



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107148274 A

(43)申请公布日 2017.09.08

(21)申请号 201580043408.X

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

(22)申请日 2015.08.17

代理人 王达佐 洪欣

(30)优先权数据

2014-166593 2014.08.19 JP

2015-085556 2015.04.20 JP

(51)Int.Cl.

A61K 35/17(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.02.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/073011 2015.08.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/027764 JA 2016.02.25

(71)申请人 国立大学法人 冈山大学

地址 日本冈山

申请人 小野药品工业株式会社

(72)发明人 鹤殿平一郎 荣川伸吾 豊冈伸一

权利要求书2页 说明书23页 附图10页

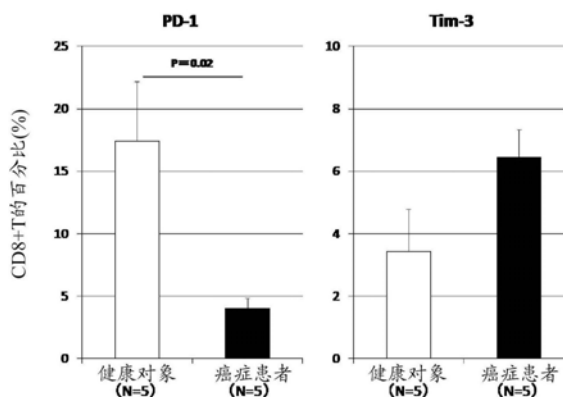
(54)发明名称

增强免疫细胞功能的方法和评估免疫细胞多功能性的方法

(57)摘要

本发明提供了通过离体激活各种免疫细胞来增强免疫细胞功能的方法,并提供功能增强的免疫细胞。本发明还提供免疫相关的细胞多功能性评估方法。选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药,通过增加具有高的产生IL-2、TNF α 和IFN γ 能力的CD8⁺T细胞,能够增强免疫细胞多功能性。通过将用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药处理的免疫细胞与未用双胍类抗糖尿病药处理的对照免疫细胞进行比较,可以评估免疫相关的细胞多功能性。当与对照相比,用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药处理的免疫细胞的多功能性被确定显著增加时,可以评估为所述免疫细胞对该治疗剂的敏感性提高。

CD8T细胞中的衰竭分子PD-1和Tim-3的表的比较 (健康对象与癌症患者)



PD-1的表达频率在癌症患者中显著较低。相反, Tim-3的表达频率在癌症患者中趋于较高。

1. 增强免疫细胞功能的方法,其包括使用治疗剂在体外处理移出的免疫细胞,所述治疗剂包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物。

2. 根据权利要求1所述的增强免疫细胞功能的方法,其中所述免疫细胞选自:CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、NK细胞、 γ δ T细胞、NKT细胞、B细胞和骨髓细胞。

3. 通过权利要求1或2所述的方法功能被增强的免疫细胞。

4. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的通过权利要求1至3中任一项所述的方法功能被增强的免疫细胞。

5. 根据权利要求4所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述与免疫异常有关的疾病选自:癌症、感染和自身免疫性疾病。

6. 用于评估移出的免疫细胞的多功能性的方法,其包括使用治疗剂在体外处理移出的免疫细胞,所述治疗剂包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物;测量经处理的免疫细胞的三种细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 的细胞因子产生能力;以及测量细胞阳性率,所述细胞阳性率表示所述三种细胞因子的细胞因子产生能力均为阳性的细胞的比率。

7. 根据权利要求6所述的多功能性评估方法,其还包括测量移出的免疫细胞中Tim-3和/或PD-1的表达的步骤。

8. 根据权利要求6或7所述的多功能性评估方法,其中所述免疫细胞选自:CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、NK细胞、 γ δ T细胞、NKT细胞、B细胞和骨髓细胞。

9. 与免疫异常有关的疾病的测试方法,所述方法使用权利要求6至8中任一项所述的多功能性评估方法。

10. 根据权利要求9所述的测试方法,其中与免疫异常有关的疾病的测试是这样的测试:其补充性地用来确定,治疗剂对所述疾病的功效的预测、所述疾病的严重性的预测、所述疾病的预后的预测、或所述疾病的发作的预测。

11. 根据权利要求10所述的测试方法,其中用于所述疾病的治疗剂是包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂。

12. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物,所述药剂在使用权利要求9至11中任一项所述的测试方法进行测试之后使用。

13. 根据权利要求12所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述与免疫异常有关的疾病选自:癌症、感染和自身免疫性疾病。

14. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物,所述药剂与选自免疫抑制因子阻断剂和共刺激受体激动剂的至少一种治疗剂组合施用。

15. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的选自免疫抑制因子阻断剂和共刺激受体激动剂的至少一种治疗剂,所述药剂与选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物组合施用。

16. 根据权利要求14或15所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述免疫抑制因子阻断剂是选自以下的抗体或融合蛋白的一种或任意组合:抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、PD-L1融合蛋白、PD-L2融合蛋白、抗Tim-3抗

体、抗LAG-3抗体、抗BTLA抗体、抗VISTA抗体。

17. 根据权利要求16所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述抗CTLA-4抗体是易普利姆玛 (Ipilimumab) 或曲美木单抗 (Tremelimumab), 所述抗PD-1抗体是纳武单抗 (Nivolumab)、派姆单抗 (Pembrolizumab)、PDR-001、REGN-2810、BGB-A317或AMP-514, 所述抗PD-L1抗体是阿特朱单抗 (Atezolizumab)、阿维单抗 (Avelumab)、德瓦鲁单抗 (Durvalumab) 或BMS-936559, 以及所述PD-L2融合蛋白是AMP-224。

18. 根据权利要求14或15所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述共刺激受体激动剂是选自以下的抗体或抗体的任意组合: 抗CD137抗体、抗OX40抗体、抗HVEM抗体、抗CD27抗体、抗GITR抗体和抗CD28抗体。

19. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物,并且与癌症疫苗组合施用。

20. 根据权利要求19所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述癌症疫苗是癌肽疫苗、癌蛋白疫苗、树突细胞疫苗或者针对已证实由病毒感染产生的癌症的疫苗。

21. 根据权利要求13至20中任一项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述与免疫异常有关的疾病选自: 癌症、感染和自身免疫性疾病。

22. 根据权利要求21所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述癌症是选自以下的至少一种癌症: 头颈癌、食道癌、胃癌、结肠直肠癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胆囊癌、胆管癌、胆道癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、肾癌、尿路上皮癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤、白血病、骨髓增生异常综合征、恶性淋巴瘤、成人T细胞白血病、多发性骨髓瘤、皮肤癌、脑肿瘤、胸膜间皮瘤和未知的原发性癌。

23. 根据权利要求21或22所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中癌症的治疗是抑制癌症进展,以及癌症的预防是预防癌症复发。

24. 用于抑制癌症的进展、治疗癌症、预防癌症和/或预防癌症复发的药剂,其包含作为活性成分的抗PD-1抗体,所述药剂与二甲双胍组合施用,其中所述癌症是选自以下的至少一种癌症: 头颈癌、食管癌、胃癌、结肠直肠癌、肝细胞癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、肾细胞癌、尿路上皮癌、霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、成胶质细胞瘤和胸膜间皮瘤。

25. 根据权利要求14至24中任一项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述药剂在使用权利要求9至11中任一项所述的测试方法进行测试之后使用。

增强免疫细胞功能的方法和评估免疫细胞多功能性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及增强免疫细胞功能的方法,涉及功能增强的免疫细胞,以及用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,所述药剂含有作为活性成分的功能增强的免疫细胞。本发明还涉及用于评估免疫细胞的多功能性的方法。

背景技术

[0002] T细胞作为免疫细胞,占外周血淋巴细胞的70~80%。T细胞分布在脾脏或遍及体内的淋巴结中,并有助于生物防御。T细胞分为细胞毒性T细胞(CD8⁺T细胞)和辅助性T细胞(CD4⁺T细胞),其中细胞毒性T细胞直接影响病毒感染的细胞或癌细胞,辅助性T细胞(CD4⁺T细胞)辅助免疫活性细胞如细胞毒性T细胞的功能。T细胞具有在其表面上表达的T细胞受体(TCR),并且通过这些TCR识别抗原。单一T细胞表达用于识别一种特定种类抗原的TCR。这被称为T细胞的抗原特异性。T细胞在各种免疫相关的临床病症中发挥重要作用,包括感染、肿瘤、器官移植和过敏。

[0003] 近年来,已经阐明了免疫衰竭的机制,并且有报道指出,在癌症治疗中,抑制衰竭分子与配体的结合很重要。一些癌症患者具有显著较差的免疫应答(免疫衰竭)。免疫衰竭由以下引起:CD8⁺T细胞表达衰竭标记物如PD-1、Tim-3、Lag3等,并且这些衰竭标记物分子(衰竭分子)与其配体结合,这导致同时产生IL-2、TNF α 和IFN γ (多功能性)的能力丧失,并且还导致经由细胞凋亡的细胞死亡(非专利文献1-6)。为了避免这种细胞凋亡和CD8⁺T细胞的免疫衰竭,有必要抑制衰竭分子本身的表达。然而,由于目前不存在这样的技术,抑制衰竭分子与配体的结合是恢复CD8⁺T细胞功能并阻止细胞凋亡的唯一方法。然而,衰竭分子的种类(数量)有增加的趋势,并且探寻适当数量的衰竭分子和被抑制免受结合的配体的研究仍在进行中。此外,由于该方法明显地具有副作用,所以期望具有较少副作用的方法。

[0004] 为了监测疾病状态下的免疫状态或评估疫苗功效,对抗原特异性T细胞进行定量和定性测量作为免疫细胞多功能性的评估是重要的。对于进行免疫疗法如癌症疫苗疗法的患者,需要在体外对移出的细胞进行1或2周的抗原刺激以便判断治疗效果。T细胞功能测量方法的实例包括:细胞毒性测试,用于检测细胞因子产生的ELISA方法,通过荧光珠免疫测定检测分泌自整个细胞组的分子的方法,通过使用流式细胞仪(FCM,FACS)技术进行的细胞内细胞因子分析(细胞内细胞因子染色测定:ICS方法),以及通过ELISPOT(酶联免疫斑点)法以单个细胞为基础检测分子分泌的方法。

[0005] 尽管先前已知的用于测量T细胞功能的技术能够精确分析单个T细胞功能,但是分析结果不一定与预后相关。更具体地,难以确定健康对象或患有例如难治性感染或癌症的患者的免疫动力学,并且难以预测通过免疫激活剂进行的治疗的预后。在先前已知的用于增加T细胞功能的技术中,显著地增加患有例如难治性感染或癌症的患者或者健康对象的获得性免疫并从而治愈该症状存在局限性。首先,用于精确地验证或预测治疗效果的免疫动力学评估的条件不够好,并且不存在可用于全面判断并评估用于增加多种T细胞功能的方法和技术(评估免疫细胞多功能性的方法涉及治疗预后)的方法。

[0006] 例如,在施用疫苗中,几乎总是需要施用佐剂以及抗原,但佐剂可引起严重的副作用。迄今为止,还没有发现安全、有效并可用于所有疫苗的佐剂。此外,在感染或癌症的许多情况下,通过施用疫苗不能获得足够的保护性免疫,尽管外周血中针对疫苗的CD8阳性杀伤T细胞有所增加。这种疫苗应用中的失败,通常可能是由于免疫衰竭。基于这种观点,至今没有全面的免疫动力学评估技术和T细胞功能增加剂,或者通过消除各种免疫细胞的免疫衰竭的细胞多功能性增加方法和精确且便利地预测和评估所产生的效果的方法的组合技术的方法。

[0007] 专利文献1公开了二甲双胍用于增强化疗药物的效果,但是专利文献1的实施例公开了二甲双胍本身不具有肿瘤治疗效果。非专利文献7公开了二甲双胍作为II型糖尿病治疗剂的作用机制。

[0008] 引用列表

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:JP2013-503171 A

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:Proc Natl Acad Sci USA.2002;99:12293-7

[0013] 非专利文献2:Cancer Res.2004;64:1140-5

[0014] 非专利文献3:J Exp Med.2010;207:2187-94

[0015] 非专利文献4:Trends Immunol.2011;32:345-9

[0016] 非专利文献5:Cancer Res.2011;71:3540-51

[0017] 非专利文献6:Nat Rev Cancer.2012;12:252-64

[0018] 非专利文献7:Nature 2006;439:682-687

[0019] 发明概述

[0020] 技术问题

[0021] 本发明的目的是离体激活免疫细胞,并提供用于增强免疫细胞功能的方法,以及提供功能增强的免疫细胞。本发明的另一个目的是提供评估免疫相关细胞的多功能性的方法。

[0022] 问题的解决方案

[0023] 为了实现上述目的,本发明的发明人的注意力集中于由CD8⁺T细胞产生的细胞因子和免疫细胞的功能,并进行了广泛的研究。结果,发明人发现,选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物,增加了具有高的产生IL-2、TNF α 和IFN γ 能力的CD8⁺T细胞,从而增强所述功能;根据该发现,发明人完成了本发明。通过将用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物处理的对照免疫细胞的多功能性,与未用双胍类抗糖尿病药物处理的对照免疫细胞的多功能性进行比较,来评估免疫细胞的多功能性。当确认用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物处理的免疫细胞与对照的多功能性相比具有显著增加的多功能性时,可以确定免疫细胞对治疗剂的敏感性提高了。在通过评估方法确定对治疗剂具有增加的敏感性的免疫细胞中,可以预期来自选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的高治疗效果。

[0024] 本发明包括以下发明。

[0025] 1.增强免疫细胞功能的方法,其包括使用治疗剂在体外处理移出的免疫细胞,所

述治疗剂包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物。

[0026] 2. 根据第1项所述的增强免疫细胞功能的方法,其中所述免疫细胞选自:CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、NK细胞、 γ δ T细胞、NKT细胞、B细胞和骨髓细胞。

[0027] 3. 通过第1项或第2项所述的方法功能被增强的免疫细胞。

[0028] 4. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的通过第1项至第3项中任一项所述的方法功能被增强的免疫细胞。

[0029] 5. 根据第4项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述与免疫异常有关的疾病选自:癌症、感染和自身免疫性疾病。

[0030] 6. 用于评估移出的免疫细胞的多功能性的方法,其包括使用治疗剂在体外处理移出的免疫细胞,所述治疗剂包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物;测量所处理的免疫细胞的三种细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 的细胞因子产生能力;以及测量细胞阳性率,所述细胞阳性率表示三种细胞因子的细胞因子产生能力均为阳性的细胞的比率。

[0031] 7. 根据第6项所述的多功能性评估方法,其还包括测量移出的免疫细胞中Tim-3和/或PD-1的表达的步骤。

[0032] 8. 根据第6项或第7项所述的多功能性评估方法,其中所述免疫细胞选自:CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、NK细胞、 γ δ T细胞、NKT细胞、B细胞和骨髓细胞。

[0033] 9. 与免疫异常有关的疾病的测试方法,所述方法使用第6项至第8项中任一项所述的多功能性评估方法。

[0034] 10. 根据第9项所述的测试方法,其中与免疫异常有关的疾病的测试是这样的测试:其补充性地用于确定:治疗剂对疾病的功效的预测,疾病的严重性的预测,疾病的预后的预测,或疾病的发作的预测。

[0035] 11. 根据第10项所述的测试方法,其中所述疾病的治疗剂是包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂。

[0036] 12. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物,所述药剂在用第9项至第11项中任一项所述的测试方法进行测试之后使用。

[0037] 13. 根据第12项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中与免疫异常有关的疾病选自:癌症、感染和自身免疫性疾病。

[0038] 14. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物,其中将所述药剂与选自免疫抑制因子阻断剂和共刺激受体激动剂的至少一种治疗剂组合施用。

[0039] 15. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的选自免疫抑制因子阻断剂和共刺激受体激动剂的至少一种治疗剂,其中将所述药剂与选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物组合施用。

[0040] 16. 根据第14项或第15项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述免疫抑制因子阻断剂是选自以下的抗体或融合蛋白的一种或任意组合:抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、PD-L1融合蛋白、PD-L2融合蛋白、抗Tim-3抗体、抗LAG-3抗体、抗BTLA抗体和抗VISTA抗体。

[0041] 17. 根据第16项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中抗CTLA-4抗体是易普利姆玛(Ipilimumab)或曲美木单抗(Tremelimumab),抗PD-1抗体是纳武单抗(Nivolumab)、派姆单抗(Pembrolizumab)、PDR-001、REGN-2810、BGB-A317或AMP-514,以及抗PD-L1抗体是阿特朱单抗(Atezolizumab)、阿维单抗(Avelumab)、德瓦鲁单抗(Durvalumab)或BMS-936559,并且所述PD-L2融合蛋白是AMP-224。

[0042] 18. 根据第14项或第15项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述共刺激受体激动剂是选自以下的抗体或抗体的任意组合:抗CD137抗体、抗OX40抗体、抗HVEM抗体、抗CD27抗体、抗GITR抗体和抗CD28抗体。

[0043] 19. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物,并且将其与癌症疫苗组合施用。

[0044] 20. 根据第19项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述癌症疫苗是癌肽疫苗(如MAGE-3、MUC-1、WT1肽、P53或NY-ES01)、癌蛋白疫苗、树突细胞疫苗或针对证明通过病毒感染产生的癌症的疫苗。

[0045] 21. 根据第13项至第20项中任一项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述与免疫异常有关的疾病选自:癌症、感染和自身免疫性疾病。

[0046] 22. 根据第21项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述癌症是选自以下的至少一种癌症:头颈癌、食道癌、胃癌、结肠直肠癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胆囊癌、胆管癌、胆道癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、肾癌、尿路上皮癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤、白血病、骨髓增生异常综合征、恶性淋巴瘤、成人T细胞白血病、多发性骨髓瘤、皮肤癌、脑肿瘤、胸膜间皮瘤和未知的原发性癌。

[0047] 23. 根据第21项或第22项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中癌症的治疗是抑制癌症进展,以及癌症的预防是预防癌症复发。

[0048] 24. 用于抑制癌症进展、治疗癌症、预防癌症和/或预防癌症复发的药剂,其包含作为活性成分的抗PD-1抗体,所述药剂与二甲双胍组合施用,其中所述癌症是选自以下的至少一种癌症:头颈癌、食管癌、胃癌、结肠直肠癌、肝细胞癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、肾细胞癌、尿路上皮癌、霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑素瘤、成胶质细胞瘤和胸膜间皮瘤。

[0049] 25. 根据第14项至第24项中任一项所述的治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其中所述药剂在使用第9项至第11项中任一项所述的测试方法进行测试之后使用。

[0050] A. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其包括在使用第9项至第11项中任一项所述的测试方法进行测试之后,使用包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂。

[0051] B. 根据A项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其中所述与免疫异常有关的疾病选自:癌症、感染和自身免疫性疾病。

[0052] C. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其包括将包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂与选自免疫抑制因子阻断剂和共刺激受体激动剂的至少一种治疗剂组合施用。

[0053] D. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其包括将包含作为活性成分的选自免疫抑制因子阻断剂和共刺激受体激动剂的至少一种治疗剂与选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物组合施用。

[0054] E. 根据C项或D项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其中所述免疫抑制因子阻断剂是选自以下的抗体或融合蛋白的一种或任意组合:抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、PD-L1融合蛋白、PD-L2融合蛋白、抗Tim-3抗体、抗LAG-3抗体、抗BTLA抗体和抗VISTA抗体。

[0055] F. 根据E项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其中所述抗CTLA-4抗体是易普利姆玛或曲美木单抗,所述抗PD-1抗体是纳武单抗、派姆单抗、PDR-001、REGN-2810、BGB-A317或AMP-514,以及所述抗PD-L1抗体是阿特朱单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗或BMS-936559,并且所述PD-L2融合蛋白是AMP-224。

[0056] G. 根据C项或D项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其中所述共刺激受体激动剂是选自以下的抗体的一种或任意组合:抗CD137抗体、抗OX40抗体、抗HVEM抗体、抗CD27抗体、抗GITR抗体和抗CD28抗体。

[0057] H. 用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其包括将包含作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物治疗剂与癌症疫苗组合施用。

[0058] I. 根据H项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其中所述癌症疫苗是癌肽疫苗(如IMAGE-3、MUC-1、WT1肽、P53或NY-ES01)、癌蛋白疫苗、树突细胞疫苗或针对证明通过病毒感染产生的癌症的疫苗。

[0059] J. 用于治疗 and/或预防伴有免疫异常的疾病的方法,其包括施用通过根据第1项至第3项中任一项所述的方法功能被增强的免疫细胞。

[0060] K. 根据B项至J项中任一项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其中所述与免疫异常有关的疾病选自:癌症、感染和自身免疫性疾病。

[0061] L. 根据K项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其中所述癌症选自以下的至少一种癌症:头颈癌、食道癌、胃癌、结肠直肠癌、结肠癌、直肠癌、肝癌(如肝细胞癌)、胆囊癌、胆管癌、胆道癌、胰腺癌、肺癌(如非小细胞肺癌(鳞状非小细胞肺癌、非鳞状非小细胞肺癌)或小细胞肺癌)、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、肾癌(如肾细胞癌)、尿路上皮癌(如膀胱癌或上尿路癌)、前列腺癌、睾丸肿瘤(如生殖细胞瘤)、骨肉瘤、软组织肉瘤、白血病、骨髓增生异常综合征、恶性淋巴瘤(如霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤或弥漫性大B细胞淋巴瘤)、成人T细胞白血病、多发性骨髓瘤、皮肤癌(如恶性黑色素瘤或Merkel细胞癌)、脑肿瘤(如成胶质细胞瘤)、胸膜间皮瘤和未知的原发癌。

[0062] M. 根据K项或L项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其中所述癌症治疗是抑制癌症进展,并且所述癌症预防是预防癌症复发。

[0063] N. 用于抑制癌症进展、治疗癌症、预防癌症和/或预防癌症复发的方法,其包括将包含作为活性成分的抗PD-1抗体(例如纳武单抗、派姆单抗)的治疗剂与二甲双胍组合施用,其中所述癌症是选自以下的至少一种癌症:头颈癌、食管癌、胃癌、结肠直肠癌、肝细胞癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、肾细胞癌、尿路上皮癌、霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、多发性骨

髓瘤、恶性黑素瘤、成胶质细胞瘤和胸膜间皮瘤。

[0064] 0. 根据C项至N项中任一项所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其中所述方法在使用第9项至第11项中任一项所述的测试方法进行测试后使用。

[0065] 发明的有益效果

[0066] 本发明的用于治疗与免疫异常有关的疾病的药剂能够提高免疫力。例如,在癌症治疗中,本发明的药剂与外科手术、放射线治疗或化疗联合能够进行更有效的治疗,并且从而期望改善预后。另外,预期本发明的药剂用作术前化疗具有显著效果。此外,预期本发明的药剂具有抑制治疗后复发的效果。

[0067] 另外,通过使用本发明所述的增强免疫细胞功能的方法进行的细胞处理,可以预期以下效果。根据本发明的方法,通过用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物离体处理自身来源的细胞,然后将细胞返回至从其中获得所述细胞的身体内,赋予针对癌症或病原微生物的高生物防御能力是可能的。根据本发明所述的增强免疫细胞功能的方法处理细胞,然后将细胞返回至从其中获得所述细胞的身体内,可以期望预防癌症或感染的效果。

附图说明

[0068] 图1示出通过使用流式细胞仪进行的CD8⁺T细胞多功能性分析的结果。在用PMA(佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-醋酸酯)/离子霉素处理过的外周血单个核细胞(PBMC)中,对CD8⁺T细胞设门,并通过FSC-A和FSC-H移除细胞碎片(tablet cell)。随后,使用参数FSC-A和SSC-A对活细胞的淋巴细胞区域设门,由此分析PD-1和Tim-3的表达。另外,对细胞内细胞因子IFN γ 、TNF α 和IL-2进行染色,由此检测多功能性(实施例1)。

[0069] 图2示出通过以下步骤获得的细胞中的CD8⁺T细胞中能够同时产生IFN γ 、TNF α 和IL-2的细胞的检测结果:在存在或不存在二甲双胍的情况下将健康对象的PBMC培养1小时,然后,在移除二甲双胍后,用PMA/离子霉素处理细胞(实施例1)。

[0070] 图3示出使用癌症患者的外周血单个核细胞,以类似于图2的方式进行分析的结果(实施例1)。

[0071] 图4示出从健康对象(N=5)和癌症患者(N=5)获得的CD8⁺T细胞中衰竭分子PD-1和Tim-3的表达频率的确认结果(实施例2)。

[0072] 图5示出使用小鼠(C57BL/6)确认二甲双胍处理离体细胞的效果的程序(实施例5)。

[0073] 图6示出通过使用流式细胞仪获得的结果,显示了在测试中浸入肿瘤细胞的T细胞的细胞因子产生能力,其中在肿瘤细胞移植后7天,将用二甲双胍离体处理的源自供体OT-I小鼠(TCR转基因小鼠:TCR识别H-2K^b+OVA₂₅₇₋₂₆₄, Cell, vol. 76, 17-27, 1994)的脾细胞的CD8⁺T细胞引入受体C57BL/6(实施例5)。

[0074] 图7示出通过使用流式细胞仪获得的结果,显示了在测试中浸入肿瘤细胞的T细胞的Annexin V-阳性率(细胞凋亡比),其中在肿瘤细胞移植后7天,将用二甲双胍离体处理的供体OT-I小鼠的CD8⁺T细胞引入受体C57BL/6(实施例5)。

[0075] 图8示出在肿瘤细胞移植后7天,将用二甲双胍离体处理的供体OT-I小鼠的CD8⁺T细胞引入受体C57BL/6的测试中的肿瘤大小的测量结果(实施例5)。

[0076] 图9示出在肿瘤细胞移植后7天,将用二甲双胍(0M、10M、100M)离体处理的供体OT-I小鼠的CD8⁺T细胞引入受体C57BL/6的测试中的肿瘤生长曲线的监测结果(实施例6)。

[0077] 图10示出在肿瘤细胞移植后7天在自由饮水的二甲双胍施用和/或将OVA疫苗(通过将小鼠hsc70的C末端与OVA 257-264融合获得的融合蛋白:Int. Immunol. 13, 1233-1242, 2001)引入受体C57BL/6之后监测肿瘤生长曲线的结果(实施例7)。

[0078] 图11示出在肿瘤移植(M05→C57BL/6, Meth A→BALB/c)后五天,在自由饮水的二甲双胍施用和/或抗PD-1抗体(克隆4H2,具有源于大鼠的抗小鼠PD-1抗体可变区和小鼠IgG κ1恒定区的鼠源化嵌合抗体,由Ono Pharmaceutical Co., Ltd.提供)引入受体C57BL/6或BALB/c小鼠后监测肿瘤生长曲线的结果(实施例8)。

[0079] 图12示出各C57BL/6小鼠的肿瘤直径曲线图(实施例8)。

[0080] 图13示出各BALB/c小鼠的肿瘤直径曲线图(实施例8)。

[0081] 实施方案的描述

[0082] 本发明的一个实施方案涉及增强免疫细胞功能的方法,其特征在于,其包括用含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂在体外处理移出的免疫细胞;涉及免疫力增强的免疫细胞;以及涉及用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,所述药剂含有作为活性成分的免疫力增强的免疫细胞。

[0083] 本发明另一个实施方案涉及移出的免疫细胞的多功能性,以及用于评估免疫细胞的多功能性的方法,所述免疫细胞针对选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物,针对3种细胞因子IL-2、TNFα和IFN γ的细胞因子产生能力呈阳性。本发明又一个实施方案涉及评估对免疫细胞治疗剂的敏感性的方法,其特征在于包括使用免疫细胞多功能性评估方法。当确定用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物处理的免疫细胞的多功能性与对照相比显著提高时,则可以评估,对免疫细胞治疗剂的敏感性得以提高。

[0084] 在本说明书中,“免疫细胞”是指能够干扰靶细胞的效应细胞。免疫细胞特别优选为CD8⁺T细胞,但免疫细胞也可以选自:例如CD4⁺T细胞、NK细胞、γ δT细胞、NKT细胞、B细胞和骨髓细胞。这些细胞包括遗传修饰的细胞,如来自病毒的iPS细胞或癌细胞特异性CD8⁺T细胞,或者通过将能够识别癌细胞表面表达分子的抗原受体(T细胞抗原受体:TCR)基因或嵌合抗体(嵌合抗原受体:CAR)基因并入初始CD8⁺T细胞获得的细胞。

[0085] 1. 增强免疫细胞功能的方法

[0086] 在本说明书中,“具有高免疫功能的免疫细胞”是指具有高含量的针对3种细胞因子IL-2、TNFα和IFN γ的细胞因子产生能力呈阳性的细胞的免疫细胞。

[0087] 本发明涉及增强免疫细胞功能的方法。更具体地,通过用含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂处理免疫细胞来实施所述方法。另外,本发明还包括根据增强免疫细胞功能的方法处理的细胞。

[0088] 在本说明书中,通过用含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂处理的免疫力增强的免疫细胞,也可被称为“二甲双胍诱导的免疫细胞”(MTi细胞)。如上所述,待处理的免疫细胞包括能够干扰靶细胞的所有效应细胞。例如,待处理的免疫细胞可选自:CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、NK细胞、γ δT细胞、NKT细胞、B细胞和骨髓细胞。上述细胞的实例也包括遗传修饰的细胞,如来自病毒的iPS细胞或癌细胞特

异性CD8⁺T细胞,以及通过将能够识别癌细胞表面表达分子的抗原受体(T细胞抗原受体:TCR)基因或嵌合抗体(嵌合抗原受体:CAR)基因并入初始CD8⁺T细胞所获得的细胞。所述细胞特别优选为CD8⁺T细胞。待处理的免疫细胞可以通过本身已知的方法或将来开发的任何方法来收集。另外,不一定要直接处理免疫细胞,例如CD8⁺T细胞。只要免疫细胞如CD8⁺T细胞包含在所述细胞中,就可以处理源自通过常用方法获得的外周血的外周血单个核细胞(PBMC)。

[0089] 可通过本身已知的方法获得PBMC。例如,通过将来自供体的全血样品添加至Ficoll溶液,并对该混合物进行离心,随后通过重力分离可以获得PBMC。

[0090] 通过培养其中将选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物添加至PBMC以产生MTi细胞的培养基,可以增强免疫细胞的功能。

[0091] 更具体地,通过使用含有选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的培养基,在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、5%的CO₂下培养含有CD8⁺T细胞的细胞(如PBMC)3-12小时,优选4-10小时,最优选6小时,可以提高CD8⁺T细胞的功能,其中所述药物的量为每 $10 \times 10^6/2\text{mL}$ CD8⁺T细胞约1-500 μM 、优选1-100 μM 、更优选约5-100 μM 。对培养基没有特别的限定,任何能培养CD8⁺T细胞的培养基是足够的。尤其优选AIM-V^(R)培养基(Invitrogen)。

[0092] 本发明还包括通过上述处理功能增强的免疫细胞。功能增强的免疫细胞,意指针对3种细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 的细胞因子产生能力呈阳性的细胞的含量增加的免疫细胞群。获得的功能增强的免疫细胞含有大量CD8⁺T细胞,在将所述CD8⁺T细胞引入体内之后,其针对3种细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 的细胞因子产生能力呈阳性。具有增强的功能的免疫细胞,可以用作治疗与免疫异常有关的疾病的药剂。

[0093] 另外,使用本发明所述的增强免疫细胞功能的方法进行的细胞处理,预期具有以下效果。根据本发明所述的方法,通过用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物离体处理自身来源的细胞,然后将所得到的细胞返回至从其中获得所述细胞的体内,可以赋予针对癌症或病原微生物的高生物防御能力。含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂,忌用于患肝功能障碍或肾功能障碍的患者、老年人、在过去发生过乳酸中毒的患者等。然而,通过本发明所述的增强免疫细胞功能的方法离体处理自身来源的细胞,可消除有关服用双胍类抗糖尿病药物的副作用或安全性的担忧。另外,相比服用含有双胍类抗糖尿病药物作为活性成分的治疗剂的情况,在癌症免疫疗法中,通过进行免疫细胞处理,其中将根据本发明所述的方法得到的免疫力增强的免疫细胞再放回患者体内,可提高引入的细胞到达目标肿瘤区域的能力;因此,可以预期治疗效果的改善。可以使用本发明的方法,例如,防止健康对象中的癌症的发作。通过本身已知的方法增殖获自健康对象的外周血的淋巴细胞,冷冻保存并部分地解冻得到的细胞,然后使用本发明所述的增强免疫细胞功能的方法处理所述细胞并将其放回患者体内,帮助预防与免疫异常相关的疾病(如癌症或感染)是可能的。

[0094] 具有优异免疫力的此类细胞群,可以以类似于用于免疫疗法的通常已知细胞的方式来保存。本发明还包括用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,其含有作为活性成分的通过上述方法制备的免疫力增强的免疫细胞(MTi细胞)。用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂的施用的剂量、频率和间隔,根据例如患者的年龄、性别、体重和症状来适当确定。

[0095] 在与免疫异常有关的疾病中，T细胞功能可能被衰竭，因此免疫力可能降低或异常增加。这种疾病的实例包括癌症、免疫缺陷性疾病、自身免疫性疾病、过敏性疾病和各种难治性感染。

[0096] 当所述疾病是癌症时，癌症的实例包括但不限于：头颈癌、食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胆囊癌、胆管癌、胆道癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸肿瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤、白血病、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、皮肤癌、脑肿瘤和间皮瘤。另外，免疫缺陷性疾病的实例包括先天性免疫缺陷病和获得性免疫缺陷病。先天性免疫病的实例包括但不限于：重症联合免疫缺陷病、Wiskott-Aldrich综合征、腺苷脱氨酶缺乏症和嘌呤核苷酸/磷酸化酶缺乏症。另外，获得性免疫缺陷病的实例包括但不限于：因抗癌药物、免疫抑制剂、类固醇等的使用引起的继发性免疫缺陷，以及人类免疫缺陷病毒的感染引起的AIDS。自身免疫性疾病的实例包括但不限于：系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合征 (Sjogren's syndrome)、重症肌无力、恶性贫血和桥本氏甲状腺炎。过敏性疾病的实例包括但不限于：支气管炎哮喘、雪松花粉病和荨麻疹。感染的实例包括病毒感染和细菌感染。病毒感染的实例包括但不限于：消化道病毒感染 (如肠道病毒或巨细胞病毒)、呼吸道感染 (感染有诸如流感病毒、鼻病毒、冠状病毒、副流感病毒、RS病毒、腺病毒或呼肠孤病毒的呼吸道病毒)、由疱疹病毒引起的带状疱疹、由轮状病毒引起的腹泻、病毒性肝炎和AIDS。细菌感染的实例包括但不限于：感染有蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、肠出血性大肠杆菌 (*E. coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、MRSA、沙门氏菌 (*Salmonella*)、肉毒杆菌 (*Botulinus*) 和假丝酵母 (*Candida*)。

[0097] 2. 免疫细胞多功能性评估方法

[0098] 在本说明书中，通过在移出的免疫细胞中评估具有产生细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 的能力的细胞的功能，进行用于评估移出的免疫细胞的多功能性的方法。针对通过用含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂在体外处理免疫细胞获得的细胞进行多功能性的评估。细胞功能的评估使能够预测细胞对选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的敏感性或者治疗效果。当用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物处理的免疫细胞的多功能性与对照相比确定显著提高时，可以评估为免疫细胞对治疗剂的敏感性被改善。因此，评估移出的免疫细胞对选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的敏感性是可能的。衰竭的CD8⁺T细胞或具有衰竭倾向的CD8⁺T细胞由二甲双胍来恢复。正常的CD8⁺T细胞 (即，来自健康对象的PBMC) 由于其正常状态对二甲双胍的敏感性较低，因此更常观察到由二甲双胍处理多功能性降低的结果。相反，由于癌症患者具有许多对二甲双胍高度敏感的衰竭的CD8⁺T细胞，大概更常观察到通过二甲双胍处理导致多功能性的增加或没有变化的结果。

[0099] 对于本发明所述的免疫细胞多功能性评估方法，优选刺激移出的免疫细胞如PBMC，因为有必要引起细胞内活化并促进细胞因子产生。可以通过本身已知的方法，如利用蛋白激酶活化剂 (高度有效的蛋白激酶C (PKC) 活化剂：PMA) 和离子霉素进行的刺激，来实施细胞刺激。使用例如，20-100ng/mL，优选30-80ng/mL，更优选50ng/mL的PMA，以及1-10 μ M，优选1-5 μ M，更优选2 μ M的离子霉素实施利用PMA和离子霉素进行的刺激。利用PMA和离子霉素进行的刺激，可通过如下来实施：使用含有选自上述范围的浓度的PMA和离子霉素的培养

基,于 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下将PBMC培养3-12小时,优选4-10小时,最优选6小时。在这种情况下,为阻止产生的细胞因子释放到细胞外,优选使用阻止从细胞质中的高尔基体运输蛋白的治疗剂,如莫能菌素、布雷菲德菌素A等。

[0100] 本发明所述的免疫细胞多功能性的评估,其特征在于通过确认包含 CD8^+ T细胞的免疫细胞中具有细胞因子IL-2、 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IFN}\gamma$ 产生能力的细胞,并测量针对3种细胞因子的细胞因子产生能力呈阳性的细胞(B)与群体(即 CD8^+ T细胞群)(A)的比率(细胞阳性率)。在本说明书中,细胞阳性率可以根据下面的公式计算。细胞阳性率,也可以根据用测量装置如流式细胞仪获得的分析结果来计算。

[0101] 细胞阳性率(%) = (B的细胞数) / (A的细胞数) \times 100

[0102] 在本说明书中,“三种细胞因子的细胞因子产生能力呈阳性的细胞(B)”意指这样的 CD8^+ T细胞:当单独测量这些细胞因子的产生能力时,确定所有三种细胞因子IL-2、 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IFN}\gamma$ 同时产生的能力呈阳性。更具体地说,“三种细胞因子的细胞因子产生能力呈阳性的细胞(B)”意指这样的细胞:确定在针对三种细胞因子之一的门内呈阳性,然后确定针对剩下两种细胞因子也呈阳性。

[0103] 本发明所述的免疫细胞多功能性的评估更具体地涉及 CD8^+ T细胞功能评估的方法,其包括以下的步骤1)-4)。

[0104] 1) 用含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂在体外处理移出的免疫细胞的步骤;

[0105] 2) 在将细胞离心并洗涤后,使用PMA和离子霉素刺激经处理的免疫细胞的步骤;

[0106] 3) 采用流式细胞仪分析,对步骤2)中经刺激的免疫细胞中的 CD8^+ T细胞设门的步骤;以及

[0107] 4) 测定门内 CD8^+ T细胞针对3种细胞因子IL-2、 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IFN}\gamma$ 的细胞因子产生能力的步骤。

[0108] 在本发明所述的 CD8^+ T细胞功能评估的方法中,也可以测量Tim-3和/或PD-1的表达。

[0109] 另外,更具体地,测量也可以如下进行。

[0110] 从测试对象获得外周血,利用淋巴细胞分离试剂分离PBMC,并将其储存在测试管中。可将所得的PBMC冷冻保存直到测试之前。利用含有选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物(特别优选二甲双胍)的培养基,将在测试前解冻的测试细胞(例如PBMC)在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 下培养1-12小时,优选4-10小时,最优选6小时,所述药物的量为1-500 μM ,优选1-100 μM ,更优选约5-100 μM ,尤其优选约10-100 μM 。对培养基没有特别的限制,且任何能够培养测试细胞的培养基是足够的。尤其优选AIM-V^(R)培养基(Invitrogen)。优选的是,将细胞用培养基等洗涤,并且将其在细胞活化剂(有效纳摩尔的蛋白激酶C活化剂(PMA, 50ng/mL)和离子霉素(1 μM))的存在下培养,从而产生对T细胞的非特异性刺激。此后,优选的是,用细胞内蛋白转运抑制剂处理细胞,以使所产生的细胞因子保留在细胞内。将这样处理的PBMC分离,并用细胞染色缓冲液洗涤1-4次;加入染色缓冲液后,可将细胞在 $2-10^\circ\text{C}$,优选 $3-5^\circ\text{C}$,且最优选 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养。用细胞洗涤缓冲液洗涤细胞,并进行细胞因子IL-2、 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IFN}\gamma$ 的染色。将细胞分离、洗涤,并使用FACS分析,在未用双胍类抗糖尿病药物处理的对照和用双胍类降糖药物处理的细胞之间比较三种细胞因子IL-2、 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IFN}\gamma$

的产生量的值。

[0111] 在本发明的流式细胞仪分析中,对CD8⁺T细胞设门后,通过FSC(前向散射)的FSC-A和FSC-H移除细胞碎片。然后,使用参数FSC-A和SSC-A对淋巴细胞群设门,由此分析Tim-3和/或PD-1的表达。另外,可以对细胞内的细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 进行染色,由此检测多功能性(实施例1)。在本说明书中,免疫细胞同时产生细胞内细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 的能力,有时可被称为“多功能性”。关于多功能性,最强的效应细胞是能够同时产生三种细胞因子的细胞,第二最强的效应细胞是能够同时产生两种细胞因子的细胞。只产生一种细胞因子的细胞不被视为具有多功能性,因为该细胞的效应功能是有限的。

[0112] 本发明还包括使用本发明所述的免疫细胞多功能性评估方法,测试与免疫异常有关的疾病的方法。在本说明书中,与免疫异常有关的疾病的测试是指这样的测试,其辅助性地用于预测治疗剂对疾病的功效、预测疾病的严重程度、预测疾病治疗的预后、或预测疾病的发作。完全不响应二甲双胍的癌症患者可被视为具有严重的免疫衰竭。对于与免疫异常有关的疾病,本发明所述的免疫细胞多功能性评估,可以辅助性地用于判断预测治疗剂对疾病的功效、预测疾病的严重程度、预测预后、或预测疾病的发作。

[0113] 近年来,已经阐明了免疫衰竭的机制,并且有报道称,衰竭分子的抑制在癌症治疗中是重要的。本发明的测试方法使得能够组合使用对同时产生三种细胞因子的检测和对衰竭分子的检测,从而便利地检测患者的免疫细胞(即CD8⁺T细胞)的免疫状态。如果细胞表达诸如PD-1或Tim-3的衰竭分子,则所述细胞被确定为衰竭细胞。但是,如果所述细胞群的多功能性通过用二甲双胍的处理被恢复,则可以判定所述衰竭无疑被消除(免疫力恢复)。

[0114] 在先前的癌症疫苗治疗中,基于在癌组织中存在或不存在疫苗抗原的表达来选择要接受治疗的患者。然而,除检测抗原表达之外,本发明所述的评估方法能够在免疫疗法之前检测免疫状态,从而大大有助于治疗的选择。

[0115] 在本说明书中,在“治疗剂的功效预测”中的“治疗剂”,是指含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂。关于与免疫异常有关的疾病的治疗效果在具有这样的移出的免疫细胞的供体中很优异,所述移出的免疫细胞被含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂在体外处理,并通过流式细胞仪分析证明了有关细胞内细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 的多功能性。

[0116] 通过将用于治疗 and/或预防与免疫异常有关疾病的药剂应用于健康对象,可赋予CD8⁺T细胞潜在的多功能性,所述药剂含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物。因此,可预期减轻免疫受损症状(慢性难治性感染、癌症患者、糖尿病患者等)或例如以下病况的影响。例如,所述病况包括:体力消耗、老年化引起的体力下降、免疫缺陷症(如联合免疫缺陷性疾病、抗体产生紊乱、或补体缺乏症)、甲状腺功能减退、由于辐射引起的免疫受损、先天性免疫缺陷病、获得性免疫缺陷病(包括AIDS)。推定,通过施用用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,免疫力恢复,并且全身的免疫系统恢复,由此导致病况和症状的减轻或缓解。

[0117] 本发明还包括用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,所述药剂含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物。在本发明所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的药剂中所含的活性成分能够恢复免疫细胞的功能

并抑制细胞凋亡,从而恢复免疫力。免疫细胞功能的恢复意指,在CD8⁺T细胞的情况下,同时产生三种细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 的能力的恢复。另外,在其他免疫活性细胞的情况下,免疫细胞功能的恢复意指,由于细胞凋亡的抑制而恢复细胞的固有功能。例如,在CD4T细胞、NK细胞、NKT细胞和 γ δ T细胞的情况下,免疫细胞功能的恢复可能意指IFN γ 产生能力的增加;在B细胞的情况下,意指抗体产生能力的增加;以及在骨髓细胞的情况下,意指分化诱导能力的增加。

[0118] 本发明所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关疾病的药剂中的作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物,可按如下用量施用:成人每天1-5000mg,优选10-4000mg,更优选约50-3000mg,特别优选约100-2500mg。活性成分可以每日一次施用,或可分成每日2-4次的剂量。另外,如需要,可以施用活性成分数天。可以适当地确定施用的间隔和频率。

[0119] 3. 与其他治疗剂的组合使用

[0120] 在本发明所述的治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病中,当将选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物施用于患有这些疾病的患者时,可以将所述药剂与其它治疗剂组合。在分别地施用本发明所述的双胍类抗糖尿病药物和其它治疗剂的情况下,可以首先施用本发明所述的双胍类抗糖尿病药物,然后施用其它治疗剂;或者,先施用其它治疗剂,然后施用本发明所述的双胍类抗糖尿病药物。另外,在施用期间,可以将所有的治疗剂同时施用限定的确定时期。另外,治疗剂可以通过相同的方法或不同的方法施用。根据治疗剂的性质,可以提供包括含有本发明所述的双胍类抗糖尿病药物和其它治疗剂的制备物的试剂盒。可以基于以上提到的剂量适当地选择本发明所述的双胍类抗糖尿病药物的剂量。还可以基于临床使用的剂量适当地选择其它治疗剂的剂量。其它治疗剂包括过去发现的药剂和将来发现的药剂。其它治疗剂的主要实例包括免疫抑制因子阻断剂。在癌细胞或癌症微环境中,存在多种干扰对癌症免疫应答的免疫抑制因子。在免疫应答的过程中有多个免疫检查点。具体而言,诸如CTLA-4或PD-1的阴性共刺激分子的功能是用于控制自体反应性的重要检查点。抑制免疫检查点的此类分子(即免疫抑制因子阻断剂)的实例包括:抗CTLA-4抗体(例如,易普利姆玛、曲美木单抗)、抗PD-1抗体(例如,人抗人PD-1单克隆(中和)抗体(例如,纳武单抗、REGN-2810)、人源化抗人PD-1单克隆(中和)抗体(例如,派姆单抗、PDR-001、BGB-A317、AMP-514 (MEDI0680)))、抗PD-L1抗体(例如,阿特朱单抗(RG7446、MPDL3280A)、阿维单抗(PF-06834635、MSB0010718C)、德瓦鲁单抗(MEDI4736)、BMS-936559)、抗PD-L2抗体、PD-L1融合蛋白、PD-L2融合蛋白(例如,AMP-224)、抗Tim-3抗体(例如,MBG453)、抗LAG-3抗体(例如,BMS-986016、LAG525)、抗KIR抗体(例如,利瑞鲁单抗(Lirilumab))、抗BTLA抗体和抗VISTA抗体。另外,其它的治疗剂的实例还包括共刺激受体激动剂,如抗CD137抗体(例如,乌瑞鲁单抗(Urelumab))、抗OX40抗体(例如,MEDI6469)、抗HVEM抗体、抗CD27抗体(例如,瓦利鲁单抗(Varlilumab))、抗GITR抗体(例如,MK-4166)和抗CD28抗体。这些免疫抑制因子阻断剂和共刺激受体激动剂中的任一种或多种抗体或融合蛋白,可以与本发明所述的双胍类抗糖尿病药物组合。预期通过本发明所述的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物与免疫抑制因子阻断剂和/或共刺激受体激动剂的组合治疗或预防的疾病的实例包括癌症,如但不具体限于:头颈癌、食道癌、胃癌、结肠直肠癌、结肠癌、直肠癌、肝癌(如肝细胞癌)、胆囊癌、胆管癌、胆道癌、胰腺癌、肺癌(如非小细

胞肺癌(鳞状非小细胞肺癌、非鳞状非小细胞肺癌)、或小细胞肺癌)、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、肾癌(如肾细胞癌)、尿路上皮癌(如膀胱癌或上尿路癌)、前列腺癌、睾丸肿瘤(如生殖细胞瘤)、骨肉瘤、软组织肉瘤、白血病、骨髓增生异常综合征、恶性淋巴瘤(如霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、或弥漫性大B细胞淋巴瘤)、成人T细胞白血病、多发性骨髓瘤、皮肤癌(如恶性黑素瘤或Merkel细胞癌)、脑肿瘤(如成胶质细胞瘤)、胸膜间皮瘤和未知的原发性癌。在这些癌症中,可最大限度地发挥抗肿瘤效果,特别是,对于接受仅使用免疫抑制因子阻断剂或共刺激受体激动剂的不足治疗效果的癌症患者或癌症类型。

[0121] 本发明所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,当经静脉内施用,优选为例如液体形式。所述液体可以例如通过使用溶剂来制备,所述溶剂如纯净水、生理盐水溶液、醇(包括乙醇、丙二醇、甘油和聚乙二醇)或三醋酸甘油酯。也可以将诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、稳定剂等佐剂加入到制备物中。另外,所述制备物可作为悬液施用。

[0122] 另外,诸如片剂、丸剂、粉状的药物、颗粒剂或细粒剂的固体制备物,可以例如通过采用标准的方法来制备,所述标准方法为添加诸如碳酸氢钠、碳酸钙、淀粉、蔗糖、甘露醇或羧甲基纤维素的载体,以及诸如硬脂酸钙、硬脂酸镁或甘油的添加剂。另外,通过喷洒肠溶包衣物质进行肠溶包衣可以将所述药剂制备为包有肠溶衣的制备物,所述肠溶包衣物质如邻苯二甲酸乙纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、聚乙烯醇邻苯二甲酸酯、苯乙烯-马来酸酐共聚物、甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物等的有机溶剂或水溶液。药学可接受的载体的实例包括其他通用佐剂、芳香剂以及稳定剂或防腐剂。

[0123] 另外,本发明还包括用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,以及通过将含有作为活性成分的选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药物的治疗剂,与癌症疫苗组合施用来治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法。“癌症疫苗”包括:癌症肽疫苗(MAGE-3、MUC-1、WT1肽、P53、NY-ES01等)、癌蛋白疫苗、树突状细胞疫苗、基因治疗疫苗等。树突状细胞疫苗的实例包括:捕获癌症肽或癌抗原蛋白的树突状细胞疫苗,癌症细胞来源的mRNA被转导的树突状细胞疫苗(也作为基因疗法疫苗),以及用癌抗原蛋白如前列腺酸性磷酸酶和

[0124] GM-CSF融合蛋白(如Provenge)培养的树突状细胞疫苗。癌症疫苗的实例包括针对证明由病毒感染引起的癌症的疫苗,如源自乙肝病毒的乙肝病毒疫苗,或源自人乳头状瘤病毒的宫颈癌预防性疫苗。通过将本发明所述的用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂与各种疫苗进行组合,可以大大提高疫苗的效果。因此,可预期减少癌症疫苗等的剂量,从而减少由疫苗和佐剂引起的副作用。

[0125] 本发明还包括用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的方法,其包括使用用于治疗 and/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂。

实施例

[0126] 为了进一步理解本发明,下面参考参照实施例和实施例更具体地描述本发明。然而,本发明并不局限于这些实施例。下文使用临床样本进行的研究被冈山大学(Okayama University)伦理委员会批准。以下实施例显示了使用I期原发性肺癌患者和转移性肺癌

(即IV期)患者的外周血,进行不同阶段的癌症的实例分析。癌症阶段是按照UICC第7版TNM分期矩阵(肺)来确定。

[0127] 实施例1:免疫细胞多功能性评估方法

[0128] 该实施例描述了评估免疫细胞的免疫力的方法。首先,使用流式细胞仪分析免疫细胞的多功能性。随后,在健康对象和癌症患者中确认通过二甲双胍处理的免疫细胞多功能性的变化。使用下面的(1)材料和(2)方法进行免疫细胞的处理。

[0129] (1) 材料

[0130] • 淋巴细胞分离试剂:Ficoll-Paque^(R) (GE Healthcare)

[0131] • 细胞冻存液:Bambang Car (Nippon Genetics)

[0132] • 人细胞培养基:AIM V^(R) 培养基 (Gibco)

[0133] • 细胞活化剂:

[0134] 有效纳摩尔的蛋白激酶C活化剂 (Sigma-Aldrich)

[0135] 离子霉素 (Sigma-Aldrich)

[0136] • 细胞内蛋白转运抑制剂:BD Gorgi StopTM (含有莫能菌素) (BD Biosciences)

[0137] • 染色缓冲液:0.58克EDTA (Nacalai Tasque) 溶于含有2%FCS (Thermo) 的1L PBS (Gibco)

[0138] • 细胞固定液/渗透缓冲剂

[0139] BD Cytotfix/CytopermTM (BD Biosciences)

[0140] BD Perm/WashTM (使用前以1:10稀释于蒸馏水中) (BD Biosciences)

[0141] (2) 方法

[0142] 1. 从测试对象获得外周血,并使用淋巴细胞分离试剂Ficoll-Paque^(R) (GE Healthcare) 通过密度梯度离心分离PBMC。将3mL Ficoll-Paque^(R) 分配到15mL管中。将8mL外周血轻轻放置到试剂上。此时,应注意不让Ficoll-Paque^(R) 与外周血混合。在400g下离心30分钟,从而分离PBMC。

[0143] 2. 使用Bambang Car细胞冻存液通过将细胞数目调节至 2.0×10^6 个细胞/管,将分离的PBMC保存在-150°C的冰箱或液氮中。

[0144] 3. 在测试中,将解冻的PBMC在存在或不存在10 μ M二甲双胍的情况下培养1-10小时。使用24孔板进行培养,并将细胞数目调节至约 5.0×10^5 个细胞/孔。

[0145] 4. 1-10小时后收集细胞,用培养基洗涤,并在细胞活化剂(有效纳摩尔的蛋白激酶C活化剂(PMA, 50ng/mL), 离子霉素(1 μ M))的存在下培养6小时,从而非特异性地刺激T细胞。此时,添加BD Gorgi StopTM以将产生的细胞因子保持在细胞内。

[0146] 5. 将细胞分离,并用细胞染色缓冲液洗涤两次。首先,进行CD8、PD-1和Tim-3的染色,所述CD8、PD-1和Tim-3是在T细胞表面上表达的分子。在所述染色中,添加的染色缓冲液的量为每个样品50 μ L。于4°C培养30分钟。

[0147] 6. 收集细胞,并用细胞染色缓冲液洗涤两次。添加500 μ L的BD Cytotfix/CytopermTM,并于4°C培养30分钟。

[0148] 7. 收集细胞,并用BD Perm/WashTM洗涤两次。进行细胞因子IL-2、TNF α 和IFN γ 的染色。在所述染色中,BD Perm/WashTM添加的量为每个样品50 μ L。于4°C培养30分钟。

[0149] 8. 收集细胞,并用BD Perm/WashTM洗涤两次,并添加200 μ L BD Perm/WashTM。

[0150] 9. 使用FACSCanto™ II流式细胞仪 (Becton, Dickinson and Company) 进行分析。

[0151] (3) 使用流式细胞仪分析免疫细胞的多功能性

[0152] 在上述 (2) 所述方法中的用PMA/离子霉素处理的PBMC中,首先,使用FACSCanto™ II流式细胞仪 (Becton, Dickinson and Company),对CD8⁺T细胞设门,然后通过FSC-A和FSC-H移除细胞碎片。使用参数FSC-A和SSC-A中,对淋巴细胞群设门,从而分析PD-1和Tim-3的表达。另外,对细胞内细胞因子IFN γ 、TNF α 和IL-2进行染色,并分析PBMC中包含的CD8⁺T细胞的多功能性(图1)。

[0153] (4) 健康对象的CD8⁺T细胞的多功能性分析

[0154] 将从健康对象获得的PBMC (N=10),通过 (2) 中所述方法在存在或不存在二甲双胍的情况下培养1小时。移除二甲双胍后,通过 (3) 中所述方法用PMA/离子霉素将PBMC刺激培养6小时。在所得的PBMC中,检测到能够同时产生三种细胞因子,即IFN γ 、TNF α 和IL-2的CD8⁺T细胞。未用二甲双胍处理的CD8⁺T细胞被测定为0.11%;用二甲双胍处理的CD8⁺T细胞被测定为0.09%(图2)。因此,判定在健康对象中,通过二甲双胍处理,没有增加CD8⁺T细胞的多功能性。

[0155] 在如上述处理的健康对象的PBMC中,计算产生三种细胞因子 (IFN γ /TNF α /IL-2) 的CD8⁺T细胞、产生两种细胞因子 (IFN γ /TNF α 或IFN γ /IL-2) 的CD8⁺T细胞,以及产生一种细胞因子 (IFN γ) 的CD8⁺T细胞与总CD8⁺T细胞的比率,并且将其示于表1中。将二甲双胍未处理组 (对照) 和二甲双胍处理组 (二甲双胍) 之间的计算结果进行比较。关于产生细胞因子的CD8⁺T细胞的比率,通过二甲双胍处理增加10%或更多的用向上箭头表示(\uparrow),通过二甲双胍处理降低10%或更多的用向下箭头表示(\downarrow),以及没有显著差异的其他情况用向右箭头(\rightarrow)表示。

[0156] 表1

[0157]

ID	IFN γ /TNF α /IL-2			IFN γ /TNF α			IFN γ /IL-2			IFN γ		
	对照	二甲双胍		对照	二甲双胍		对照	二甲双胍		对照	二甲双胍	
1	0.15	0.03	↓	1.53	1.50	→	0.11	0.03	↓	1.75	1.68	→
2	0.92	0.48	↓	15.16	11.17	↓	0.66	0.21	↓	5.55	6.23	↑
3	0.01	0.00	→	0.17	0.12	↓	0.06	0.05	↓	0.75	0.95	↑
4	0.04	0.01	↓	0.98	1.08	↑	0.11	0.14	↑	2.37	1.87	↓
6	0.14	0.09	↓	4.20	3.98	→	0.29	0.24	↓	10.87	12.00	↑
8	3.91	3.79	→	35.44	31.38	↓	0.55	0.47	↓	13.80	13.18	→
10	0.12	0.09	↓	4.19	3.54	↓	0.26	0.48	↑	18.34	16.70	→
12	2.22	2.16	→	25.78	32.26	↑	0.64	0.71	↑	7.25	8.18	↑
16	0.80	0.37	↓	19.64	11.52	↓	1.04	0.28	↓	21.13	11.64	↓
18	0.61	0.48	↓	14.91	16.84	↑	0.15	0.15	→	4.73	4.62	→

[0158] (5) 癌症患者中CD8⁺T细胞的多功能性分析

[0159] 以与(4)中相同的方式,将从31名原发性肺癌患者(I期)获得的各PBMC,在存在或不存在二甲双胍的情况下培养1小时。移除二甲双胍后,分析各个得到的PBMC。在示例性实例中,未用二甲双胍处理的CD8⁺T细胞,被测定为0.92%;用二甲双胍处理的CD8⁺T细胞,被测定为1.44%(图3)。因此判定,与健康对象相比,在许多癌症患者中,经二甲双胍处理增加CD8⁺T细胞的多功能性。

[0160] 在如上述处理的癌症患者中,按照与(4)相同的分析,计算了产生三种细胞因子(IFN γ /TNF α /IL-2)的CD8⁺T细胞、产生两种细胞因子(IFN γ /TNF α 或IFN γ /IL-2)的CD8⁺T细胞,以及产生一种细胞因子(IFN γ)的CD8⁺T细胞与总CD8⁺T细胞的比率,并且将其示于表2中。将二甲双胍未处理组(对照)和二甲双胍处理组(二甲双胍)之间计算结果进行比较。关于产生细胞因子的CD8⁺T细胞的比率,通过二甲双胍处理增加10%或更多的用向上箭头表示(↑),通过二甲双胍处理降低10%或更多的用向下箭头表示(↓),以及没有显著差异的其他情况用向右箭头(→)表示。

[0161] 表2

[0162]

ID	IFN γ /TNF α /IL-2			IFN γ /TNF α			IFN γ /IL-2			IFN γ		
	对照	二甲双胍		对照	二甲双胍		对照	二甲双胍		对照	二甲双胍	
8	1.11	0.81	↓	1.48	1.70	↑	4.85	4.88	→	13.76	14.19	→
10	1.50	1.48	→	4.76	4.19	↓	4.51	3.46	↓	48.65	39.46	↓
11	0.17	0.52	↑	0.43	0.83	↑	1.20	0.31	↓	5.75	3.83	↓
13	0.33	0.43	↑	0.89	1.09	↑	1.85	1.40	↓	5.51	3.96	↓
17	0.40	0.59	↑	0.00	0.12	↑	1.09	0.48	↓	2.87	2.50	↓
26	1.05	3.62	↑	2.65	3.68	↑	6.93	5.65	↓	30.38	12.72	↓
32	0.41	1.05	↑	0.27	0.63	↑	5.71	3.52	↓	3.71	5.00	↑
38	13.30	12.47	→	17.00	20.08	↑	4.23	4.08	↓	14.17	13.07	↓
54	4.62	3.11	↓	19.94	14.85	↓	1.44	1.59	↑	14.23	15.55	→
55	5.37	5.14	→	16.34	17.42	→	2.35	2.63	↑	14.82	15.31	→
56	3.03	1.73	↓	6.10	6.01	→	1.97	2.50	↑	9.50	11.17	↑
59	3.60	5.78	↑	14.75	17.26	↑	2.02	2.26	↑	20.85	15.70	↓
61	3.38	2.93	↓	20.59	17.85	↓	4.33	3.16	↓	31.18	35.58	↑
65	1.76	2.16	↑	3.17	3.54	↑	0.79	1.34	↑	3.49	3.66	→
66	2.16	2.11	→	5.66	4.79	↓	2.35	2.23	↓	14.33	13.66	→
80	1.94	6.28	↑	15.68	21.02	↑	2.08	3.99	↑	38.59	30.91	↓
82	0.02	0.82	↑	0.93	2.80	↑	0.46	1.44	↑	9.79	7.04	↓
86	5.26	4.47	↓	8.91	5.72	↓	2.42	1.45	↓	9.32	4.57	↓
92	1.84	1.24	↓	6.75	5.85	↓	0.65	0.84	↑	5.47	5.37	→
101	0.38	0.63	↑	1.64	2.19	↑	1.35	1.41	→	32.83	29.66	→
104	0.93	0.25	↓	3.04	2.78	→	1.11	0.43	↓	14.41	14.72	→
105	0.92	0.34	↓	2.94	1.31	↓	2.54	1.46	↓	18.70	22.19	↑
106	0.16	0.14	↓	0.78	0.74	→	0.21	0.16	↓	2.44	2.51	→
108	1.05	1.39	↑	5.67	8.05	↑	2.09	2.18	→	37.29	33.58	→
120	0.92	0.51	↓	4.31	2.62	↓	0.58	0.97	↑	15.18	17.19	↑
123	2.62	1.74	↓	12.22	9.70	↓	0.58	0.00	↓	21.25	19.41	→
124	0.65	0.61	→	4.46	3.09	↓	0.40	0.61	↑	6.78	6.70	→
128	0.04	0.16	↑	0.72	1.47	↑	0.33	0.68	↑	10.42	7.54	↓
130	0.35	0.53	↑	6.67	4.27	↓	0.00	0.53	↑	8.08	8.36	→
131	0.66	0.77	↑	6.41	5.60	↓	0.26	0.38	↑	10.47	7.14	↓
133	1.65	1.11	↓	21.21	24.50	↑	0.71	0.19	↓	51.59	44.56	↓

[0163] 实施例2:免疫细胞多功能性评估方法

[0164] 该实施例检验5名健康对象和5名原发性肺癌患者(I期)的CD8⁺T细胞中衰竭分子PD-1和Tim-3的表达频率。据披露,PD-1的表达在癌症患者中显著较低。另外,尽管趋势为Tim-3的表达在癌症患者中较高,但是用该样品数没有观察到显著性差异(图4)。然而,由于健康对象和癌症患者的CD8⁺T细胞具有明显不同的表达模式,除了总的CD8⁺T细胞外,通过将PD-1和Tim-3的表达模式和多功能性分析结合,有可能进行更详细的多功能性分析。

[0165] 实施例3:由二甲双胍导致的多功能性恢复的测试结果

[0166] 基于由实施例1的方法得到的结果,本实施例分析在10名健康对象和31名癌症患者(I期)中通过二甲双胍恢复CD8⁺T细胞多功能性的测试结果。分析结果在下文的表3中示出。表3示出除总的CD8⁺T细胞(总的CD8T)之外四种CD8⁺T细胞的细胞因子产生能力的结果,即,PD-1阳性且Tim-3阴性的CD8⁺T细胞(PD-1+,Tim-3-);PD-1阳性且Tim-3阳性的CD8⁺T细胞(PD-1+,Tim-3+);PD-1阴性且Tim-3阳性的CD8⁺T细胞(PD-1-,Tim-3+);以及PD-1阴性且Tim-3阴性的CD8⁺T细胞(PD-1-,Tim-3-)。细胞因子产生能力是指(A)三种细胞因子IFN γ /TNF α /IL-2、(B)两种细胞因子IFN γ /TNF α 、(C)两种细胞因子IFN γ /IL-2、以及(D)一种细胞因子IFN γ 的细胞因子产生比率。

[0167] 表3所示的结果表明,在总的CD8⁺T细胞、PD-1阴性且Tim-3阳性的CD8⁺T细胞、PD-1阴性且Tim-3阴性的CD8⁺T细胞中,在健康对象和癌症患者之间,三种细胞因子的细胞因子产生能力显著不同。具体而言,在总的CD8⁺T细胞中,在健康对象中,增加为0/10(0%),在癌症患者中,增加为14/31(45.2%)。因此,很明确的是,通过二甲双胍处理,在癌症患者中更

容易出现多功能性增加。另外,通过二甲双胍处理,多功能性的下降率,在健康对象中为7/10 (70%),在癌症患者中为12/31 (38.7%)。这说明健康对象中的多功能性明显下降。关于两种细胞因子的细胞因子产生能力,在总的CD8⁺T细胞、或PD-1阴性且Tim-3阳性的CD8⁺T细胞中,健康对象和癌症患者之间存在明显的差异。关于一种细胞因子的细胞因子产生能力(在这种情况下,为IFN γ),健康对象和癌症患者之间不存在明显差异。

[0168] 表3健康对象和癌症患者(I期)的CD8⁺T细胞的多功能性分析概述

[0169] (A)

产三种细胞因子的细胞						
IFN γ /TNF α /IL2	健康对象			癌症患者(I期)		
	增加	无变化	减少	增加	无变化	减少
总的 CD8T	<u>0/10</u>	3/10	7/10	<u>14/31</u>	5/31	12/31
PD-1+,Tim-3-	3/10	2/10	5/10	14/31	7/31	10/31
PD-1+,Tim-3+	5/10	4/10	1/10	11/31	13/31	7/31
PD-1-,Tim-3+	<u>1/10</u>	6/10	3/10	<u>12/31</u>	13/31	6/31
PD-1-,Tim-3-	<u>2/10</u>	1/10	7/10	<u>13/31</u>	4/31	14/31

[0171] (B)

产两种细胞因子的细胞						
IFN γ /TNF α	健康对象			癌症患者(I期)		

	增加	无变化	减少	增加	无变化	减少
总的 CD8T	<u>3/10</u>	2/10	5/10	<u>15/31</u>	4/31	12/31
PD-1+,Tim-3-	3/10	3/10	4/10	10/31	11/31	10/31
PD-1+,Tim-3+	3/10	1/10	6/10	11/31	11/31	9/31
PD-1-,Tim-3+	<u>3/10</u>	2/10	5/10	<u>13/31</u>	10/31	8/31
PD-1-,Tim-3-	4/10	2/10	4/10	13/31	4/31	14/31

[0174] (C)

产两种细胞因子的细胞						
IFN γ /IL2	健康对象			癌症患者(I期)		
	增加	无变化	减少	增加	无变化	减少
[0175] 总的 CD8T	3/10	1/10	6/10	13/31	3/31	15/31
PD-1+,Tim-3-	3/10	1/10	6/10	12/31	7/31	12/31
PD-1+,Tim-3+	2/10	4/10	4/10	9/31	14/31	8/31
PD-1-,Tim-3+	<u>1/10</u>	5/10	4/10	<u>13/31</u>	9/31	9/31
PD-1-,Tim-3-	4/10	1/10	5/10	12/31	2/31	17/31

[0176] (D)

产一种细胞因子的细胞						
IFN γ	健康对象			癌症患者(I期)		
	增加	无变化	减少	增加	无变化	减少
[0177] 总的 CD8T	4/10	4/10	2/10	5/31	13/31	13/31
PD-1+,Tim-3-	2/10	3/10	5/10	11/31	10/31	10/31
PD-1+,Tim-3+	6/10	0/10	4/10	19/31	2/31	10/31
PD-1-,Tim-3+	2/10	2/10	6/10	10/31	7/31	14/31
PD-1-,Tim-3-	2/10	4/10	4/10	9/31	6/31	16/31

[0178] 实施例4:免疫细胞多功能性评估方法

[0179] 本实施例通过与实施例1相同的方法,分析了在10名健康对象和5名转移性肺癌患者(IV期)中,经二甲双胍处理后CD8⁺T细胞的多功能性恢复的测试结果。分析结果在下文表4中示出。如表3所示,在表3中,除了总的CD8⁺T细胞(总CD8T)之外,确认了四种CD8⁺T细胞的细胞因子产生能力,即,PD-1阳性且Tim-3阴性的CD8⁺T细胞、PD-1阳性且Tim-3阳性的CD8⁺T细胞、PD-1阴性且Tim-3阳性的CD8⁺T细胞,以及PD-1阴性且Tim-3阴性的CD8⁺T细胞(表4)。细胞因子产生能力是指(A)三种细胞因子IFN γ /TNF α /IL-2,(B)两种细胞因子IFN γ /TNF α ,(C)两种细胞因子IFN γ /IL-2,以及(D)一种细胞因子IFN γ 的细胞因子产生率。

[0180] 表4所示的结果表明,在总的CD8⁺T细胞、PD-1阳性且Tim-3阴性的CD8⁺T细胞,以及PD-1阴性且Tim-3阴性的CD8⁺T细胞中,三种细胞因子的细胞因子产生能力在健康对象和癌症患者之间显著不同。更具体地,通过二甲双胍的处理,多功能性的减少在癌症患者中非常小(零)。对于两种细胞因子的细胞因子产生能力,健康对象和癌症患者之间不存在明显差异。另外,对于一种细胞因子的细胞因子产生能力,健康对象和癌症患者之间也不存在明显差异。

[0181] 表4健康对象和癌症患者(IV期)的CD8⁺T细胞的多功能性分析概述

[0182] (A)

[0183]

产三种细胞因子的细胞						
IFN γ /TNF α /IL2	健康对象			癌症患者(IV期)		
	增加	无变化	减少	增加	无变化	减少
总的 CD8T	0/10	3/10	<u>7/10</u>	1/5	4/5	<u>0/5</u>
PD-1+,Tim-3-	3/10	2/10	<u>1/5</u>	4/5	1/5	<u>0/5</u>
PD-1+,Tim-3+	5/10	4/10	1/10	0/5	5/5	0/5
PD-1-,Tim-3+	1/10	6/10	3/10	0/5	5/5	0/5
PD-1-,Tim-3-	2/10	1/10	<u>7/10</u>	2/5	3/5	<u>0/5</u>

[0184]

(B)

产两种细胞因子的细胞						
IFN γ /TNF α	健康对象			癌症患者(IV期)		
	增加	无变化	减少	增加	无变化	减少
总的 CD8T	3/10	2/10	5/10	1/5	0/5	4/5
PD-1+,Tim-3-	3/10	3/10	4/10	1/5	2/5	2/5
PD-1+,Tim-3+	3/10	1/10	6/10	1/5	3/5	1/5
PD-1-,Tim-3+	3/10	2/10	5/10	1/5	2/5	2/5
PD-1-,Tim-3-	4/10	2/10	4/10	1/5	2/3	2/5

[0186]

(C)

产两种细胞因子的细胞						
IFN γ /IL2	健康对象			癌症患者(IV期)		
	增加	无变化	减少	增加	无变化	减少
总的 CD8T	3/10	1/10	6/10	1/5	4/5	0/5
PD-1+,Tim-3-	3/10	1/10	6/10	4/5	0/5	1/5
PD-1+,Tim-3+	2/10	4/10	4/10	1/5	3/5	1/5
PD-1-,Tim-3+	1/10	5/10	4/10	0/5	2/5	3/5
PD-1-,Tim-3-	4/10	1/10	5/10	1/5	2/5	2/5

[0188]

(D)

产一种细胞因子的细胞						
IFN γ	健康对象			癌症患者(IV期)		
	增加	无变化	减少	增加	无变化	减少
[0189] 总的 CD8T	4/10	4/10	2/10	0/5	2/5	3/5
PD-1+,Tim-3-	2/10	3/10	5/10	0/5	4/5	1/5
PD-1+,Tim-3+	6/10	0/10	4/10	1/5	3/5	1/5
PD-1-,Tim-3+	2/10	2/10	6/10	3/5	0/5	2/5
PD-1-,Tim-3-	2/10	4/10	4/10	1/5	2/5	2/5

[0190] 根据实施例3和4的结果,所述结果显示在健康对象、癌症患者(I期)和癌症患者(IV期)中经二甲双胍处理后的多功能性恢复的测试结果,集中对显示总的CD8⁺T细胞中三种细胞因子(IFN γ /TNF α /IL-2)的产生增加或没有变化的细胞群进行分析。在30%的健康对象、61.3%的癌症患者(I期)和100%的癌症患者(IV期)中,三种细胞因子(IFN γ /TNF α /IL-2)的产生增加或没有变化,并且健康对象和癌症患者(表5)之间观察到显著差异。在癌症患者中,假定,衰竭的CD8⁺T细胞随着癌症阶段的进展可能增加,检测到该衰竭的细胞群经二甲双胍处理后具有多功能性“增加”或“没有变化”的状态。

[0191] 表5

IFN γ /TNF α /IL2	增加 + 无变化		
	健康对象	患者(I期)	患者(IV期)
[0192] 总的 CD8 ⁺ T	3/10 (30%)	19/31 (61.3%)	5/5 (100%)

[0193] 实施例5:二甲双胍离体处理细胞的效果

[0194] 采用小鼠(C57BL/6),在体外用二甲双胍处理T细胞,并且在将所述细胞放回体内之后,确认所得细胞是否存在抗肿瘤效果。首先,将8-9周龄的C57BL/6(CD45.2)小鼠作为受体,并将 2×10^5 个黑素瘤细胞株(B16-OVA)经皮内移植到受体的背侧区域。将8-9周龄的C57BL/6(CD45.1) \times OT-1小鼠(转基因小鼠,其具有识别OVA抗原的包含 α 链 β 链T细胞受体的CD8⁺T细胞)用作供体。用磁珠纯化从移出的脾脏获得的CD45.1 OT-1 CD8⁺T细胞群。细胞经二甲双胍处理(+/-)后,在肿瘤细胞移植后7天将所述细胞引入受体(参见图5)。更具体地,将CD8⁺T细胞以 3×10^6 个/2mL 10 μ M的二甲双胍浓度,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下在二甲双胍中培养6小时。将所述细胞(MTi细胞)进行分离之后,将细胞用PBS洗涤两次,并将 3×10^6 个细胞由小鼠尾静脉注射。使用通过将青霉素(50U/mL)、链霉素(50g/mL, Sigma P0781)、丙酮酸钠(1mM, Sigma S8636)、L-谷氨酰胺(2mM, Sigma G7513)、MEM非必需氨基酸(稀释100倍的溶液, Life Technologies)、2-巯基乙醇(5×10^{-5} M, Sigma M6250)加入RPMI-1640培养基(Sigma R0883)所获得的培养基。不使用胎牛血清。

[0195] 通过使用FACSCantoTM II流式细胞仪(Becton, Dickinson and Company),对所得的浸润在肿瘤中的CD45.1 OT-1 CD8⁺T细胞设门,从而确认IFN α 和IL-2的产生能力。在通过PMA和离子霉素刺激并用二甲双胍处理的CD45.1 OT-1 CD8⁺T细胞(MTi细胞)群中,确认针

对所有细胞因子的高细胞阳性率(参见图6)。据证实,将二甲双胍处理的CD45.1 OT-1 CD8⁺T细胞(MTi细胞)引入后在受体肿瘤中浸润的细胞的细胞凋亡频率,显著低于将未经二甲双胍处理的CD45.1 OT-1 CD8⁺T细胞(MTi细胞)引入后在受体肿瘤中浸润的细胞的细胞凋亡频率(参见图7)。在引入细胞后第二天,在引入二甲双胍处理的CD45.1 OT-1 CD8⁺T细胞(MTi细胞)的受体和引入未经二甲双胍处理的CD45.1 OT-1 CD8⁺T细胞(MTi细胞)的受体之间,观察到肿瘤大小方面有显著差异(参见图8)。据证实,引入的二甲双胍处理的CD45.1 OT-1 CD8⁺T细胞(MTi细胞)向肿瘤的转移效率高,并且这些CD8⁺T细胞在肿瘤中也具有高的多功能性。结果证实,用二甲双胍离体处理然后放回体内的T细胞表现出抗肿瘤效果,从而证实细胞免疫治疗是可能的。

[0196] 实施例6:二甲双胍离体处理细胞的效果

[0197] 使用小鼠(C57BL/6),确认用二甲双胍离体处理然后放回体内的T细胞是否存在抗肿瘤效果。首先,将8-9周龄的C57BL/6(CD45.2)小鼠作为受体,并将 2×10^5 个黑素瘤细胞株(B16-OVA)经皮内移植到受体的背侧区域。在肿瘤细胞移植后第5天、第7天、第9天和第11天,将用二甲双胍(0 μ M, 10 μ M, 100 μ M)处理的供体OT-I小鼠(Cell, Vol. 76, pp. 17-27, 1994)的CD8⁺T细胞多次引入受体,并监测肿瘤生长曲线(参见图9)。

[0198] 结果证实,在引入经100 μ M二甲双胍处理的供体OT-I小鼠的CD8⁺T细胞(MTi细胞)的受体肿瘤中,观察到极好的肿瘤抑制效果(参见图9)。

[0199] 实施例7:二甲双胍口服施用和癌症疫苗施用组合使用的效果

[0200] 采用自由饮水口服施用二甲双胍以及OVA疫苗(通过将OVA₂₅₇₋₂₆₄与小鼠hsc70的C末端融合得到的融合蛋白: Int. Immunol. 13, 1233-1242, 2001)处理,确认了抗肿瘤效果。在肿瘤细胞移植后第7天、第12天、第17天和第22天,进行自由饮水的二甲双胍施用和/或通过受体的尾静脉进行OVA疫苗处理(参见图10)。本实施例的癌症疫苗属于癌蛋白疫苗类。

[0201] 结果证实,在接受二甲双胍和癌症疫苗的组合的受体肿瘤中,观察到极好的肿瘤抑制效果(参见图10)。

[0202] 实施例8:二甲双胍施用和抗PD-1抗体施用组合使用的效果

[0203] 将肿瘤移入受体小鼠,并确认二甲双胍施用和抗PD-1抗体施用组合使用的效果。采用8-9周龄的C57BL/6(n=10)或BALB/c(N=10)小鼠。均以 2×10^5 个细胞的量,将M05肿瘤细胞经皮内植入C57BL/6小鼠背侧区域,以及将Meth A植入BALB/c小鼠背侧区域。监测肿瘤细胞移植后5天,自由饮水施用二甲双胍和/或施用抗PD-1抗体(克隆4H2,具有源于大鼠的抗小鼠PD-1抗体的可变区和小鼠IgG κ 1恒定区的鼠源化嵌合抗体(通过W02006/121168的实施例12的方法产生的抗体): α PD-1,由Ono Pharmaceutical Co., Ltd.提供)的肿瘤生长曲线。在肿瘤细胞移植后第5天、第11天、第17天和第23天,以200 μ g的量腹腔内施用抗PD-1抗体。向对照施用PBS。图11示出10只小鼠为一组的平均肿瘤直径。结果证实,在组合施用二甲双胍和抗PD-1抗体的组中有明显的肿瘤缩小。

[0204] 图12示出在对照组、单独施用二甲双胍的组、单独施用 α PD-1的组以及组合施用二甲双胍和 α PD-1的组中,C57BL/6小鼠肿瘤直径的测量值。类似地,图13示出BALB/c小鼠的肿瘤直径的测量值。这些结果证实,在组合施用二甲双胍和抗PD-1抗体的组中有明显的肿瘤缩小。

[0205] 工业应用性

[0206] 如在上面详细描述,测量关于三种细胞因子的细胞阳性率,使得能够便利地检查患者的免疫状态。另外,本发明的评估方法,使能够将检测免疫细胞的衰竭分子和测量关于三种细胞因子的细胞阳性率结合,从而使能够便利而准确地检查患者的免疫状态。

[0207] 在先前的癌症疫苗治疗中,基于癌组织中是否存在疫苗抗原的表达来选择待治疗的患者;然而,由于除了抗原表达之外,本发明的评估方法在免疫治疗之前提供免疫状态的信息,使得更容易地选择待接受疫苗治疗的患者。这对待治疗的患者大有益处。

[0208] 本发明所述的用于治疗与免疫异常有关的疾病的药剂提高了免疫力,并且例如,对于癌症而言,所述药剂预期通过与外科手术、放射治疗或化学疗法组合来改善预后。另外,作为术前化疗使用的效果被认为是显著的。另外,可以预期抑制治疗后复发的作用。

[0209] 另外,本发明还包括增强免疫细胞功能的方法,还包括功能增强的免疫细胞(MTi细胞),以及包括用于治疗和/或预防与免疫异常有关的疾病的药剂,所述药剂含有作为活性成分的MTi细胞的药剂。所获得的细胞具有优异的免疫功能,可以用作用于治疗与免疫异常有关的疾病的药剂。例如,所述细胞可以表现出作为抗肿瘤剂的优良效果。

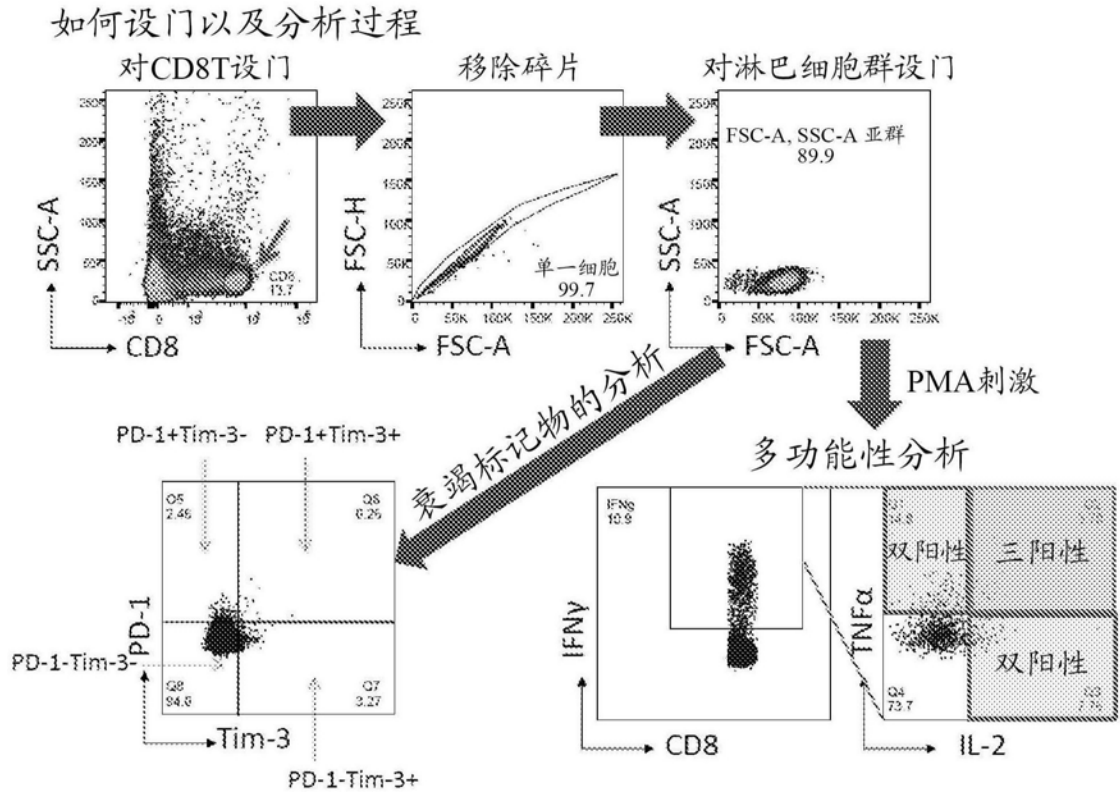
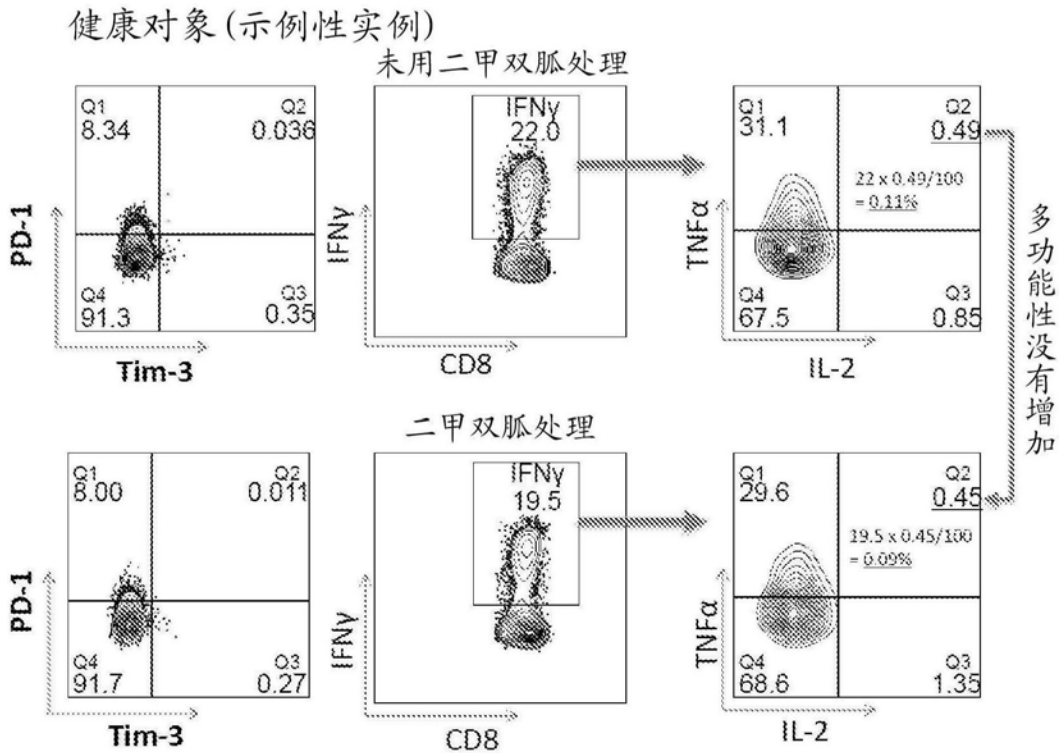


图1



在少数健康对象中观察到通过二甲双胍处理的CD8T细胞的多功能性增加

图2

癌症患者(示例性实例)

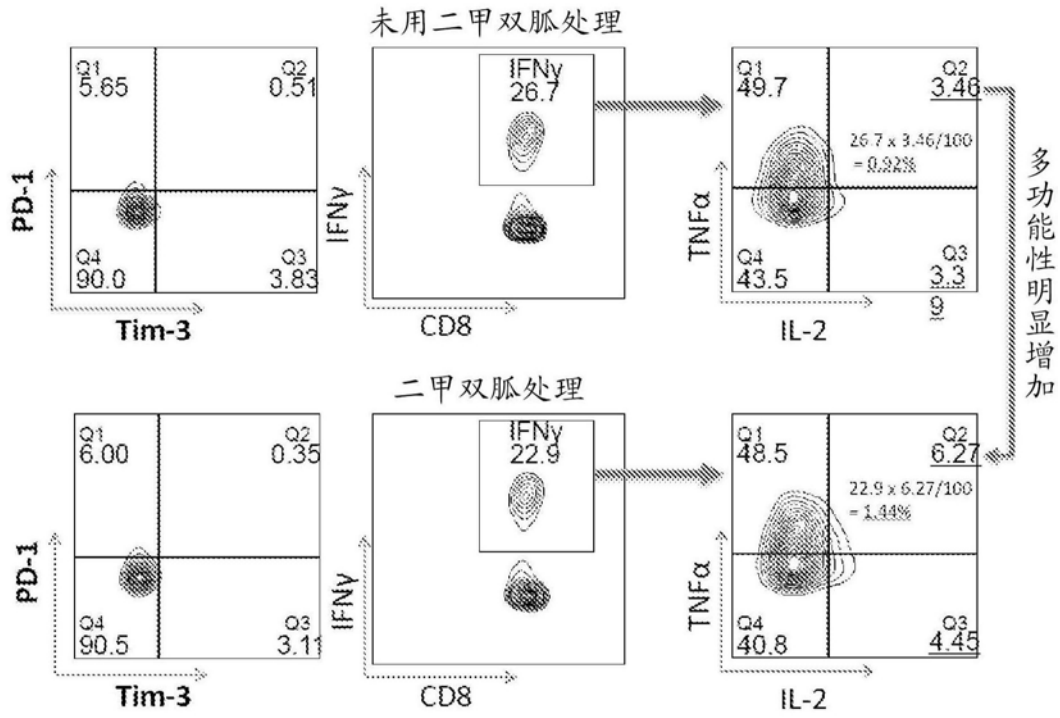
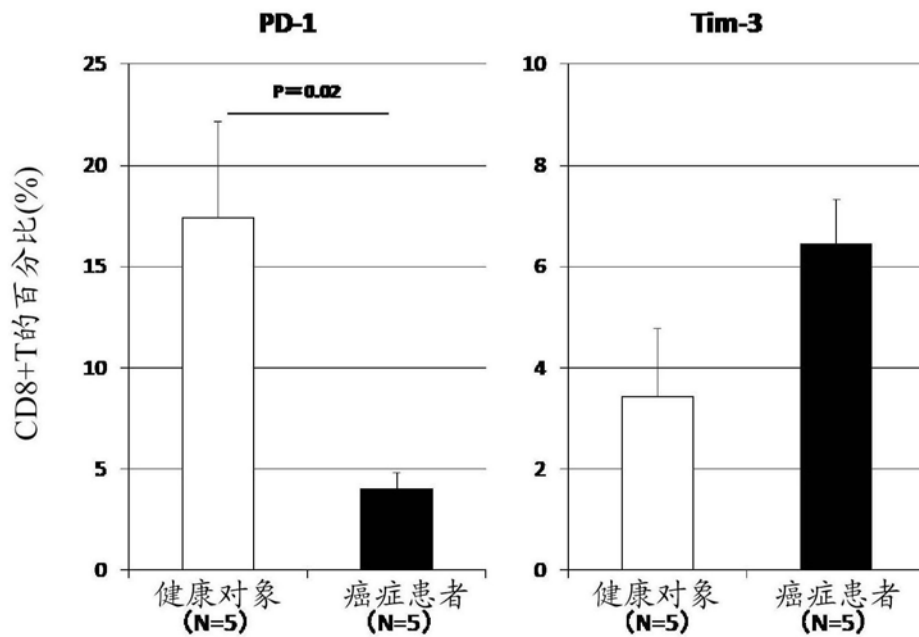


图3

CD8T细胞中的衰竭分子PD-1和Tim-3的表达的比较
(健康对象与癌症患者)



PD-1的表达频率在癌症患者中显著较低。相反，Tim-3的表达频率在癌症患者中趋于较高。

图4

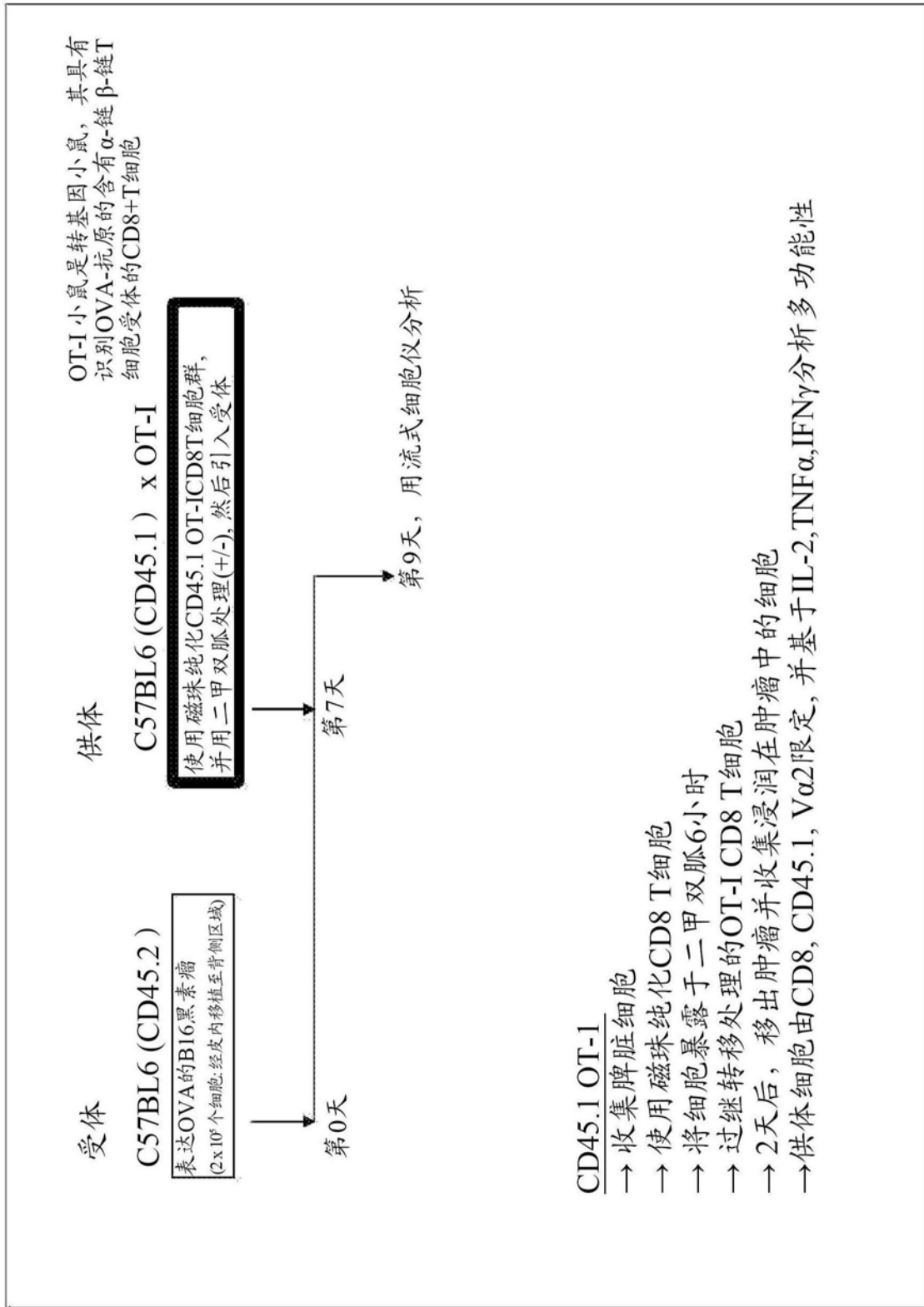


图5

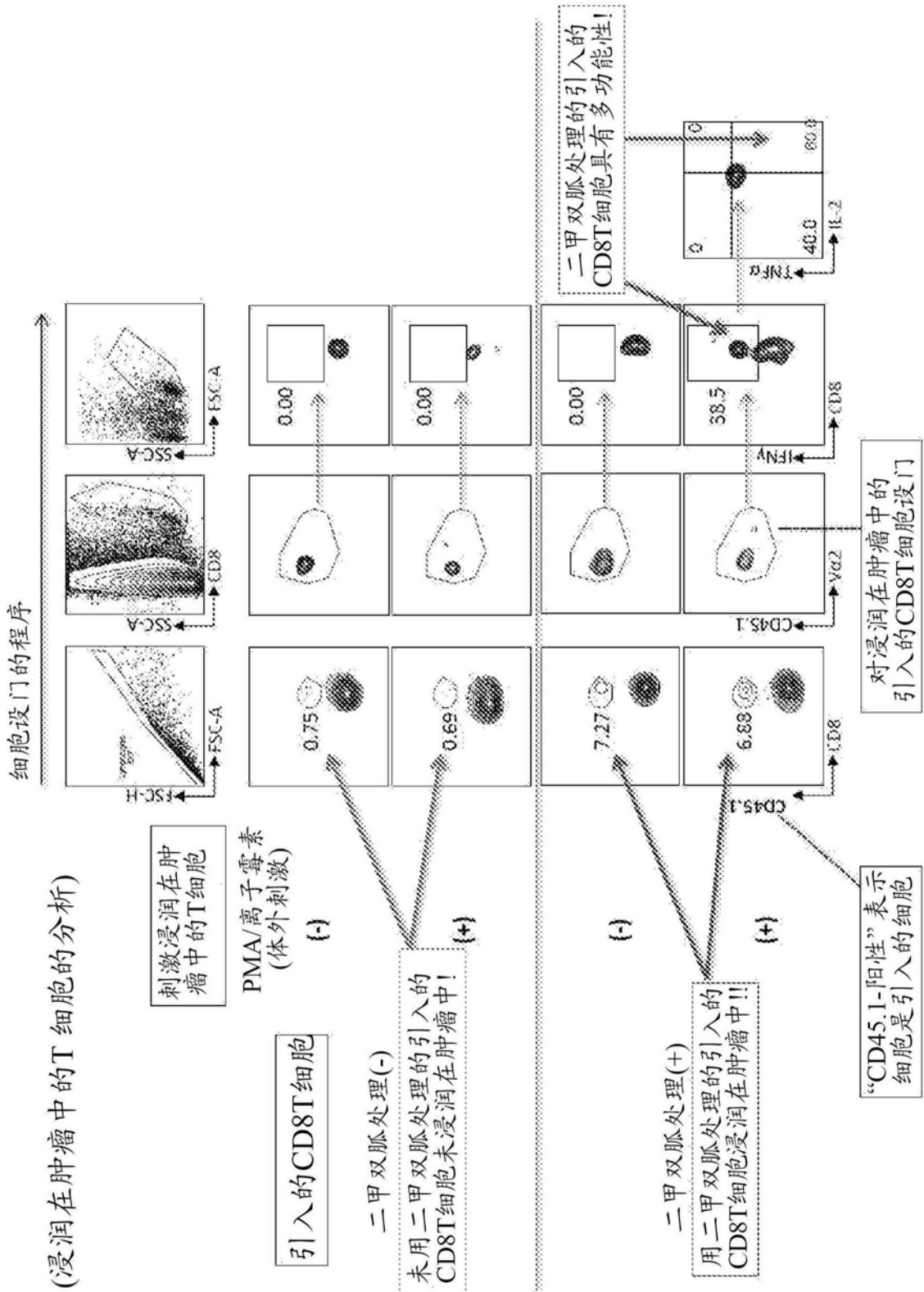


图6

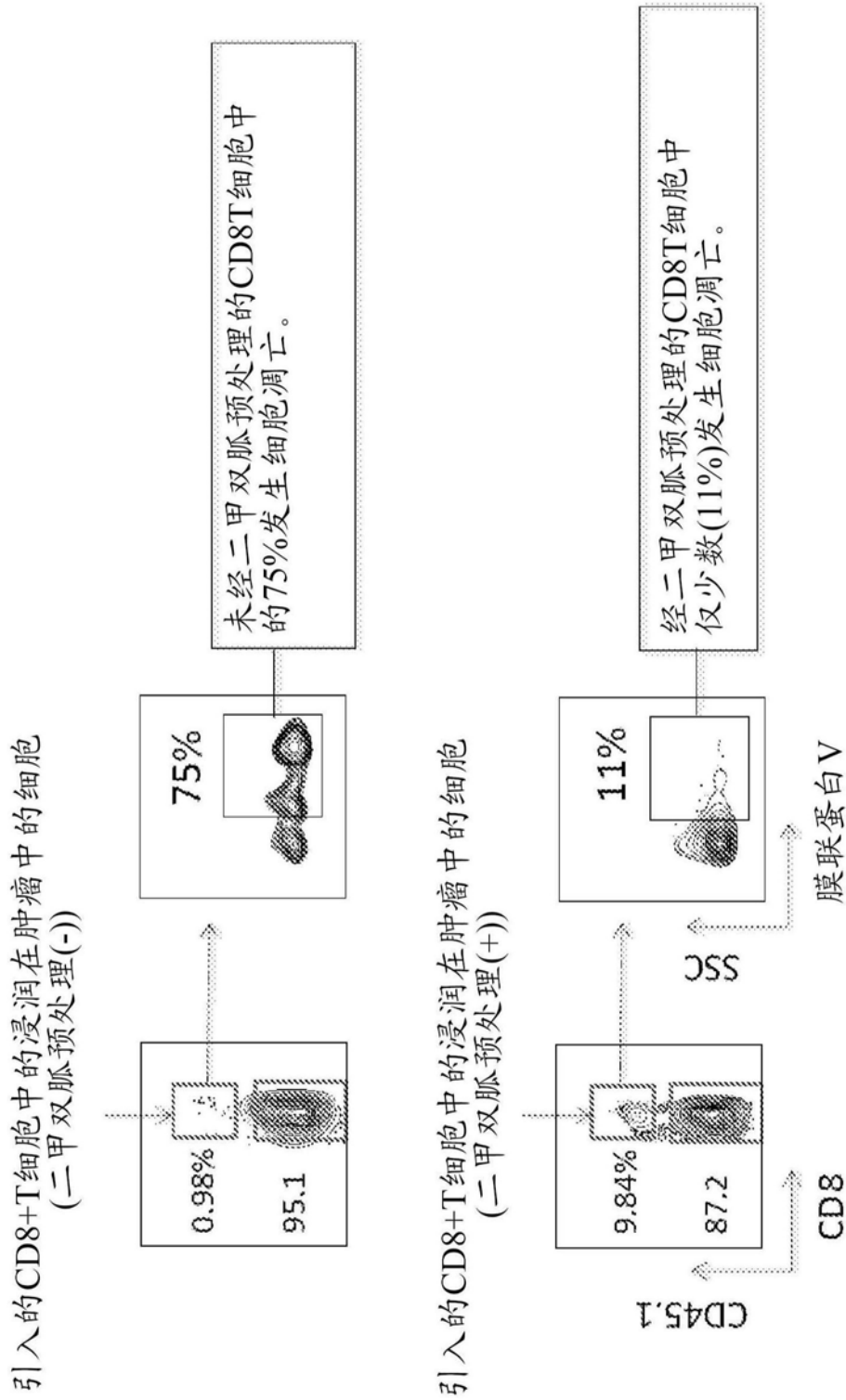


图7

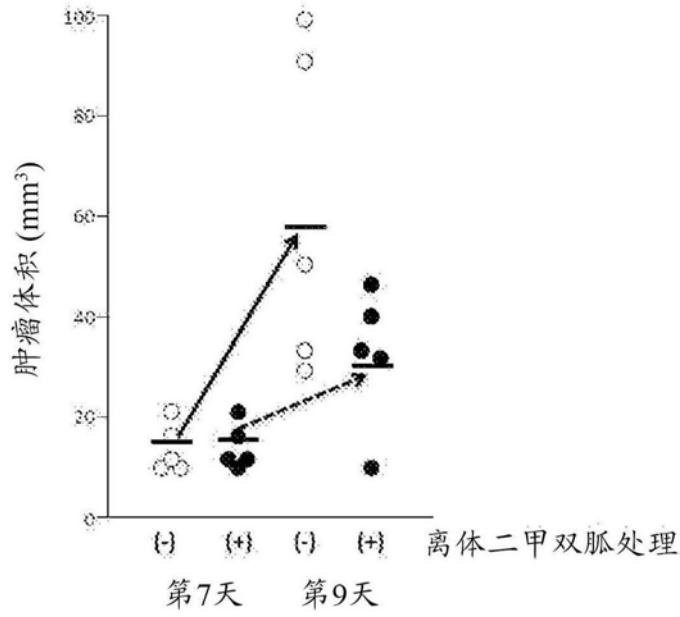


图8

使用二甲双胍进行的细胞免疫处理

将OT-ICD8T细胞与0 μM、10 μM、100 μM二甲双胍培养6小时以制备PJ细胞



PJ细胞向MO5荷瘤小鼠的过继转移



肿瘤生长的监测

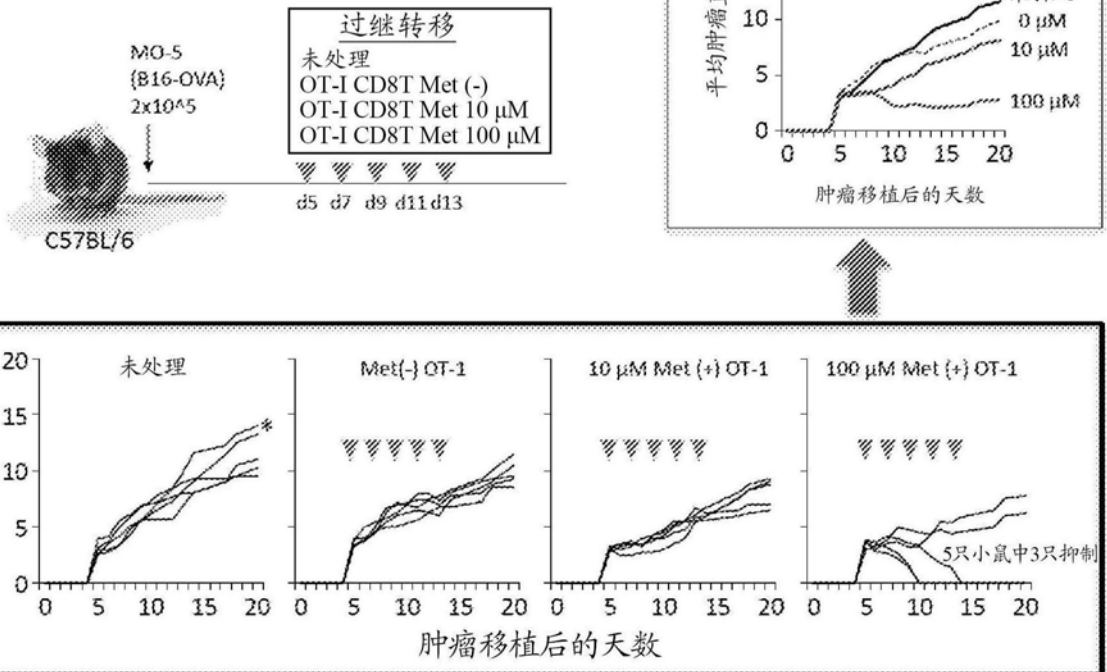


图9

二甲双胍和癌症疫苗组合使用的效果

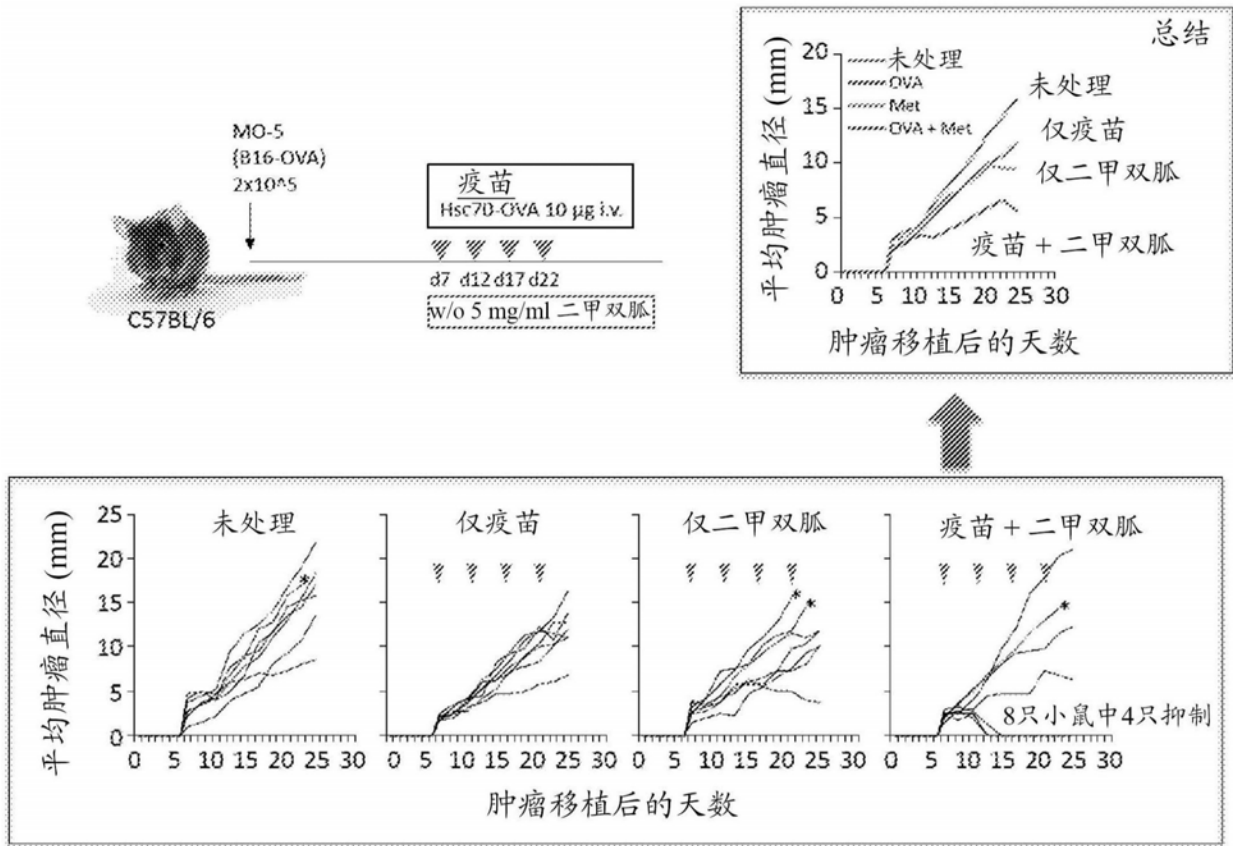


图10

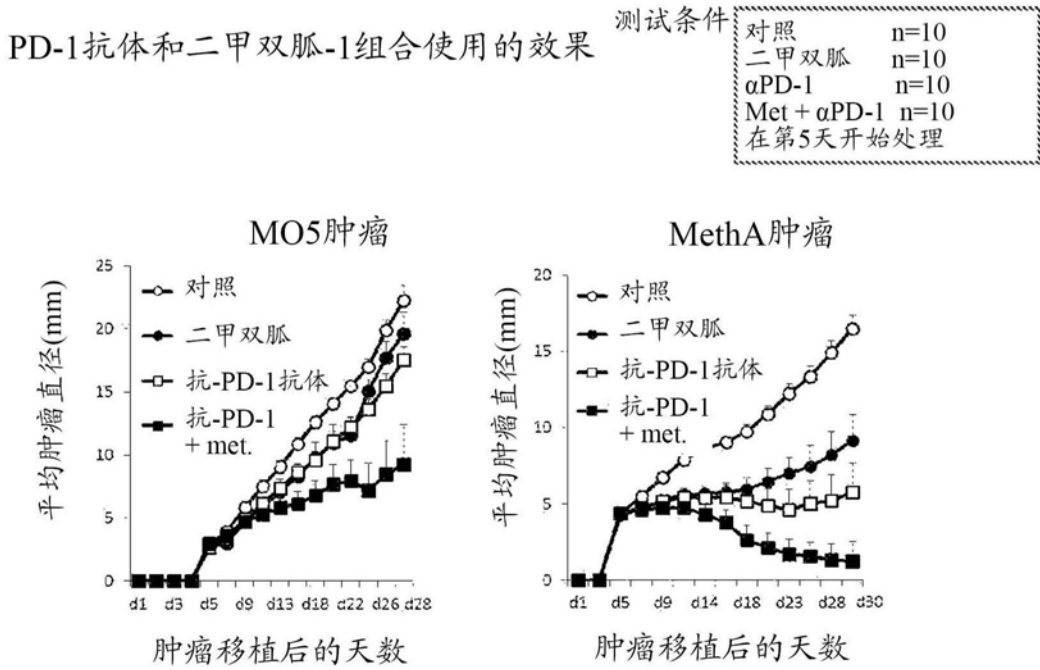


图11

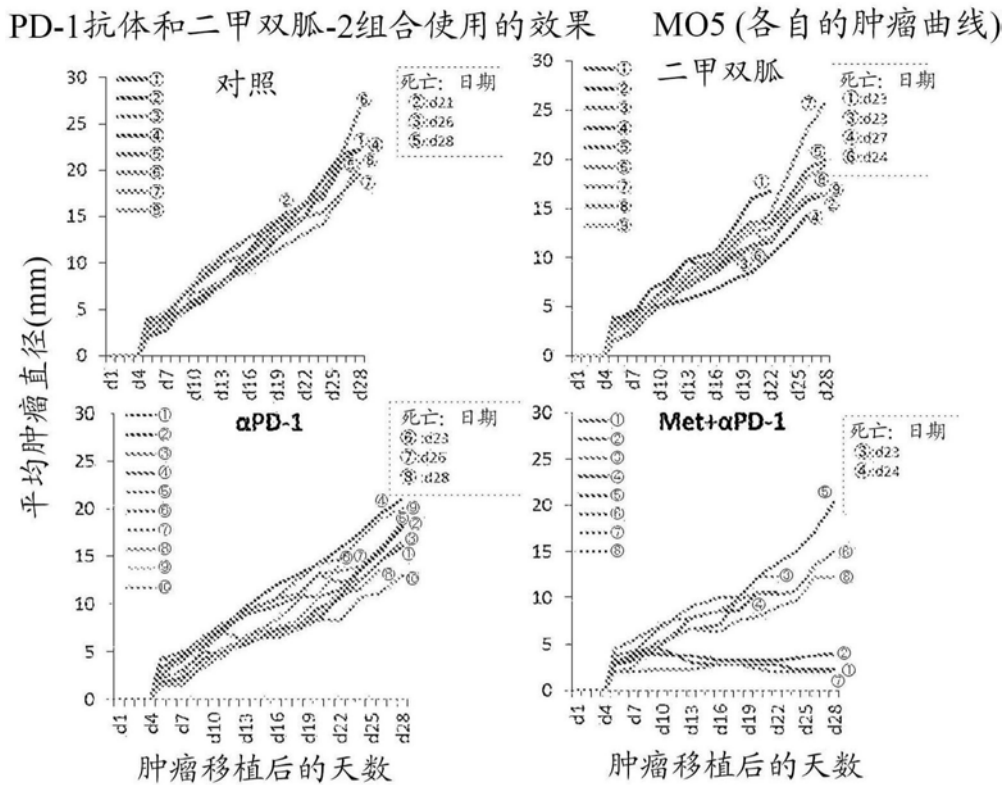


图12

PD-1抗体和二甲双胍-3组合使用的效果 Meth A (各自的肿瘤曲线)

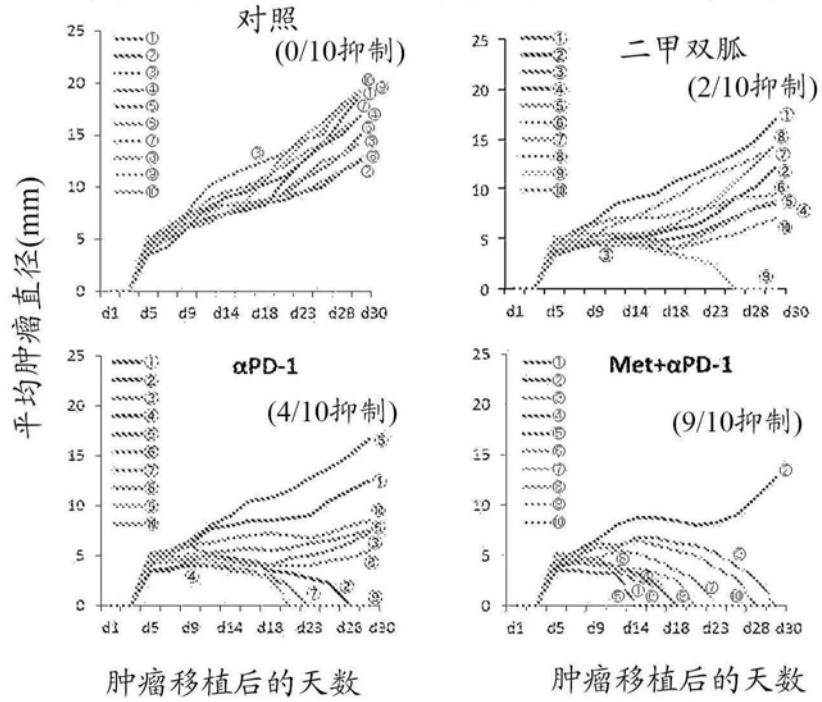


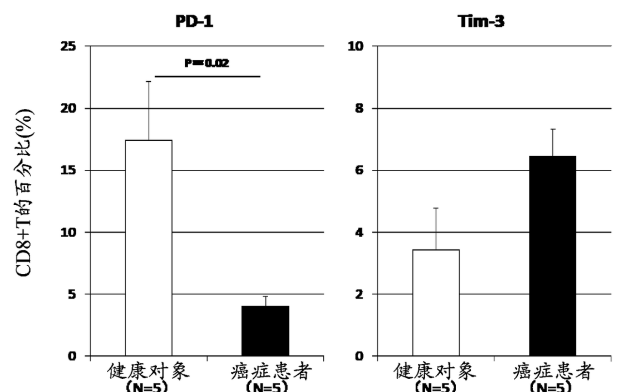
图13

专利名称(译)	增强免疫细胞功能的方法和评估免疫细胞多功能性的方法		
公开(公告)号	CN107148274A	公开(公告)日	2017-09-08
申请号	CN201580043408.X	申请日	2015-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	小野药品工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人冈山大学 小野药品工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人冈山大学 小野药品工业株式会社		
[标]发明人	鹤殿平一郎 荣川伸吾 豊冈伸一		
发明人	鹤殿平一郎 荣川伸吾 豊冈伸一		
IPC分类号	A61K35/17 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 A61K35/17 G01N33/564 G01N33/56911 G01N33/56983 G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 A61K31/155 A61K39/0011 A61K39/3955 A61K2039/505 A61K2039/515 G01N33/5047 G01N33/6863 G01N33/6866 G01N33/6869 G01N33/6893 G01N2333/525 G01N2333/55 G01N2333/57 G01N2333/70503		
代理人(译)	洪欣		
优先权	2014166593 2014-08-19 JP 2015085556 2015-04-20 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了通过离体激活各种免疫细胞来增强免疫细胞功能的方法，并提供功能增强的免疫细胞。本发明还提供免疫相关的细胞多功能性评估方法。选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药，通过增加具有高的产生IL-2、TNF α 和IFN γ 能力的CD8+T细胞，能够增强免疫细胞多功能性。通过将用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药处理的免疫细胞与未用双胍类抗糖尿病药处理的对照免疫细胞进行比较，可以评估免疫相关的细胞多功能性。当与对照相比，用选自二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍的双胍类抗糖尿病药处理的免疫细胞的多功能性被确定显著增加时，可以评估为所述免疫细胞对该治疗剂的敏感性提高。

CD8T细胞中的衰竭分子PD-1和Tim-3的表的比较
(健康对象与癌症患者)



PD-1的表达频率在癌症患者中显著较低。相反，Tim-3的表达频率在癌症患者中趋于较高。