上时,几乎不受读段数的影响,在这种情况下,并非必须将指数进行标准化。

[0249] DE指数具有通常随着读段数的增加而减少的倾向。认为在受试者之间或在受试者与参照受试者之间测序读段数之差变大时(例如,具有10倍以上的变动时),通过利用对一定的读段数进行标准化而得到的DE指数,可实现更准确的响应性的评价。

[0250] 作为标准化的一个方法,DE指数可近似为在两个对数轴与读段数具有线性关系的那些指标,可基于该关系性来对指数进行标准化。因此,可通过将某读段数处的DE指数与根据线性关系所调节的阈值相比较来进行响应性的评价。

[0251] 作为线性关系的一例,本说明书的实施例中记载的DE指数的阈值与读段数之间的线性关系如下式所示:

[0252] [数学式6]

[0253] DE50、TCR α : $y = 1892.344x^{-0.8239}$

[0254] DE50、TCR β : $y = 993.116x^{-0.8072}$

[0255] DE30、TCR α : $y = 260.0x^{-0.7008}$

[0256] DE30、TCR β : $y = 476.4x^{-0.8032}$

[0257] DE80、TCR α : $y = 4275.6x^{-0.7905}$

[0258] DE80、TCR β : $y = 6151.8x^{-0.8406}$

[0259] (式中,y为阈值,x为读段数)

[0260] 本领域技术人员可利用上述关系来进行标准化。即,通过将基于读段数x所获得的DE指数与上述y相比较来进行响应性的评价。另外,本领域技术人员还能够根据多个测序结果导出新的线性关系用于标准化。

[0261] 另外,对于阈值的线性关系,可视为具有宽度。例如,在以多样性指数的值为纵轴且以读段数为横轴的情况下,可表示成带状。还可以为如下的指标的使用方法:若为其上限以上,则判定为见效者,若为其下限以下,则判定为未见效,若为中间,则按照医生的裁量来

判定给药。对于变动幅度,可利用例如拟合曲线(fitting curve)的95%置信区间,在本说明书的实施例中示出一例。通过如上所述进行计算,可使特异性或灵敏度最大化。

[0262] 另外,作为其他标准化方法,还可根据通过测序所获得的读段,对一定数量的读段进行重采样,并基于所重采样的读段来计算多样性指数,由此进行标准化。重采样可通过从所获得的读段随机取得读段来进行。另外,重采样可进行多次,在这种情况下,可将每次尝试的多样性指数的代表值(中间值、平均值等)用作标准化的多样性指数。

[0263] 对于设为标准化的基准的读段数,没有限制,但可以例如1000、10000、20000、40000、80000、100000或200000等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。在一些实施方式中,使用对30000读段进行了标准化的DE50指数。

[0264] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的对30000读段进行了标准化的香农-韦弗指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约2.8~4.1的范围设定,优选可在约3.9~约4.1的范围设定,作为具体的阈值,可以例如约2.8、约2.9、约3.0、约3.1、约3.2、约3.3、约3.4、约3.5、约3.6、约3.7、约3.8、约3.9、约4.0、约4.1等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0265] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的对30000读段进行了标准化的反向辛普森指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约8~约16的范围设定,优选可在约13~约15的范围设定,作为具体的阈值,可以例如约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0266] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的对30000读段进行了标准化的辛普森指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约0.89~约0.94的范围设定,优选可在约0.92~约0.94的范围设定,作为具体的阈值,可以例如约0.89、约0.90、约0.91、约0.92、约0.93、约0.94等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0267] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的对30000读段进行了标准化的标准化香农-韦弗指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约0.41~约0.54的范围设定,优选可在约0.50~约0.52的范围设定,作为具体的阈值,可以例如约0.41、约0.42、约0.43、约0.44、约0.45、约0.46、约0.47、约0.48、约0.49、约0.50、约0.51、约0.52、约0.53、约0.54等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0268] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的对30000读段进行了标准化的DE50指数(%)为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约0.36~约0.40等的范围适当确定,作为具体的阈值,可列举例如约0.36、约0.37、约0.38、约0.39、约0.40等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0269] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR β 的对30000读段进行了标准化的香农-韦弗指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前

瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约3.2~约4.0的范围设定,优选可在约3.7~约3.9的范围设定,作为具体的数值,可列举例如约3.2、约3.3、约3.4、约3.5、约3.6、约3.7、约3.8、约3.9、约4.0等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0270] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR β 的对30000读段进行了标准化的反向辛普森指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,阈值可在约10~23范围设定,优选可在约12~约22的范围设定,作为具体的数值,可列举例如约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0271] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR β 的对30000读段进行了标准化的辛普森指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,可通过对对象患者进行前瞻性或回顾性临床试验来确定阈值,在一具体实施方式中,阈值可在约0.90~约0.97的范围设定,优选可在约0.92~约0.96的范围设定,作为具体的阈值,可以为例例如约0.90、约0.91、约0.92、约0.93、约0.94、约0.95、约0.96、约0.97等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0272] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的对30000读段进行了标准化的标准化香农-韦弗指数为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,阈值可在约0.42~约0.53的范围设定,优选可在约0.47~约0.52的范围设定,作为具体的数值,可列举例如约0.42、约0.43、约0.44、约0.45、约0.46、约0.47、约0.48、约0.49、约0.50、约0.51、约0.52、约0.53等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0273] 在一个实施方式中,当受试者的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α 的对30000读段进行了标准化的DE50指数(%)为阈值以上时,表示上述受试者为见效患者,阈值可在约0.22~约0.26的范围设定,优选可在约0.23~约0.25的范围设定,作为具体的数值,可列举例如约0.22、约0.23、约0.24、约0.25、约0.26等(还可使用这些特定的数值之间的其他任意的特定的数值)。

[0274] 对于进行了标准化的多样性指数,可使用与如上所述相同地基于ROC分析所计算的阈值,例如,对于对30000读段进行了标准化的多样性指数,可使用本说明书中例示的阈值。

[0275] 例如,作为TCR α 的对30000读段进行了标准化的香农-韦弗指数的临界值,可使用约3.9;作为TCR α 的对30000读段进行了标准化的反向辛普森指数的临界值,可使用约14;作为TCR α 的对30000读段进行了标准化的辛普森指数的临界值,可使用约0.92;作为TCR α 的对30000读段进行了标准化的标准化香农-韦弗指数的临界值,可使用约0.51;作为TCR α 的对30000读段进行了标准化的DE50指数的临界值,可使用约0.39;作为TCR β 的对30000读段进行了标准化的香农-韦弗指数的临界值,可使用3.8;作为TCR β 的对30000读段进行了标准化的反向辛普森指数的临界值,可使用约22;作为TCR β 的对30000读段进行了标准化的辛普森指数的临界值,可使用约0.95;作为TCR β 的对30000读段进行了标准化的标准化香农-韦弗指数的临界值,可使用约0.51;作为TCR β 的对30000读段进行了标准化的DE50指数的临界值,可使用约0.24。

[0276] 另外,临界值可根据目的进行调节并选择,例如,可根据(i)排除未见效患者(社会

保障费用的观点)、或(ii)消除见效患者的遗漏(医生·治疗的观点)这样的目的来确定。为了目的(i),可通过将高于未见效患者的最高线的值设为临界值来实现,为了目的(ii),可通过将低于见效患者最低线的值设为临界值来实现。这些值可由本领域技术人员基于受试者群的多样性指数来确定,或基于记载于本说明书中的、非应答及应答受试者所呈现的多样性指数的最大值或最小值的示例,设定阈值。

[0277] 通常,生物标志物成为具有偏差的数据,进行比较的两组很少能够清楚地分离。通常,能够根据多个数据设定正常值的阈值、并以此为基准判别是否为异常值时,则可用作标志物,例如,关于Keytruda(PD-L1抗体)的适用,将PD-1高阳性设为标志物,但实际的见效率为50%左右。作为标志物,即使无法100%的预测,也充分具有价值,因此,灵敏度·特异性均能够以100%进行两组分离的标志物(例如,TCR多样性的DE50指数)是非常有利的。

[0278] 在一个优选实施方式中,TCR为TCR α 。在另一优选实施方式中,TCR为TCR β 。为TCR β 时更优选。虽然不希望受理论束缚,但其原因在于,TCR β 的多样性指数在响应性受试者和非响应性受试者所显示的数值中不存在重复。但是,本发明不限于此,还可以为TCR α 。虽然不希望受理论束缚,但其原因在于,例如,显示出可通过使用DE50指数来严加区别。

[0279] 在一个实施方式中,本发明中利用的多样性可采用下述工序算出,即,从受试者的外周血样品分析CD8⁺PD-1⁺T细胞的工序,以及测定、确定或计算CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR多样性的工序。

[0280] 本发明一个实施方式为用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法,其中,包括在上述TCR多样性高的情况下,判定上述受试者对癌症免疫疗法的响应性好的工序。

[0281] 优选地,此处计算的TCR多样性在利用本说明书中详细描述的大规模高效率TCR库分析(WO2015/075939)时是有利的。虽然不希望受理论束缚,但在利用其他TCR库分析的情况下,无法检测一部分的可利用大规模高效率TCR库分析检测的独特读段。因此,通过大规模高效率TCR库分析计算的多样性指数更加精细,更加准确地反映受试者的状态。并且,虽然不希望受理论束缚,但实际上认为,大规模高效率TCR库分析中的多样性指数能清楚地辨别见效患者和未见效患者,而相对于此,采用现有的大规模高效率TCR库分析以外的库分析无法充分进行见效或者和未见效患者之间的辨别。因此,在使用利用大规模高效率库分析所测定的TCR多样性时,能够得到比现有分析更准确的评价结果。

[0282] 在本发明的用于诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性的方法中,通过包括大规模高效率TCR库分析的方法测定受试者的T细胞的TCR多样性之后,在上述TCR多样性高的情况下,判定上述受试者对癌症免疫疗法的响应性好。对于TCR多样性是否高,可相对地判定,或者与预先确定的多样性指数的阈值(例如,本说明书中所记载的阈值)对比来判定多样性是否高。并且,在多样性指数高的情况下,判断为对癌症免疫疗法的响应性好或具有响应性,并且可根据适当需要进行其后的治疗。可使用的T细胞可以为本说明书中记载的任意种类的一个或多个T细胞,优选为外周血中的CD8⁺PD-1⁺T细胞。

[0283] 本发明的进一步实施方式为诊断受试者对癌症免疫疗法的响应性并治疗上述受试者的癌症的方法(所谓伴随诊断或伴随治疗),其中,包括:测定受试者的T细胞的TCR多样性的工序;以及当上述TCR多样性高于基准值时,对上述受试者施用癌症免疫疗法的工序。本领域技术人员可基于本说明书的记载来适当确定TCR多样性的基准值或阈值,其具体的多样性指数的数值例示于本说明书中,可适当利用。可使用的T细胞为本说明书中记载的任

意种类的一种或多种T细胞,优选T细胞为外周血中的CD8⁺PD-1⁺T细胞。

[0284] (免疫检查点抑制剂的伴随用途)

[0285] 在本发明的进一步的方案中,本发明提供一种包含免疫检查点抑制剂的组合物,其用于对T细胞的TCR多样性高的受试者治疗癌症。向T细胞的TCR多样性高的受试者给药时,这种免疫检查点抑制剂是有利的,这由本发明的发明人们发现。并且,对T细胞的TCR多样性低的受试者可判定为未见效患者,还可判定为不给与免疫检查点抑制剂、或者中断或中止给与。测定TCR多样性的T细胞可以为本说明书中记载的任意种类的一种或多种T细胞,优选为外周血中的CD8⁺PD-1⁺T细胞。

[0286] 本发明的组合物优选为药物组合物,作为其有效成分所包含的免疫检查点抑制剂,例如可列举PD-1抑制剂。作为PD-1抑制剂,可列举为抗PD-1抗体的纳武单抗或派姆单抗。

[0287] 组合物可配制成任意的剂型,如气溶胶、液剂、浸膏剂、酏剂、胶囊剂、颗粒剂、丸剂、软膏、粉剂、片剂、溶液、悬浮液、乳液等。组合物可包含本技术领域中公知的任意药学上可接受的添加物和/或赋形剂。

[0288] 本发明的组合物可通过由本领域技术人员确定的任意的适当路径来进行给药,但不仅限于此,可列举静脉注射、静脉滴注、经口给药、胃肠外给药、透皮给药等。

[0289] 在一个实施方式中,提供一种组合物,用于对T细胞的TCR的香农指数、辛普森指数、标准化香农指数或DE50指数高的受试者治疗癌症。在优选实施方式中,提供用于对T细胞的TCR的DE50指数高的受试者治疗癌症的组合物。

[0290] 本发明提供一种组合物,对于外周血中的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR α ,对已标准化为30000读段的DE50指数为0.39%以上的受试者治疗癌症。

[0291] 本发明提供一种组合物,对于外周血中的CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR β ,对已标准化为30000读段的DE50指数为0.24%以上的受试者治疗癌症。

[0292] (大规模高效率TCR库分析的新用途)

[0293] 在一方案中,提供一种方法,其使用通过包括大规模高效率TCR库分析的方法所确定的库的多样性用作受试者对治疗的响应性的指标。在上述方法中,利用包含一种正向引物和一种反向引物的一组引物,在不改变存在频率的情况下对包含所有同种型或亚型基因的TCR基因或BCR基因进行扩增,从而确定库的多样性。如本说明书中所记载,又如W02015/075939中所记载,上述引物设计对非偏向性的扩增是有利的。

[0294] 在利用其它库分析的情况下,无法检测一部分的能够用大规模高效率库分析检测的独特读段。因此,通过大规模高效率库分析计算的多样性指数更精细,并更加准确地反映受试者的状态。并且,虽然不希望受理论束缚,但实际上认为,大规模高效率库分析中的多样性指数可清楚地辨别对治疗的见效患者和未见效患者,而相对于此,利用现有的大规模高效率库分析以外的库分析无法充分进行对上述治疗的见效患者和未见效患者之间的辨别。

[0295] 在一个实施方式中,靶向治疗为与免疫应答相关的治疗。在另一优选实施方式中,利用的库分析为TCR库分析。

[0296] (注释)

[0297] 在本说明书中,“或”在可采用文中列举的项目中的“至少一个(种)以上(至少一个

(种)或更多个(种))”时使用。“或者”也相同。在本说明书中明确记载为“两个值”的“范围内”时,其范围内包含两个值本身。

[0298] 对于本说明书中所引用的科学文献、专利、专利申请等参考文献,以与分别具体记载时相同的程度作为参考将其全文援用至本说明书中。

[0299] 以上,为了便于理解示出优选实施方式对本发明进行了说明。以下,基于实施例来说明本发明,但上述的说明及以下的实施例仅以例示的目的,其目的不是用于限定本发明。因此,本发明的范围仅限于权利要求,而限于本说明书中具体描述的实施方式或实施例。

[0300] 实施例

[0301] 以下,描述实施例。必要时,在以下实施例中,所有实验都根据兵庫医科大学伦理委员会批准的指南进行。并且,按照文部科学省・厚生劳动省・经济产业省制订的“关于以人类为对象的医学系研究的伦理指南”(平成26年12月22日26文科振第475号厚生劳动省发科1222第1号医政发1222第1号)的指南进行。并且,以人类基因分析研究的伦理指南为基准。实验是在经兵庫医科大学伦理委员会的审查后经批准进行的。对于试剂种类,具体而言使用了实施例中记载的产品,但还可用其他制造商(美国西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)、日本和光纯药公司、日本半井公司(Nakarai)、美国安迪生物(R&D Systems)、USCN Life Science INC等)的同等产品代替使用。

[0302] (实施例1:接受抗PD-1抗体治疗的患者的TCR多样性)

[0303] (1.材料与方法)

[0304] 1.1.外周血单个核细胞(PBMC)的分离

[0305] 在12例的肺癌患者的抗PD-1抗体(纳武单抗(nivolumab)、欧狄沃(Opdivo))治疗开始之前,采取了8mL全血置于含肝素的采血管。对于全血,通过利用葡聚糖泛影葡胺(Ficoll-Hypaque)的比重离心来分离PBMC,通过血细胞计数器计算了细胞数。将所分离的PBMC直接进行免疫细胞染色或者悬浮于细胞用冻存液STEM-CELLBANKER中,并保存在液氮中。

[0306] 1.2.利用抗CD8抗体及抗PD-1抗体的双重染色

[0307] PBMC按照下述的顺序进行了免疫染色。

[0308] 1.为了除去STEM-CELLBANKER,将冷冻保存的细胞悬浮于染色缓冲液(Stain Buffer)(PBS、0.1%BSA、0.1%的叠氮化钠(Sodium Azide))中,通过离心后弃去上清液从而进行两次清洗。

[0309] 2.使新鲜或者保管的PBMC以 1×10^6 /管的方式悬浮于染色缓冲液中,并以1000rpm于4℃离心5分钟。

[0310] 3.在100μL的抗体稀释液(5μl/测试抗人CD8抗体、2.0μg抗人PD-1抗体)中、在室温、遮光的条件下对细胞染色30分钟。

[0311] 4.抗体染色后,悬浮于2mL的染色缓冲液中之后,以1000rpm于4℃离心5分钟后,除去上清液,进行两次清洗。

[0312] 5.清洗后,浆细胞悬浮于100μL的染色缓冲液中,添加5μL的7-AAD,在遮光、室温的条件下反应了10分钟。

[0313] 6.在细胞中加入500μL的染色缓冲液,进行了过滤。

[0314] 7.经染色细胞利用BD FACSAria III细胞分选仪(美国碧迪生物科技(BD

Bioscience)),对7AAD-CD8⁺PD-1⁺细胞群进行分选分离。

[0315] 8.所分选的细胞移入1.5mL的微量离心管(Eppendorf tube),以1000rpm于4℃进行离心5分钟。

[0316] 9.留下50μL上清液并除去染色缓冲液之后,加入750μL的TRIzol LS试剂(Invitrogen)进行移液,由此使细胞溶解。

[0317] 10.在所溶解的TRIzol液中补充200μL的DEPC水,调节至1000μL之后,通过漩涡混合器(Vortex)混合后,于-80℃冷冻保存。

[0318] 1.3.RNA提取

[0319] 利用RNeasy Plus Universal Mini Kit(QIAGEN),从溶解于TRIzol LS试剂的细胞中提取总RNA并纯化。利用Nanodrop分光光度计(美国赛默飞世尔公司(Thermo Scientific))或者TapeStation2200(美国安捷伦公司(Agilent))对所纯化的RNA进行了定量。

[0320] 1.4.互补DNA及双链互补DNA的合成

[0321] 为了使用所提取的RNA合成互补DNA,而将1.25μL的BSL-18E引物(表1)与3.75μL的RNA混合,并于70℃退火8分钟。

[0322] [表1]

[0323] 表1引物序列

引物	序列
BSL-18E	AAAGCGGCCGCATGCTTTTTTTTTTTTTTTVN (序列号1)
P20EA	TAATACGACTCCGAATTCCC(序列号2)
P10EA	GGGAATTCGG(序列号3)
P22EA-ST1-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTAAT ACGACTCCGAATTCCC(序列号4)
CA1	TGTTGAAGGCGTTTGCACATGCA(序列号5)
CA2	GTGCATAGACCTCATGTCTAGCA(序列号6)
CA-ST1-R	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGG GTCAGGGTTCTGGA(序列号7)
CB1	GAACTGGACTTGACAGCGGAACT(序列号8)
CB2	AGGCAGTATCTGGAGTCATTGAG(序列号9)
CB-ST1-R	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTC AAACACAGCGACCTC(序列号10)

[0325] 在冰上冷却之后,在以下组成中在RNase抑制剂(RNasin)的存在下进行了逆转录反应,合成了互补DNA。

[0326] [表2]

[0327]

cDNA 的合成		
试剂	容量 (μL)	最终浓度
RNA 溶液	3.75	
200μM BSL-18E	1.25	50μM
	总计 5	70°C、8 分钟
5 × 第一链缓冲液	2	50mM 的 Tris-HCl, pH8.3, 75mM 的 KCl, 3mM 的 MgCl ₂
0.1M 的 DTT	1	10mM
10mM 的 dNTPs	0.5	500μM
RNasin (Promega)	0.5	2U/μL
Superscript III TM , 200 U/μL (Invitrogen)	1	20U/μL
	总计 10	50°C, 1 小时

[0328] 接着,在以下双链DNA合成缓冲液中,在存在大肠杆菌DNA聚合酶(E.coli DNA polymerase) I、大肠杆菌DNA连接酶(E.coli DNA Ligase)、RNase H的条件下,在16°C温度下保温2小时,合成双链互补DNA。此外,在16°C温度下,使T4 DNA聚合酶反应5分钟,进行了5'末端平端化反应(blunting reaction)。

[0329] [表3]

[0330]

双链互补 DNA 的合成		
试剂	容量 (μL)	最终浓度
互补 DNA 反应溶液	9	
无菌水	46.5	
5 × 第二链缓冲液	15	25mM 的 Tris-HCl, pH7.5, 100mM 的 KCl, 5mM 的 MgCl ₂ , 10mM 的 (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.15mM 的 β-NAD ⁺ , 1.2mM 的 DTT
10mM 的 dNTPs	1.5	0.2mM
大肠杆菌 DNA 连接酶, 10U/μL (Invitrogen)	0.5	0.067U/μL
大肠杆菌 DNA 聚合酶, 10 U/μL (Invitrogen)	2	0.27U/μL
RNase H, 2 U/μL (Invitrogen)	0.5	0.013U/μL
	总计 75μL	16°C, 2 小时
T4 DNA 聚合酶, 5 U/μL (Invitrogen)	1	0.067U/μL
		16°C, 5 分钟

[0331] 双链DNA通过MiniElute Reaction Cleanup Kit(QIAGEN)进行了柱纯化之后,在以下的T4连接酶缓冲液中,在P20EA/10EA衔接子(表4)及T4连接酶存在的条件下,在16°C温度下彻夜孵育,进行连接反应(ligation reaction)。

[0332] [表4]

[0333]	衔接子添加反应		
	试剂	容量 (μL)	最终浓度
	双链互补DNA溶液	14	
	1 × 快速连接反应缓冲液 (NEB)	25	66mM 的 Tris-HCl, pH7.6, 10mM 的 MgCl ₂ , 1mM ATP, 7.5 % PEG6000, 1mM 的 DTT
	50μM的P20EA/10EA 衔接子	10	10μM
	快速连接酶 (Quick Ligase), 2000U/μL (NEB)	1	40U/μL
		总计25	室温, 30分钟

[0334] 对于与上述相同地通过柱进行了纯化的添加衔接子的双链DNA, 利用Not I限制酶 (50U/μL, Takara) 以下述组成进行了消化, 从而除去添加于3'末端的衔接子。

[0335] [表5]

[0336]	限制酶处理		
	试剂	容量 (μL)	最终浓度
	互补的双链DNA溶液	34	
	10 × H 限制酶缓冲液	5	50mM 的 Tris-HCl, pH7.5, 10mM 的 MgCl ₂ , 1mM, 1mM 的 DTT, 100mM 的 NaCl
	0.1 % BSA	5	0.01 %
	0.1 % Triton X-100	5	0.01 %
	Not I, 50U/μL (Takara)	1	1U/μL
		总计50	37°C, 2小时

[0337] 此外, 消化时间可适当变更。

[0338] 1.5. PCR

[0339] 如表2所示利用的共通衔接子引物P20EA和C区特异性引物 (CG1、CK1或CL1), 从双链互补DNA进行了第一次PCR扩增。PCR以如下所示的组成将95°C温度下20秒、60°C温度下30秒、72°C温度下1分钟的循环进行了20个循环。

[0340] [表6]

[0341]	第一次PCR扩增反应组成		
		容量 (pL)	最终浓度
	2 × KAPA HiFi Ready mix (KAPA Biosystems)	10	
	10mM的P20EA引物	0.2	100nM
	10mM的CA1或CA2引物	0.2	100nM
	双链互补DNA	2	
	无菌水	7.6	

[0342] 接着, 利用第一次PCR扩增产物, 使用P20EA引物和C区特异性引物 (CA2或CB2), 以如下所示的反应组成进行了第二次PCR。PCR以如下所示的组成将95°C温度下20秒、60°C温度下30秒、72°C温度下1分钟的循环进行了20个循环。

[0343] [表7]

第二次PCR扩增反应组成		
	容量 (pL)	最终浓度
2 × KAPA HiFi Ready mix (KAPA Biosystems)	10	
[0344] 10mM P20EA引物	1	500nM
10mM CA2或CB2引物	1	500nM
第一次PCR扩增产物	2	
无菌水	6	

[0345] 利用Agencourt AMPure XP(美国贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))对所得的第二次PCR扩增产物10μL进行了扩增产物的纯化。将最终洗脱液30μL中的5μL作为模板，进行了Tag添加PCR。在扩增中，如图1所示利用了的P22EA-ST1-R和mCG-ST1-R、mCK-ST1-R或mCL-ST1-R引物。PCR循环将95℃温度下20秒、60℃温度下30秒、72℃温度下1分钟进行了20个循环。

[0346] [表8]

Tag PCR扩增反应组成		
	容量 (μL)	最终浓度
2 × KAPA HiFi Ready mix (KAPA Biosystems)	10	
[0347] 10mM的P22EA-ST1-R引物	0.4	200nM
10mM的CA-ST1-R或mCB-ST1-R的引物	0.4	200nM
第二次PCR纯化产物	5	
无菌水	4.2	

[0348] 利用Agencourt AMPure XP(美国贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))对所得的Tag PCR扩增产物10μL进行了扩增产物的纯化。将最终洗脱液30μL中的2μL作为模板，利用Nextera XT Index Kit v2 SetA(美国衣露米娜公司(Illumina))附加INDEX。PCR循环将95℃温度下20秒、55℃温度下30秒、72℃温度下30秒进行了12个循环。为了确认PCR扩增，用2%琼脂糖凝胶电泳确认了10μL的扩增产物。利用Qubit 2.0荧光计(Fluorometer)(美国赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific))来对所得的INDEX化PCR扩增产物进行定量，稀释至适当浓度之后，利用MiSeq测序仪(美国衣露米娜公司(Illumina))进行了测序。序列装置的操作及顺序基于MiSeq使用说明书及手册。

[0349] 对于根据序列所获得的Fastq数据，利用Repertoire Genesis公司的库分析软件(Repertoire Genesis)，进行了已知的参考序列与V、D、J及C区的对照及CDR3氨基酸序列的确定。将序列相同的作为独特读段，通过对其复制数进行计数来求得占整体的比例。

[0350] 1.6. 多样性指数的计算

[0351] 根据所获得的各独特读段的读段数数据求得多样性指数。根据下式计算香农-韦弗指数(Shannon-Weaver index)、辛普森指数(Simpson index)、反向辛普森指数(Inverse Simpson index) (1/λ) 及DE50指数。N:总读段数、n_i:第i个独特读段的读段数、S:独特读段

数、 S_{50} : 占总读段的50%的最佳独特读段的数量

[0352] [数学式7]

[0353] 辛普森指数 (Simpson's index) ($1-\lambda$)

$$[0354] \quad 1-\lambda = 1 - \sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \right)$$

[0355] [数学式8]

[0356] 香农-韦弗指数 (Shannon-Weaver index) (H')

$$[0357] \quad H' = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

[0358] [数学式9]

[0359] 标准化香农-韦弗指数 (Normalized Shannon-Weaver index) (H')

$$[0360] \quad H' = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} / \ln N$$

[0361] [数学式10]

[0362] DE50 (D)

$$[0363] \quad D = \frac{S_{50}}{S}$$

[0364] 计算是作为Repertoire Genesis公司的分析服务器中库分析程序的分析程序的一部分来实施的 (<http://www.repertoire.co.jp/>)。除此之外,还针对使用 S_{30} (占总读段的30%的最佳独特读段的数量)及 S_{80} (占总读段的80%的最佳独特读段的数量)来代替 S_{50} (占总读段的50%的最佳独特读段的数)的DE30指数及DE80指数、直接利用S部分的Unique指数,进行了计算。

[0365] (2. 结果)

[0366] 2.1. 临床评价

[0367] 在抗PD-1抗体治疗开始前及治疗后3个月后,进行患者胸部CT或者PET图像诊断,并基于肿瘤量的形态评价及肿瘤量的变化来评价治疗效果(图1)。一部分患者的效果判定结果(完全见效、部分见效、稳定疾病、进行疾病)及主要治疗过程在表9中示出。一部分患者的胸部CT图像在图2中示出。图2中所示的4例中的2例患者在治疗后三个月的时刻被判定为部分见效(PR),其他2例被判定为未见效。

[0368] [表9]

[0369] 表9肺癌患者与治疗过程

[0370]

患者	分类	判定效果	治疗过程
1	未见效患者	SD	多发转移至两肺，气管内有肿瘤
2	见效患者	PR	左肺有两个转移灶，在胸椎有骨转移，3个月后左肺两个转移灶消失，胸椎转移灶的FDG减少一半
3	未见效患者	SD	纵隔淋巴结转移
4	见效患者	PR	向第七肋骨骨转移，右第七肋骨的FDG积聚减少
实体瘤治疗效果的判定：按照观察到效果的顺序，完全见效（CR）→部分见效（PR）→稳定疾病（SD）→进行疾病（PD）			

[0371] 2.2.FACS分选

[0372] 利用在12例肺癌患者治疗前所采取的PBMC进行FACS分析。PBMC利用PE-Cy7标记抗人CD8抗体及FITC标记抗PD-1抗体进行了染色。通过FSC/SSC设门 (FSC/SSC gating) 除去淋巴细胞级分,进一步通过7AAD除去死细胞。利用FACS Aria III细胞分选仪收集7AAD⁻CD8⁺PD-1⁺T细胞,溶解于TRIzol LS RNA提取试剂中。图3中示出FACS分析的结果的一部分。示出了基于FSC/SSC的淋巴细胞门 (Lymph gate) (上图) 及CD8抗体及PD-1抗体的双重染色 (下图)。对于淋巴细胞级分,通过FACS分选从而分取7AAD⁻CD8⁺PD-1⁺细胞级分 (P3) (图3)。

[0373] 对于每个患者的CD8⁺PD-1⁺细胞占淋巴细胞的比例及CD8⁺PD-1⁺细胞占CD8⁺T细胞的比例,在抗PD-1抗体治疗见效患者 (n=6) 与未见效患者 (n=6) 之间进行了比较 (图4)。前者显示出未见效患者比见效患者高的倾向,另一方面,后者未呈现明显差异。

[0374] 2.3.CD8⁺PD-1⁺T细胞的TCR库分析

[0375] 利用通过FACS分选所回收的CD8⁺PD-1⁺T细胞,根据方法中所记载的方法,通过下一代测序仪确定TCR基因的全部碱基序列。通过FACS分选所回收的细胞数及RNA量如表10所示。由各样品获得的TCR读段数、所指定的 (assigned) 读段数、框内 (In-frame) 读段数及独特读段数如表11所示。

[0376] [表10]

[0377] 表10从肺癌患者所获得的CD8⁺PD-1⁺细胞数与RNA量

[0378]

患者	%CD8+PD-1+	CD8+PD-1+细胞数	RNA (ng)
1	8.63	54000	121.5
2	8.00	12000	27
3	9.04	12000	27
4	7.80	13000	29.25
5	7.17	40500	91
6	6.49	6000	14
7	11.54	11000	25
8	12.08	24000	54
9	7.38	10500	24
10	9.10	11000	25

11	9.52	22500	51
12	17.28	57000	128

[0379] [表11]

[0380] 表11所获得的TCR读段数

[0381]

No.	TCR α				TCR β			
	总读段数	指定的读段数	框内读段数	独特读段数	总读段数	指定的读段数	框内读段数	独特读段数
1	192256	165832	149153	7578	173419	136768	134157	5034
2	217649	185372	171316	7448	222284	161939	159984	6181
3	167936	151540	113273	6367	402088	246329	241973	12611
4	207228	149670	136036	9783	386463	323689	305501	19545
5	162478	147399	130215	5113	206399	158466	150697	10195
6	93244	90810	90049	1702	138594	110899	109722	3467
7	91827	81083	59873	2229	104549	80042	73299	4524
8	185656	165973	143218	12362	226485	146742	141974	12147
9	148281	142782	139427	7330	236182	179662	173067	12207
10	214686	198246	163682	7547	246771	210379	207223	10067
11	126241	111935	109890	7389	247806	143189	136428	12755
12	163409	146095	140299	6079	244657	173443	167549	10808

[0382] 所获得的TCR读段数与独特读段数在4个未见效患者中最多,并且未发现TCR读段数或者独特读段数与治疗效果之间的关联性。

[0383] 2.4. 利用多样性指标的治疗患者之间的CD8⁺PD-1⁺T细胞的多样性的比较

[0384] 为了在抗PD-1抗体治疗患者之间比较CD8⁺PD-1⁺T细胞的多样性,利用根据12例的肺癌患者试样测序的TCR读段数据,计算多样性指标并进行比较。利用每个独特读段与其读段数(复制数),根据方法中记载的数学式计算多样性指标。在多样性指标中,使用香农-韦弗指数、标准化香农-韦弗指数、辛普森指数、反向辛普森指数及DE50指数(图5及图6)。对于显著性差异检验,采用非参数的曼-惠特尼检验(双尾检验)。在TCR α 链中,与未见效患者相比,在见效患者中香农-韦弗指数显示出显著高的值(平均值 $\pm$ 标准偏差,未见效患者vs. 见效患者, 2.796 ± 0.9519 vs. 4.081 ± 0.7124 , $P=0.0411$)。相同地,标准化香农-韦弗指数、反向辛普森指数及DE50的多样性指标分别为 0.3327 ± 0.1018 vs. 0.4771 ± 0.05547 ($P=0.0260$)、 7.530 ± 4.906 vs. 23.85 ± 14.02 ($P=0.0152$)、 0.0006220 ± 0.0003472 vs. 0.001951 ± 0.0005909 ($P=0.0022$),与未见效患者相比,在见效患者中均显示出显著高的值。另外,相同地,在TCR β 链中,与未见效患者相比,所有指标均在见效患者中显示出显著高的值。平均值 $\pm$ 标准偏差分别为 3.129 ± 0.6742 vs. 4.345 ± 0.6555 , $P=0.0087$ (香农-韦弗指数)、 0.3528 ± 0.0612 vs. 0.4815 ± 0.04832 , $P=0.0087$ (标准化香农-韦弗指数)、 8.198 ± 3.551 vs. 30.25 ± 14.41 , $P=0.0087$ (反向辛普森指数)、 0.0003910 ± 0.00007243 vs. 0.001403 ± 0.0004480 , $P=0.0022$ (DE50)。从这些结果可知,关于CD8⁺PD-1⁺T

细胞的多样性,与未见效患者相比,见效患者显著更高。

[0385] 2.5.临界值的设定

[0386] 为了进行抗PD-1抗体治疗患者的治疗前效果预测,利用ROC分析(Receiver Operating Characteristic analysis)进行了各多样性指标的临界值的设定。在ROC分析中,制作了ROC曲线,其以使临界值变化时的阳性率作为灵敏度来作为纵轴,以假阳性率(1-特异性)作为横轴进行制图。在设定临界值时,具有如下方法:将与ROC曲线的左上角之间的距离最小的点设定为临界值的方法;以及计算距离ROC曲线中的曲线下面积(AUC)成为0.500的斜线最远的点、即(灵敏度+特异性-1),将成为其最大值的点(Youden指数)设定为临界值的方法。将各多样性指标中的ROC曲线在图7中示出。DE50与其他多样性指标相比,TCR α 、TCR β 两者中AUC显示出最高值,提示了预测能力最优异。对于各多样性指标中的临界值,可以采用R程序(ROCRpackage)根据Youden指数计算,在表12中示出。小于这些临界值时,则可预测出无法期待由抗PD-1抗体产生的高治疗效果。

[0387] [表12]

[0388] 表12各多样性指标中的暂定临界值

[0389]

TCR	指数	临界值
TCR α	香农-韦弗指数	3.695
TCR α	反向辛普森指数	12.56
TCR α	标准化香农指数	0.4345
TCR α	DE50指数	0.001175
TCR β	香农-韦弗指数	3.804
TCR β	反向辛普森指数	17.04
TCR β	标准化香农指数	0.4275
TCR β	DE50指数	0.0006853

[0390] 另外,虽然不希望受理论束缚,但可观察到,与TCR α 库多样性相比,TCR β 库多样性具有能够进一步明确地严加区别的倾向。并且,可观察到若为DE50指数时,则所有库均具有可进一步明确地严加区别的倾向。

[0391] (3.探讨)

[0392] 已知CD8⁺PD-1⁺T细胞通过抗PD-1抗体能够消除免疫抑制,发挥抗肿瘤效果。根据本实验可知,越是肺癌患者的外周血中的CD8⁺PD-1⁺T细胞的多样性高的患者,对抗PD-1抗体的治疗效果越高。肿瘤浸润T细胞识别肿瘤特异性抗原,发挥抗肿瘤效果。肿瘤细胞在肿瘤化的过程中存储多个基因突变,产生在正常细胞中无法表达的新生抗原(neoantigen)。已知免疫检查点抑制药等的免疫疗法对存储更多的基因突变的肿瘤的效果较高。认为为了抑制肿瘤,更多的新生抗原成为T细胞的靶标是十分重要的。可推测:对抗PD-1抗体有效的患者存在对治疗前被免疫抑制的多个新生抗原反应的多种T细胞。可推测,这通过抗PD-1抗体而解除抑制,获得更高的治疗效果。对肺癌患者而言,对抗PD-1抗体(Nivolumab)有效的患者占20~30%。若可在抗PD-1抗体治疗前预测有效患者,则能够实现更有效的治疗,避免医疗费用的浪费。进行易于采样的外周血细胞的TCR库分析,使用多样性指标作为生物标志物,则可期待至今无法实现的抗PD-1抗体治疗的效果预测。

[0393] (实施例2:利用读段数的多样性指数的变化的研究)

[0394] 多样性指数有可能受到样品数(即通过测序而获得的读段数)的影响而产生变动。因此,根据实施例1中所获得的每个受试者的数据,通过随机取样来取得一定读段数(100、300、1000、3000、10000、30000、80000),分别计算基于上述读段的多样性指数(香农-韦弗指数、辛普森指数、标准化香农指数、反向辛普森指数、DE30指数、DE50指数、DE80指数、Unique30指数、Unique50指数、Unique80指数),并进行制图。重采样尝试100次,将各多样性指标的中间值用作相对于各个读段数进行了标准化的值。与TCR α 及TCR β 的多样性指数相关的由读段数产生的变化,分别在图8及图9中示出。

[0395] 与读段数无关,香农指数、辛普森指数、反向辛普森指数几乎为恒定的数值,尤其认为在为实际分析水平的1万读段以上时几乎不受读段数的影响。另一方面,DE指数受到读段数的影响,可观察到若读段数变多则指数降低的倾向。对于为DE50以外的DE指数的DE30、DE80,也示出相同倾向。因此,对于DE指数,在作为阈值使用特定数值的情况下,认为设定已考虑了读段数影响的阈值是有利的。

[0396] 此外,对于将实施例1的见效组与未见效组的TCR多样性指数标准化为30000读段的比较结果,如图10及图11所示。对于各个受试者,将各多样性指数标准化为100、300、1000、3000、10000、30000及80000读段而得的值在以下的表13~33中示出。在临床(Clinical)的栏中示出每个受试者的治疗效果。Res_min表示见效患者组中的指数的最小值,Non_max表示未见效患者组中的指数的最大值。在表13~33中,Discrim表示见效患者组中的指数的最小值是否大于未见效患者组中的指数的最大值。见效患者组与未见效患者组之间的多样性指数的t统计值示于t-检验栏中。

[0397] [表13]

不同的重采样读段数下的参数(TCR α)								
指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0398]	见效患者平均值	3.24	3.54	3.73	3.84	3.94	4.01	4.06
	未见效患者平均值	2.19	2.38	2.51	2.60	2.69	2.74	2.78
	见效患者最小值	2.39	2.52	2.61	2.67	2.72	2.76	2.78
	未见效患者最大值	3.12	3.51	3.75	3.88	3.99	4.06	4.11
	明确的辨别							
	t-检验	0.0131	0.0167	0.02	0.0215	0.024	0.0245	0.0251

[0399] [表14]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0400]	标 准 化							
	香农							
	见效患者平均值	0.89	0.84	0.77	0.69	0.61	0.54	0.50
	未见效患者平均值	0.73	0.64	0.54	0.48	0.42	0.38	0.35
	见效患者最小值	0.84	0.77	0.66	0.56	0.47	0.42	0.38
	未见效患者最大值	0.85	0.79	0.73	0.67	0.60	0.55	0.50
	明确的辨别							
	t-检验	0.0149	0.0105	0.0093	0.0113	0.0163	0.0198	0.0214

[0401] [表15]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0402]	辛 普 森 指 数							
	见效患者平均值	0.93	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94
	未见效患者平均值	0.80	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
	见效患者最小值	0.88	0.88	0.88	0.89	0.89	0.89	0.89
	未见效患者最大值	0.92	0.93	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94
	明确的辨别							
	t-检验	0.0428	0.0439	0.0459	0.0445	0.0448	0.0447	0.0447

[0403] [表16]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0404]	反 向							
	辛 普 森 指 数							
	见效患者平均值	18.67	21.79	23.00	23.55	23.75	23.84	23.86
	未见效患者平均值	6.85	7.31	7.50	7.51	7.53	7.53	7.53
	见效患者最小值	8.15	8.45	8.68	8.87	8.82	8.85	8.84
	未见效患者最大值	13.13	14.90	15.42	15.43	15.54	15.49	15.49
	明确的辨别							
	t-检验	0.0187	0.0306	0.0343	0.034	0.035	0.035	0.0348

[0405] [表17]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0406]	DE30							
	见效患者平均值	9.15	5.76	3.27	1.63	0.65	0.27	0.12
	未见效患者平均值	7.13	3.55	1.42	0.64	0.26	0.12	0.06
	见效患者最小值	5.13	2.99	1.45	0.70	0.30	0.13	0.06
	未见效患者最大值	12.50	5.88	2.17	1.18	0.50	0.23	0.12
	明确的辨别							
	t-检验	0.3915	0.1426	0.0465	0.054	0.0615	0.0706	0.0717

[0407] [表18]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0408] DE50	见效患者平均值	20.77	13.68	7.93	4.06	1.63	0.68	0.32
	未见效患者平均值	13.57	6.88	2.86	1.26	0.51	0.23	0.11
	见效患者最小值	17.95	11.11	5.73	2.58	0.95	0.39	0.18
	未见效患者最大值	16.67	8.70	3.77	1.80	0.81	0.36	0.17
	明确的辨别	是	是	是	是	是	是	是
	t-检验	0.0036	0.0016	0.0035	0.0079	0.0111	0.0106	0.0089

[0409] [表19]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0410] DE80	见效患者平均值	57.14	41.27	24.42	12.63	5.15	2.16	1.01
	未见效患者平均值	36.71	20.85	9.70	4.62	1.98	0.89	0.43
	见效患者最小值	44.44	33.33	16.67	7.73	2.92	1.24	0.57
	未见效患者最大值	56.41	38.10	21.59	11.82	5.46	2.51	1.20
	明确的辨别							
	t-检验	0.0055	0.0019	0.002	0.0056	0.0143	0.0243	0.0283

[0411] [表20]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0412] Unique30	见效患者平均值	3.5	4.2	3.7	3.8	3.8	4.0	4.0
	未见效患者平均值	1.5	1.8	1.8	1.7	1.7	1.8	1.8
	见效患者最小值	2	2	2	2	2	2	2
	未见效患者最大值	3	3	3	3	3	3	3
	明确的辨别							
	t-检验	0.0309	0.0453	0.0674	0.0566	0.0566	0.0474	0.0474

[0413] [表21]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0414] Unique50	见效患者平均值	8.5	10.3	10.0	11.0	11.0	11.2	11.2
	未见效患者平均值	3.2	3.2	3.2	3.2	3.0	3.0	3.0
	见效患者最小值	3	4	3	3	3	3	3
	未见效患者最大值	6	6	7	7	6	6	6
	明确的辨别							
	t-检验	0.0108	0.0038	0.0125	0.0104	0.0083	0.0093	0.0093

[0415] [表22]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0416] Unique80	见效患者平均值	23.2	31.0	33.8	36.3	35.8	37.0	36.7
	未见效患者平均值	8.5	11.0	12.7	12.5	12.3	12.7	12.8
	见效患者最小值	7	9	9	9	9	9	9
	未见效患者最大值	22	33	43	42	40	41	42
	明确的辨别							
	t-检验	0.0155	0.0185	0.0543	0.0407	0.0333	0.0367	0.0392

[0417] [表23]

不同的重采样读段数下的参数 (TCR β)								
指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0418] 香农	见效患者平均值	3.38	3.69	3.90	4.03	4.15	4.24	4.31
	未见效患者平均值	2.44	2.62	2.78	2.89	2.98	3.05	3.10
	见效患者最小值	2.65	2.84	2.97	3.09	3.17	3.24	3.29
	未见效患者最大值	2.88	3.09	3.31	3.44	3.55	3.63	3.69
	明确的辨别							
	t-检验	0.0054	0.005	0.0068	0.0074	0.0082	0.0085	0.0087

[0419] [表24]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0420] 标准化香农	见效患者平均值	0.91	0.85	0.77	0.69	0.61	0.55	0.51
	未见效患者平均值	0.76	0.67	0.58	0.51	0.45	0.41	0.38
	见效患者最小值	0.83	0.74	0.63	0.55	0.49	0.44	0.40
	未见效患者最大值	0.84	0.75	0.66	0.58	0.52	0.47	0.44
	明确的辨别							
	t-检验	0.0089	0.0042	0.0032	0.0039	0.0052	0.0061	0.0066

[0421] [表25]

[0422]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
辛普森指数	见效患者平均值	0.95	0.95	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96
	未见效患者平均值	0.84	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
	见效患者最小值	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
	未见效患者最大值	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
	明确的辨别							
	t-检验	0.0232	0.0208	0.0221	0.0223	0.0221	0.0222	0.0223

[0423] [表26]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
反向辛普森指数	见效患者平均值	22.84	27.30	29.27	29.84	30.14	30.23	30.26
	未见效患者平均值	7.69	7.94	8.16	8.17	8.19	8.19	8.20
	见效患者最小值	9.63	10.16	10.27	10.31	10.33	10.32	10.31
	未见效患者最大值	11.21	11.77	12.44	12.36	12.44	12.41	12.44
	明确的辨别							
	t-检验	0.0072	0.0102	0.011	0.012	0.012	0.0122	0.0122

[0425] [表27]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
DE30	见效患者平均值	10.11	6.09	3.16	1.44	0.54	0.23	0.10
	未见效患者平均值	6.28	3.29	1.35	0.56	0.21	0.09	0.04
	见效患者最小值	8.17	4.26	1.85	0.76	0.29	0.12	0.06
	未见效患者最大值	10.00	6.45	2.54	1.02	0.39	0.17	0.08
	明确的辨别							
	t-检验	0.0438	0.0253	0.0104	0.0134	0.0125	0.0113	0.0109

[0427] [表28]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
DE50	见效患者平均值	21.51	13.77	7.31	3.42	1.31	0.54	0.25
	未见效患者平均值	13.85	6.69	2.75	1.15	0.45	0.19	0.09
	见效患者最小值	16.00	8.70	3.72	1.52	0.58	0.25	0.11
	未见效患者最大值	19.05	9.76	3.75	1.43	0.54	0.24	0.11
	明确的辨别				是	是	是	
	t-检验	0.0057	0.0017	0.0045	0.0091	0.0105	0.0108	0.0098

[0429] [表29]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0430]	DE80							
	见效患者平均值	56.77	38.44	20.86	9.84	3.79	1.57	0.72
	未见效患者平均值	36.58	19.40	8.62	3.81	1.52	0.65	0.30
	见效患者最小值	40.00	22.34	9.90	4.09	1.57	0.68	0.31
	未见效患者最大值	44.64	26.09	12.38	5.61	2.49	1.10	0.51
	明确的辨别							
	t-检验	0.0025	0.0028	0.0056	0.0116	0.0165	0.0194	0.0202

[0431] [表30]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0432]	Unique30							
	见效患者平均值	4.3	4.7	5.2	5.3	5.2	5.2	5.2
	未见效患者平均值	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
	见效患者最小值	2	2	2	2	2	2	2
	未见效患者最大值	3	3	3	3	3	3	3
	明确的辨别							
	t-检验	0.012	0.0221	0.0129	0.0129	0.0129	0.0129	0.0129

[0433] [表31]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0434]	Unique50							
	见效患者平均值	10.0	11.0	12.2	12.5	12.2	12.3	12.3
	未见效患者平均值	3.3	3.5	3.5	3.5	3.3	3.5	3.3
	见效患者最小值	4	4	4	4	4	4	4
	未见效患者最大值	5	5	5	5	5	5	5
	明确的辨别							
	t-检验	0.0107	0.0111	0.013	0.0133	0.0131	0.0121	0.0128

[0435] [表32]

指数	参数	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
[0436]	Unique80							
	见效患者平均值	25.8	32.2	36.3	37.5	36.2	37.3	37.2
	未见效患者平均值	10.2	11.0	11.3	11.7	11.3	11.7	11.5
	见效患者最小值	9	9	11	10	10	11	11
	未见效患者最大值	17	19	18	20	18	19	19
	明确的辨别							
	t-检验	0.0183	0.0306	0.0277	0.0283	0.0253	0.0275	0.0271

[0437] 测试以这种方式标准化的多样性指数以检查实施例1中所检测的见效组 (n=6) 与

未见效组 (n=6) 的显著性差异是否在任一读段数中都同样地被检测出。显著性差异检验通过不等方差 (unequal variance)、t 检验进行。结果在表13~32中示出, 香农、辛普森、DE50等在实施例1中所用的所有多样性指数不受读段数的影响, 显示出了显著性差异。认为读段数虽影响DE50指数等DE指数的绝对值, 但不影响显著性差异, 由多样性指数所带来的效果预测的意义不变。

[0438] 因此, 多样性指数可通过对读段数进行标准化来进行比较, 在为绝对值变化的DE指数时, 对于与特定阈值之间的比较, 对读段数进行标准化是有利的。

[0439] 此外, 根据实施例1的数据已知DE50值在见效组与未见效组的分离方面上较佳。在本实施例中调查了是否即使在标准化为一定读段数 (100、300、1000、3000、10000、30000、80000) 的情况下严加区别性也同样地好。查找表示如见效组的最小值超过未见效组的最大值这样的“明显”分离 (ROC曲线的AUC成为1) 的指数及读段数, 对于这种指标在表13~32的“辨别”栏中以“是”表示。在DE50中, 证实了可以实现这种完全分离。并且, 已知虽然在DE30中有时显著性差异消失, 但在DE50指数中, 读段数也从10000读段直至80000读段显示出几乎相同程度的辨别性。证实了在DE指数中DE50值最佳, 通过使用DE50能够实现无法预料到的严加区别性。

[0440] 此外, 针对使用经如上所述标准化的多样性指数来评价响应性时所使用的阈值, 进行了研究。首先, 基于将各多样性指数标准化为各读段数时的值, 进行ROC分析, 并求出阈值。基于ROC分析所计算的各多样性指数的临界值在下表33 (TCR α) 及表34 (TCR β) 中示出。例如, 对于计算出的针对各读段数的阈值, 可在利用对各读段数进行了标准化的指数来评价响应性时使用。

[0441] [表33]

通过ROC分析所计算的临界值 (TCR α)							
	重采样读段数						
	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
香农	3.19	3.43	3.61	3.72	3.83	3.91	3.97
标准香农	0.85	0.81	0.73	0.65	0.57	0.51	0.47
辛普森	0.92	0.92	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93
反向辛普森	12.39	13.03	13.76	13.79	13.76	13.91	13.87
% DE30	11.76	7.69	4.00	0.95	0.42	0.18	0.09
% DE50	17.14	11.04	5.80	2.58	0.96	0.39	0.18
% DE80	45.00	31.52	17.39	7.63	2.94	1.24	0.57
Unique30	2	3	3	2	2	2	2
Unique50	6	7	9	8	8	8	8
Unique80	20	23	25	25	27	26	26

[0443] [表34]

[0444]

通过ROC分析所计算的临界值 (TCR β)							
	重采样读段数						
	100	300	1000	3000	10000	30000	80000
香农	3.23	3.44	3.58	3.66	3.75	3.81	3.85
标准香农	0.90	0.84	0.75	0.67	0.58	0.52	0.48
辛普森	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
反向辛普森	18.57	20.12	21.11	21.54	21.66	21.59	21.65
% DE30	7.89	4.30	1.85	0.77	0.29	0.12	0.06
% DE50	19.05	11.63	3.64	1.55	0.58	0.25	0.11
% DE80	51.67	35.53	17.07	7.35	2.66	1.07	0.48
Unique30	3	3	4	4	4	4	4
Unique50	6	9	9	9	9	9	9
Unique80	16	22	22	22	21	22	22

[0445] 进而,为了确定根据 (i) 排除未见效患者的 (社会保障费用的观点) 或 (ii) 消除见效患者的遗漏 (医生 • 治疗的观点) 这样的目的而使用的阈值,进一步研究了标准化为 30000 读段时的各多样性指数的阈值。标准化为 30000 读段的非响应及响应受试者所示的多样性指数的最大值或最小值的示例以及基于 ROC 分析而得到的阈值在下述表 35 (TCR α) 及表 36 (TCR β) 中示出。通过基于这种值的示例来设定阈值,可进行如实现上述目的这样的响应性评价。

[0446] [表35]

[0447]

临界值, 见效患者中的最小值以及未见效患者中的最大值 (TCR α)			
	临界值	见效患者_min	未见效患者_max
香农	3.914	2.757	4.061
标准香农	0.513	0.418	0.547
辛普森	0.928	0.887	0.935
反向辛普森	13.905	8.850	15.486
% DE30	0.182	0.131	0.234
% DE50	0.387	0.387	0.361
% DE80	1.236	1.236	2.513
Unique30	2	2	3
Unique50	8	3	6
Unique80	26	9	42

[0448] [表36]

[0449]

临界值，见效患者中的最小值以及未见效患者中的最大值（TCR β ）			
	临界值	见效患者_min	未见效患者_max
香农	3.808	3.242	3.632
标准香农	0.518	0.439	0.475
辛普森	0.954	0.903	0.919
反向辛普森	21.589	10.322	12.407
% DE30	0.123	0.123	0.168
% DE50	0.246	0.247	0.237
% DE80	1.065	0.679	1.100
Unique30	4	2	3
Unique50	9	4	5
Unique80	22	11	19

[0450] 进而，研究了由随机重采样所引起的多样性指数的阈值的变动。对于各个多样性指数，将阈值进行了制图，该阈值是根据以标准化为各读段数的值为基础的ROC分析而算出的（图12及图13）。有关香农、辛普森、反向辛普森指数、Unique指数的阈值几乎为恒定的数值，与读段数无关。发现了呈现出随着读段数的增加而减少的倾向的DE指数的阈值在log-log制图（双对数）中近似于一次函数（图12及图13）。特别是，在实际分析中使用的可能性较高的3000读段以上的制图中，相关系数也非常高。对于DE50指数， α 链可与 $y=1892.344x^{-0.8239}$ 近似， β 链可与 $y=993.116x^{-0.8072}$ 近似（ x =读段数、 y =DE50指数的阈值）（图14）。因此，认为通过对某一读段数所算出的DE50指数与从上述关系导出的上述读段数中的DE50指数的阈值相比较，可评价受试者的响应性。

[0451] 对于其他的DE指数，能够以如下方式近似。

[0452] [数学式11]

[0453] DE30、TCR α : $y=260.0x^{-0.7008}$

[0454] DE30、TCR β : $y=476.4x^{-0.8032}$

[0455] DE80、TCR α : $y=4275.6x^{-0.7905}$

[0456] DE80、TCR β : $y=6151.8x^{-0.8406}$

[0457] (x =读段数、 y =DE指数的阈值)

[0458] 为了研究这种线性关系的适用范围，计算了与这些拟合曲线(fitting curve)相关的95%置信区间。所计算的95%置信区间为如下表37所示。

[0459] [表37]

[0460]

指数	基因	参数	最佳拟合值	95% 置信区间	
DE30	TCRa	Y截距	2.415	2.164	2.666
		斜率(b)	-0.7008	-0.7703	-0.6312
		10 ^a Y截距(a)	260.0	145.9	463.4
	TCRb	Y截距	2.678	2.588	2.767
		斜率	-0.8032	-0.8282	-0.7782
		10 ^a Y截距(a)	476.4	387.3	584.8
DE50	TCRa	Y截距	3.277	3.248	3.307
		斜率(b)	-0.8239	-0.8322	-0.8157
		10 ^a Y截距(a)	1892.3	1770.1	2027.7
	TCRb	Y截距	2.997	2.902	3.092
		斜率	-0.8072	-0.8337	-0.7807
		10 ^a Y截距(a)	993.1	798.0	1235.9
DE80	TCRa	Y截距	3.631	3.618	3.644
		斜率(b)	-0.7905	-0.7942	-0.7868
		10 ^a Y截距(a)	4275.6	4149.5	4405.5
	TCRb	Y截距	3.789	3.748	3.831
		斜率	-0.8406	-0.8522	-0.829
		10 ^a Y截距(a)	6151.8	5597.6	6776.4

[0461] 进而,在各点的数据(值)变动10%的情况下,求出在最大值和最小值下斜率(Slope)和截距(intercept)以如何程度变动。结果在下表38中示出。

[0462] [表38]

[0463] 将各点的数据变动幅度设为10%时的斜率及Y截距的最大值和最小值($Y=aX^b$)

[0464]

	TCRa			TCRb		
		Res_Min	NonRes_Max		Res_Min	NonRes_Max
Y截距	3.277	3.509	2.997	2.997	3.213	2.701
斜率(b)	-0.8239	-0.8787	-0.7565	-0.8072	-0.8574	-0.7352
10 ^a Y截距(a)	1892.3	3228.5	993.1	993.1	1633.1	502.3

[0465] 并且,关于见效者的判定,可将见效患者的最小值和/或未见效患者的最大值用作阈值,还针对该种值相对于读段数的线性变动进行了研究。还可实现区别使用,即,在Res_Min以上为见效,在NonRes_Max以下为未见效。变动的结果在下表39中示出。

[0466] [表39]

[0467] 见效患者最小值和未见效患者最大值的斜率及Y截距($Y=aX^b$)

[0468]

	TCRa			TCRb		
		Res_Min	NonRes_Max		Res_Min	NonRes_Max
Y截距	3.277	3.274	2.637	2.997	2.948	2.901
斜率(b)	-0.8239	-0.8235	-0.685	-0.8072	-0.7955	-0.7898

10 ⁴ Y截距(a)	1892.3	1879.3	433.5	993.1	887.2	796.2
------------------------	--------	--------	-------	-------	-------	-------

[0469] (实施例3:表达免疫抑制分子的T细胞级分中的TCR多样性)

[0470] (1.材料与方法)

[0471] 1.外周血单个核细胞(PBMC)的分离

[0472] 采取1例抗PD-1抗体(纳武单抗、欧狄沃(Opdivo))治疗见效患者的全血20mL置于含肝素的采血管中。通过利用了Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) 的比重离心分离,对外周血单个核细胞(PBMC)进行分离,用血细胞计数器计数了细胞数。将所分离的PBMC悬浮于细胞冻存液STEM-CELLBANKER (TaKaRa Bio) 中,并在-80℃超低温冷冻库中保管。

[0473] 2.PBMC的抗体染色

[0474] PBMC按照以下步骤进行免疫染色。

[0475] 2.1将冷冻保存的PBMC溶解,并将表41中所示的细胞数悬浮于染色缓冲液(Stain Buffer)中。

[0476] 2.2为了除去STEM-CELLBANKER,在染色缓冲液中悬浮之后,以800×g于4℃温度下离心5分钟,清洗两次。

[0477] 2.3将细胞悬浮于染色缓冲液中,根据所附说明书的指示添加下表40的抗体,在遮光、室温条件下与细胞反应了30分钟。

[0478] [表40]

[0479] 表40分选的细胞级分及抗体

No.	分选的级分	抗体
1	CD8+PD1+7AAD-	PECy7 抗人CD8 (BD) AF488 抗人PD-1 (R&D) 7AAD
2	CD8+4-1BB+7AAD-	PECy7 抗人CD8 (BD) PE 抗人CD137 (BD) 7AAD
3	CD8+TIM3+7AAD-	PECy7 抗人CD8 (BD) PE 抗人TIM3 (CD366) (BD) 7AAD
4	CD8+OX40+7AAD-	FITC 抗人CD8 (BD) PE/Cy7 抗人CD134 (BioLegend) 7AAD
5	CD8+TIGIT+7AAD-	PECy7 抗人CD8 (BD) FITC 抗人TIGHT (ThermoFisher) 7AAD
6	CD8+CTLA-4+7AAD-	FITC 抗人CD8 (BD) PE/Cy7 抗人CD152 (BioLegend) 7AAD

[0481] 2.4清洗后悬浮于100μL的染色缓冲液中,添加5μL的7-AAD,并在遮光、室温条件下反应了10分钟。

[0482] 2.5向细胞中加入500μL的染色缓冲液,过滤之后,利用BD FACSAria III细胞分选仪(BD Bioscience)或者FACSMelody细胞分选仪(BD Bioscience),对上述分选级分进行了分选分离。

[0483] 2.6分选级分通过在 $800 \times g$ 、 4°C 温度条件下离心5分钟来回收。

[0484] 2.7将上清液保留250 μl 并除去之后,加入750 μl 的Trizol LS试剂(Invitrogen)进行移液,将细胞溶解。

[0485] 2.8RNA提取后的TCR库分析根据实施例1的“1.3.RNA提取”、“1.4.互补DNA及双链互补DNA的合成”及“1.5.PCR”的方法实施。

[0486] 2.9抗体染色后,悬浮于2mL的染色缓冲液,在 $800 \times g$ 、 4°C 温度条件下离心5分钟后,舍弃上清液,籍此进行两次清洗。

[0487] (2.结果)

[0488] $\text{CD8}^+\text{PD1}^+$ 、 $\text{CD8}^+\text{4-1BB}^+$ 、 $\text{CD8}^+\text{TIM3}^+$ 、 $\text{CD8}^+\text{OX40}^+$ 、 $\text{CD8}^+\text{TIGIT}^+$ 及 $\text{CD8}^+\text{CTLA4}^+$ T细胞级分在淋巴细胞中所占的比例(%)以及通过FACS分选所回收的细胞数示于表41中。将共表达CD8与各分子标志物的约 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 的T细胞回收,并从这些T细胞级分中提取RNA,按照惯例进行TCR库分析。TCR序列分析结果、由各试样所获得的总读段数、独特读段数、框内(In-frame)读段数如表42a及表42b所示。所有试样均能够获得10万读段以上的读段。

[0489] [表41]

[0490] 表41分选细胞的比例及分选细胞数

[0491]

级分	细胞数	%阳性细胞	回收细胞数
$\text{CD8}^+\text{PD1}^+$	4.0×10^6	1.0%	14,922
$\text{CD8}^+\text{4-1BB}^+$	4.0×10^6	1.2%	21,337
$\text{CD8}^+\text{TIM3}^+$	2.7×10^6	11.4%	83,027
$\text{CD8}^+\text{OX40}^+$	6.0×10^6	2.4%	31,072
$\text{CD8}^+\text{TIGIT}^+$	2.0×10^6	8.4%	43,694
$\text{CD8}^+\text{CTLA4}^+$	8.0×10^6	0.76%	20,340

[0492] [表42a]

[0493] 表42a获得读段数 (TCR α 链)

[0494]

细胞级分	总读段数	独特读段数	框内独特读段数
$\text{CD8}^+\text{PD1}^+$	170496	6315	4705
$\text{CD8}^+\text{4-1BB}^+$	209446	7592	5429
$\text{CD8}^+\text{TIM3}^+$	186132	6785	5486
$\text{CD8}^+\text{OX40}^+$	266802	13630	10392
$\text{CD8}^+\text{TIGIT}^+$	204745	7456	5694
$\text{CD8}^+\text{CTLA4}^+$	157692	8400	6107
CD8^+	214966	13938	10489

[0495] [表42b]

[0496] 表42b获得读段数 (TCR β 链)

[0497]

细胞级分	总读段数	独特读段数	框内独特读段数
CD8 ⁺ PD1 ⁺	140815	6280	5157
CD8 ⁺ 4-1BB ⁺	168696	6378	5118
CD8 ⁺ TIM3 ⁺	56084	3891	2978
CD8 ⁺ OX40 ⁺	199828	12114	10026
CD8 ⁺ TIGIT ⁺	106902	7513	5969
CD8 ⁺ CTLA4 ⁺	147223	8656	7146
CD8 ⁺	168732	11984	10064

[0498] (各T细胞级分之间的TCR库的共通性)

[0499] 对于通过TCR库分析所获得的TCR克隆的序列,将CD8⁺PD1⁺、CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40⁺、CD8⁺TIGIT⁺及CD8⁺CTLA4⁺T细胞级分之间共通的克隆进行比较。将所有的级分之间或者多个级分之间共通存在的TCR克隆示于表43中。可知CD8⁺PD-1⁺级分中高频率存在的TCR克隆在CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40⁺、CD8⁺TIGIT⁺或者CD8⁺CTLA4⁺级分中也高频率存在。这种情况提示CD8⁺PD-1⁺T细胞共表达4-1BB、TIM3、OX40、TIGIT或者CTLA4分子的可能性。另外,针对TCR克隆的读段数,调查各T细胞级分之间的相关性(图15)。高频率存在的TCR克隆共通地存在于各T细胞级分,显示出高度相关。接着,调查了在CD8⁺PD-1⁺T细胞与CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40⁺、CD8⁺TIGIT⁺或者CD8⁺CTLA4⁺T细胞之间共通的TCR克隆的读段的比例(表44)。CD8⁺PD-1⁺的TCR克隆在各级分中所占的读段比例与对照的CD8⁺T细胞相比,明显在CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40⁺、CD8⁺TIGIT⁺或者CD8⁺CTLA4⁺T细胞中较高。这种情况提示包含在CD8⁺PD-1⁺T细胞中的肿瘤特异性T细胞的肿瘤特异性TCR也高频率包含在4-1BB、TIM3、OX40、TIGIT或CTLA-4阳性的T细胞级分中。由此可以期待外周血中的CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40⁺、CD8⁺TIGIT⁺、CD8⁺CTLA4⁺的所有T细胞级分都能够用作基于TCR多样性的生物标志物。

[0500] [表43]

[0501] 表43各T细胞级分中共通存在的TCRβ链克隆

[0502]

No.	TRV	TRJ	CDR3	CD8+ PD-1+	CD8+ 4-1BB+	CD8+ TIM3+	CD8+ OX40+	CD8+ TIGIT+	CD8+ CTLA4+
1	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVPTFLGSYNEQFF	5565	12961	1014	410	5638	1937
2	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASSPLAGVAYNEQFF	5229	0	2381	2443	1175	640
3	TRBV6-1	TRBJ2-5	CASSEEAGGVETQYF	4983	0	1	560	1	1076
4	TRBV29-1	TRBJ1-2	CSVLMWTGDLNRYGYTF	4053	1	813	55	34	386
5	TRBV30	TRBJ2-5	CAWSVPSRETQYF	3984	0	1	30	10	0
6	TRBV4-1	TRBJ2-7	CASSQGTfYEQYF	2924	0	1	126	57	1
7	TRBV28	TRBJ2-6	CASSLYPPGGANVLTf	2424	1576	924	4785	18689	8630
8	TRBV30	TRBJ2-7	CAWTFsNEQYF	2041	3695	278	902	2053	728
9	TRBV13	TRBJ2-7	CASSLGPGTSGRVSYEQYF	1865	1241	0	2339	9090	874
10	TRBV29-1	TRBJ2-3	CSVVTSNSDTQYF	1708	180	0	395	555	0
11	TRBV29-1	TRBJ2-2	CSVEEGDTGELFF	870	0	1	470	83	0
12	TRBV15	TRBJ2-7	CATSRDFGGSYEQYF	745	7829	1	48	788	0
13	TRBV28	TRBJ2-6	CASSLYPPGGVNVLTf	648	4	3	5	28	13
14	TRBV28	TRBJ2-1	CASRSSGDNEQFF	572	0	0	1628	1074	244
15	TRBV11-1	TRBJ2-1	CANSPVPTFLGSYNEQFF	47	28	1	2	13	5
16	TRBV11-1	TRBJ2-1	CVSSPVPTFLGSYNEQFF	28	40	3	0	8	8
17	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASSPVPTFLGSYNEQFF	21	7	1	1	14	0
18	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASSTLAGVAYNEQFF	15	0	2	6	3	2
19	TRBV28	TRBJ2-6	CVSSLYPPGGANVLTf	14	3	2	7	41	24
20	TRBV7-6	TRBJ2-1	CASSPLAGVAYNEQFF	13	0	1	1	1	0
21	TRBV30	TRBJ2-7	CAWTLsNEQYF	10	26	1	1	3	3
22	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASRPLAGVAYNEQFF	10	0	2	1	1	0
23	TRBV30	TRBJ2-5	CAWGVPSRETQYF	10	0	1	1	1	0
24	TRBV11-1	TRBJ2-1	WASSPVPTFLGSYNEQFF	9	22	5	0	22	6
25	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSTVPTFLGSYNEQFF	9	11	0	0	7	1
26	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVPTFLGSYKEQFF	8	9	1	1	5	1
27	TRBV28	TRBJ2-6	CASSRYPPGGANVLTf	8	1	0	7	52	22
28	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVPTFLGSYNGQFF	8	14	1	0	7	1
29	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASSPLAGVAYDEQFF	8	0	1	2	2	0
30	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVPTCLGSYNEQFF	8	9	0	0	9	2
31	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPGPTFLGSYNEQFF	7	15	1	2	17	3
32	TRBV28	TRBJ2-6	CASSLYPPGGANVLSf	7	1	0	5	10	5
33	TRBV7-9	TRBJ2-7	CASSPLAGVAYNEQFF	7	0	0	5	1	1
34	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVPTFRGSYNEQFF	7	12	2	0	10	0
35	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVTTFLGSYNEQFF	6	10	1	0	7	4
36	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVPTLLGSYNEQFF	6	6	0	1	5	1
37	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVPTFLGAYNEQFF	6	12	0	1	10	1
38	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASSPLVGAYNEQFF	6	0	4	4	1	0
39	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASSPLAGVDYNEQFF	6	0	4	1	1	0
40	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASSPLAGVAYNEQFL	6	0	0	2	1	1
41	TRBV29-1	TRBJ2-3	CSVVTSNSDAQYF	6	1	0	1	1	0
42	TRBV13	TRBJ2-7	RASSLGPGTSGRVSYEQYF	6	0	0	3	5	2
43	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPAPTFLGSYNEQFF	6	9	0	0	7	1
44	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASNVPVPTFLGSYNEQFF	5	20	2	1	4	1
45	TRBV7-9	TRBJ2-1	CANSPLAGVAYNEQFF	5	0	3	1	1	3
46	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVSTFLGSYNEQFF	5	6	1	0	6	3
47	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPVPTFPGSYNEQFF	5	2	0	1	3	1
48	TRBV11-1	TRBJ2-1	CASSPDPTFLGSYNEQFF	5	8	1	0	5	1
49	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASSPLAGVAYNGQFF	5	0	3	2	2	0
50	TRBV7-9	TRBJ2-1	CASSPLAGGAYNEQFF	5	0	2	4	1	0

[0503] [表44]

[0504] 表44 CD8⁺PD-1⁺TCR克隆所占的读段数的比例

	T细胞亚群	%CD8+PD-1+ TCR 克隆	
		TCR α	TCR β
[0505]	CD8+4-1BB+	38.92	20.63
	CD8+TIM3+	17.98	18.41
	CD8+OX40+	9.01	9.31
	CD8+TIGIT+	31.90	50.13
	CD8+CTLA4+	8.70	13.81
	对照 (CD8+)	3.79	5.98

[0506] 对于通过FACS分选从治疗见效患者的PBMC中分离的CD8⁺PD1⁺、CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40⁺、CD8⁺TIGIT⁺及CD8⁺CTLA4⁺级分,实施TCR库分析,计算出香农指数、标准化香农指数、反向辛普森指数、DE50指数。其结果,CD8⁺PD1⁺T细胞的多样性指数表现出与相同患者的CD8⁺4-1BB⁺、CD8⁺TIM3⁺、CD8⁺OX40⁺、CD8⁺TIGIT⁺或者CD8⁺CTLA4⁺T细胞相同程度的多样性。另外,所有级分均以与治疗见效患者(N=6)的CD8⁺PD-1⁺T细胞相同程度地、显示出了明显高于未见效患者(N=6)的CD8⁺PD-1⁺T细胞的多样性指数(图16及图17)。由此能够期待,不限于CD8⁺PD1⁺T细胞,通过分析具有4-1BB⁺、TIM3⁺、OX40⁺、TIGIT⁺或者CTLA4⁺等T细胞表面标志物的CD8⁺T细胞,能够用作免疫检查点抑制药的治疗效果预测的生物标志物。

[0507] (注释)

[0508] 如上所述,利用本发明的优选实施方式而例示了本发明,但应理解的是,本发明应该根据权利要求来解释其范围。对于本说明书中所引用的专利、专利申请及文献,与其内容本身在本说明书中具体记载的内容相同地、应当作为针对本说明书的参考而援用其内容。

[0509] 产业上的可利用性

[0510] 对于进行易于采样的外周血细胞的TCR库分析所获得的多样性指标,可用作用于预测癌症免疫疗法的效果预测的生物标志物。

[0511] 序列列表自由文本

[0512] 序列号1:BSL-18E引物

[0513] 序列号2:P20EA引物

[0514] 序列号3:P10EA引物

[0515] 序列号4:P22EA-ST1-R引物

[0516] 序列号5:CA1引物

[0517] 序列号6:CA2引物

[0518] 序列号7:CA-ST1-R引物

[0519] 序列号8:CB1引物

[0520] 序列号9:CB2引物

[0521] 序列号10:CB-ST1-R引物

[0522] 序列号11~60:实施例3中的各TCR β 链克隆的CDR3序列

序列表

<110> 学校法人兵庫医科大学

组库创世纪株式会社

<120> 癌症免疫疗法的新型生物标志物

<130> F517PCT269

<160> 60

<170> PatentIn 第3.5版

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BSL-18E 引物

<220>

<221> 未归类特性

<222> (35) .. (35)

<223> n为a, c, g, t或u

<400> 1

aaagcggccg catgcttttt tttttttttt tttvn 35

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P20EA 引物

<400> 2

taatacgact ccgaattccc 20

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P10EA 引物

<400> 3

gggaattcgg 10

<210> 4

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P22EA-ST1-R 引物

<400> 4

gtctcgtggg ctcggagatg tgtataagag acagctaata cgactccgaa ttccc 55

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CA1 引物

<400> 5

tgttgaaggc gtttgacat gca 23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CA2 引物

<400> 6

gtgcatagac ctcattgtcta gca 23

<210> 7

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CA-ST1-R 引物

<400> 7

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggagggtc agggttcttg a 51

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CB1 引物

<400> 8

gaactggact tgacagcgga act 23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CB2 引物

<400> 9

aggcagtatc tggagtcatt gag 23

<210> 10

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CB-ST1-R 引物

<400> 10

tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggctcaaa cacagcgacc tc 52

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Cys Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Cys Ala Ser Ser Pro Leu Ala Gly Val Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Cys Ala Ser Ser Glu Glu Ala Gly Gly Val Glu Thr Gln Tyr Phe

1 5 10 15

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Cys Ser Val Leu Met Trp Thr Gly Asp Leu Asn Tyr Gly Tyr Thr Phe

1 5 10 15

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Cys Ala Trp Ser Val Pro Ser Arg Glu Thr Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Cys Ala Ser Ser Gln Gly Thr Phe Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Cys Ala Ser Ser Leu Tyr Pro Pro Gly Gly Ala Asn Val Leu Thr Phe

1 5 10 15

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Cys Ala Trp Thr Phe Ser Asn Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Cys Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gly Thr Ser Gly Arg Val Ser Tyr Glu

1 5 10 15

Gln Tyr Phe

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Cys Ser Val Val Thr Ser Asn Ser Asp Thr Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Cys Ser Val Glu Glu Gly Asp Thr Gly Glu Leu Phe Phe

1 5 10

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Cys Ala Thr Ser Arg Asp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10 15

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

Cys Ala Ser Ser Leu Tyr Pro Pro Gly Gly Val Asn Val Leu Thr Phe

1 5 10 15

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Cys Ala Ser Arg Ser Ser Gly Asp Asn Glu Gln Phe Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

Cys Ala Asn Ser Pro Val Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 26

Cys Val Ser Ser Pro Val Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Cys Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Cys Ala Ser Ser Thr Leu Ala Gly Val Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe

1 5 10 15

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Cys Val Ser Ser Leu Tyr Pro Pro Gly Gly Ala Asn Val Leu Thr Phe

1 5 10 15

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

Cys Ala Ser Ser Pro Leu Ala Gly Val Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe
1 5 10 15

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Cys Ala Trp Thr Leu Ser Asn Glu Gln Tyr Phe
1 5 10

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 32

Cys Ala Ser Arg Pro Leu Ala Gly Val Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe
1 5 10 15

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 33

Cys Ala Trp Gly Val Pro Ser Arg Glu Thr Gln Tyr Phe
1 5 10

<210> 34

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 34

Trp Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

Cys Ala Ser Ser Thr Val Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

Cys Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Lys Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 37

Cys Ala Ser Ser Arg Tyr Pro Pro Gly Gly Ala Asn Val Leu Thr Phe

1 5 10 15

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 38

Cys Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 39

Cys Ala Ser Ser Pro Leu Ala Gly Val Ala Tyr Asp Glu Gln Phe Phe

1 5 10 15

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

Cys Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Cys Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Cys Ala Ser Ser Pro Gly Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

Cys Ala Ser Ser Leu Tyr Pro Pro Gly Gly Ala Asn Val Leu Ser Phe

1 5 10 15

<210> 43

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Cys Ala Ser Ser Pro Leu Ala Gly Val Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe

1 5 10 15

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 44

Cys Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Phe Arg Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 45

Cys Ala Ser Ser Pro Val Thr Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 46

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 46

Cys Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Leu Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

Cys Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Phe Leu Gly Ala Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 48

Cys Ala Ser Ser Pro Leu Val Gly Val Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe

1 5 10 15

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 49

Cys Ala Ser Ser Pro Leu Ala Gly Val Asp Tyr Asn Glu Gln Phe Phe

1 5 10 15

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

Cys Ala Ser Ser Pro Leu Ala Gly Val Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Leu

1 5 10 15

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

Cys Ser Val Val Thr Ser Asn Ser Asp Ala Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 52

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 52

Arg Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gly Thr Ser Gly Arg Val Ser Tyr Glu

1 5 10 15

Gln Tyr Phe

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 53

Cys Ala Ser Ser Pro Ala Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 54

Cys Ala Ser Asn Pro Val Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 55

Cys Ala Asn Ser Pro Leu Ala Gly Val Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe

1 5 10 15

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 56

Cys Ala Ser Ser Pro Val Ser Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 57

Cys Ala Ser Ser Pro Val Pro Thr Phe Pro Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 58

Cys Ala Ser Ser Pro Asp Pro Thr Phe Leu Gly Ser Tyr Asn Glu Gln

1 5 10 15

Phe Phe

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 59

Cys Ala Ser Ser Pro Leu Ala Gly Val Ala Tyr Asn Gly Gln Phe Phe

1 5 10 15

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 60

Cys Ala Ser Ser Pro Leu Ala Gly Gly Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe

1 5 10 15

在抗PD-1抗体疗法肺癌患者中作为预测治疗效果指标的TCR库分析

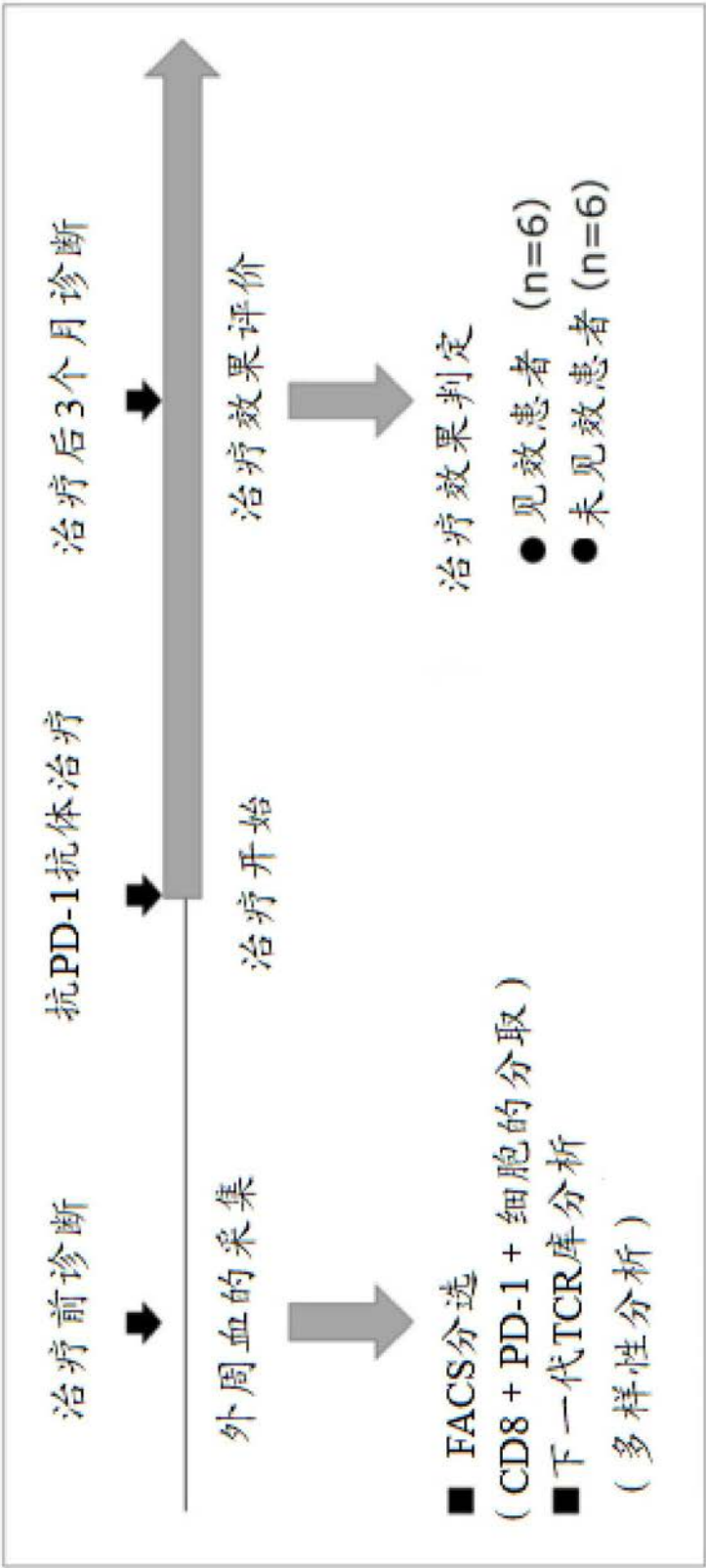


图1

基于CT图像诊断的临床评价

未见效患者（患者#1）

CT图像



治疗开始前

治疗后3个月后

见效患者（患者#2）

CT图像



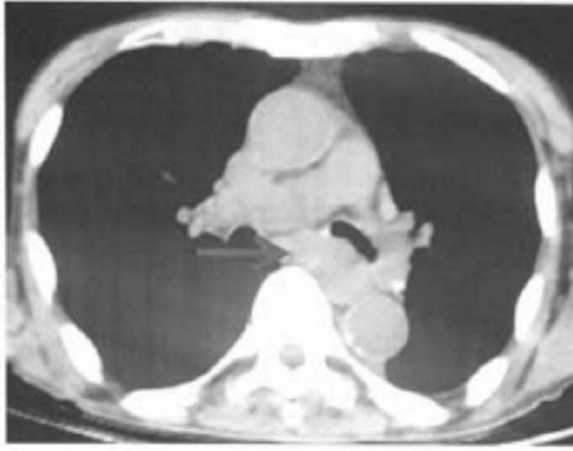
治疗开始前



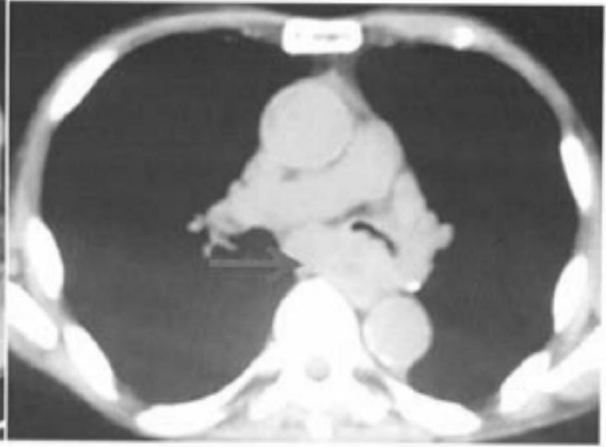
治疗后3个月后

图2A

基于CT图像诊断的临床评价
未见效患者（患者#3）
CT 图像



治疗开始前



治疗后3个月后

见效患者（患者#4）
FDG-PET 图像



治疗开始前



治疗后3个月后

图2B

FACS 分析例 (患者#1)

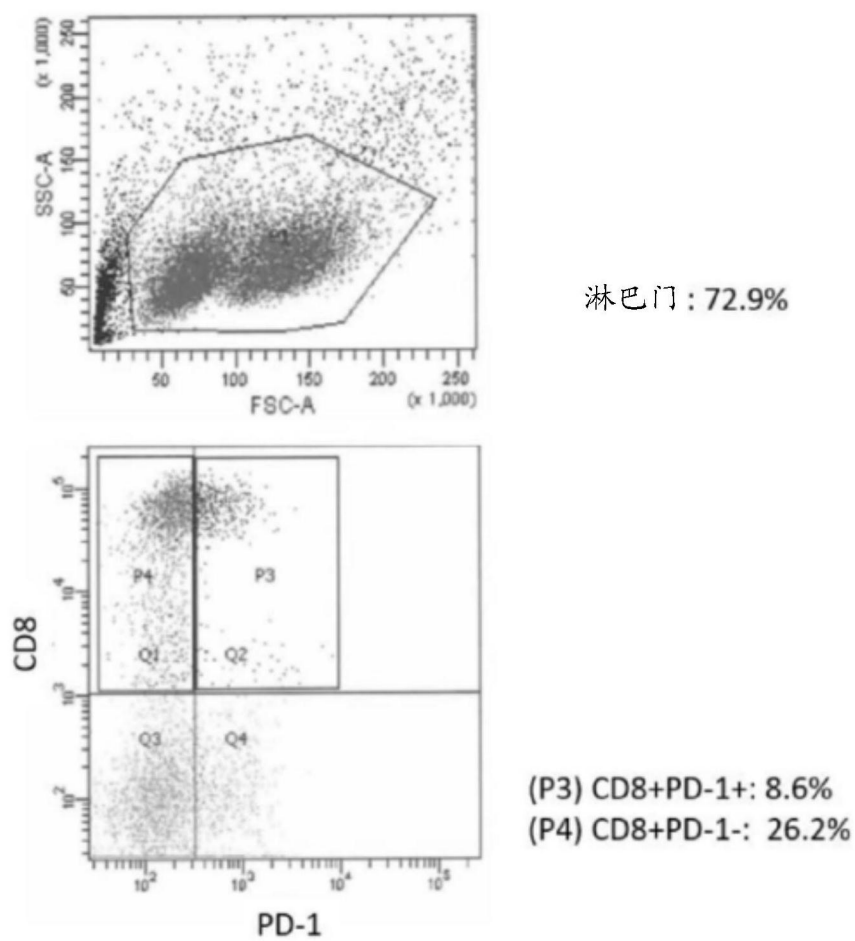


图3

抗PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的PD1阳性细胞的比较

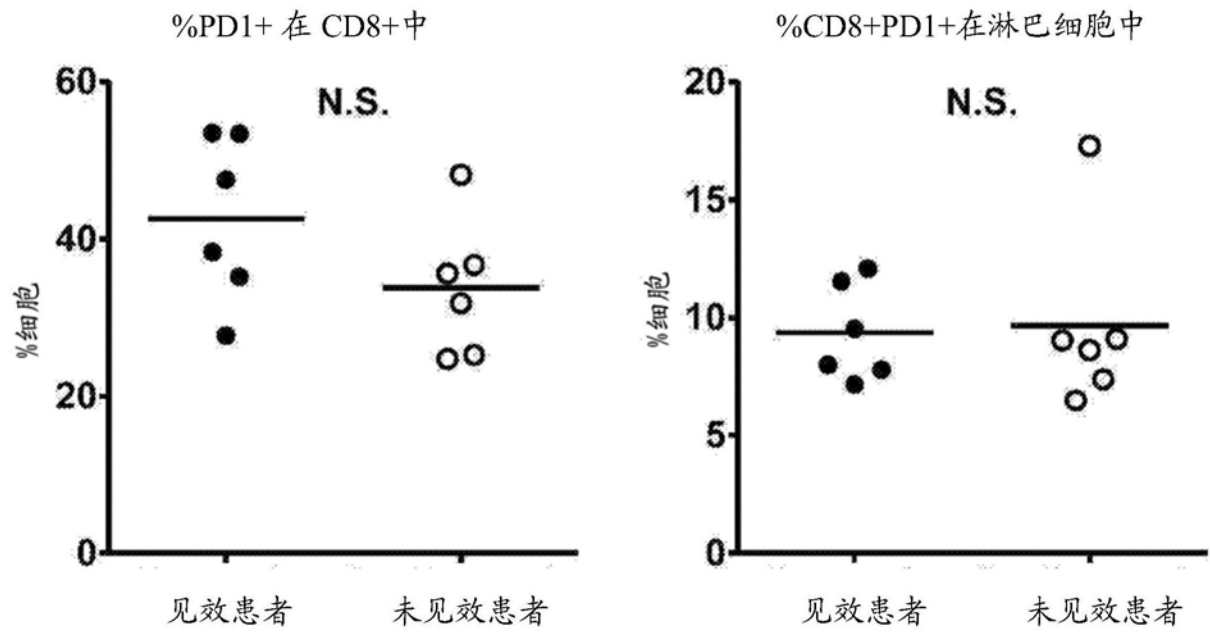


图4

治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的多样性指标的比较 (TCR α)

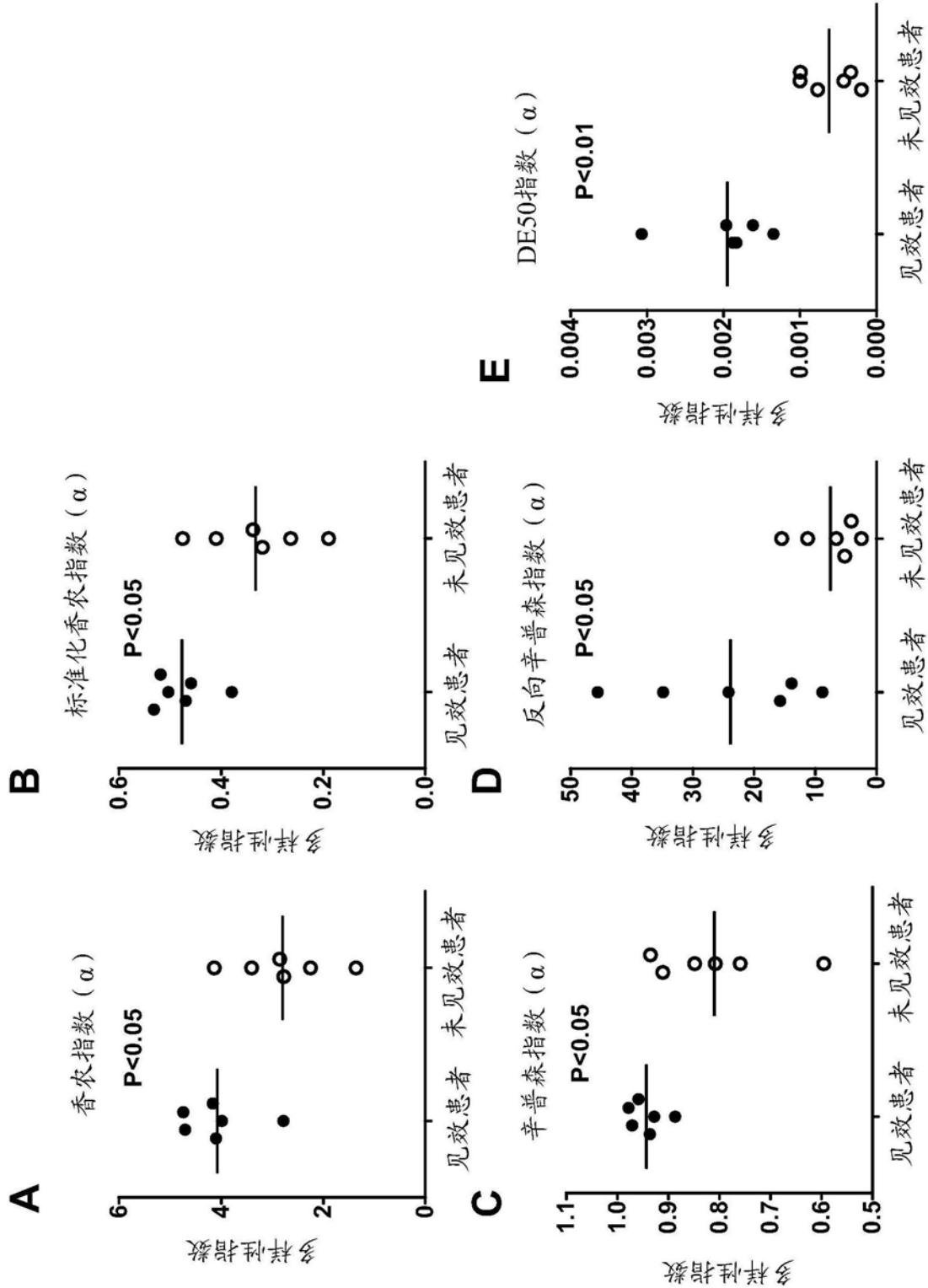


图5

治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的多样性指标的比较 (TCRβ)

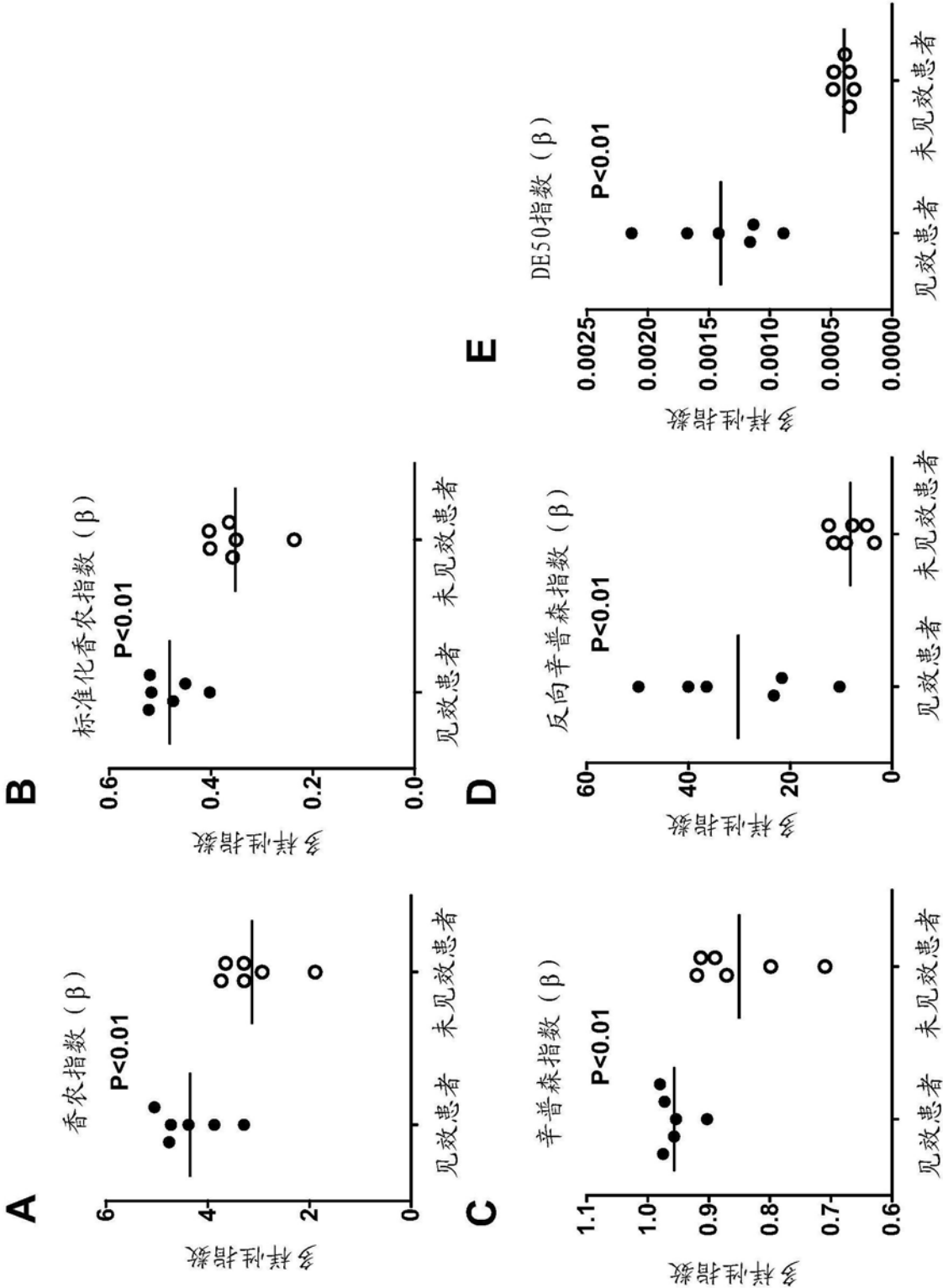


图6

各多样性指数ROC曲线

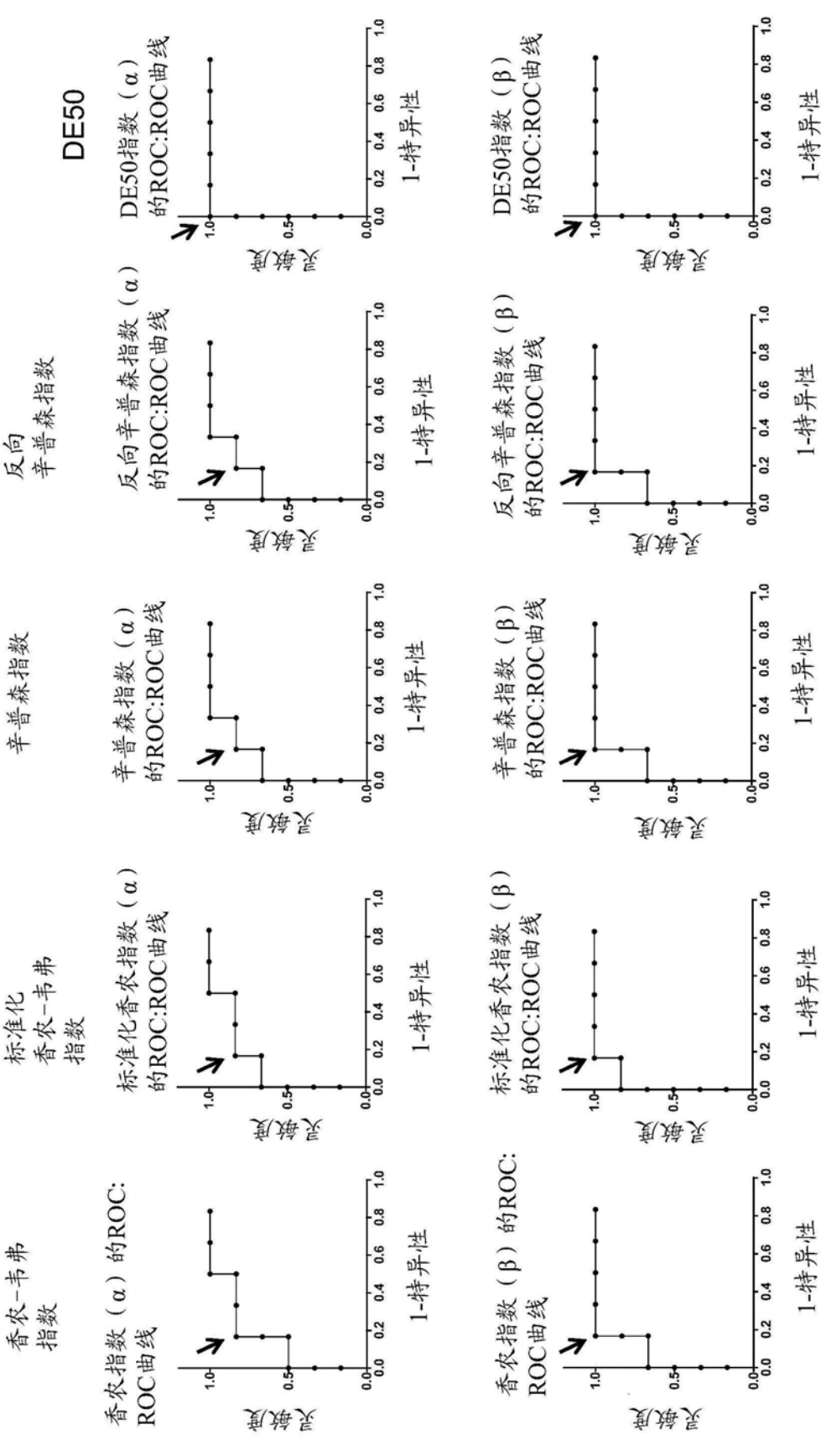


图7

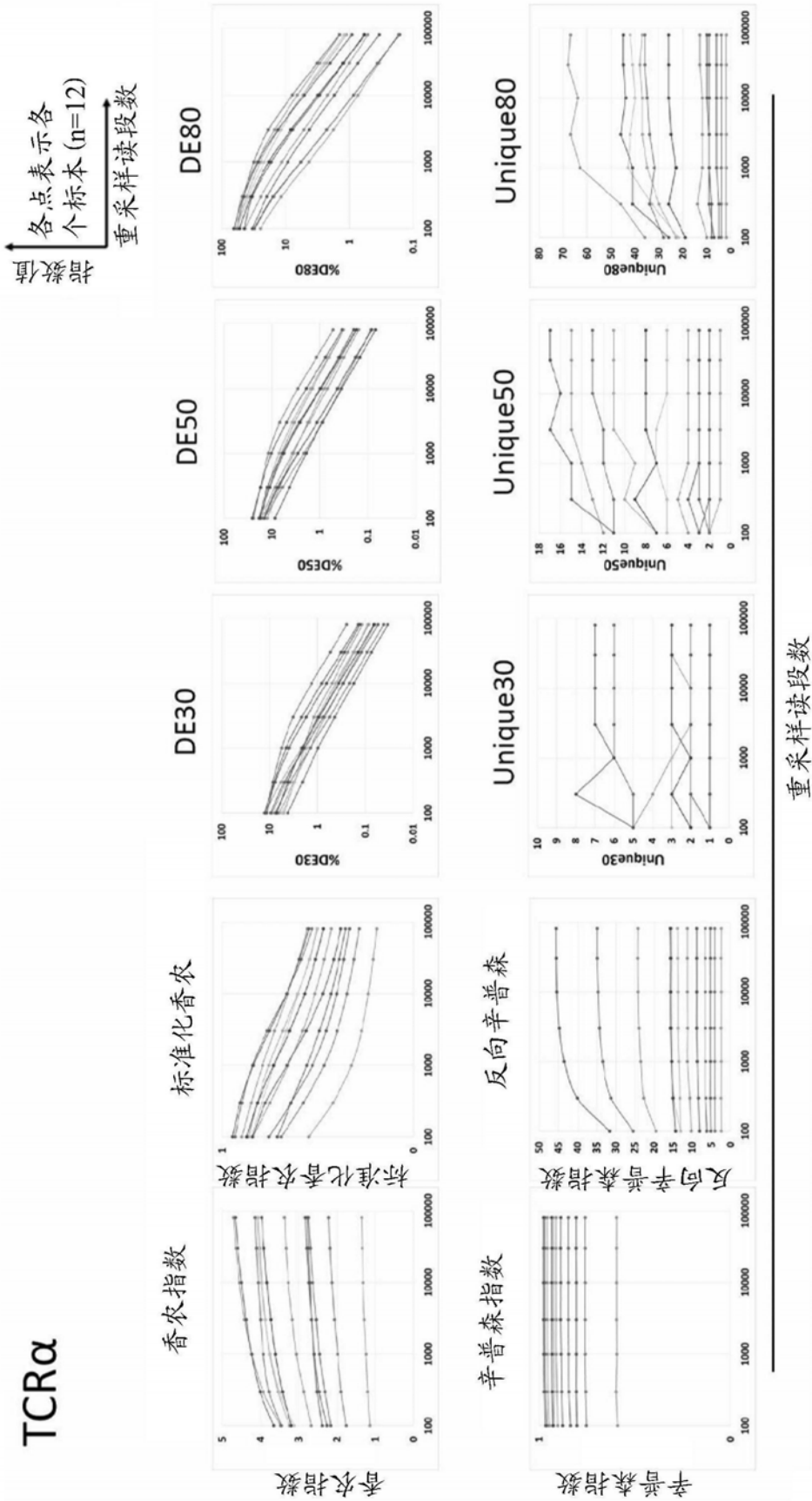


图8

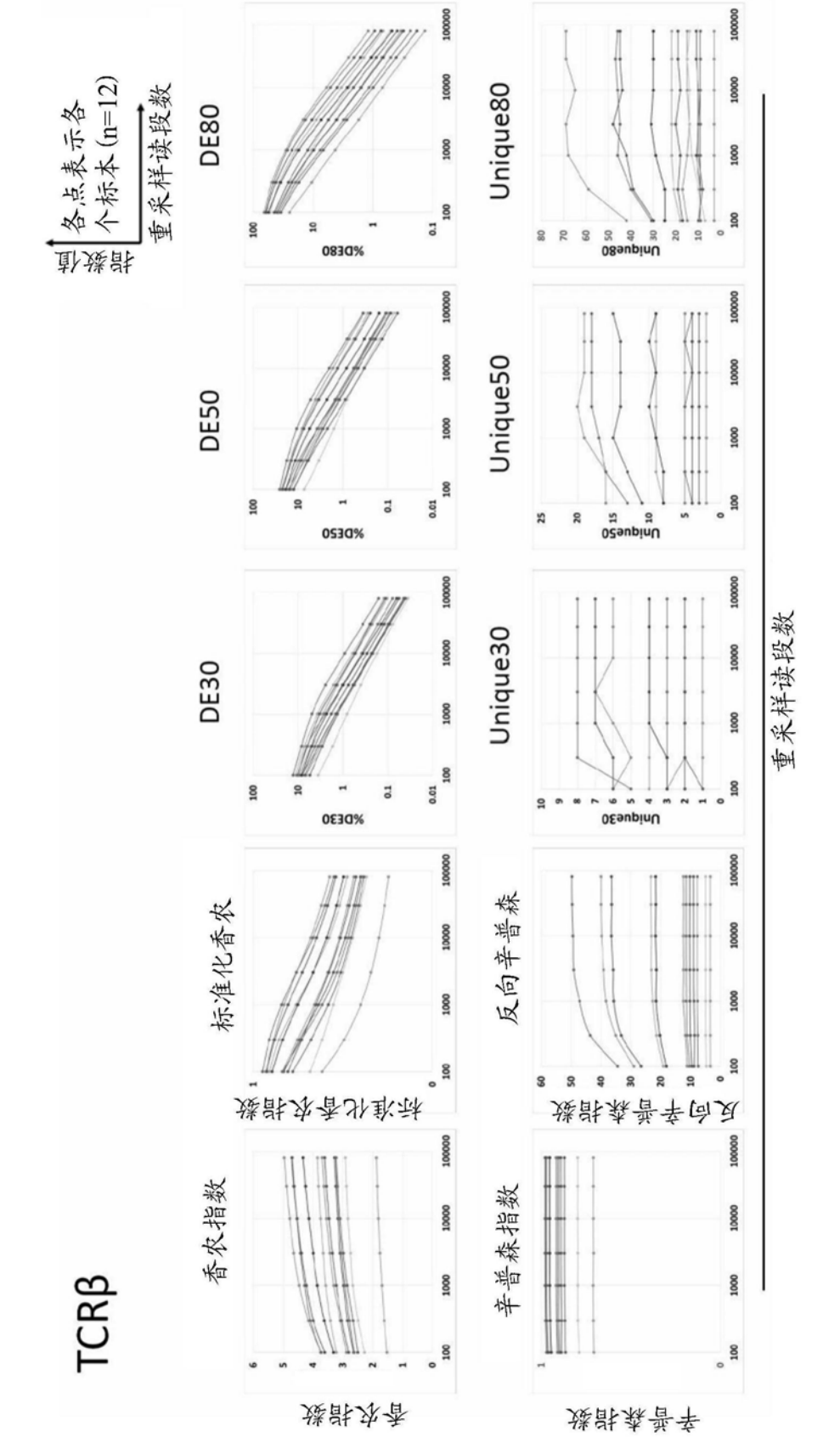


图9

治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的多样性指标的比较 (TCR α) (标准化为300000读段)

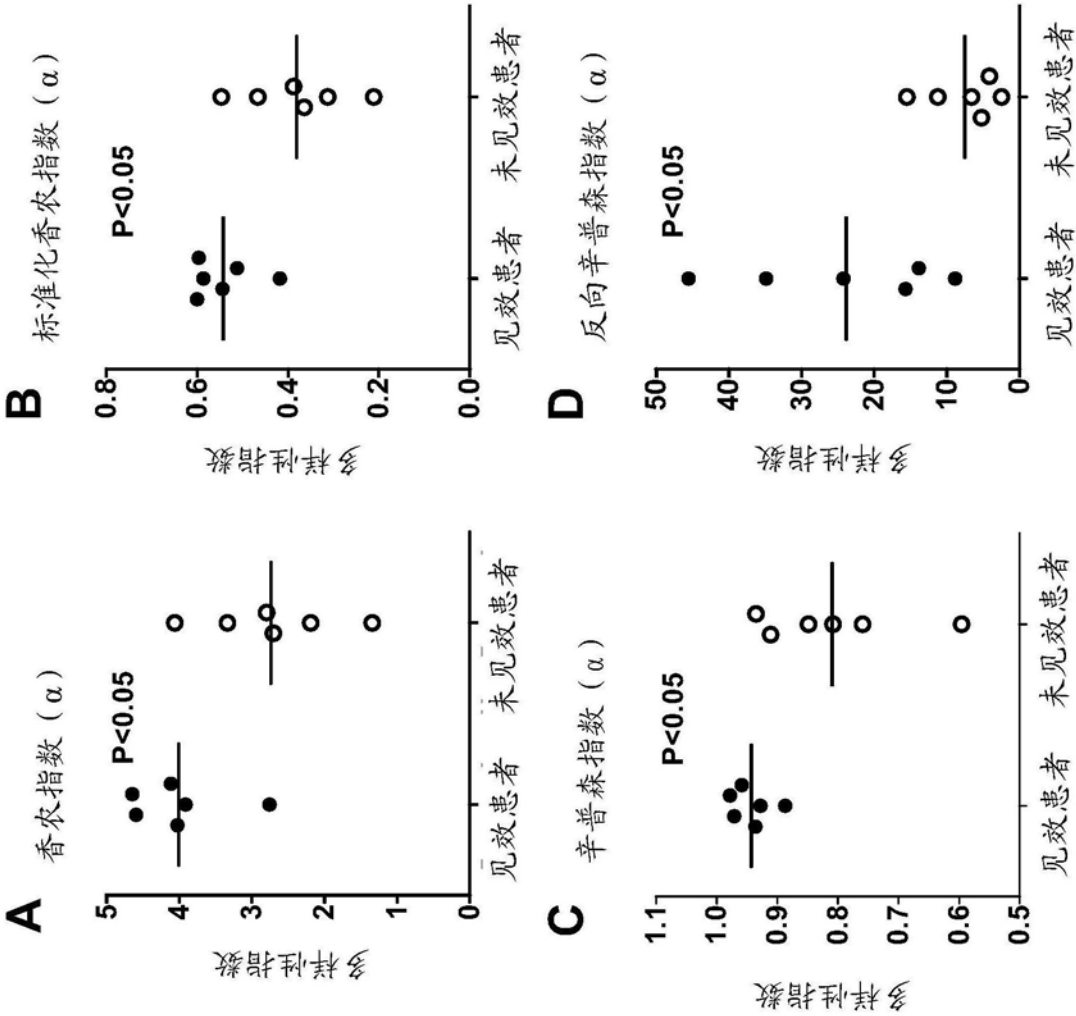


图10A

治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的多样性指标的比较 (TCR α) (标准化为30000读段)

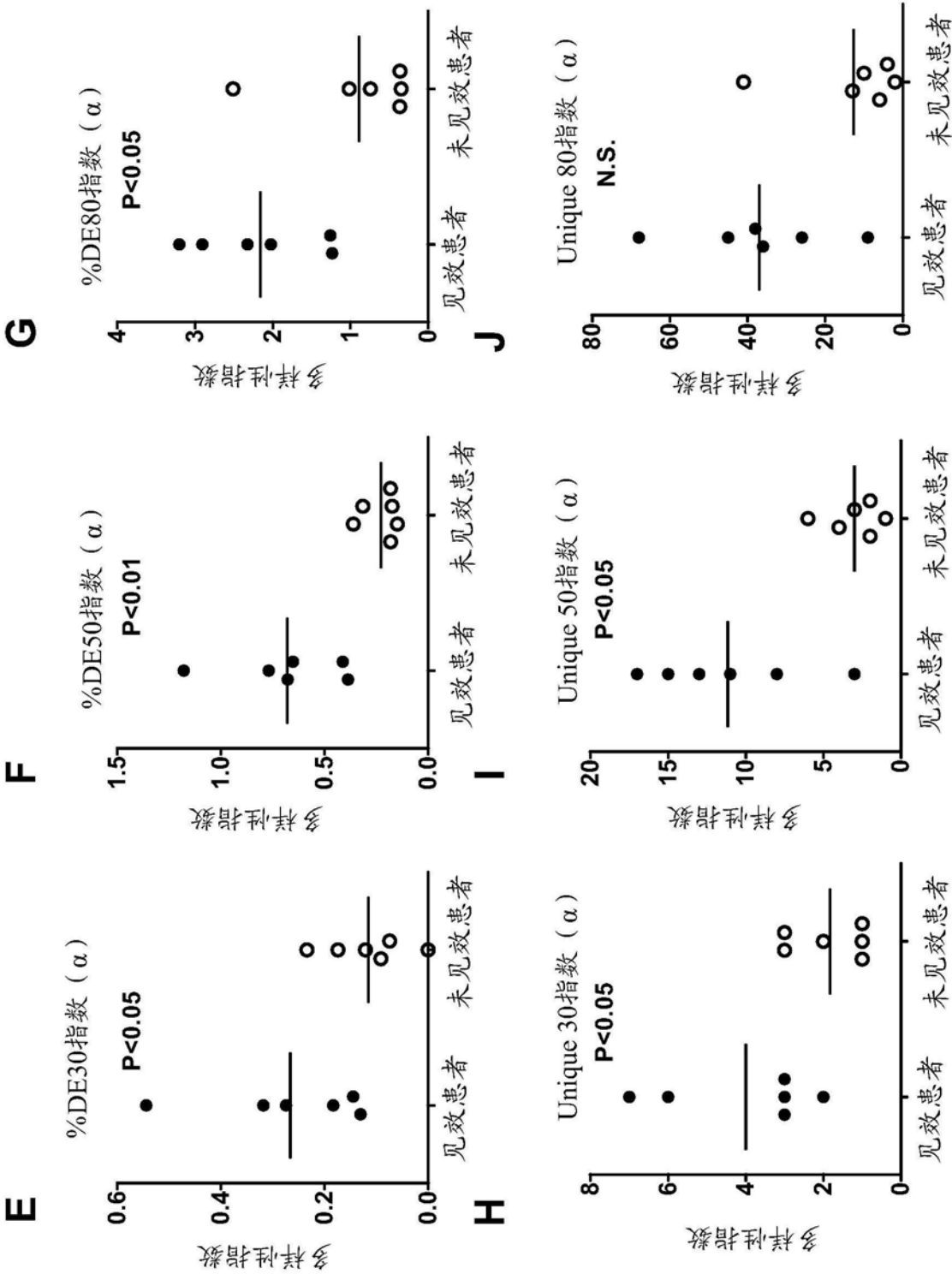


图10B

治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的多样性指标的比较 (TCR β) (标准化为300000读段)

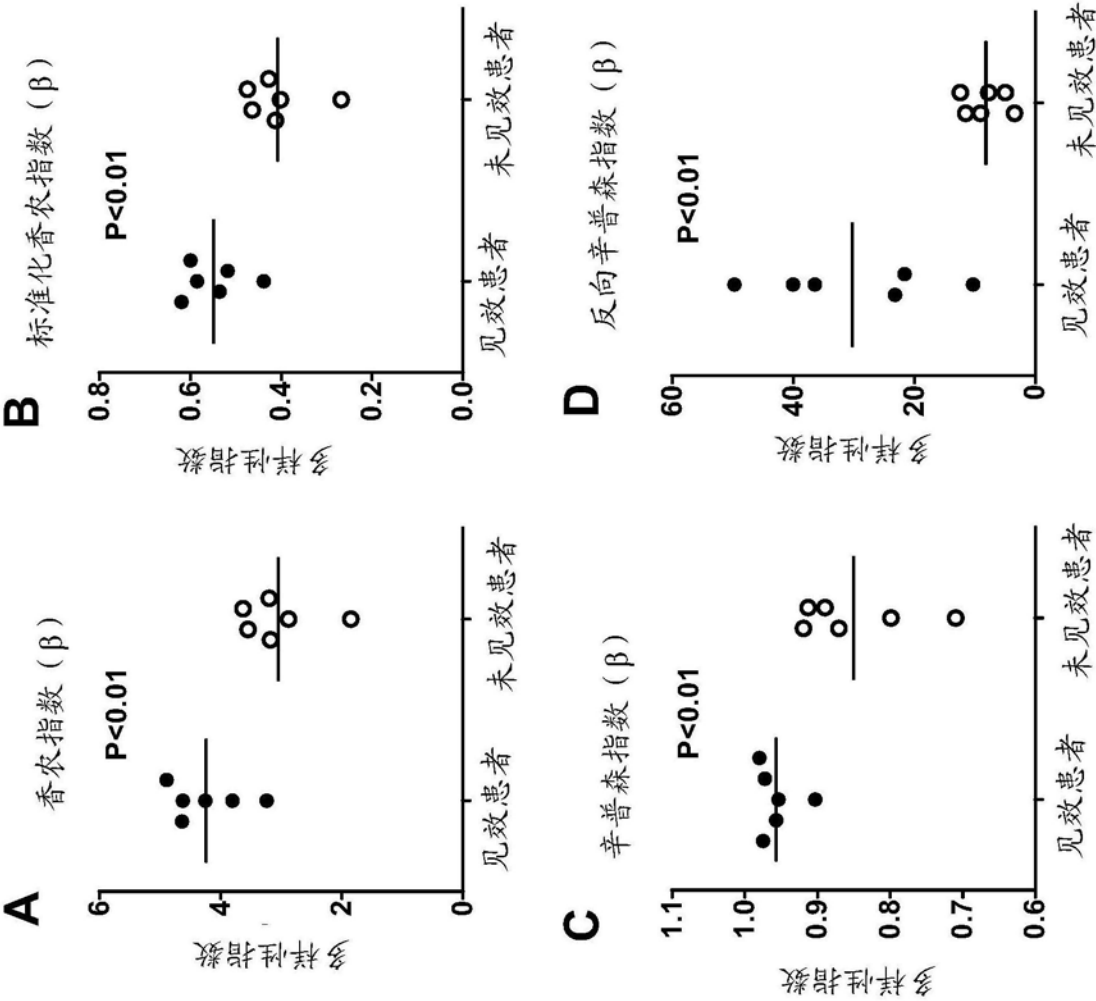


图11A

治疗前PD-1抗体见效患者与未见效患者之间的多样性指标的比较 (TCR β) (标准化为300000读段)

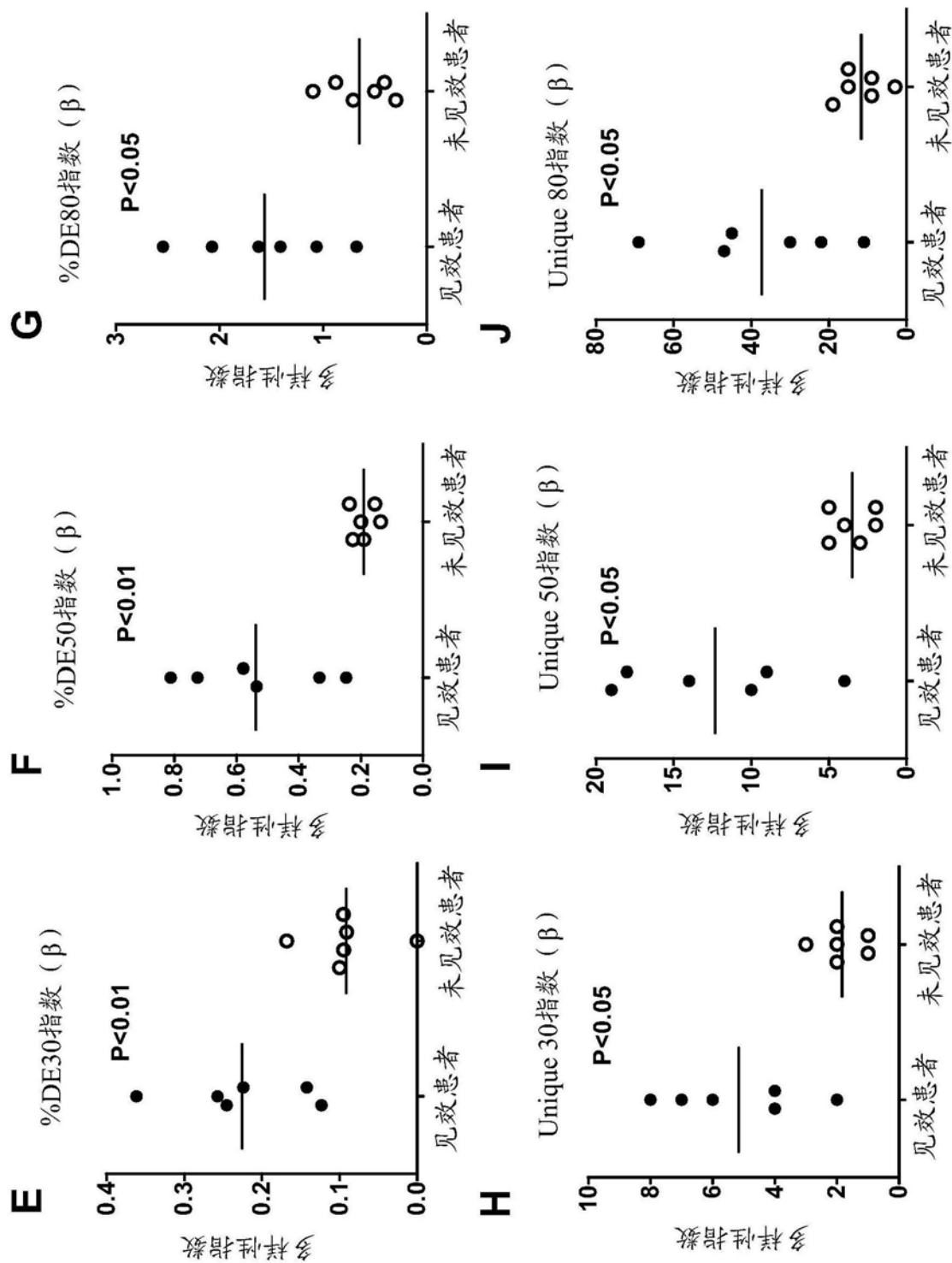


图11B

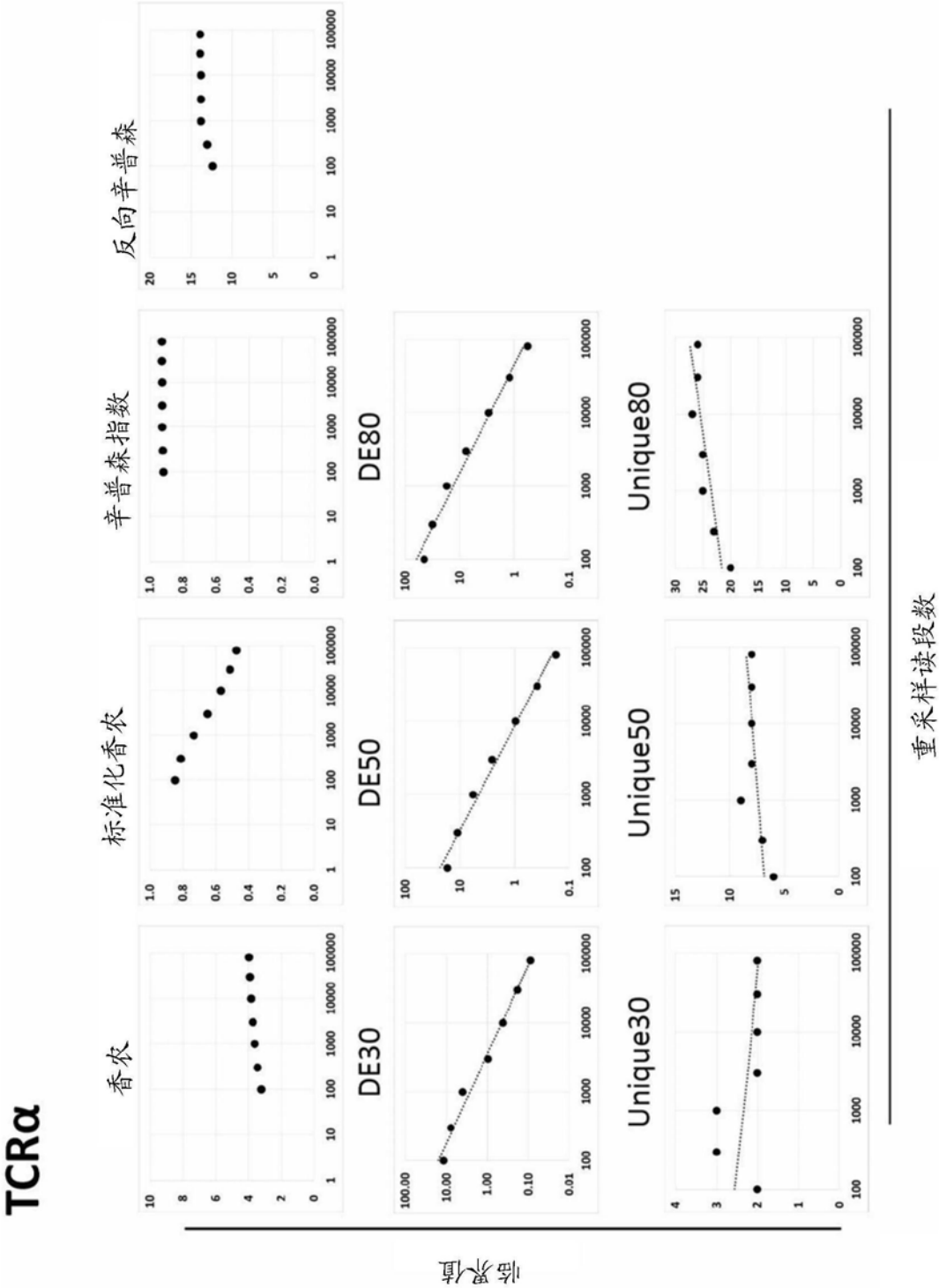
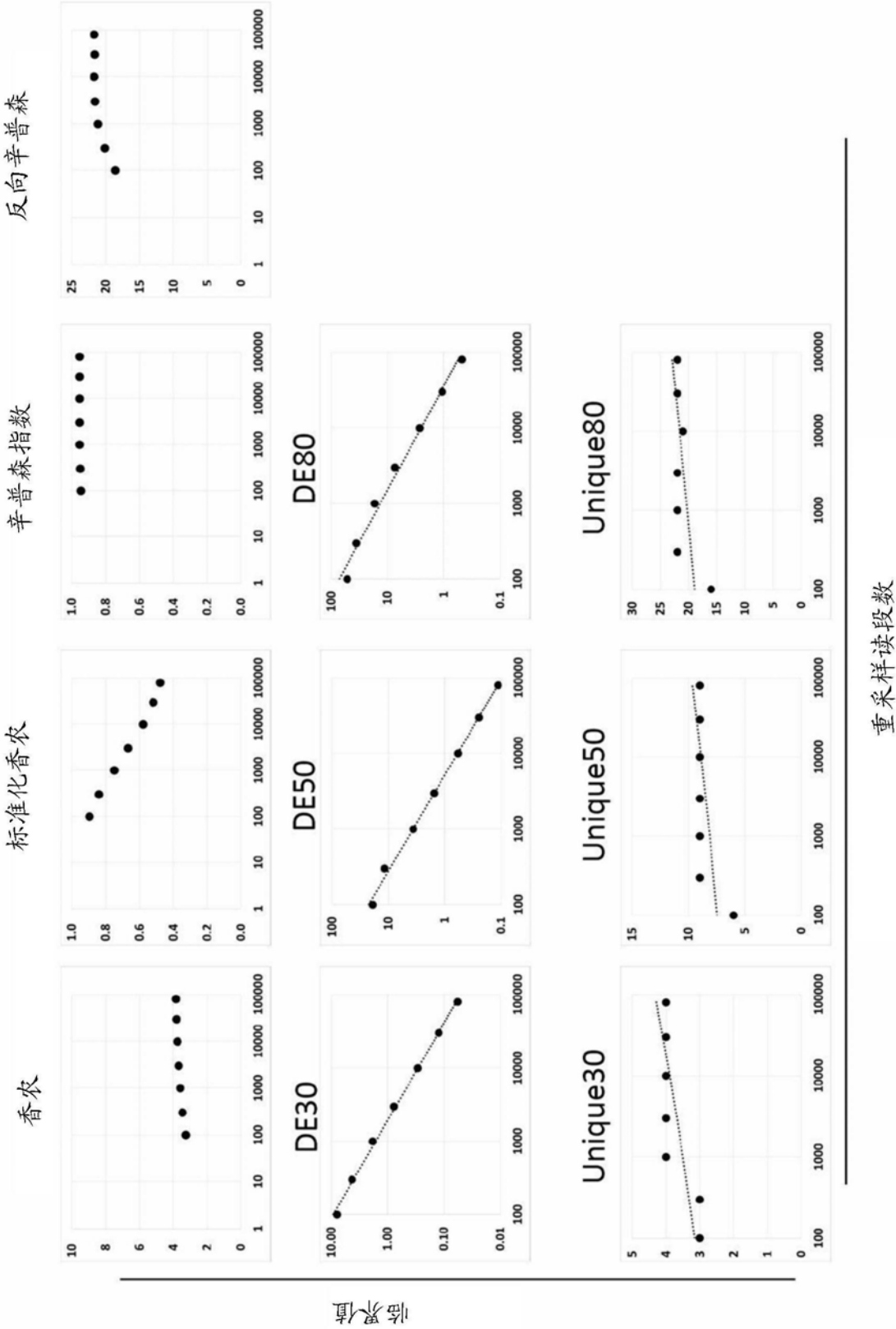


图12

TCRβ



临界值

图13

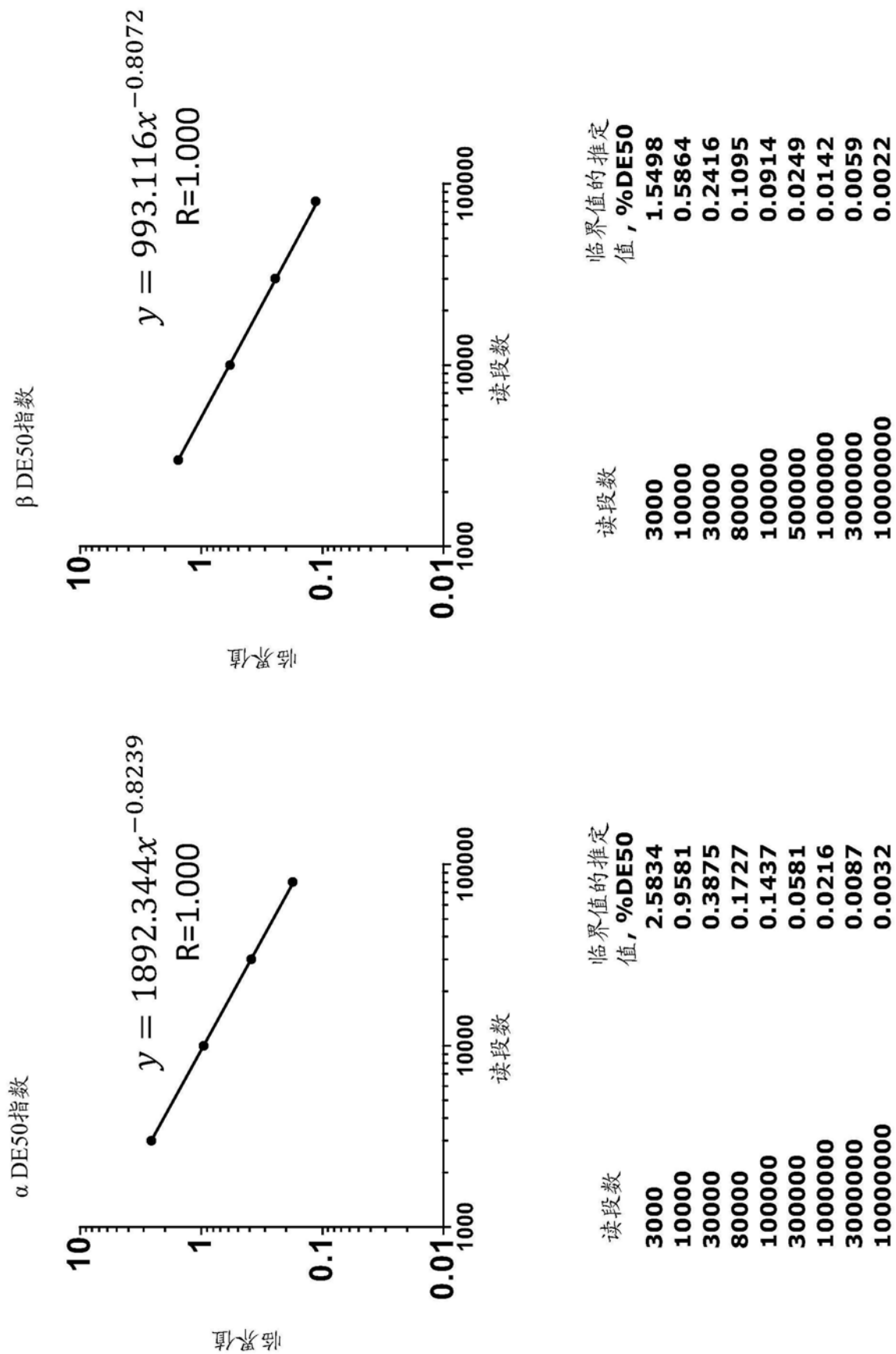


图14

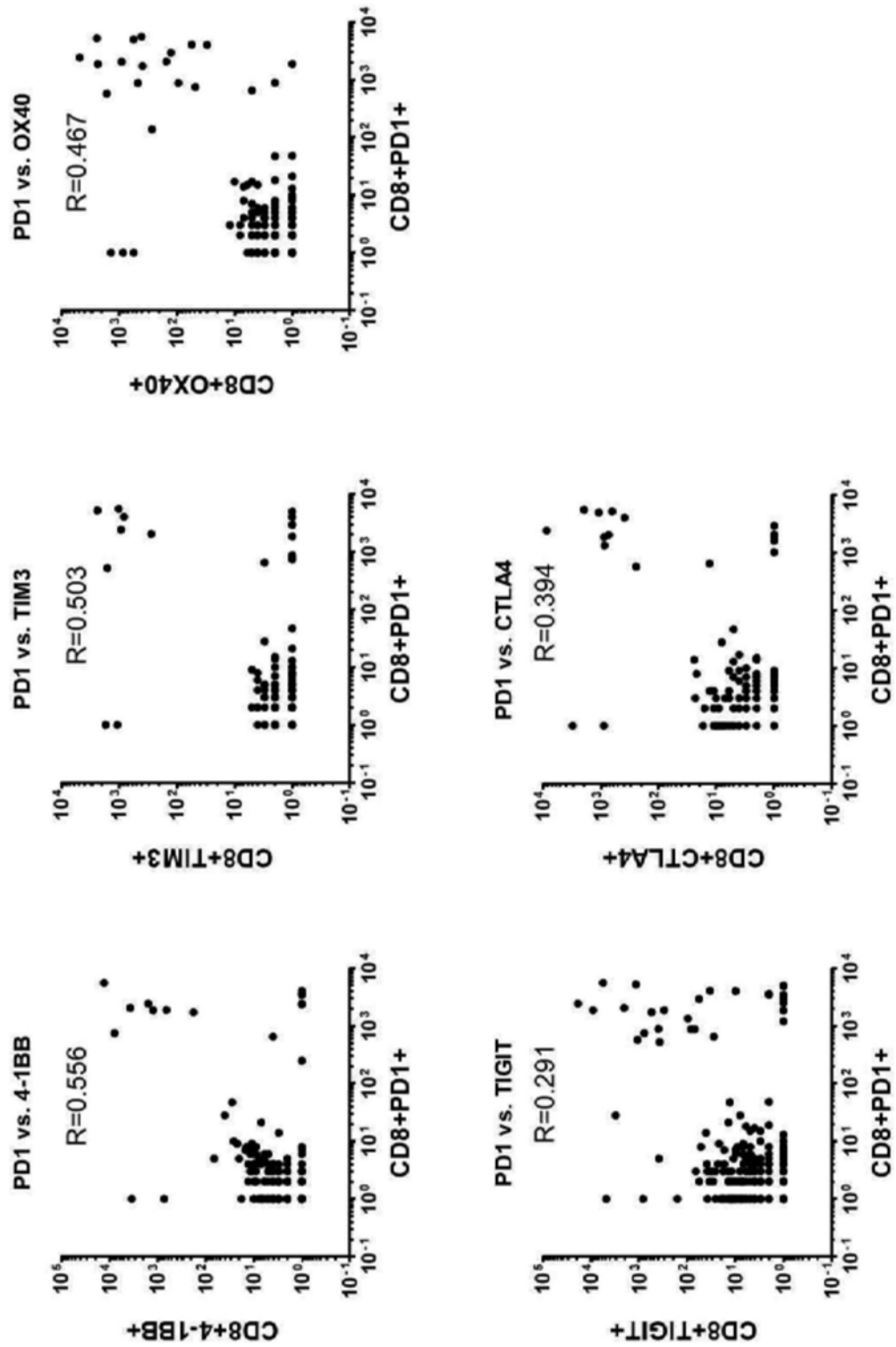


图15

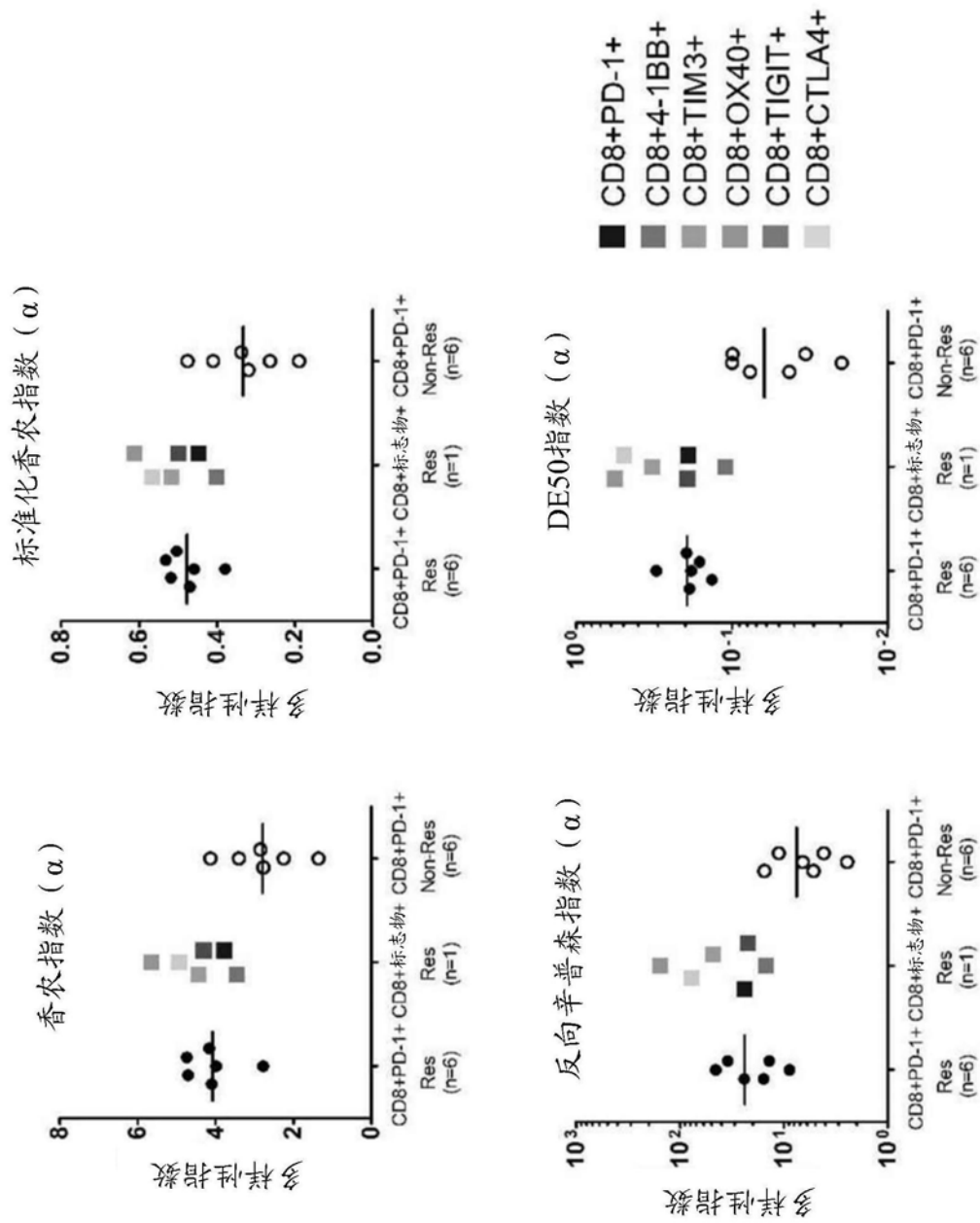


图16

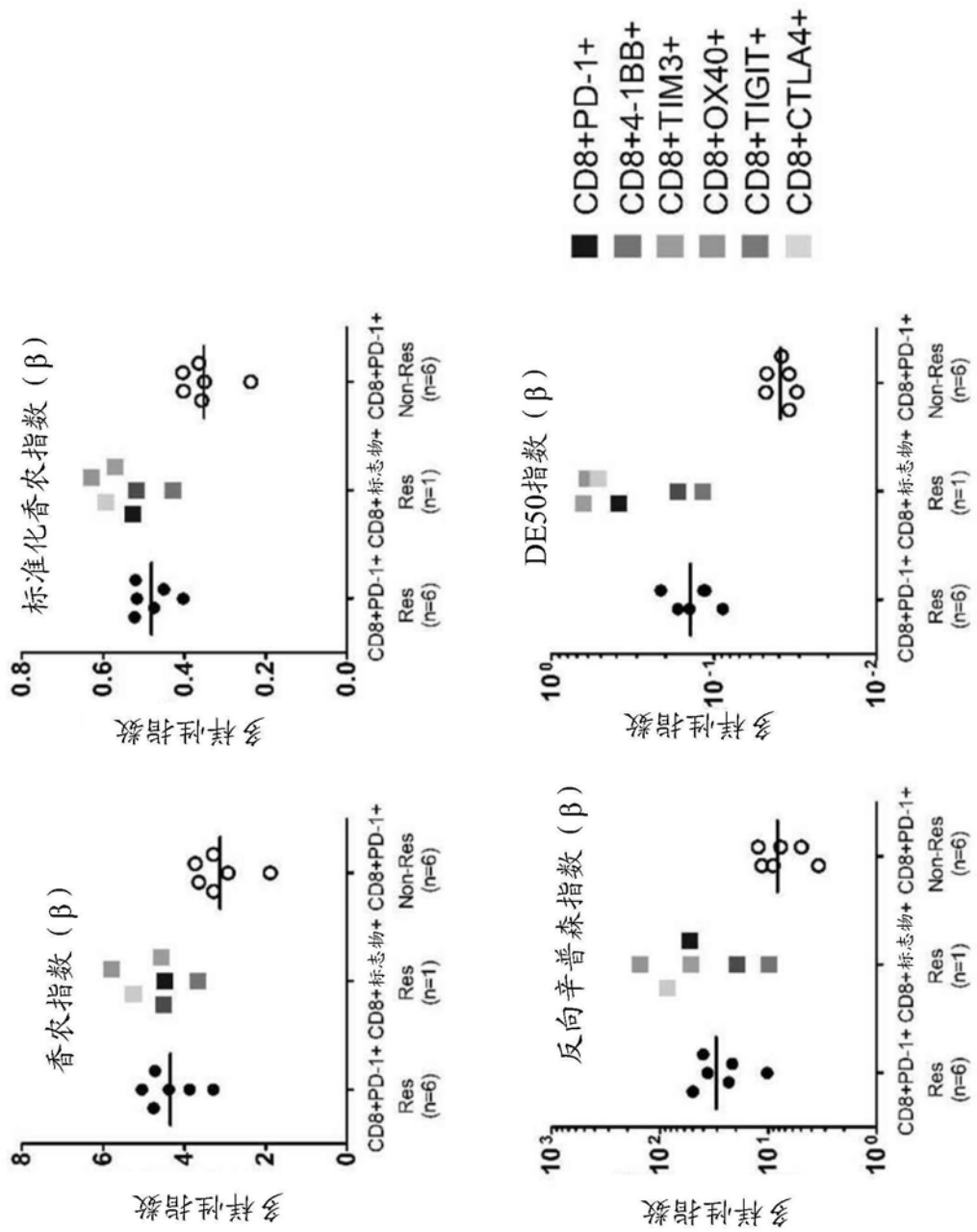


图17

专利名称(译)	癌症免疫疗法的新生物标志物		
公开(公告)号	CN110546269A	公开(公告)日	2019-12-06
申请号	CN201880017953.5	申请日	2018-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人兵庫医科大学 组库创世纪株式会社		
申请(专利权)人(译)	学校法人兵庫医科大学 组库创世纪株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人兵庫医科大学 组库创世纪株式会社		
[标]发明人	松本成司 铃木隆二		
发明人	松本成司 铃木隆二		
IPC分类号	C12Q1/02 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 A61P37/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 A61P37/02 C12Q1/02 G01N33/53 A61K45/06 C07K16/2809 C07K16/2815 G01N33/574		
代理人(译)	李雪 陈万青		
优先权	2017050105 2017-03-15 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种在开始癌症免疫疗法之前预测有效患者的技术。本发明提供一种使用受试者的T细胞受体(TCR)多样性作为对上述受试者的癌症免疫疗法的响应性的指标的方法。本发明还提供一种组合物，其是包含免疫检查点抑制剂的组合物，用于对T细胞的TCR多样性高的受试者治疗癌症。本发明还涉及利用这种TCR多样性的伴随药物。

$$1-\lambda = 1 - \sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \right)$$