202035701

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202035701 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：109105319　(22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 02 月 19 日

(51)Int. Cl.： ***C12Q1/6816 (2018.01)***　*C07K16/18 (2006.01)*

C07K16/46 (2006.01)　*A61K39/395 (2006.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/02/20　日本　2019-028507

2019/11/14　日本　2019-206277

(71)申請人：學校法人埼玉醫科大學 (日本) SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY (JP)

日本

(72)發明人：各務博 KAGAMU, HIROSHI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：49 項　圖式數：22　共 137 頁

(54)名稱

用以預測於癌症免疫療法下之長期存活之方法及組合物

(57)摘要

本發明提供一種預測於癌症免疫療法下之長期存活/治療介入之必要性的末梢血液生物標記。本發明提供一種將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標的方法。可藉由將與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之 $CD4^+$ T 細胞亞群、或與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量與基準比較，而預測受驗體之癌症免疫療法下之長期存活/治療介入之必要性。

202035701

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用以預測於癌症免疫療法下之長期存活之方法及組合物

【中文】

本發明提供一種預測於癌症免疫療法下之長期存活/治療介入之必要性的末梢血液生物標記。本發明提供一種將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標的方法。可藉由將與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群、或與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量與基準比較，而預測受驗體之癌症免疫療法下之長期存活/治療介入之必要性。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用以預測於癌症免疫療法下之長期存活之方法及組合物

【技術領域】

【0001】

本發明係與癌症治療之領域相關。尤其是關於癌症免疫療法下之長期存活之預測。

【先前技術】

【0002】

於黑色素瘤、肺癌、頭頸部癌、泌尿癌、胃癌等多種癌中證明以PD-1/PD-L1抑制為作用機理之免疫檢查點抑制藥之有效性，於日本亦適用保險。臨床試驗中表示，無論何種癌，均可以10～20%獲得長期存活。關於肺癌之研究中，報告有該長期存活即便於2年內結束治療，亦可5年以上無惡化存活。作為與短期起效關聯之生物標記，對腫瘤PD-L1或腫瘤基因變異量等若干種進行了研究，但至今完全未對預測長期存活群之生物標記進行研究。

【0003】

作為預測PD-1/PD-L1抑制藥之短期起效之生物標記，於肺癌中使用腫瘤PD-L1表現比率。然而，肺癌以外未明確與起效之相關，又，肺癌下之ROC解析中AUC亦止於0.6～0.7左右。於基礎研究中，報告有即便使用藉由基因組編輯而剔除PD-L1之腫瘤，亦獲得PD-1/PD-L1抑制藥之抗腫瘤效果。藉由剔除宿主之PD-L1，抗腫瘤效果會消失，因此認為抗原呈現細胞上之PD-L1表現較為重要。腫瘤基因變異量亦為預測短期起效之有希

望之生物標記，但ROC解析下之AUC仍止於0.6～0.7左右。

【0004】

癌症免疫療法下之單獨治療中，起效率未必高。例如，雖為臨床可見取得極大成功之抗PD-1抗體，但根據無惡化存活時間(PFS)之資料，確認幾乎所有抗PD-1抗體臨床試驗中3個月以內病情惡化之「無效群」約為40%。作為增加單獨療法下之較低之起效率的方法，可列舉併用療法。雖然進行PD-1抑制藥與細胞毒殺性抗癌劑或其他免疫檢查點抑制藥之併用療法開發，但併用療法存在毒性較高之問題。

【發明內容】

[解決問題之技術手段]

【0005】

本發明者已發現：對於癌症免疫療法(例如，抗PD-1治療或抗PD-L1治療)之治療效果為發展(PD)、穩定(SD)、起效(完全起效(CR)＋部分起效(PR))之三群分別呈現出不同之免疫狀態。並且，本發明者已提供如下方法：於對受驗體進行癌症免疫療法之情形時，預測對於該癌症免疫療法之應答為發展(PD)、穩定(SD)或起效(完全起效(CR)＋部分起效(PR))之哪一種(再者，於受驗體之群除部分起效群(PR)外包含完全起效群(CR)之情形時，或不包含部分起效群(PR)而包含完全起效群(CR)之情形時，均可視為與部分起效群(PR)相同而檢測)。

【0006】

本發明提供一種將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標的方法。可藉由將本說明書中記載之特定之細胞亞群之量與基準比較，而預測受驗體中產生之癌症免

疫療法下之長期存活之有無及/或程度。

【0007】

作為本發明中可用作指標之細胞亞群，並無限定，可列舉：與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群、與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群或與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群。與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群例如係包含於$CD62L^{low}CD4^+$T細胞群之細胞亞群(例如，$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群本身、或$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群等)。與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群例如為$HLA\text{-}DR^+CD141^+CD11c^+$細胞亞群等。與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群例如為$CD137^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群等。

【0008】

於本發明之另外實施形態中，表示受驗體中產生之癌症免疫療法下之長期存活預測，藉此可表示對該受驗體是否應實施治療介入或何時應實施治療介入之指標。於未預測於癌症免疫療法下之長期存活之情形時，一般認為可有利於實施對癌症之治療介入，但至今，不存在用以預測於癌症免疫療法下之長期存活之生物標記。

【0009】

治療介入代表而言，可與1個或複數個另外藥劑組合投予。或者，治療介入可為與放射線治療之組合。1個或複數個另外藥劑可為任意之化學療法藥，或可包含第2免疫檢查點抑制劑。或者，作為治療介入中使用之其他癌症治療，可列舉：其他癌症免疫療法(例如，過繼細胞移入)、溫熱療法、外科程序等。較佳為治療介入係與如放射線治療或化學療法劑般之

包含抗癌劑投予之癌症治療之組合。

【0010】

本發明之實施形態之例表示於以下之項目。

(項目1)

一種方法，其係將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標者，且

包含：分析自該受驗體獲得之該樣品中之細胞亞群之組成的步驟，

藉由該樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+T$細胞亞群之量與基準之比較，而預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活。

(項目2)

一種方法，其係將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標者，且

包含：分析自該受驗體獲得之該樣品中之細胞亞群之組成的步驟，

藉由該樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量與基準之比較，而預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活。

(項目3)

一種方法，其係將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標者，且

包含：分析自該受驗體獲得之該樣品中之細胞亞群之組成的步驟，

藉由該樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+T$細胞亞群之量與基準之比較，而預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存

活。

(項目4)

如項目1至3中任一項之方法，其中藉由上述樣品中之選自由與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量及與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量所組成之群之至少兩個量與基準之比較，而預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活。

(項目5)

如項目1或4之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群係包含於$CD62L^{low}CD4^+$T細胞群之細胞亞群。

(項目6)

如項目5之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群係$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群。

(項目7)

如項目5之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群係$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群。

(項目8)

如項目2或4之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群係$HLA\text{-}DR^+CD141^+CD11c^+$細胞亞群。

(項目9)

如項目3或4之方法，其中與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群係包含於$CD62L^{low}CD8^+$T細胞群之細胞亞群。

(項目10)

如項目9之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群係$CD137^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群。

(項目11)

一種方法，其係將針對選自由以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量、

控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、及

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量

所組成之群之量(X、Y)的相對值作為該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標，且

包含：測定該X之步驟，及

測定該Y之步驟，

使用X相對於Y之相對值與基準之比較作為用以預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活之指標。

(項目12)

如項目11之方法，其中上述量(X)及(Y)分別選自由以下：

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量、

$CD137^+CD8^+$T細胞亞群之量、及

$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群。

(項目13)

如項目11之方法，其中上述量(X)係$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量，及(Y)係$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量。

(項目14)

如項目11至13中任一項之方法，其中上述相對值為X/Y。

(項目15)

如項目11至13中任一項之方法，其中上述相對值為X^2/Y。

(項目16)

如項目1至15中任一項之方法，其中上述樣品係末梢血液樣品。

(項目17)

如項目1至16中任一項之方法，其中上述基準係上述癌症免疫療法前之上述受驗體之樣品中之上述細胞亞群之量、或預先決定之值。

(項目18)

如項目1至17中任一項之方法，其中上述樣品中之上述細胞亞群之量

多於上述基準表示就上述受驗體預測到癌症免疫療法下之長期存活。

(項目19)

如項目1至17中任一項之方法，其中上述樣品中之上述細胞亞群之量少於上述基準表示就上述受驗體未預測到癌症免疫療法下之長期存活。

(項目20)

如項目1至19中任一項之方法，其中就上述受驗體未預測到癌症免疫療法下之長期存活之情形時，進而表示應對該受驗體實施併用療法。

(項目21)

一種方法，其係如項目1至20中任一項之方法，其進而規定為將自受驗體於複數個時間點獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為用以預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活之指標的方法，且包含：分析自該受驗體於複數個時間點獲得之樣品中之細胞亞群之組成的步驟。

(項目22)

如項目15之方法，其中於上述X^2/Y為約324以上之情形時，預測長期存活。

(項目23)

一種藥學組合物，其特徵在於包含用以處置受驗體中之癌症之免疫檢查點抑制劑，且

該藥學組合物係投予至藉由如項目1至18或21至22中任一項之方法就該受驗體預測到癌症免疫療法下之長期存活之受驗體。

(項目24)

如項目23之藥學組合物，其中上述免疫檢查點抑制劑係PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

(項目25)

一種組合醫藥，其特徵在於包含用以處置受驗體中之癌症之免疫檢查點抑制劑，且

該組合醫藥投予至藉由如項目1至22中任一項之方法就該受驗體未預測到癌症免疫療法下之長期存活之受驗體。

(項目26)

如項目25之組合醫藥，其中上述免疫檢查點抑制劑係PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

(項目27)

如項目25之組合醫藥，其包含選自由化學療法劑及另外癌症免疫療法所組成之群之醫藥。

(項目28)

一種套組，其係用以判定就受驗體是否預測到癌症免疫療法下之長期存活者，且

包含對於選自由

・CD4及CD62L之組合、

・CD4及CCR7之組合、

・CD4、CD62L及LAG-3之組合、

・CD4、CD62L及ICOS之組合、

・CD4、CD62L及CD25之組合、

・CD4、CD127及CD25之組合、

・CD4、CD45RA及Foxp3之組合、

・CD4、CD25及Foxp3之組合、

・CD11c、CD141及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD141及CD80之組合、

・CD11c、CD123及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD123及CD80之組合、

・CD8及CD62L之組合、

・CD8及CD137之組合、以及

・CD28、CD62L及CD8之組合

所組成之群之標記之組合的檢測劑。

(項目29)

一種套組，其係用以判定就受驗體是否癌症免疫療法中必需治療介入者，且

包含對於選自由

・CD4及CD62L之組合、

・CD4及CCR7之組合、

・CD4、CD62L及LAG-3之組合、

・CD4、CD62L及ICOS之組合、

・CD4、CD62L及CD25之組合、

・CD4、CD127及CD25之組合、

・CD4、CD45RA及Foxp3之組合、

・CD4、CD25及Foxp3之組合、

・CD11c、CD141及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD141及CD80之組合、

・CD11c、CD123及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD123及CD80之組合、

・CD8及CD62L之組合、

・CD8及CD137之組合、以及

・CD28、CD62L及CD8之組合

所組成之群之標記之組合的檢測劑。

(項目30)

一種方法，其係將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為就該受驗體之癌症免疫療法中必需治療介入之指標者，且

包含：分析自該受驗體獲得之該樣品中之細胞亞群之組成的步驟，

藉由該樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量與基準之比較，而提供就該受驗體之癌症免疫療法中必需治療介入之指標。

(項目31)

如項目30之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群係包含於$CD62L^{low}CD4^+$T細胞群之細胞亞群。

(項目32)

如項目30之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群係$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群。

(項目33)

一種方法，其係將針對選自由以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量、

控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、及

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量

所組成之群之量(X、Y)之相對值作為就該受驗體之癌症免疫療法中必需治療介入之指標，且

包含：測定該X之步驟，及

測定該Y之步驟，

將X相對於Y之相對值與基準之比較作為就該受驗體之癌症免疫療法中必需治療介入之指標。

(項目34)

如項目33之方法，其中上述量(X)及(Y)分別選自由以下：

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量、

$CD137^+CD8^+$T細胞亞群之量、及

$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群。

(項目35)

如項目33之方法，其中上述量(X)係$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量，及(Y)係$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量。

(項目36)

如項目33至35中任一項之方法，其中上述相對值為X/Y。

(項目37)

如項目33至35中任一項之方法，其中上述相對值為X^2/Y。

(項目38)

如項目30至37中任一項之方法，其中上述治療介入係放射線治療。

(項目39)

如項目30至37中任一項之方法，其中上述治療介入係化學療法劑治療。

(項目40)

如項目37之方法，其中上述X^2/Y約未達324係必需治療介入之指標。

(項目41)

如項目37之方法，其中上述X^2/Y約174以上且約未達324係必需治療介入之指標，該治療介入包含除投予之癌症免疫療法外，進行化學療法、放射線療法、外科程序、或溫熱療法，或進行另外癌症免疫療法。

(項目42)

如項目37之方法，其中上述X^2/Y約未達174係必需治療介入之指標，該治療介入包含中止投予之癌症免疫法，或除投予之癌症免疫法外，進行

化學療法、放射線療法、外科程序、或溫熱療法，或進行另外癌症免疫療法。

(項目43)

一種組合醫藥，其特徵在於包含用以處置受驗體中之癌症之免疫檢查點抑制劑，且

該組合醫藥投予至藉由如項目30至42中任一項之方法判斷為於該受驗體中癌症免疫療法中必需治療介入之受驗體。

(項目44)

如項目43之組合醫藥，其中上述免疫檢查點抑制劑係PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

(項目45)

如項目43之組合醫藥，其包含選自由化學療法劑及另外癌症免疫療法所組成之群之醫藥。

(項目46)

一種方法，其係將自治療前之作為癌症患者之受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為決定對於該受驗體之治療方針之指標者，且包含以下：

測定自該受驗體獲得之該樣品中之$CD62L^{low}CD4^{+}T$細胞亞群之量(X)與$Foxp3^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$細胞亞群之量(Y)的步驟，及

求出相對值X^2/Y之步驟，

進而包含選自由以下步驟所組成之群之步驟：

(a)關於相對值X^2/Y設定閾值α，於該X^2/Y未達閾值α時，判斷受檢體為對於癌症免疫療法之不應答者的步驟；

(b)關於相對值X^2/Y設定閾值α及β，此處α＜β，並且於該X^2/Y為閾值α以上且未達閾值β之情形時，判斷受檢體為對於癌症免疫療法之短期應答者的步驟；以及

(c)關於相對值X^2/Y設定閾值β，於該X^2/Y為閾值β以上之情形時，判斷受檢體為對於癌症免疫療法之長期應答者的步驟。

(項目47)

如項目46之方法，其中上述閾值β係較上述閾值α大至少50之值。

(項目48)

如項目47之方法，其中上述閾值α係100～400之範圍內之值，

上述閾值β係150～450之範圍內之值。

(項目49)

一種製品，其包含記載有如項目46至48中任一項之方法之隨附文件、及免疫檢查點抑制劑。

[發明之效果]

【0011】

藉由本發明，可預測癌症免疫療法下之長期存活。藉此，可判斷癌症免疫療法中是否應進行治療介入，或應何時實施治療介入。

【圖式簡單說明】

【0012】

圖1A係由Brahmer等人(2017AARC)表示之圖。具體而言，係表示總存活時間(OS、%)之圖表。

圖1B係由Brahmer等人(2017AARC)表示之圖。具體而言，係表示各患者(n＝16)之治療之圖表。

圖2係自Brahmer等人(N Eng J Med 2015: 373: 123-135)更改之圖表。

圖3之左圖係表示早期病情惡化之無效群(非應答者群)與其以外之起效群(應答者群)中之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率之圖。

圖4係表示與$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率有關之ROC解析及PFS繪圖的圖。

圖5係測定納武單抗治療之前(Nivo前)及後(Nivo後)之各種標記之變化的結果。

圖6係表示起效群(應答者 圖6左)與無效群(非應答者 圖6右)之納武單抗治療前(Nivo前)及治療4週後(治療4W)之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率的圖表。

圖7左係分別關於在治療開始時間點有治療耐性之患者群(原發耐性圖表右)、自治療開始平均63.3週後(28～92週)於治療開始後獲得治療耐性之患者群(獲得性耐性 圖表中央)、及自治療開始平均64.5週後(12～92週)於治療開始後依然對治療有應答性之患者群(持續應答 圖表左)，表示$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率的圖表。圖7右係分別關於在治療開始時間點有治療耐性之患者群(原發耐性 圖表右)、自治療開始平均63.3週後(28～92週)於治療開始後獲得治療耐性之患者群(獲得性耐性 圖表中央)、及自治療開始平均64.5週後(12～92週)於治療開始後依然對治療有應答性之患者群(持續應答 圖表左)，表示將$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率設為「X」，將$CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率設為「Y」時之X^2/Y的圖表。

圖8係關於長期無惡化存活群(LR)、短期起效群(SR)、及無效群(NR)，表示$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率之圖表(圖8左)，及表示將

$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率設為「X」且將$CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率設為「Y」時之X^2/Y的圖表(圖8右)。

圖9係記載與本發明相關之機制的模式圖。

圖10係表示T細胞部分群與應答納武單抗療法之NSCLC患者之相關。a：CONSORT圖。自171名NSCLC患者收取知情同意。未自28名患者於納武單抗治療之前採取末梢血液試樣。17名患者未進行第9週之圖像評價。b-d：至納武單抗治療後9週前達成PR或SD之應答者、及呈現疾病之發展之非應答者中的末梢血液單核細胞(PBMC)之部分群之差異。使用FITC偶聯抗CD4、PE偶聯抗CD62L、及PE-Cy5偶聯抗CD8 mAb、或FITC偶聯抗CD4、PE偶聯抗FOXP3、及PE-Cy5偶聯抗CD25 mAb，染色PBMC。板塊b及c：分別係所有$CD4^{+}$細胞群中及所有$CD8^{+}$細胞群中之$CD62L^{low}$細胞之比率；板塊d：所有$CD4^{+}$細胞群中之$CD25^{+}FOXP3^{+}$細胞之比率。e：關於探索組之患者之預測式之值。預測式(X^2/Y)係基於所有$CD4^{+}$細胞群中之$CD62L^{low}$細胞之比率(X)及$CD25^{+}FOXP3^{+}$細胞之比率(Y)。f：預測探索組(n＝40)中之非應答者之式之接受者操作特性曲線。於式之閾值(192)下，感度及特異度係85.7%及100%(P＜0.0001)。g：基於預測式之閾值(192)診斷為非應答者或應答者之探索組之患者之無惡化存活時間(PFS)曲線。h：探索組之總存活時間(OS)曲線。i：驗證組之患者之預測式之值。j：驗證組之患者之PFS曲線。k：驗證組之患者之OS曲線。於板塊b-e及i中，將資料以平均值±平均值之標準誤差表示，記號表示關於各個患者之值。關於差異之統計學上之有意義性，使用Student's兩側t檢定(b-e,i)或對數等級檢定(g,h,j,k)進行評價。

圖11係表示$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞與其他T細胞部分群之間之相關的

圖。a,b：PBMC之中之經圈選之$CD8^+CD3^+$細胞及$CD4^+CD3^+$細胞中之CCR7及CD45RA表現。c,d：所有$CD4^+$細胞群中之$CD62L^{low}CD4^+$細胞之比率與$CCR7^-CD45RA^-$細胞之比率之間之線性相關(c)、以及$CD62L^{low}CD4^+$細胞之比率與$CCR7^+CD45RA^-$細胞之比率或$CCR7^+CD45RA^+$細胞之比率之間之線性相關(d)。e-h：所有$CD4^+$細胞群中之$CD62L^{low}CD4^+$細胞之比率與$CXCR3^+CCR4^-CCR6^-$細胞、$CXCR3^-CCR4^+CCR6^-$細胞、$CXCR3^-CCR4^-CCR6^+$細胞、或$CXCR5^+$細胞之比率之間之線性相關。i,j：分別為$CD62L^{low}CD4^+$細胞之比率與$CD8^+CD3^+$細胞及(效應)$CCR7^-CD45RA^+CD8^+$細胞之比率之間之線性相關。

圖12係表示$CD4^+$T細胞之質譜流式細胞術及基因表現之分析的圖。a：基於29種分子(CD3、CD4、CD8、CD19、CD27、CD28、CD45RA、CD62L、CD69、CD80、CD90、CD103、CD134、CD137、CD152、CD154、CD183、CD194、CD196、CD197、CD223、CD273、CD274、CD278、CD279、T-bet、BCL-6、FOXP3、TIM-3)之表現之藉由無監督學習聚類之對經圈選之$CD4^+CD3^+$細胞之viSNE分析的代表例。b：表示關於經圈選之$CD45RA^+CCR7^+$、$CD45RA^-CCR7^-$、$CD62L^{high}$、及$CD62L^{low}CD4^+CD3^+$T細胞之CD62L、CCR7、CD45RA、CD27、T-bet、FOXP3、CXCR3、CCR4、CCR6、及PD-1之表現(n＝10)。c：經圈選之$CD45RA^-CCR7^-$與$CD62L^{low}CD4^+CD3^+$T細胞之間之CD27、T-bet及CXCR3表現之比較(n＝10)。

圖13係表示$CD62L^{low}CD4^+$T細胞部分群與PD-1、LAG3、及CTLA-4表現之間之相關、以及樹狀細胞之狀態的圖。a-d：$CD62L^{low}CD4^+$細胞之比率與$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$細胞、$PD\text{-}1^+CCR7^-CD45RA^-CD8^+$細胞、

LAG-3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}細胞、或CTLA-4^{+}CD62L^{low}CD4^{+}細胞之比率之間之線性相關。

圖14表示對應於對納武單抗治療之良好之應答的基因表現。比較來自部分起效(PR)、穩定(SD)、及發展(PD)之患者之CD62L^{high}CD4^{+}T細胞與CD62L^{low}CD4^{+}T細胞之間的基因表現資料，獲得印記。其後，將源自PR及SD、PR及PD、SD及PD、PR+SD及PD、以及PR及SD+PD之細胞間比較之作為印記之基因(分別為1884、1826、1410、1167、及1513基因)於a中與所有3458基因合併。對CD62L^{low}CD4^{+}T細胞與CD62L^{high}CD4^{+}T細胞之間顯示不同之表現之30個免疫相關基因進行表示。上述印記中眾所周知與抗腫瘤免疫性關聯之53基因中，就對納武單抗治療之應答之觀點而言，將30基因之基因表現示於b：表示CD62L^{low}CD4^{+}T細胞中之基因表現之程度，該等基因相對於PD中，於PR中基因表現相對高，相對於SD中，於PR中基因表現相對高，並且，相對於PD中，於PR及SD中基因表現相對高。

圖15表示長期存活者相對短期應答者之CD62L^{low}CD4^{+}T細胞之部分群。係預測長期應答者之式之接受者操作特性曲線(n＝126)。預測式之閾值(323.5)下之感度及特異度係68.2%及81.7%(P＜0.0001)。

圖16係表示納武單抗治療後之患者之存活時間的圖。於納武單抗治療後第9週之最初之腫瘤應答評價期間，關於呈現發展(PD)、穩定(SD)、或部分起效(PR)之三個患者之部分群(全部n＝126)之總存活時間曲線(a)及無惡化性時間曲線(b)。關於包含無法評價第9週之腫瘤應答之患者的根據預測式之閾值(192)診斷為非應答者或應答者之患者(全部n＝143)之OS曲線(c)及PFS曲線(d)。(e,f)關於用以預測驗證組中(n＝86)及所有患者中

(n＝126)之非應答者之式的接受者操作特性曲線(ROC)。

圖17係表示免疫系細胞之部分群之比率之間之相關以及所有$CD4^+$T細胞群中之$CD62L^{low}$細胞及$CCR7^-CD45RA^-$細胞與預測式之值之間之相關的圖。c-e：所有$CD4^+$細胞群中之$CCR7^-CD45RA^-$細胞之比率與所有$CD4^+$細胞群中之$CXCR3^+CCR4^-CCR6^-$細胞、$CXCR3^-CCR4^+CCR6^-$細胞、或$CXCR3^-CCR4^-CCR6^+$細胞之比率之間之相關。a,b：自23名患者獲得之所有$CD4^+$T細胞群中之$CD62L^{low}$細胞與$CCR7^-CD45RA^-$細胞之比率。將資料以平均值±平均值之標準誤差表示，記號表示關於各個患者之值。關於差異之統計學之有意義性，使用Student's兩側t檢定進行評價。

圖18係表示T細胞部分群之比率之間之相關之圖。所有$CD4^+$T細胞群中之$CCR7^-CD45RA^-$細胞之比率與(a,b)所有$CD62L^{low}CD4^+$細胞群中及所有$CCR7^-CD45RA^-CD8^+$細胞群中之$PD\text{-}1^+$細胞之比率之間之線性相關、以及(c,d)所有$CD62L^{low}CD4^+$細胞群中之$LAG\text{-}3^+$細胞之比率及$CTLA\text{-}4^+$細胞之比率之間之線性相關。

圖19係表示質譜流式細胞術分析之圈選策略之圖。發明者等人使用識別金屬嵌入聚丙烯EQ^{TM}四元素校準珠之訊號強度之正規化演算法。於正規化後，除去珠粒，藉由^{191}Ir圈選單細胞(singlet)。藉由^{191}Ir及^{198}Pt圈選活細胞。

圖20係表示LSR Fortessa分析之圈選策略之圖。使用FSC、SSC、及FVD染色，圈選活單細胞。關於$CD3^+$細胞，作為T細胞進行圈選。

圖21係表示作為第一線治療之使用帕博利珠單抗之情形之結果之圖。A：解析患者群。B：帕博利珠單抗治療下之無惡化存活(PFS)曲線。C：帕博利珠單抗治療下之總存活(OS)曲線。D：以$CD62L^{low}CD4^+/CD3^+$

為橫軸，以PFS為縱軸之ROC解析結果。E：以$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$為橫軸，以OS為縱軸之ROC解析結果。F：PFS＜490之群及PFS≧490之群之$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$之繪圖結果。G：關於PFS，以$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$＞17.6為閾值而進行ROC解析之結果。H：OS＜637之群及OS≧637之群之$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$之繪圖結果。I：關於OS，以$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$＞15.6為閾值而進行ROC解析之結果。

圖22A及圖22B係表示藉由帕博利珠單抗之第一線治療之患者(●)與藉由納武單抗之第二線治療之患者(○)之比較結果的圖表。對於已治療非小細胞肺癌之納武單抗治療效果與對於未治療PD-L1＞50%非小細胞肺癌之帕博利珠單抗治療效果若以%CD62Llow/CD4+調整則幾乎相同(PFS係PD-L1＞50%群良好，但每一%CD62Llow/CD4＋之PFS增加比率相同)。

【實施方式】

【0013】

以下，一面表示最佳形態一面說明本發明。本說明書之全文中，只要未特別說明，單數形之表達應理解成亦包含其複數形之概念。因此，只要未特別說明，單數形之冠詞(例如，英語之情形時，「a」、「an」、「the」等)應理解成亦包含其複數形之概念。又，只要未特別說明，於本說明書中使用之用語應理解成以該領域通常使用之含義使用。因此，只要未特別定義，於本說明書中使用之全部專門用語及科學技術用語具有與由本發明所屬領域之業者通常所理解相同之含義。於矛盾之情形時，本說明書(包含定義)優先。

【0014】

以下適當說明本說明書中特別使用之用語之定義及/或基本技術內

容。

【0015】

(定義)

於本說明書中，所謂「長期應答者」係指無惡化存活時間為500天以上之患者，例如納武單抗療法後500天以上未產生惡化之患者。推定為長期應答者之患者預測藉由癌症免疫療法之長期存活，因此臨床醫生可判斷應以最小限度(例如一次投予)結束癌症免疫療法。

【0016】

於本說明書中，所謂「短期應答者」係指無惡化存活時間未達500天之患者，例如納武單抗療法後未達500天產生惡化之患者。推定為短期應答者之患者預測為無法期待藉由癌症免疫療法之效果，或者，預測為相應取得藉由癌症免疫療法之效果但無法獲得長期存活，因此臨床醫生可(1)進而繼續治療並且研究與其他治療法之併用，或者，(2)研究變更成其他治療法、及/或研究與其他治療法之併用。

【0017】

於本說明書中，所謂「生物標記」係指作為對於通常之生物學過程、病理學過程、或治療介入之藥理學應答之指標，客觀測定並評價之特性。

【0018】

於本說明書中，「癌症」或「癌」可互換使用，係指異型性較強、增殖快於正常細胞，可於周圍組織破壞性浸潤或可引起轉移之惡性腫瘤或存在此種惡性腫瘤之狀態。於本發明中，癌症包含實體癌及造血器官腫瘤，但並不限定於該等。

【0019】

於本說明書中，所謂「癌症免疫療法」係指使用生物具有之免疫機制等生物體防禦機制治療癌症之方法。

【0020】

於本說明書中，所謂「抗腫瘤免疫應答」係指對於生物體內之腫瘤的任意之免疫應答。

【0021】

於本說明書中，所謂「抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激」係指於對於生物體內之腫瘤之免疫應答之過程中產生的對於樹狀細胞提供刺激之任意現象。該刺激可成為直接或間接產生抗腫瘤免疫應答之要因之一。雖無限定，但代表而言，抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激係由$CD4^+$T細胞(例如，效應T細胞)提供，該刺激之結果，樹狀細胞對$CD8^+$T細胞提供刺激，接受刺激之$CD8^+$T細胞發揮抗腫瘤效果。

【0022】

於本說明書中，所謂「相關」係指兩個事物具有統計學有意之相關關係。例如所謂「與A相關之B之相對量」係指於產生事物A之情形時，B之相對量受到統計學有意之影響(例如，增加或減少)。

【0023】

於本說明書中，所謂「流式細胞儀」係指測量懸浮於液體中之細胞、個體及其他生物粒子之粒子數、各個物理・化學・生物學性狀之技術。

【0024】

於本說明書中，所謂「免疫活化」係指增大排除免疫功能之體內之

異物之功能，可藉由增大與免疫功能正作用之任意之因子(例如，免疫細胞或細胞激素)之量而表示。

【0025】

於本說明書中，所謂「細胞亞群」係指包含多樣特性之細胞的細胞群中之具有任一共通之特徵的任意細胞之集合。特定之名稱於該技術領域已知，對此亦可使用該用語於特定之細胞亞群提及，亦可記載任意之性質(例如，細胞表面標記之表現)而於特定之細胞亞群提及。

【0026】

於本說明書中，所謂某細胞亞群之「量」係包含某細胞之絕對數、及細胞群中之比率之相對量。例如，於本說明書中，所謂「$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量」，可為相對於$CD3^{+}$細胞或$CD4^{+}$細胞或$CD3^{+}CD4^{+}$細胞之量之相對量。又，於本說明書中，所謂「細胞比率」意指其細胞亞群之量，例如所謂「$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率」意指相對於$CD3^{+}$細胞亞群或$CD4^{+}$細胞亞群或$CD3^{+}CD4^{+}$細胞亞群之相對$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量。

【0027】

於本說明書中，與細胞相關之用語「相對量」可與「比率」互換使用。代表而言，用語「相對量」及「比率」意指相對於形成特定之細胞群(例如，$CD4^{+}$T細胞群)之細胞之數，形成所期望之細胞亞群(例如，$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群)之細胞之數。

【0028】

於本說明書中，所謂「基準」係指用以決定本說明書中記載之標記之量之增減的成為比較對象之量。於決定某種處置(例如，癌症免疫療法)

之前後之某量之增減之情形時，例如作為「基準」，可列舉處置之前之該量。

【0029】

於本說明書中修正數值而使用之情形時，「約」意指包含至記載之數值之±10%之範圍而使用。

【0030】

於本說明書中，所謂「閾值」係指對於某種變化之值而設定之值，且變化之值為其以上，或於其以下之情形時施加任何意思之值。於本說明書中，亦稱為截止(cut-off)值。

【0031】

於本說明書中，所謂「無效群」係指接受癌症治療之情形之治療效果依據RECIST ver1.1而判定之情形時，判定為發展(PD，Progressive disease)之受驗體之群。無效群亦稱為PD群、發展群、NR(非應答者)，於本說明書中互換使用。

【0032】

於本說明書中，所謂「部分起效群」係指接受癌症治療之情形之治療效果依據RECIST ver1.1而判定之情形時，判定為部分起效(PR，Partial response)之受驗體之群。部分起效群亦稱為PR群，於本說明書中互換使用。

【0033】

於本說明書中，所謂「穩定群」係指接受癌症治療之情形之治療效果依據RECIST ver1.1而判定之情形時，判定為穩定(SD，Stable disease)之受驗體之群。「穩定群」亦稱為SD群、中間群、IR(Intermediate

Responder)，於本說明書中互換使用。

【0034】

於本說明書中，所謂「完全起效群」係指接受癌症治療之情形之治療效果依據RECIST ver1.1而判定之情形時，判定為完全起效(CR，Complete response)之受驗體之群。「完全起效群」亦稱為CR群，於本說明書中互換使用。再者，本發明中於受驗體之群除部分起效群(PR)外包含完全起效群(CR)之情形時，或不含部分起效群(PR)而包含完全起效群(CR)之情形時，亦與部分起效群(PR)同樣而被檢測。

【0035】

於本說明書中，「起效群」於包括性稱為「部分起效群」及「完全起效群」之情形使用，亦稱為「高效群」、GR(Good Responder)。

【0036】

於本說明書中，所謂「無效群閾值」係指於給予之受檢體之群中，用於識別無效群、及穩定群＋起效群的閾值。無效群閾值係於選擇給予之受檢體之群中之無效群之情形時，以達成特定之感度及特異度之方式而選擇。

【0037】

於本說明書中，所謂「起效群閾值」係指給予之受檢體之群中，或者，使用無效群閾值自給予之受檢體之群除去無效群之群中，用於識別穩定群及起效群之閾值。起效群閾值係於給予之受檢體之群中，或者使用無效群閾值自給予之受檢體之群除去無效群之群中，選擇起效群之情形時，以達成特定之感度及特異度之方式而選擇。

【0038】

於本說明書中，所謂「長期存活閾值」係於給予之受檢體之群中，或者，使用無效群閾值自給予之受檢體之群除去無效群之群中，用於識別預測長期存活之受檢體的閾值。長期存活閾值係給予之受檢體之群中，或者，使用無效群閾值自給予之受檢體之群除去無效群之群中，選擇或預測長期存活者之情形時，以達成特定感度及特異度之方式而選擇。

【0039】

於本說明書中，「治療介入」係指進行某種治療後，或與進行某種治療同時，以與該治療相同之疾病為對象進行之任意治療。作為治療介入，可重複進行一次治療，或可進行與一次治療不同之治療。作為進行癌症免疫療法之情形之治療介入之例，可列舉該癌症免疫療法與其他癌症治療之組合療法，代表而言，可為1個或複數個另外藥劑之組合投予。或者，併用療法可為與放射線治療之組合。1個或複數個另外藥劑可為任意之化學療法藥，或者可包含第2免疫檢查點抑制劑。或者，作為併用療法中使用之其他癌症治療，可列舉其他癌症免疫療法(例如，過繼細胞移入)、溫熱療法、外科程序等，但並不限定於該等。

【0040】

較佳為治療介入表示給予之受檢體中之細胞亞群之組成超過(或者，低於)無效群閾值或起效群閾值，為無效群，或於表示並非起效群之情形時進行，或者，給予之受檢體中之細胞亞群之組成超過(或者，低於)基準，未預測長期存活之情形時進行。為決定是否治療介入，可經過給予之受檢體中之細胞亞群之組成而測定。治療介入例如可以增加樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量為目的。作為該$CD4^+$T細胞亞群之量，並無限定，代表而言，選自由

$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CCR7^{-}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$ICOS^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、及

$PD\text{-}1^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量

所組成之群。

【0041】

「感度(sensitivity)」係指自受驗體之群之中選擇具有所期望之特徵之受驗體之情形時，對於受驗體群所含之具有所期望之特徵之總受驗體數，所選擇之對象中之具有所期望之特徵的受驗體數之比率。例如，於受檢體之群所含之具有所期望之特徵的受檢體全部被選擇之情形時，感度係100%，受檢體之群所含之具有所期望之特徵的受檢體之半數被選擇之情形時，感度為50%，受檢體之群所含之具有所期望之特徵之受檢體未完全選擇之情形時，感度為0%。感度例如作為(選擇之對象中之具有所期望之特徵的受驗體數)/(受驗體群所含之具有所期望之特徵的總受驗體數)而決定。感度較高之判定意指欲發現某種狀態(例如，癌症免疫療法之結果、長期存活)之受驗體之情形時，易於將此種受驗體確實判定為此種狀態。

【0042】

「特異度(specificity)」係自受驗體之群之中選擇具有所期望之特徵之受驗體的情形時，相對於選擇之對象之總數，選擇之對象中具有所期望之特徵的受驗體數之比率。例如，於自受檢體群之中選擇之候選具有全部所期望之特徵的情形時，特異度係100%，於自受檢體群之中選擇之候選之半數具有所期望之特徵之情形時，特異度為50%，於自受檢體群之中選

擇之候選之全部不具有所期望之特徵之情形時，特異度為0%。例如，特異度作為(選擇之對象中之具有所期望之特徵的受驗體數)/(選擇之對象之總數)而決定。特異度較高之判定意指並非某種狀態(例如，對癌症免疫療法為起效群)之受驗體判定為被誤用之狀態(例如，癌症免疫療法之結果、長期存活)之概率較低。

【0043】

(標記)

$CD62L^{low}CD4^{+}$細胞亞群具有強正相關之T細胞亞群係類型1輔助$CD4^{+}$T細胞(Th1)、效應記憶$CD4^{+}$T細胞、$CD8^{+}$T細胞、效應$CD8^{+}$T細胞。該等係於細胞性免疫中對殺細胞功能重要之細胞亞群。另一方面，具有負相關係類型2輔助$CD4^{+}$T細胞(Th2)、控制性T細胞。該等作為抑制細胞性免疫之細胞亞群而已知。藉此，$CD62L^{low}CD4^{+}$細胞亞群之增加表示抗腫瘤細胞性免疫之活化，表示減少妨礙此之細胞亞群。又，$CD62L^{low}CD4^{+}$細胞亞群藉由具有與$CD4^{+}$T細胞、$CD8^{+}$T細胞上之LAG3、ICOS、PD-1、CTLA-4表現有意之相關關係，而控制其抗腫瘤免疫功能。具體而言，$CD62L^{low}CD4^{+}$細胞亞群之增加與PD-1、LAG-3、ICOS表現增加相關，與CTLA-4表現減少相關。一般認為該抗腫瘤免疫主要由PD-1、LAG-3控制，與該等免疫檢查點抑制治療之有效性關聯。進而，$HLA\text{-}DR^{+}CD141^{+}CD11c^{+}$樹狀細胞亞群與$CD62L^{low}CD4^{+}$細胞亞群具有正相關關係。一般認為其藉由活化之樹狀細胞表現出MHC classII拘束性抗原，而帶來識別MHC classII拘束性抗原之$CD62L^{low}CD4^{+}$細胞亞群之增加，係與腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群。一般認為$HLA\text{-}DR^{+}CD141^{+}CD11c^{+}$樹狀細胞亞群係與腫瘤免疫應答下之樹狀

細胞刺激相關之樹狀細胞亞群。於本說明書中，於表達細胞亞群之情形時，例如$CD62L^{low}/CD4^{+}$細胞意指相對於$CD4^{+}$T細胞之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之比率，分子所記載之細胞全部具備分母所記載之細胞之特徵。又，於本說明書中例如$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$細胞可為$CD62L^{low}/CD4^{+}CD3^{+}$細胞，任一細胞亦表示$CD62L^{low}CD4^{+}CD3^{+}$細胞之比率，亦可將母群設為$CD4^{+}$以$CD62L^{low}/CD4^{+}$表達。

【0044】

根據上述結果，顯示藉由使用與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群及/或與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群，可預測於癌症免疫療法下之長期存活。

【0045】

於本發明之實施形態中，提供一種將接受癌症免疫療法之受驗體中之細胞亞群之組成作為癌症免疫療法下之長期存活預測之指標的方法。方法可包含分析樣品中之細胞亞群之組成的步驟。細胞亞群之組成之分析可記載於本說明書，或可由業者藉由公知任意之方法進行。方法可為活體外或計算機模擬者。於本發明之一實施形態中，藉由細胞亞群之量與適當之基準之比較，而表示受驗體中之免疫活化之有無。尤其，細胞亞群可使用與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之細胞亞群。

【0046】

(1.與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群)

於一實施形態中，成為指標之細胞亞群係與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群。$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞擔負抗腫瘤免疫中樹狀細胞之刺激。一般認為與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關

之$CD4^+$T細胞亞群同樣可用作癌症免疫療法下之長期存活預測之指標。

【0047】

作為與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群，例如可列舉：對二次淋巴器官之導向分子之表現降低之$CD4^+$T細胞亞群、由效應型T細胞引發之$CD4^+$T細胞亞群、接受藉由抗原識別之引發的$CD4^+$T細胞亞群、及控制性T細胞亞群，但並不限定於該等。

【0048】

作為與樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之例，例如可列舉：$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群、$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群、$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群、$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群、$CCR4^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群、$CD45RA^-CD4^+$T細胞亞群、$CD45RO^+CD4^+$T細胞亞群、$CD62L^{high}CD25^+CD4^+$T細胞亞群、$CD127^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群、$CD45RA^-Foxp3^+CD4^+$T細胞亞群、及$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群等，但並不限定於該等。

【0049】

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群例如可為包含於$CD62L^{low}CD4^+$T細胞群之細胞亞群。作為與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群，可列舉：$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群(即，$CD62L^{low}CD4^+$T細胞群其本身)、$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群、$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群、及$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群等，但並不限定於該等。

【0050】

關於上述細胞亞群，可改成或除使用細胞亞群之量作為指標，使用

適當細胞中之適當之表面標記分子之表現量作為指標。例如可使用表現於$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之ICOS、PD-1、及LAG-3等之表現量作為指標。

【0051】

(2.與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量)

於一實施形態中，成為指標之細胞亞群係與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群。例如，本說明書之實施例中，於癌症免疫療法前後，觀察$HLA\text{-}DR^{+}CD141^{+}CD11c^{+}$細胞亞群之增大。HLA-DR係以藉由$CD4^{+}$T細胞之樹狀細胞之刺激為媒介。一般認為與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群同樣可用作癌症免疫療法下之長期存活預測之指標。

【0052】

作為與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群，例如可列舉：起因於$CD4^{+}$T細胞群中之導向分子之表現降低之細胞亞群之增加而增加之樹狀細胞亞群、起因於$CD4^{+}$T細胞群中之效應型T細胞引起之$CD4^{+}$T細胞亞群之增加而增加之樹狀細胞亞群、及起因於接受$CD4^{+}$T細胞群中之藉由抗原識別引發的$CD4^{+}$T細胞亞群之增加而增加之樹狀細胞亞群，但並不限定於該等。又，作為樹狀細胞亞群，例如可列舉：$HLA\text{-}DR^{+}$樹狀細胞亞群、$CD80^{+}$樹狀細胞亞群、$CD86^{+}$樹狀細胞亞群、及$PD\text{-}L1^{+}$樹狀細胞亞群，但並不限定於該等。作為樹狀細胞，例如可列舉：骨髓樹狀細胞(mDC、$CD141^{+}CD11c^{+}$樹狀細胞)及形質細胞樣樹狀細胞(pDC、$CD123^{+}CD11c^{+}$樹狀細胞)，但並不限定於該等。

【0053】

作為與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群，可

列舉：HLA-DR$^+$CD141$^+$CD11c$^+$細胞亞群。關於上述細胞亞群，可改變成或除使用細胞亞群之量作為指標，使用適當之細胞中之適當的表面標記分子之表現量作為指標。例如可使用CD141$^+$CD11c$^+$細胞中表現之HLA-DR等之表現量作為指標。

【0054】

(3.與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之CD8$^+$T細胞亞群之量)

於一實施形態中，成為指標之細胞亞群係與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之CD8$^+$T細胞亞群。接受藉由CD4$^+$T細胞之刺激的樹狀細胞刺激CD8$^+$T細胞，接受刺激之CD8$^+$T細胞最終發揮抗腫瘤活性。CD8$^+$T細胞上之CD137以藉由樹狀細胞之CD8$^+$T細胞之刺激為媒介。一般認為與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之CD8$^+$T細胞亞群同樣可用作癌症免疫療法下之長期存活預測之指標。

【0055】

作為與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之CD8$^+$T細胞亞群，例如可列舉：起因於CD4$^+$T細胞群中之導向分子之表現降低之細胞亞群之增加而增加之CD8$^+$T細胞亞群、起因於CD4$^+$T細胞群中之效應型T細胞引發之CD4$^+$T細胞亞群之增加而增加之CD8$^+$T細胞亞群、起因於接受CD4$^+$T細胞群中之藉由抗原識別之引發的CD4$^+$T細胞亞群之增加而增加之CD8$^+$T細胞亞群、起因於樹狀細胞群中之HLA-DR$^+$樹狀細胞亞群之增加而增加之CD8$^+$T細胞亞群、起因於樹狀細胞群中之CD80$^+$樹狀細胞亞群之增加而增加之CD8$^+$T細胞亞群、起因於樹狀細胞群中之PD-L1$^+$樹狀細胞亞群之增加而增加之CD8$^+$T細胞亞群，但並不限定於此。進而，作為與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之CD8$^+$T細胞亞群，例如可列舉：

$CD62L^{low}CD8^{+}$T 細胞亞群、$CD137^{+}CD8^{+}$T 細胞亞群、及 $CD28^{+}CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞亞群，但並不限定於該等。

【0056】

關於上述細胞亞群，可改變成或除使用細胞亞群之量作為指標，使用適當之細胞中之適當的表面標記分子之表現量作為指標。例如，可使用 $CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞中表現之CD137等之表現量作為指標。

【0057】

本說明書所記載之細胞亞群之量可組合複數個量用作指標。組合指標可使預測長期無惡化存活更正確。於一實施形態中，可藉由樣品中之選自由與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群之量、與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量及與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^{+}$T細胞亞群之量所組成之群之至少兩個量與基準之比較，而表示受驗體中之免疫活化之有無。

【0058】

本發明之一實施形態係將選自受驗體中之以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^{+}$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^{+}$T細胞亞群之量、

控制性T細胞亞群之量或與控制性T細胞相關之$CD4^{+}$T細胞亞群之量、及

$ICOS^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量

中之量用作預測長期無惡化存活之式之變數(指標)的方法。於一實施

形態中，本發明之變數(X、Y)分別選自由以下：

$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CCR7^{-}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$ICOS^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD45RA^{-}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD45RO^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CCR4^{+}CD25^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD62L^{high}CD25^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD127^{+}CD25^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD45RA^{-}Foxp3^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$Foxp3^{+}CD25^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^{+}$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^{+}$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^{+}$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^{+}$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞亞群之量、

$CD137^{+}CD8^{+}$T細胞亞群之量、及

$CD28^{+}CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞亞群之量

所組成之群。

【0059】

例如，於本發明之方法中，

可將選自由與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、及

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量、

所組成之群之值設為(X)。於本發明之方法中，又，

可將選自由$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RO^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量、

$CD137^+CD8^+$T細胞亞群之量、及

$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群之值設為(X)，來計算變數(X、Y)。

【0060】

例如，於本發明之方法中，可將控制性T細胞亞群之量或與控制性T

細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量設為(Y)，計算變數(X、Y)。於本發明之方法中，又，可將選自由

$CCR4^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD62L^{high}CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD127^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-Foxp3^+CD4^+$T細胞亞群之量、及

$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

所組成之群之值設為(Y)，計算變數(X、Y)。

【0061】

於本發明之方法中，例如包含：測定$CD4^+CD62L^{low}$T細胞之量(X)之步驟、及測定$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞之量(Y)之步驟，可使用X相對於Y之相對值與閾值之比較作為用以預測長期無惡化存活之指標。作為(Y)，可使用控制性T細胞亞群之量、或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量或比率。尤其，至今未有研究$CD62L^{low}CD4^+$T細胞/控制性T細胞比作為生物標記之報告，但本發明者發現作為用以對癌症免疫療法之預測長期無惡化存活之生物標記非常有用。

【0062】

於本發明中，又，包含：測定$CD80^+$樹狀細胞亞群之量(X)之步驟、及測定$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量(Y)之步驟，可使用X相對於Y之相對值與閾值之比較作為用以預測長期無惡化存活之指標。

【0063】

本發明者發現複數個指標獨立表示與長期無惡化存活相關，故而可組合複數個指標，用作長期無惡化存活之指標。於組合兩個以上之指標，

作為長期無惡化存活之指標之情形時，可使用藉由任意數之變數之式表示之指標。於使用複數個指標(X_1、X_2、X_3・・・X_n)之情形時，作為長期無惡化存活之指標，例如可列舉以下，但並不限定於此：

$$F = a_1X_1^{b1} + a_2X_2^{b2} + a_3X_3^{b3} \cdot \cdot \cdot + a_nX_n^{bn}$$

$$F = X_1^{c1} * X_2^{c2} * X_3^{c3} \cdot \cdot \cdot * X_n^{cn}$$

(式中，各a、b、c為任意實數)。根據將由此種式計算之值(指標)與閾值比較之大小，可預測長期無惡化存活。關於本發明者發現之新穎指標，藉由判別分析進行多變量解析(例如，羅吉斯回歸之推定)而決定各係數，可預測作為受驗體之癌症免疫療法之結果的長期無惡化存活。

【0064】

代表而言，藉由將本說明書中記載之兩個指標(X，Y)設為變數之式F(X，Y)，可預測長期無惡化存活，於特定之實施形態中，式係X相對於Y之相對值。

【0065】

作為X相對於Y之相對值，可使用關於X及Y之任意函數(F(X，Y))。尤其，於一般認為X與長期無惡化存活正相關，Y與長期無惡化存活負相關之情形時，但並不限定，可使用相對於X單調增加，相對於Y單調減少之任意X及Y之函數(F(X，Y))。表示長期無惡化存活之式提供表示長期無惡化存活之2個以上之變數之情形時，可藉由計算對各個變數之長期無惡化存活之貢獻，而回歸求出。

【0066】

作為表示長期無惡化存活之式F(X，Y)，例如可列舉以下，但並不限定於此：

$F = aX^r + bY^s$

$F = X^r * Y^s$

(式中，a、b、r、s為任意實數)。

【0067】

作為r、s，由於式之簡便性，故而可使用整數。於一部分實施形態中，作為X相對於Y之相對值之例，可列舉X^n/Y^m(n及m為任意實數，例如任意整數)，例如可列舉X/Y、X^2/Y，但並不限定此。於X、Y之因子分別自不同機理表示對於治療之長期無惡化存活之情形時，如此組合指標，可更正確預測長期無惡化存活。藉由本發明者之驗證表示，使用r及s為-5～5之範圍之式，可預測作為受驗體之癌症免疫療法之結果之長期無惡化存活。

【0068】

閾值可考慮感度及特異度而決定。感度及特異度可為關於長期無惡化存活之檢測之感度及特異度。於一實施形態中，本發明之生物標記較佳為設定感度、特異度均為100%之閾值。於使用2個以上記載之指標作為本發明之生物標記之情形時，可對該等指標分別設定閾值，於必要之情形時，可以第1閾值、第2閾值、第3閾值、第4閾值之方式而區別使用。

【0069】

閾值可以關於長期無惡化存活之檢測，感度超過約90%之方式而決定。於其他實施形態中，閾值可以關於長期無惡化存活之檢測之感度為約100%之方式而決定。於進而其他實施形態中，閾值可以關於長期無惡化存活之檢測之特異度超過約90%之方式而決定。進而於其他實施形態中，閾值可以關於長期無惡化存活之檢測之特異度約100%之方式而決定。

【0070】

閾值可使用藉由參照受驗體群中於該領域進行公知之分析而決定之值。作為該分析，可列舉：機械學習或回歸分析，但並不限定於該等。可使用藉由回歸分析而製作之判別式，使用藉由回歸分析而製作之判別式，例如進行ROC分析，獲得閾值。可考慮ROC分析中之感度及特異度，來設定任一參數或兩者之參數優異之閾值。

【0071】

於一實施形態中，受驗體之T細胞之組成係自受驗體獲得之樣品中之T細胞之組成，較佳為樣品係末梢血液樣品。於本發明中提供之生物標記係可使用末梢血液樣品測定者，因此具有非侵襲、廉價可經時施行之臨床應用中之較大之優勢性。

【0072】

於一實施形態中，癌症免疫療法包含免疫檢查點抑制劑之投予。本發明之生物標記尤其可正確預測對於此種癌症免疫療法之受驗體之長期無惡化存活。

【0073】

於本發明之較佳之實施形態中，可使用X($CD62L^{low}CD4^{+}$細胞比率)及Y($CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率)。又，於本發明之較佳之實施形態中，作為使用X及Y之函數，可利用X^2/Y。例如，於本發明之尤其較佳之實施形態中，關於患者群，可關於各患者，使用X($CD62L^{low}CD4^{+}$細胞比率)及Y($CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率)計算X^2/Y，藉由已知之方法將特定之數值設定為閾值。例如，將無效群閾值設為「α」、將長期存活閾值設為「β」。其次，進行受檢體之樣品之測定，比較該受驗體之X^2/Y之值、

及α、β之值及大小，

可判斷為・X^2/Y＜α：無法期待藉由癌症免疫療法之效果。應研究變更為其他治療法、與其他治療法之併用。

・α≦X^2/Y＜β：雖相應獲得藉由癌症免疫療法之效果，但為獲得長期存活，應研究進而繼續治療或與其他治療法之併用。

・β＜X^2/Y：預測藉由癌症免疫療法之長期存活，因此應將癌症免疫療法以最小限度(例如一次投予)結束。

【0074】

上述數值「α」及「β」可特意調整感度及特異度而決定。雖無特別限定，但作為較佳之α，可使用約100、約120、約140、約160、約180、約200、約220、或約240。更佳之α為約170、約180、約190、或約200。α可設為約192。

【0075】

雖無特別限定，β可為例如大於α至少50、較佳為至少70、更佳為至少90之數值。作為較佳之β，為大於α至少50之數值，且可使用約150、約170、約190、約210、約230、約250、約270、約290、約300、約320、約340、約360、約380、約400、約420、或約440。更佳之β為約310、或約320、約330、或約340。β可為約324。

【0076】

雖無特別限定，α為約100～400之範圍內之值，較佳為約100～200之範圍內之值，例如可設定約100～110、約110～120、約120～130、約130～140、約140～150、約150～160、約160～170、約170～180、約180～190、約190～200、約200～210、約210～220、約220～230或約

230～240之範圍內之值。

【0077】

雖無特別限定，β可設定為大於α至少50且約150～450之範圍內之值、較佳為約300～440之範圍內之值例如約300～310、約310～320、約320～330、約330～340、約340～350、約350～360、約360～370、約370～380、約380～390、約390～400、約400～410、約410～420、約420～430或約430～440之範圍內之值。

【0078】

於本發明之較佳之實施形態中，於表示受驗體為無效群之情形時，例如於判別式未達無效群閾值之情形時，可表示應進行治療介入。於受驗體為無效群之情形時，作為治療介入，可改變成投予之癌症免疫療法，或此外，進行並非癌症免疫療法之治療(例如，化學療法、放射線療法、外科程序、溫熱療法等)，進行另外癌症免疫療法(例如，免疫檢查點抑制藥、過繼細胞移入等)。關於組合之治療，可進行本申請說明書中記載之任意之治療。

【0079】

於本發明之較佳之實施形態中，表示受驗體並非長期應答者、或未獲得長期存活之情形時例如判別式未達長期存活閾值之情形時，研究應進行治療介入。於該情形時，未達長期存活閾值，進而可區別為未達無效群閾值或無效群閾值以上。於表示受驗體未獲得長期存活，但並非無效群之(短期應答者)情形時，作為治療介入，除投予之癌症免疫療法，可進行並非癌症免疫療法之治療(例如化學療法、放射線療法、外科程序、溫熱療法等)，或進行另外癌症免疫療法(例如免疫檢查點抑制藥、過繼細胞移入

等)。代表而言，可對已投予之免疫檢查點抑制藥研究併用其他化學療法藥或第2免疫檢查點抑制藥。關於組合治療，進行本申請說明書中記載之任意治療。

【0080】

於一實施形態中，免疫檢查點抑制劑包含PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。作為PD-1抑制劑，可列舉抑制PD-1與PD-L1之相互作用(例如，結合)之抗PD-1抗體，例如，納武單抗、帕博利珠單抗、Spartalizumab、及Cemiplimab等抗PD-1抗體，但並不限定於該等。作為PD-L1抑制劑，可列舉抑制PD-1與PD-L1之相互作用(例如，結合)之抗PD-L1抗體，例如度伐魯單抗、阿特珠單抗、阿維魯單抗等抗PD-L1抗體，但並不限定於該等。

【0081】

本發明之另外態樣提供一種使用受驗體之T細胞之組成，預測對於受驗體之癌症免疫療法之長期無惡化存活，治療具有癌症之受驗體的方法。或者，具有特定T細胞之組成之受驗體中，提供治療癌症之方法、或因此之組合物。已知癌症免疫療法、尤其免疫檢查點抑制療法於每個受驗體之應答性之差較大，藉由本發明之生物標記選擇受驗體來實施癌症免疫療法，可顯著提高實現腫瘤縮小等之治療效果。

【0082】

於本發明之一實施形態中，提供一種方法，其係治療具有癌症之受驗體者，且包含：

(1)決定源自該受驗體之樣品中之$CD4^+$T細胞中之選自由以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之相對

量

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之相對量、及

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之相對量

所組成之群之相對量的步驟，及

(2)於該相對量高於閾值之情形時，將該受驗體判定為對於癌症免疫療法之長期無惡化存活群的步驟，及於該受驗體判定為長期無惡化存活群之情形時，對該受驗體實施該癌症免疫療法之步驟。

【0083】

於本發明之實施形態中，提供一種方法，其係將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標者，該方法包含：分析自該受驗體獲得之該樣品中之細胞亞群之組成之步驟，藉由該樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量與基準之比較，而預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活。此處，$CD4^+$T細胞亞群之量(或相對量)選自由以下：

$CD4^+$T細胞中之$CD62L^{low}$T細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CCR7^-$T細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD45RA^-$T細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD45RO^+$T細胞亞群之比率、

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中之$LAG\text{-}3^+$T細胞亞群之比率、

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中之$ICOS^+$細胞亞群之比率、

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中之$PD\text{-}1^+$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CCR4^+CD25^+$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD62L^{high}CD25^+$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD127^+CD25^+$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD45RA^-Foxp3^+$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$Foxp3^+CD25^+$細胞亞群之比率、

樹狀細胞中之$HLA\text{-}DR^+$亞群之比率、

樹狀細胞中之$CD80^+$亞群之比率、

樹狀細胞中之$CD86^+$亞群之比率、

樹狀細胞中之$PD\text{-}L1^+$亞群之比率

$CD8^+$T細胞中之$CD62L^{low}$細胞亞群之比率、

$CD8^+$T細胞中之$CD137^+$細胞亞群之比率、及

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞中之$CD28^+$細胞亞群之比率

所組成之群。

【0084】

較佳為上述量(或相對量)選自由以下：

$CD4^+$T細胞中之$CD62L^{low}$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CCR7^-$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD45RA^-$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD45RO^+$細胞亞群之比率、

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中之$LAG\text{-}3^+$細胞亞群之比率、

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中之$ICOS^+$細胞亞群之比率、

樹狀細胞中之$HLA\text{-}DR^+$亞群之比率、

樹狀細胞中之$CD80^+$亞群之比率、

樹狀細胞中之$CD86^+$亞群之比率、

樹狀細胞中之$PD\text{-}L1^+$亞群之比率

$CD8^+$T細胞中之$CD62L^{low}$細胞亞群之比率、

$CD8^+$T細胞中之$CD137^+$細胞亞群之比率、及

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞中之$CD28^+$細胞亞群之比率

所組成之群。

【0085】

於本發明之其他實施形態中，提供一種方法，其係治療具有癌症之受驗體者，且包含：決定源自該受驗體之樣品中之$CD4^+$T細胞中之$Foxp3^+CD25^+$T細胞之比率的步驟，於$CD4^+$T細胞中之$Foxp3^+CD25^+$T細胞之比率低於閾值之情形時，將該受驗體判定為對於癌症免疫療法為長期無惡化存活群之步驟，及於將該受驗體判定為對於癌症免疫療法為長期無惡化存活群之情形時，對該受驗體實施該癌症免疫療法之步驟。於本發明之其他實施形態中，提供一種方法，其係治療具有癌症之受驗體者，且包含：決定源自該受驗體之樣品中之$CD4^+$T細胞中之$Foxp3^+CD25^+$T細胞之比率之步驟，及$CD4^+$T細胞中之$Foxp3^+CD25^+$T細胞之比率低於閾值之情形時，將該受驗體判定為對於癌症免疫療法為長期無惡化存活群，藉由此步驟，對判定為長期無惡化存活群之該受驗體實施該癌症免疫療法。

【0086】

於本發明之其他實施形態中，提供一種方法，其係治療具有癌症之受驗體者，且包含

(1)決定選自由以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之相對

量

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之相對量、及

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之相對量

控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、及

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量

所組成之群之量(X，Y)的步驟，

(2)

使用X相對於Y之相對值及閾值之比較，將該受驗體判定為對於癌症免疫療法為長期無惡化存活群之步驟，及

(3)

於將該受驗體判定為對於癌症免疫療法為長期無惡化存活群之情形時，對該受驗體實施該癌症免疫療法之步驟。

【0087】

於本發明之其他實施形態中，提供一種治療具有癌症之受驗體之方法，且包含決定

(1)選自由以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之相對量

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之相對量、及

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之相對

量

控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、及

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量

所組成之群之量(X，Y)的步驟，

(2)

使用X相對於Y之相對值與閾值(無效群閾值)之比較，將該受驗體判定為對於癌症免疫療法為長期無惡化存活群之步驟，及

藉此於判定為對於癌症免疫療法為長期無惡化存活群之該受驗體實施該癌症免疫療法的步驟。

【0088】

例如，上述量(X)及(Y)選自以下：

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RO^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD137^+CD8^+$T細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量、

$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量

$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD62L^{high}CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-Foxp3^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR4^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、及、

$CD127^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量

所組成之群。

【0089】

例如，於本發明之方法中，可將選自由

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、及

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群之值設為(X)。於本發明之方法中，又，可將選自由

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RO^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量、及

$CD137^+CD8^+$T細胞亞群之量

$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群之值設為(X)，計算變數(X、Y)。

【0090】

例如，於本發明之方法中，可將控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量設為(Y)，計算變數(X、Y)。於本發明之方法中，又，可將選自由

$CCR4^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD62L^{high}CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD127^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-Foxp3^+CD4^+$T細胞亞群之量、及

$CD4^+Foxp3^+CD25^+$T細胞亞群之量

所組成之群之值設為(Y)，計算變數(X、Y)。

【0091】

於本發明之另外態樣中，提供一種套組，其係用以預測包含對於選自CD4、CD25、CD62L及Foxp3等中之1個以上之細胞表面標記例如選自由以下：

- CD4及CD62L之組合、
- CD4、CD45RA及CCR7之組合、
- CD4、CD45RO及CCR7之組合、

・CD4、CD62L及LAG-3之組合、

・CD4、CD62L及ICOS之組合、

・CD4、CD62L及PD-1之組合、

・CD4、CD62L及CD25之組合、

・CD4、CD127及CD25之組合、

・CD4、CD45RA及Foxp3之組合、

・CD4、CD45RO及Foxp3之組合、

・CD4、CD25及Foxp3之組合、

・CD11c、CD141及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD141及CD80之組合、

・CD11c、CD123及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD123及CD80之組合、

・CD8及CD62L之組合、

・CD8及CD137之組合、以及

・CD28、CD62L及CD8之組合

所組成之群之標記之組合的檢測劑之受驗體，對於癌症免疫療法之長期無惡化存活。較佳為套組包含分別對於CD4及CD62L之檢測劑。可將此種檢測劑之組合用於決定受驗體之T細胞組成。此種套組可用於測定受驗體中之本說明書中記載之作為新穎之生物標記的特定之T細胞亞群之比率。

【0092】

本發明之一實施形態係用以預測受驗體對於癌症免疫療法之應答，且包含對於細胞表面標記之檢測劑的套組。本發明者發現受檢體之T細胞所表現之該等細胞表面標記與受驗體對於癌症免疫療法之長期無惡化存活

有關係。藉此，理解包含對於該等細胞表面標記之檢測劑的套組對預測對於癌症免疫療法之長期無惡化存活有用。套組較佳為包含對於CD4及CD62L之檢測劑。套組更佳為包含對於CD4、CD25、CD62L及Foxp3之檢測劑。於一實施形態中，檢測劑為抗體。較佳為抗體經適當標識而容易進行標記之檢測。

【0093】

本發明之其他態樣係用以於預測為長期無惡化存活群之受驗體中治療癌症的包含免疫檢查點抑制劑之組合物。於本發明中，又可提供一種包含隨附文件、及免疫檢查點抑制劑的製品。隨附文件可為記載有用於依據本說明書中記載之方法之任一個或複數個步驟使用免疫檢查點抑制劑的指示者。

【0094】

本發明之一實施形態係一種組合物，其特徵在於，其係用以於預測為長期無惡化存活群之受驗體中治療癌症之包含免疫檢查點抑制劑者，且該受驗體之選自由以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之相對量

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之相對量、及

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之相對量

所組成之群之相對量為閾值以上。

【0095】

該相對量例如代表而言，選自由以下：

$CD4^+$T細胞中之$CD62L^{low}$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CCR7^-$細胞亞群之比率、

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中之$LAG\text{-}3^+$細胞亞群之比率、

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中之$ICOS^+$細胞亞群之比率、

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中之$PD\text{-}1^+$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD62L^{high}CD25^+$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD127^+CD25^+$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$CD45RA^-Foxp3^+$細胞亞群之比率、

$CD4^+$T細胞中之$Foxp3^+CD25^+$細胞亞群之比率、

樹狀細胞中之$HLA\text{-}DR^+$亞群之比率、

樹狀細胞中之$CD80^+$亞群之比率、

樹狀細胞中之$CD86^+$亞群之比率、

樹狀細胞中之$PD\text{-}L1^+$亞群之比率、

$CD8^+$T細胞中之$CD62L^{low}$亞群之比率、

$CD8^+$T細胞中之$CD137^+$亞群之比率、及

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞中之$CD28^+$細胞亞群之比率

所組成之群。

【0096】

本發明之另外其他實施形態係用以於預測為長期無惡化存活群之受驗體中治療癌症之包含免疫檢查點抑制劑的組合物，且該受驗體係藉由源自該受驗體之樣品中之選自由以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量、

控制性T細胞或與控制性T細胞相關之CD4＋T細胞亞群之量、及

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群

所組成之群之量(X，Y)及X相對於Y之相對值與閾值之比較而選擇之受驗體。量(X、Y)代表而言，選自由以下：

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR4^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RO^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD62L^{high}CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD127^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-Foxp3^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞亞群之量、

$CD137^{+}CD8^{+}$T細胞亞群之量、及

$CD28^{+}CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞亞群之量

所組成之群。

【0097】

例如，於本發明之方法中，可將選自由

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^{+}$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、及

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^{+}$T細胞亞群之量、

所組成之群之值設為(X)。於本發明之方法中，又，可將選自由

$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CCR7^{-}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$ICOS^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD45RA^{-}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD45RO^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^{+}$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^{+}$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^{+}$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^{+}$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞亞群之量、

$CD137^{+}CD8^{+}$T細胞亞群之量、及

$CD28^{+}CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞亞群之量

所組成之群之值設為(X)，計算變數(X、Y)。

【0098】

例如，於本發明之方法中，可將控制性T細胞亞群之量或與控制性T細胞相關之$CD4^{+}$T細胞亞群之量設為(Y)，計算變數(X、Y)。於本發明之方法中，又，可將選自由

$CCR4^{+}CD25^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD62L^{high}CD25^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD127^{+}CD25^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、

$CD45RA^{-}Foxp3^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量、及

$CD4^{+}Foxp3^{+}CD25^{+}$T細胞亞群之量

所組成之群之值設為(Y)，計算變數(X、Y)。

【0099】

於本發明之方法中，包含：例如測定$CD4^{+}CD62L^{low}$T細胞之量(X)之步驟，及測定$CD4^{+}Foxp3^{+}CD25^{+}$T細胞之量(Y)之步驟，可使用X相對於Y之相對值及閾值之比較作為預測該受驗體對於癌症免疫療法為長期無惡化存活群之指標。作為(Y)，可使用控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^{+}$T細胞亞群之量或比率。

【0100】

本發明之另外其他實施形態係一種組合物，其係用以於預測為長期無惡化存活群之受驗體中治療癌症的包含免疫檢查點抑制劑者，且該受驗體係藉由源自該受驗體之樣品中之選自以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量、

控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、及

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量

中之量(X、Y)之相對值與閾值之比較而選擇之受驗體，且源自該受驗體之樣品中之$CD4^+$T細胞中之$Foxp3^+CD25^+$T細胞亞群之比率或$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中之$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之比率為閾值以上。量(X)及(Y)代表而言，選自由以下：

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR4^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RO^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD62L^{high}CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD127^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-Foxp3^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量、

$CD137^+CD8^+$T細胞亞群之量、及

$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群。

【0101】

例如，本發明之組合物可將選自由

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、及

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群之值設為(X)，將藉由變數(X、Y)附特徵之受驗體作為投予之對象。於本發明之方法中，又，可將選自由

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RO^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量、

$CD137^+CD8^+$T細胞亞群之量、及

$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群之值設為(X)，計算變數(X、Y)，將藉由變數(X、Y)附特徵之受驗體作為投予之對象。

【0102】

例如，本發明之組合物可將控制性T細胞亞群之量或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量設為(Y)，計算變數(X、Y)。於本發明之方法中，又，可將選自由

$CCR4^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD62L^{high}CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD127^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$CD45RA^-Foxp3^+CD4^+$T細胞亞群之量、及

$CD4^+Foxp3^+CD25^+$T細胞亞群之量

所組成之群之值設為(Y)，計算變數(X、Y)，將藉由變數(X、Y)附特徵之受驗體作為投予之對象。

【0103】

本發明之組合物例如可自$CD4^+CD62L^{low}$T細胞之量(X)、及$CD4^+Foxp3^+CD25^+$T細胞之量(Y)，藉由將X相對於Y之相對值與閾值比較，而將判斷為對於癌症免疫療法為長期無惡化存活群之受驗體作為投予

之對象。作為(Y)，可使用控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量或比率。

【0104】

於一實施形態中，組合物包含PD-1抑制劑。PD-1抑制劑例如係抑制PD-L1與PD-1之結合的抗PD-1抗體，例如可為納武單抗、帕博利珠單抗、Spartalizumab、或Cemiplimab。於其他實施形態中，組合物包含PD-L1抑制劑。PD-L1抑制劑例如為抑制PD-L1與PD-1之結合的抗PD-L1抗體，例如可為度伐魯單抗、阿特珠單抗或阿維魯單抗。於包含該等免疫檢查點抑制劑之組合物於投予至由本發明之生物標記選擇之受驗體之情形時，一般認為以尤其較高之概率實現治療效果。本發明之組合物可與任意其他藥劑併用。

【0105】

(本發明之生物標記)

本發明之生物標記係評價包含$CD4^+$T細胞、樹狀細胞、及/或$CD8^+$T細胞之抗腫瘤免疫應答全體之平衡者，一般認為係全體評價腫瘤免疫者。因此，本發明之方法可對於範圍較寬之癌有效。又，本發明係評價抗腫瘤免疫應答全體之平衡，故而預測不僅對於PD-1・PD-L1之免疫檢查點抑制劑，對於其他免疫檢查點起作用之抗癌治療亦有效。

【0106】

於本發明中，亦可代替$CD62L^{low}$，或除$CD62L^{low}$外，使用成為效應T細胞之指標之標記例如$CCR7^-$。或者，亦可使用CD45RA－及/或CD45RO＋。例如，亦可使用$CD4^+$T細胞中之$CD45RA^-CD4^+$T細胞亞群之比率、及/或$CD4^+$T細胞中之$CD45RO^+CD4^+$T細胞亞群之比率。判明

LAG3、ICOS、PD-1之表現亦又可與$CD62L^{low}$同樣使用(可追加或取代)。同樣判明CCR4表現亦又可與$CD62L^{low}$同樣使用(可追加或取代)。

【0107】

可代替實施例中使用之$CD4^+$T細胞($CD62L^{low}CD4^+$T細胞)為指標(或者，除此之外)，亦可以表現骨髓樹狀細胞(mDC)及/或形質細胞樣樹狀細胞(pDC)群中之HLA-DR及/或CD80及/或CD86的細胞之數/比率為指標。又，一般認為樹狀細胞上之PD-L1亦又可用作本發明之標記。

【0108】

又，亦可代替以實施例中使用之$CD4^+$T細胞($CD62L^{low}CD4^+$T細胞)作為指標(或者，除此之外)，將$CD8^+$T細胞中表現CD137之細胞之數/比率為指標。

【0109】

(本發明之機制)

不期望理論拘束，若模式表示本發明者提倡之腫瘤局部中之抗腫瘤免疫應答現象，則如圖9所示。圖9記載可以末梢血液觀測之作為細胞之$CD62L^{low}CD4^+$T細胞、骨髓樹狀細胞(mDC)、形質細胞樣樹狀細胞(pDC)、及$CD62L^{low}CD8^+$T細胞，進而，記載於該等細胞中表現之作為標記分子之LAG-3、ICOS、PD-1、HLA-DR、CD80、及CD137。PD-L1係以樹狀細胞表現，PD-1係於$CD62L^{low}CD4^+$T細胞及$CD62L^{low}CD8^+$T細胞中表現。

【0110】

一般認為抗腫瘤免疫應答中T細胞組成較為重要。例如，藉由$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之樹狀細胞之刺激較為重要，於$CD62L^{low}CD4^+$T細

胞未充分之情形時(例如，效應T細胞與初始T細胞之平衡傾斜於初始T細胞之情形時)，即便投予免疫檢查點抑制藥，亦無法充分進行樹狀細胞之刺激，其結果，無法充分進行抗腫瘤免疫應答。因此，$CD4^+$T細胞中之$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之比率係預測藉由免疫檢查點抑制藥之抗腫瘤效果的指標。與CD62L同樣$CD4^+$T細胞中之CD45RA陰性CCR7陰性T細胞之比率亦又表示效應T細胞與初始T細胞之平衡，故而可用作本發明之指標。

【0111】

又，藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞之刺激經由HLA-DR進行，因此若樹狀細胞中之HLA-DR陽性細胞之比率降低，則即便投予免疫檢查點抑制藥，亦無法充分進行樹狀細胞之刺激，其結果，無法充分進行抗腫瘤免疫應答。因此，樹狀細胞中之HLA-DR陽性細胞之比率亦又成為預測藉由免疫檢查點抑制藥之抗腫瘤效果的指標。

【0112】

接受藉由$CD4^+$T細胞之刺激之樹狀細胞刺激$CD8^+$T細胞，接受刺激之$CD8^+$T細胞最終發揮抗腫瘤活性。藉由樹狀細胞之$CD8^+$T細胞之刺激經由樹狀細胞上表現之CD80/CD86與$CD8^+$T細胞上之CD137而進行，故而樹狀細胞中之CD80陽性細胞之比率及$CD8^+$T細胞中之CD137陽性細胞之比率之任一者均成為預測藉由免疫檢查點抑制藥之抗腫瘤效果(長期無惡化存活)的指標。

【0113】

除由上述機制明確之生物標記，$CD4^+$T細胞中之LAG-3、ICOS、PD-1及CCR4亦又成為預測藉由免疫檢查點抑制藥之抗腫瘤效果(長期無

惡化存活)的指標。

【0114】

於本發明中，可將細胞亞群量與適當之基準比較，藉由比較來預測受驗體之癌症免疫療法下之長期存活。樣品中之細胞亞群之量自基準增加可表示就受驗體預測到癌症免疫療法下之長期存活。或者，樣品中之細胞亞群之量未自基準增加可表示就受驗體未預測到癌症免疫療法下之長期存活。

【0115】

作為基準，例如可列舉對應於癌症免疫療法前之受驗體之樣品中之細胞亞群之量，但並不限定於此。此外，作為基準，亦可使用自不接受癌症免疫療法之受驗體之樣品實驗算出的值等。

【0116】

與基準相比增加可藉由癌症免疫療法後之細胞亞群量為超過基準之量，或超過基準之1、2、3、4、5、10、15、20、30%而增加，或超過基準之1.5倍、2倍、3倍、5倍而增加而表示。典型而言，一般認為只要超過基準之值，則與基準相比增加。於實驗算出基準之情形時，觀察到自基準值觀察超過適當之誤差的增加之情形時，可與基準相比增加。作為適當之誤差，例如可列舉1標準偏差、2標準偏差、3標準偏差、或超過該等。

【0117】

(放射線治療)

於本發明之實施形態中，提供一種藉由放射線治療之免疫活化之指標。於放射線治療中，可藉由照射放射線，而破壞癌症細胞之DNA或RNA來抑止細胞分裂，及/或藉由誘發細胞凋亡(細胞死)，而減少癌症細

胞。一般而言，將至正常細胞之容許劑量之極限(約50～60 Gy)之劑量分割(1天約2 Gy)並照射於組織。正常細胞係修復基因之破壞而殘留，自己修復作用慢於正常細胞之癌症細胞於修復破壞之基因以前，無法再次接受照射，修復基因，因此誘發細胞死。藉此，於照射視野中實現腫瘤消退。

【0118】

報告有放射線治療中除照射視野中之腫瘤消退，產生照射視野之外之腫瘤消退，稱為遠端效應。照射視野之外之腫瘤消退無法藉由上述藉由放射線之癌症細胞之增殖抑制・細胞死而說明，一般認為係經由任一免疫系之活化的作用，但對詳細之機制不明方面較多。一般認為可藉由放射線治療之免疫系之活化，而提高利用抗腫瘤免疫之癌症免疫療法之有效性，未發現用以確認接受放射線治療之受驗體中是否產生遠端效應之生物標記。於本說明書中，提供一種表示對接受放射線治療之受驗體中之照射視野之外有影響之免疫活化(遠端效應)的生物標記。

【0119】

放射線大致分為電磁波及粒子束此2種。電磁波包含X射線、γ射線等。粒子束係具有較高之運動能量而流動之物質粒子，可列舉：α射線、β射線、中子射線、陽子束、重離子束、介子束等。

【0120】

作為放射線治療中之放射線之照射方法，分為自體外照射放射線之「外部照射」，及自體內側對癌症或其周邊照射放射線之「內部照射」。亦可將外部照射及內部照射組合進行。

【0121】

外部照射中，自體外通過皮膚照射放射線。照射高能量之X射線之方

法最一般。作為外部照射，可列舉各種樣式，例如可列舉藉由直線加速器(linear accelerator)之X射線照射、三維原體照射(3D-CRT)、強度調變放射線治療(IMRT)、定位放射線治療(SRT)、粒子束治療(陽子束治療・重粒子束治療)、圖像誘發放射線治療(IGRT)等，但並不限定於該等。

【0122】

作為內部照射之樣式，例如可列舉：密封小線源治療(組織內照射、腔內照射)、或使用非密封之放射線同位元素之治療(內用療法)等，但並不限定於該等。

【0123】

本發明中可成為對象之放射線治療只要為可產生免疫活化之態樣下之照射，則其態樣並無限定。例如，放射線治療中之照射視野可為包含腫瘤組織之照射範圍。並非期望理論拘束，但一般認為接受放射線治療之腫瘤細胞產生免疫原性細胞死對增加抗腫瘤效應T細胞較為重要。例如，放射線治療可列舉：胸部放射線照射、對骨轉移部位之放射線照射、對淋巴結轉移之放射線照射、對腎上腺轉移之放射線照射、對肝轉移之放射線照射、對腦轉移之放射線照射等。

【0124】

本發明之生物標記可用於研究企圖產生免疫活化之放射線治療之排程。例如，可表示藉由於受驗體中未產生放射線治療之免疫活化，而應對受驗體再次實施放射線治療。或者，可表示藉由於受驗體中產生藉由放射線治療之免疫活化，而應結束放射線治療。

【0125】

放射線治療可將每1次約1～3 Gy之劑量之照射以每1天約1～2次，經

過3週～8週進行。然而，小劑量之多次照射於研究與癌症免疫療法之併用之情形時，亦可對免疫細胞(例如，T細胞)有影響，故而可較佳為寡分割照射法(例如，於1～2週少次照射大劑量)。

【0126】

為降低放射線治療中可產生副作用之可能性，可於表示產生免疫活化之時間點，不進行另外放射線治療。尤其，於增大每一次劑量之情形時，不進行多餘照射而產生免疫活化較為有利。先前無法監控何時產生免疫活化，依據預先經驗決定之排程，進行放射線治療，可藉由本發明之生物標記，決定結束放射線治療之適當之時機。

【0127】

(細胞之區分・分離)

用於T細胞之區分・分離之樣品，可藉由常法自受驗體適當採取。例如，可自受驗體之末梢血液、骨髓、腫瘤組織、造血組織、脾臟、正常組織、淋巴液等進行。來自末梢血液之樣品採取非侵襲且簡便，故而可有利。

【0128】

受驗體之樣品中之T細胞之組成可由業者藉由常法而測定。通常，可關於規定作為樣品中之目標之細胞亞群之標記(例如，CD4)，使用流式細胞儀等測定作為陽性之細胞之數。細胞群之組成之測定一般使用流式細胞儀，但此外亦可使用對於包含細胞之樣品的免疫染色、使用抗體陣列之方法、包含細胞之樣品中之蛋白質表現分析(例如，西方點墨、質量分析、HPLC等)、包含細胞之樣品中之mRNA表現分析(例如，微陣列、下一代定序等)等進行。

【0129】

可測量$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群等細胞亞群之各個細胞數，而自全體之細胞實驗除去各個細胞之亞群以外之細胞而求出。係實現其之套組。例如，若使用$CD4^{+}$效應記憶T細胞隔離套組、人(Militenyi Biotech公司)，則可不使用CD4抗體及CD62L抗體，而自末梢血液分離相當於$CD4^{+}CD62L^{low}$T細胞亞群之細胞。可數出全體之活細胞數而記錄，又，可數出使用該套組獲得之細胞之數而記錄。

【0130】

又，可不使用抗體。抗體可為將各個細胞中表現之分子特異識別而結合者，且進而抗體結合於細胞表面上、或細胞內表現之分子時，以可顯色之方式而檢測，測量顯色之細胞之數。此處，該等細胞表面上、或細胞內表現之分子為蛋白質，因此於表現該蛋白質之情形時，編碼其之mRNA亦可於細胞內產生。即，只要調查各個細胞內之mRNA，調查編碼注目之蛋白質分子的mRNA之有無即可。使其可能，但為單細胞之基因表現解析即1細胞等級之mRNA解析。作為單細胞之基因表現解析，例如可列舉：1)藉由Quartz-Seq進行下一代定序之方法；2)使用Fluidigm C1 System或ICELL8 SIngle-Cell System單離細胞，以SMART-Seq v4進行基因庫製備之方法；3)利用細胞分選儀分離細胞，使用Ambion Single Cell-to-CT套組，利用定量PCR測量之方法；4)CyTOF SYSTEM(Helios公司)等。

【0131】

可取得血液，數出活細胞數，利用細胞分選儀等分離細胞，對分離之各個細胞，例如使用Ambion Single Cell-to-CT套組，對特定之基因，利用定量PCR法之裝置測量表現量。根據其結果，調查各個細胞符合

$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群等何種亞群，數出相當於各個亞群之細胞之數。作為調查表現之基因之候選，存在：αβTCR、CD3、CD4、CD25、CTLA4、GITR、FoxP3、STAT5、FoxO1、FoxO3、IL-10、TGFbeta、IL-35、SMAD2、SMAD3、SMAD4、CD62Llow、CD44、IL-7R(CD127)、IL-15R、CCR7low、BLIMP1等。

【0132】

例如，$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞中，作為較$CD62L^{high}CD4^{+}$T細胞表現更亢進之基因，可列舉：AURAKA、CCL17、CD101、CD24、FOXF1、GZMA、GZMH、IL18RAP、IL21、IL5RA、ND2、SMAD5、SMAD7、及VEGFA(WO2018/147291)。可藉由調查該等基因之表現，判定取得之T細胞屬於任一T細胞亞群，來測定細胞亞群之量及/或比率。

【0133】

又，$CD62L^{high}CD4^{+}$T細胞中，作為較$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞表現更亢進之基因，可列舉：BACH2、CCL28、CCR7、CD27、CD28、CD62L、CSNK1D、FOXP1、FOXP3、IGF1R、IL16、IL27RA、IL6R、LEF1、MAL、及TCF7(WO2018/147291)。可藉由調查該等基因之表現，來判定取得之T細胞屬於任一T細胞亞群，來測定細胞亞群之量及/或比率。

【0134】

本發明中之細胞亞群之比率之測定、或與閾值之比較可使用具有規定之訊號的標準樣品進行。可比較以產生對應於特定之細胞亞群之螢光訊號之方式而製備之標準(例如，附著螢光色素之粒子)與包含細胞群之樣品之間之訊號，藉由與標準之比較，而測定樣品中之細胞亞群之量或比率。

又，可比較以產生對應於特定之閾值之螢光訊號之方式而製備之標準(例如，附著螢光色素之粒子)與包含細胞群之樣品之間之訊號，藉由與標準之比較，而判定樣品中之T細胞組成中之本發明之標記之有無或量。

【0135】

於本發明中，關於特定之標記，於判定high(高表現)或low(低表現)之情形時，業者可使用該技術領域中一般使用之表現強度之分類基準進行。例如，關於CD62L，以使用PE標記抗人CD62L抗體之情形對應於10E2之訊號之訊號強度為邊界，可明確分割$CD62L^{low}$及$CD62L^{high}$(WO2018/147291)。

【0136】

本發明之生物標記可用於是否開始併用療法，或者，研究併用療法之排程。例如，於受驗體中未預測到癌症免疫之情形時，可暗示應對受驗體實施併用療法。或者，就受驗體預測到癌症免疫療法下之長期存活之情形時，可暗示不進行併用療法。

【0137】

或者，為降低併用療法中可產生副作用之可能性，作為併用療法之結果，可於預測長期存活之時間點中止另外併用療法。

【0138】

(癌症免疫療法)

所謂癌症免疫療法係指使用生物具有之生物體防禦機制來治療癌症之方法。癌症免疫療法大致區分存在藉由強化對於癌症之免疫功能的癌症免疫療法、及藉由抑制癌症之免疫回避功能之癌症免疫療法。進而，癌症免疫療法存在活化體內之免疫功能之主動免疫療法，及藉由於體外活化免

疫功能，或將增殖之免疫細胞返回體內之被動免疫療法。藉由本發明之生物標記表示預測於癌症免疫療法下之長期存活，藉此可知是否進行併用療法，或者，進行併用療法之較佳之時機。

【0139】

作為癌症免疫療法之例，可列舉：非特異免疫活化藥、細胞激素療法、癌症疫苗療法、樹狀細胞療法、過繼免疫療法、非特異淋巴球療法、癌症抗原特異T細胞療法、抗體療法、免疫檢查點抑制療法等。

【0140】

免疫檢查點抑制劑之代表之例為PD-1抑制劑。作為PD-1抑制劑，可列舉：作為抗PD-1抗體之納武單抗(Nivolumab；作為objeeB™而售賣)及帕博利珠單抗(Pembrolizumab)、以及Spartalizumab、及Cemiplimab，但並不限定於該等。於一較佳之實施形態中，可選擇納武單抗作為對象。

【0141】

於本發明中，PD-L1抑制劑亦又可與PD-1抑制劑同樣使用。一般認為抗PD-1抗體藉由解除藉由PD-1訊號之T細胞活化之抑制而實現抗癌症效果者。一般認為抗PD-L1抗體亦又藉由解除藉由PD-1訊號之T細胞活化之抑制而實現抗癌症效果者。一般認為PD-1抑制T細胞功能之機制未完全解明，但若PD-1(programmed death1)與PD-L1或PD-L2相互作用，則於PD-1之細胞質域吸收作為酪氨酸脫磷酸化酵素之一種之SHP-1,2，將作為T細胞受體訊號傳遞蛋白質之ZAP70不活化，藉此抑制T細胞之活化(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))。一般認為其於稱為ITSM結構之

部分吸收SHP-1,2，將鄰近之T細胞受體之近點信令激酶脫磷酸化而成，換言之，亦可認為自接受抗原刺激之T細胞消除該「接受抗原刺激」之記憶。

【0142】

PD-1係於癌症組織浸潤之殺手T細胞及自然殺手細胞中以高等級表現。又，一般認為藉由腫瘤上之PD-L1，經由藉由PD-1之PD-1訊號的免疫應答減弱。藉由PD-L1，減弱經由該PD-1訊號之免疫應答，但若藉由抗PD-1抗體，抑制PD-1與PD-L1之相互作用及/或藉由相互作用而產生之訊號傳遞，則獲得抗腫瘤免疫應答之增強效果。

【0143】

作為免疫檢查點抑制劑之其他例，可列舉PD-L1抑制劑(例如，作為抗PD-L1抗體之阿維魯單抗、度伐魯單抗或阿特珠單抗)。

【0144】

PD-L1抑制劑係將上述PD-1路徑結合於PD-L1之側而抑制，抑制PD-1與PD-L1之相互作用及/或藉由相互作用產生之訊號傳遞，產生抗腫瘤免疫應答。

【0145】

作為免疫檢查點抑制劑之其他例，可列舉：CTLA-4抑制劑(例如，作為抗CTLA-4抗體之伊匹單抗或曲美木單抗)。CTLA-4抑制劑活化T細胞，產生抗腫瘤免疫應答。T細胞藉由表面之CD28與CD80或CD86相互作用而活化。然而，一般認為即便為暫時活化之T細胞，表現於表面之CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4)與CD80或CD86，以高於CD20之親和性優先相互作用，藉此抑制活化。CTLA-4抑制劑藉由

抑制CTLA-4，而防止抑制CD20與CD80或CD86之相互作用，藉此產生抗腫瘤免疫應答。

【0146】

於另外實施形態中，免疫檢查點抑制劑可以TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3)、LAG-3(lymphocyte activation gene-3)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)、或TIGIT(T cell immune receptor with Ig and ITIM domain)等之免疫檢查點蛋白質為標的。

【0147】

一般認為如上述之免疫檢查點抑制對自組織之免疫應答，但於病毒等抗原長期存在於生物體內之情形時，亦於T細胞免疫檢查點增加。關於腫瘤組織，亦成為於生物體內長期存在之抗原，因此一般認為藉由該等之免疫檢查點而避免抗腫瘤免疫應答，如上述之免疫檢查點抑制劑使此種回避功能無效化，實現抗腫瘤效果。

【0148】

於本發明中，併用療法可適當為與其他癌症治療組合之療法，代表而言，可為與1個或複數個另外藥劑之組合投予。或者，併用療法可為與放射線治療之組合。1個或複數個另外藥劑可為任意之化學療法藥，或可包含第2免疫檢查點抑制劑。或者，作為併用療法中使用之其他癌症治療，可列舉：其他癌症免疫療法(例如，過繼細胞移入)、溫熱療法、外科程序等，但並不限定於該等。

【0149】

於本發明之一實施形態中，對被預測癌症免疫療法下之長期存活之

患者提供一種包含免疫檢查點抑制劑之組合物。本發明之包含免疫檢查點抑制劑之組合物通常全身或局部以經口或非經口之形態投予。本發明之包含免疫檢查點抑制劑之組合物藉由於本說明書中記載之方法，投予至受驗體，藉此預測帶來癌症免疫療法下之長期存活。

【0150】

投予量根據年齡、體重、症狀、治療效果、投予方法、處置時間等有所不同，通常，例如成人每一人，每1次，自0.1 mg至100 mg之範圍，1天1次至數次經口投予，或成人每一人，每1次，自0.01 mg至30 mg之範圍，自1天1次至數次非經口投予(較佳為靜脈內投予)，或自1天1小時至24小時之範圍持續投予至靜脈內。當然，投予量根據各種條件而變動，故而亦有少於上述投予量之量充分之情形，又，亦有必須超過範圍之情形。

【0151】

包含免疫檢查點抑制劑之組合物每次投予時，可採取用於經口投予之內服用固形劑、內服用液劑、及用於非經口投予之注射劑、外用劑、栓劑等之劑形。用於經口投予之內服用固形劑包含錠劑、丸劑、膠囊劑、散劑、顆粒劑等。膠囊劑包含硬膠囊及軟膠囊。

【0152】

本發明之組合物視需要直接使用1個或其以上之活性成分(例如，對於免疫檢查點蛋白質之抗體)，或混合賦形劑(乳糖、甘露醇、葡萄糖、微晶纖維素、澱粉等)、鍵結劑(羥丙基纖維素、聚乙烯吡咯啶酮、矽酸鋁鎂等)、崩解劑(纖維素乙醇酸鈣等)、潤滑劑(硬脂酸鎂等)、穩定劑、溶解輔助劑(麩胺酸、天冬胺酸等)等，依據常法製劑化使用。又，可視需要利用塗佈劑(白糖、明膠、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素苯二甲酸酯等)被

覆，又，可由2層以上之層被覆。進而亦包含如明膠般可吸收之物質之膠囊。

【0153】

本發明之組合物為經口投予，於作為內服用液劑而製劑化之情形時，包含藥學性容許之水劑、懸浮劑、乳劑、糖漿劑、酏劑等。於此種液劑中，一個或其以上之活性物質溶解、懸浮或乳化於一般使用之稀釋劑(精製水、乙醇或該等之混合液等)中。進而該液劑可含有濕潤劑、懸浮化劑、乳化劑、甜味劑、調味劑、芳香劑、保存劑、緩衝劑等。

【0154】

作為用於非經口投予之注射劑，包含於溶液、懸浮液、乳濁液及用時溶劑中溶解或懸浮使用之固形注射劑。注射劑係將一個或其以上之活性物質溶解、懸浮或乳化於溶劑中使用。作為溶劑，例如使用注射用蒸餾水、生理食鹽水、植物油、如丙二醇、聚乙二醇、乙醇之醇類等及該等之組合。進而該注射劑可包含穩定劑、溶解輔助劑(麩胺酸、天冬胺酸、聚山梨糖醇酯80(註冊商標)等)、懸浮化劑、乳化劑、鎮痛劑、緩衝劑、保存劑等。該等於最終步驟中藉由殺菌或無菌操作法而製備。又，亦可製造無菌之固形劑例如冷凍乾燥品，於其使用前無菌化或溶解於無菌之注射用蒸餾水或其他溶劑中而使用。

【0155】

(癌症)

作為本發明中成為對象之癌症，可列舉：黑色素瘤(惡性黑色素瘤)、非小細胞肺癌、腎細胞癌、惡性淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤)、頭頸部癌、泌尿癌(膀胱癌、尿路上皮癌、前列腺癌)、小細胞肺

癌、胸腺癌、胃癌、食道癌、胃食道接合部癌、肝癌(肝細胞癌、肝內膽管細胞癌)、原發性腦腫瘤(成膠質細胞瘤、中樞神經系原發淋巴瘤)、惡性胸膜中皮瘤、婦科癌(卵巢癌、子宮頸癌、子宮體癌、)、軟組織肉瘤、膽道癌、多發性骨髓瘤、乳癌、大腸癌等，但並不限定於該等。

【0156】

(套組)

於本發明之一實施形態中，提供一種用以判定就受驗體是否預測到癌症免疫療法下之長期存活之套組。為檢測本說明書中記載之細胞亞群，套組可包含對於適當之分子的1個或複數個檢測劑。可將此種檢測劑之組合用於決定受驗體之T細胞組成。此種套組可用於測定受驗體中之本說明書所記載的作為新穎生物標記的特定之細胞亞群之比率。

【0157】

於本發明之一實施形態中，套組可包含對於

CD4及CD62L；

(i)選自ICOS、PD-1、LAG-3及CD28中之標記、(ii)CD4、以及(iii)CD62L；

CD11c、CD141及HLA-DR；或

CD8、CD62L及CD137

之檢測劑。於一實施形態中，檢測劑為抗體。較佳為抗體適當標記，容易檢測標記。

[實施例]

【0158】

以上，為容易理解，揭示較佳之實施形態說明本發明。以下，基於

實施例，說明本發明，但上述說明及以下之實施例並非僅由例示之目的而提供，並非以限定本發明之目的而提供。因此，本發明之範圍既不受本說明書具體記載之實施形態亦不受實施例限定，僅由申請專利範圍限定。

【0159】

(材料及方法)

(1)患者

具有NSCLC之171名連續患者自單一設施(埼玉醫科大學國際醫療中心)於2016年2月至2018年8月參加本研究。登錄後，未獲得可評價之PBMC試樣，因此排除28名患者；進而，自納武單抗療法起9週後無法評價其抗腫瘤效果，故而排除17名患者。將患者之資料分成2份，獲得40名患者之探索組及86名患者之獨立之驗證組。將患者之特徵及應答列舉於以下之表1。

[表1]

	探索組 n＝40	驗證組 n＝86
年齡-歲		
中值	67	69
範圍	51-84	31-85
性別-數量(%)		
男性	26(65)	67(77.9)
女性	14(35)	19(22.1)
組織學-數量(%)		
Sq	10(25)	24(27.9)
Non-Sq	30(75)	62(72.1)
吸煙史-數量(%)		
當前或曾經吸煙者	29(72.5)	68(79.1)
不吸煙	11(27.5)	18(20.9)
疾病分期-數量(%)		
c期III	9(22.5)	18(20.9)
c期IV	22(55)	55(64.0)
術後復發	9(22.5)	13(15.1)
驅動突變狀態-數量(%)		
野生型	33(82.5)	73(84.9)
EGFR(19 del或L858R)	7(17.5)	12(14.0)
ALK	0(0)	1(1.1)
9週之客觀應答-數量(%)		
完全或部分應答	11(27.5)	12(14.0)
穩定疾病	15(37.5)	31(36.0)
發展疾病	14(35)	43(50.0)

Sq意指鱗狀細胞癌。c期意指癌之臨床期數。EGFR意指上皮生長因子受體。del意指缺失變異。ALK意指未分化淋巴瘤激酶。

【0160】

患者係每2週接受3 mg/kg體重之用量之納武單抗。使用Response Evaluation Criteria in Solid Tumors(RECIST；實體癌效果判定基準)，version1.1，於第9週及其後每8週評價腫瘤應答。資料採取之截止係2018年11月13日。獲得受到埼玉醫科大學國際醫療中心之臨床試驗審查委員會

認可之書面知情同意後，採取試樣。

【0161】

(2)血液試樣之分析

將試樣採取於添加肝素之CPT Vacutainer™管(Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ)，以1,500×g進行20分鐘室溫下之離心，於Ficoll梯度上自紅血球及顆粒球分離PBMC。將PBMC於Cellbanker2™(Nippon Zenyaku Kogyo C0., Ltd., Koriyama, Japan)中於-80℃下冷凍，於1週以內將冷凍細胞移至液氮槽。於T細胞之部分集合之分析時，於染色細胞之前，將細胞於培養基中保溫32～48 h。

【0162】

為了進行FACS Calibur™，使用以下mAb對細胞染色：螢光異硫氰酸鹽(FITC)偶聯抗CD3(HIT3a)及抗CD4(RPA-T4)、藻紅素(PE)偶聯抗CD8(RPA-T8)及抗CD25(M-A251)、PE-Cy7偶聯抗CD25(M-A251)、PE-Cy5偶聯抗CD62L(Dreg 56)(全部為BD Pharmingen, San Diego, CA)、及FITC偶聯抗CD62L(Dreg 56)(eBioscience, Wien, Austria)。將LSR Fortessa™及質譜流式細胞術分析使用之單株抗體列舉於以下之表2。

[表2]

a.

抗原	偶聯	純系	製造商
CD3	BUV496	UCHTI	BD
CD4	BV650	OKT4	BL
CD8	APC-Cy7	SK1	BL
CD16	BUV395	3G8	BD
CD19	PE-Cy5.5	SJ25C1	eBio
CD25	PE-CF594	M-A251	BD
CD28	PerCP-Cy5.5	CD28.2	BL
CD45RA	AF700	HI100	BL
CD56	PE-CF594	B159	BD
CD62L	BV421	DREG-56	BL
CCR4	PE-Cy7	L291H4	BL
CCR6	BV605	G034E3	BL
CCR7	BV711	G043H7	BL
CTLA-4	BV786	BNI3	BD
CXCR3	BV785	G025H7	BL
CXCR5	FITC	J252D4	BL
Foxp3	PE	236A/E7	eBio
ICOS	BUV395	DX29	BD
ICOS	PE-Cy7	ISA-3	eBio
Ki-67	BV605	Ki-67	BL
LAG-3	FITC	17B4	ENZ
PD-1	APC	MIH4	BD
Ms IgG1κ	BUV395	X40	BD
Ms IgG1κ	BV421	MOPC-21	BL
Ms IgG1κ	BV605	MOPC-21	BL
Ms IgG1κ	BV785	MOPC-21	BL
Ms IgG1κ	FITC	MOPC-21	BL
Ms IgG1κ	PerCP-Cy5.5	P3.6.2.8.1	eBio
Ms IgG1κ	PerCP-Cy5.5	MOPC-21	BL
Ms IgG1κ	PE-CF594	X40	BD
Ms IgG1κ	PE-Cy7	P3.6.2.8.1	eBio
Ms IgG1κ	PE-Cy7	MOPC-21	BL
Ms IgG1κ	APC	MOPC-21	BD
Ms IgG2aκ	BV711	MOPC-173	BL
Ms IgG2aκ	BV786	G155-178	BD
Ms IgG2bκ	BV605	MPC-11	BL

b.

抗原	偶聯	純系	製造商
CD134/OX40	150Nd	AC 35	FLUIDIGM
Gelactin-9	163Dy	9M1-3	FLUIDIGM
CD141	173Yb	1A4	FLUIDIGM
CD123/IL-3R	151Eu	6H6	FLUIDIGM
CD11b/Mac-1	167Er	ICRF44	FLUIDIGM
CD33	169Tm	WM53	FLUIDIGM
CD16	209Bi	3G8	FLUIDIGM
CD56/NCAM	149Sm	NCAM16.2	FLUIDIGM
CD11c	159Tb	Bu15	FLUIDIGM
CD14	175Lu	M5E2	FLUIDIGM
HLA-DR	170Er	L243	FLUIDIGM
HLA-ABC	144Nd	W6-32	FLUIDIGM
CD40	165Ho	5C3	FLUIDIGM
CD137配體	158Gd	5F4	FLUIDIGM
CD86/B7.2	156Gd	IT2.2	FLUIDIGM
CD3	141Pr	UCHT1	FLUIDIGM
CD8	146Nd	RPA-T8	FLUIDIGM
CD4	145Nd	RPA-T4	FLUIDIGM
Tbet	161Dy	4B10	FLUIDIGM
CD19	142Nd	HIB19	FLUIDIGM
CD45RA	169Tm	HI100	FLUIDIGM
BCL-6	163Dy	K112-91	FLUIDIGM
FoxP3	159b	259D/C7	FLUIDIGM
CD183/CXCR3	156Gd	G025H7	FLUIDIGM
CD194/CCR4	149Sm	L291H4	FLUIDIGM
CD196/CCR6	176Yb	G034E3	FLUIDIGM
CD278/ICOS	143Nd	C398.4A	FLUIDIGM
CD137	158Gd	143Nd	FLUIDIGM
CD69	144Nd	FN50	FLUIDIGM
CD134/OX40	150Nd	AC 35	FLUIDIGM
CD154/CD40L	168Er	24-31	FLUIDIGM
CD27	155Gd	L128	FLUIDIGM
CD28	160Gd	CD28.2	FLUIDIGM
CD152/CTLA-4	170Er	14D3	FLUIDIGM
CD80/B7.1	162Dy	2D10.4	FLUIDIGM
CD103	151Eu	Ber-ACT8	FLUIDIGM
CD279/PD-1	175Lu	EH12.2H7	FLUIDIGM
TIM-3	154Sm	F38-2E2	FLUIDIGM
CD223/LAG-3	165Ho	11C3C65	FLUIDIGM
CD274/PD-L1	148Nd	29E.2A3	FLUIDIGM
CD273/PDL2	172Yb	24F.10C12	FLUIDIGM
CD62L	153Eu	DREG-56	FLUIDIGM
CD197/CCR7	167Er	G043H7	FLUIDIGM

BD意指Becton Dickinson and Company製品。BL意指BioLegend公司製品。eBIO意指eBioscience公司製品。ENZ意指Enzo Life Sciences公司製品。

【0163】

關於細胞表面表現型，藉由螢光團偶聯mAb，將1×10^6細胞直接免疫螢光染色，藉此進行分析。圈選策略示於圖19及20。使用FACS Calibur™及LSR Fortessa™流式細胞儀(Becton Dickinson, Sunnyvale, CA)以及FlowJo™軟體，自各試樣分析10,000細胞。進而，使用CyTOF™(Fluidigm Corp., San Francisco, CA)質譜流式細胞儀及Cytobank™軟體，分析20,000細胞，獲得viSNE分析。

【0164】

(3)細胞之純化

自各應答群(PR、SD、及PD)之2名患者採取PBMC。藉由人$CD4^+$T細胞單離套組(Dynal Biotech, Oslo, Norway)進行負選擇，藉此純化$CD4^+$T細胞。進而，依據製造者之指示程序，使用抗CD62LmAb塗佈微珠及MACS™系統(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)，將$CD4^+$T細胞分離成$CD62L^{high}$細胞及$CD62L^{low}$細胞。細胞之純度全部＞90%。

【0165】

(4)微陣列分析

自各應答者型之2名患者純化PBMC中之$CD62L^{high}CD4^+$T細胞及$CD62L^{low}CD4^+$T細胞，使用TRIzol試劑(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)，單離總RNA。其後，合成cDNA及cRNA，依據製造者之指示，使用WT Plus 試劑套組(Thermo Fisher Scientific)，標記單鏈

cDNA(ssDNA)。將總RNA(0.5 μg)反轉錄成cDNA，其後，合成cRNA。並且，自15 μg之cRNA反轉錄ssDNA，其後進行標記；GeneChip雜交烘箱645中，使用微陣列(Clariom S Assay, human; Thermo Fisher Scientific)雜交1.8 μg之標記ssDNA。使用GCS3000 7G系統(Thermo Fisher Scientific)掃描雜交之陣列。基因表現資料之登錄編號ID係GSE103157。

【0166】

為了自2集基因表現資料鑑定基因表現印記，如以下，推定2集間之基因表現之差異。首先，對探針之全部值進行偏離值之檢定，並且使用除去偏離值之探針值之平均及方差，計算關於各探針之z得分。為了比較兩個基因集之z得分，將各基因之z得分轉換成概率，並且以下計算各基因概率之2集間之差異(p^d)：

[數1]

$$p_k^d = \left|p(z_k^a) - p(z_k^b)\right| = \left|\frac{1}{\sqrt{2\pi}}\int_{-\infty}^{z_k^a} e^{-\frac{z}{2}}dz - \frac{1}{\sqrt{2\pi}}\int_{-\infty}^{z_k^b} e^{-\frac{z}{2}}dz\right|$$

式中，比較兩個基因集(a與b)間之第k之基因。該分析中，選擇成為

[數2]

$$p_k^d > 0.2$$

之基因作為基因印記。

【0167】

(4)統計分析

為進行統計分析，使用SAS 9.4(SAS Institute Inc., Cary, NC)及Prism8(GraphPad, La Jolla, CA)。其他未明示，作為平均值±平均值之標準誤差表示資料。關於2群間之差異之檢定使用Student's t檢定。多群比

較使用one-way ANOVA。使用探索組之資料及羅吉斯回歸模型，開發預測式。使用獨立之驗證組之資料，評價預測式之性能。使用Kaplan-Meier法推定存活時間曲線。全部之P值為兩側，統計學有意發現P＜0.05。

【0168】

(實施例1：納武單抗治療下之經過)

發明者對已治療發展期肺癌患者以作為抗PD-1抗體之納武單抗接受治療之患者之自治療開始至5年後之經過，根據圖1所示之Brahmer等人(Five-year follow-up from the CA209-003 study of nivolumab in previously treated advanced non-small cell lung cancer: clinical characteristics of long-term survivors. Presented at: 2017 AACR Annual Meeting; April 1-5, 2017; Washington, DC. Abstract CT077)進行研究。

【0169】

左圖係表示總存活時間之曲線自第3年不降低，可見5年存活占全體之16%。右圖之陰影繪圖之藍條表示治療期間。該臨床試驗中於2年結束治療，但5年存活之16名中12名(＃1、2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、及13)於納武單抗治療結束後未接受任何治療，於3年以上無惡化存活。如此以抗PD-1抗體接受治療之患者之中，可知存在獲得即便中止治療亦無復發、再燃之「治療類似」之效果的患者。關於黑色素瘤，已報告有較多存在10年無治療無復發存活之患者。

【0170】

圖2係由Brahmer等人(N Eng J Med 2015: 373: 123-135)更改之圖表。可知圖1中亦可見之長期無惡化存活群，於圖2之無惡化存活曲線中，構成18個月以後可見之長尾(Tail Plateau)。該長尾表示約5年之總存活時

間。另一方面，可理解存在未達3個月早期病情惡化之「無效群」、及暫時獲得抗腫瘤效果自先前治療之PFS曲線偏離但途中病情惡化之「短期起效群」。

【0171】

根據該等結果之解析，可理解存在以抗PD-1抗體接受治療之患者之中，以約10～20%之比率，中止治療亦無復發或再燃之「治療類似」之效果長期間表示的「長期無惡化存活群」。只要可鑑定該「長期無惡化存活群」(LS)，則可理解可適當進行併用療法之必要性之有無之決定、併用療法開始時期之決定、或者併用療法之中斷/中止時期之決定之判斷。

【0172】

(實施例2：FACS Calibur解析)

依據以下之程序，進行FACS Calibur解析。

【0173】

(1)自採血直至冷凍保存

・於Becton Dickinson公司(BD公司)製之bactinaspitz(含肝素)7～8 mL管×2根中進行約14～16 ml之採血。

・採血後2小時～半天以內以3200 rpm、20分鐘、室溫(18～25℃)進行離心。

・採取血漿後，將殘留於凝膠障壁上層之血漿成分及細胞成分利用移液攪拌並採取，回收於50 mL離心管(自spitz 2根彙總為1根)。添加與回收之液量(約13 mL)同等量之PBS(+10%FBS)。

・於1600 rpm、5分鐘、4℃下離心。

・於離心後捨棄上清液，懸浮於塔卡拉生物公司之細胞料斗2液4.5

ml。

・於低溫小瓶2.0 ml(外螺絲蓋圓底)每次分注懸浮於細胞料斗2液之細胞1.5 ml(合計3根)。其後，放入至BiCell(程式冷凍櫃用之容器)，利用-80℃冷藏室保存。

・於保存1週以上之情形時，於液氮槽保存。

【0174】

(2)自解凍至FMC解析

・取出低溫小瓶，使用約37℃之溫水迅速解凍。

・於50 ml離心管回收細胞，添加HBSS為50 ml。

・於1600 rpm、5分鐘、4℃下離心。

・離心後捨棄上清液，於HBSS懸浮細胞。進而添加HBSS為50 ml，採取50 μl計數細胞數。

・於1600 rpm、5分鐘、4℃下離心。

・添加CM(RPMI1640＋10%FCS)成為1×10^6細胞/ml，移至培養皿，於保溫箱培養36～48小時。

・將培養液移至50 ml離心管，計數細胞數，於1600 rpm、5分鐘、4℃下離心分離。

・離心後捨棄上清液，於FACS緩衝液中懸浮細胞。基於細胞數計數，以成為0.3～1×10^6細胞/ml之方式添加FACS緩衝液。於FACS用管每次加入1 ml細胞懸浮液。

・於1600 rpm、5分鐘、4℃進行離心。

・離心後捨棄上清液，殘留約100 μl上清液。將細胞顆粒於漩渦等中弄碎，分別於FACS管標記後，依據操作流程添加，於4℃下靜置抗體液

30～60分鐘。

・於FACS管添加2 ml FACS緩衝液，於1600 rpm、5分鐘、4℃下離心。

・離心後捨棄上清液，添加1% PFA 0.5 ml，於漩渦等中將顆粒弄碎，進行FCM解析。

・於FACS緩衝液中懸浮細胞。基於細胞數計數，添加FACS緩衝液成為0.3～1×10^6細胞/ml。於FACS用管每次加入1 ml細胞懸浮液。

【0175】

FACS Calibur解析所使用之抗體及標記之組合如以下所示。

【0176】

[表3]

T細胞用			
	FITC	PE	fl3
1	CD4	CD62L	CD8
2	CD4	PD-1	CD62L
3	CD4	LAG-3	CD62L
4	CD4	ICOS	CD62L
5	CD4	CD62L	CD28
6	CD4	CD137	CD62L
7	CD62L	PD-1	CD8
8	CD62L	CD137	CD8
9	CD8	CD62L	CD28
10	CD4	foxp3	CD25
DC用			
	FITC	PE	fl3
1	CD141	同型對照	CD11c
2	CD141	HLA-DR	CD11c
3	CD141	CD80	CD11c

【0177】

進行FACS Calibur解析，將早期病情惡化之無效群(非應答者群)及其

以外之起效群(應答者群)中之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率示於圖3之左。起效群中，與無效群相比具有較高之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率，可知起效群之中存在具有超過40%之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率之一群(圖3左)。

【0178】

起效群之中分成持續18個月以上無惡化狀態之患者群(LS群)、暫時起效後病情惡化之暫時起效後病情惡化群(R群)，將對$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率繪圖之結果示於圖3之右。可知自具有超過40%之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率之一群出現長期無惡化存活群。

【0179】

(實施例3：ROC解析及PFS繪圖)

將關於實施例2中獲得之資料進行ROC解析之結果示於圖4左。即，將18個月以上無惡化存活群分層進行之解析中，P值0.0008表示將$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率＞35.85設為閾值之情形時，可以感度85.7%、特異度83.3%進行預測。AUC亦為0.896非常良好。

【0180】

將橫軸繪圖$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率、縱軸繪圖無惡化存活天數(PFS(天))之結果示於圖4右。顯示$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率未達20%時，幾乎為早期病情惡化群，為35.85%以上時，半數以上為長期存活群。

【0181】

該等之結果表示$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率係用於預測癌症免疫療法下之長期存活之優異之生物標記。

【0182】

(實施例4：應答者及非應答者之間之$CD62L^{low}$T細胞部分集合之比率

之差異)

171名NSCLC之連續患者參加本研究，該等患者自2016年2月至2018年8月，於單一設施(埼玉醫科大學國際醫療中心)中使用納武單抗進行了治療(圖10a)。本研究係實際治療之觀察研究，故而所有患者於納武單抗療法之前，依據日本醫藥品隨附文件，利用細胞破壞化學療法事先治療。登錄後，未獲得可評價之PBMC試樣，故而排除28名患者；進而，自納武單抗療法起9週後無法評價其抗腫瘤效果，故而排除17名患者。將探索組及驗證組所含之所有患者之特徵列舉於表1。為了鑑定區別呈現初期疾病之發展的患者之生物標記，發明者自納武單抗療法起9週後時間點利用電腦斷層攝影法(CT)進行評價，將顯示疾病之發展之患者作為「非應答者」，將顯示完全起效(CR)、部分起效(PR)、或穩定(SD)之患者作為「應答者」。尤其直至治療後9週呈現初期疾病之發展的患者存活時間顯著縮短，另一方面，SD患者及PR患者顯示良好之總存活時間(OS)(圖16)。非應答者大約可能包含不接受藉由納武單抗療法之延命效果的患者群。因此，自研究資料，對34個參數(包括白血球細胞、淋巴球、及嗜中性球之數；IgG、IgA、IgM、IgE、及IgD之血清免疫球蛋白水平；癌胚抗原及細胞角蛋白19片段之腫瘤標記；以及關於抗核抗體、類風濕因子、AST、ALT、LDH、及CRP之生化學資料)進行分析。然而，應答患者與非應答患者之間未發現有意義差。

【0183】

近年來，腫瘤、腫瘤流入區域LN、及末梢血液中等，證實包含$CD62L^{low}CD44^{+}CD69^{+}CD90^{+}CD27^{low}T\text{-}bet^{+}CD4^{+}$T細胞之部分群之全身性T細胞之免疫性於抗腫瘤免疫應答中係必需。進而，發現相當數之表現

型之$CD4^+$T細胞係人黑色素瘤浸潤淋巴球中之3個抗腫瘤T細胞叢之一。因此，本發明者於NSCLC患者之末梢血液中，對該T細胞之部分集合、尤其是$CD62L^{low}$部分群進行調查。

【0184】

其結果，與非應答者相比，應答者中，$CD4^+$T細胞之所有群中之$CD62L^{low}$細胞之比率(圖10b，$P < 0.0001$)及$CD8^+$T細胞之所有群中之$CD62L^{low}$細胞之比率(圖10c，$P = 0.0020$)有意提高。另一方面，非應答者中(圖10d)，所有$CD4^+$T細胞群中之$CD25^+FOXP3^+$細胞之比率有意提高($P = 0.034$)。本發明者作為獨立因子之一個，選擇所有$CD4^+$T細胞群中之$CD62L^{low}$細胞之比率。其原因在於，觀察到很大的差異。作為與構成與$CD62L^{low}CD4^+$T細胞叢不同之T細胞叢的臨床成績負相關之其他因子，亦選擇所有$CD4^+$T細胞群中之$CD25^+FOXP3^+$細胞之比率。為檢測非應答患者，使用包含選擇之兩個因子的羅吉斯回歸模型，獲得如下之式：

$[-31.3 + 12.0\times\log[\%\text{所有}CD4^+\text{T細胞群中之}CD62L^{low}\text{T細胞:X}] - 6.1\times\log[\%\text{所有}CD4^+\text{T細胞群中之}CD25^+FOXP3^+\text{T細胞:Y}]]$;

該式與$[-31.3 + 6.0\times\log(X^2/Y)]$近似。因此，本發明者獲得使用$X^2/Y$作為式中之變數的預測式。

【0185】

(實施例5：預測納武單抗應答之式之值)

本發明者決定關於應答者與非應答者之預測式之值(圖10e，$P < 0.0047$)，為於第9週時間點檢測探索組內之非應答者，進行接受者操作特性(ROC)分析(圖10f)。若將預測式之閾值設為192(其為以ROC曲線之相似度比為最大之點)，則感度及特異度分別為85.7%及100%。關於藉由納武

單抗治療前採取之PBMC之分析鑑定為應答者型之患者($X^2/Y \geq 192$)與鑑定為非應答者型之患者($X^2/Y < 192$)，繪圖無惡化存活時間(PFS)曲線及OS曲線(圖10g、h)。探索組中之應答者及非應答者(閾值＝192)於PSF及OS之兩者方面有意不同($P < 0.0001$)。其次，本發明者對該預測式之閾值($X^2/Y < 192$)於包含86名連續患者獨立之驗證組中，對無法區別非應答者進行驗證：預測式之值與驗證組中之非應答患者相比，於應答者之情形時有意($P = 0.0008$)較高(圖10i)。驗證組中，應答者型之患者與非應答者型之患者相比，表示有意較長之PSF(圖10j，$P < 0.0001$))及OS(圖10k，$P < 0.0001$)。包含無法評價第9週之腫瘤應答之患者之資料的全部存活資料(n＝143)於非應答型之患者與應答者型之患者之間表示有意義差(圖16c，d)。為於第9週檢測驗證組(n＝86)中，及可全部評價之患者中(n＝126)之非應答者，亦進行預測式之ROC分析(圖16e，f)。若將預測式之閾值設為192，則感度與特異度於驗證組中為92.9%及72.1%($P < 0.0001$)，無法全部評價之患者中為87.5%及81.2%($P < 0.0001$)。將由患者(n＝126)獲得之組織所見、及客觀應答及預測式之結果的關聯示於以下表4。

[表4]

組織學，Driver	客觀起效8週	數量(%)	起效群類型
Sq	完全或部分起效	9(25.7)	8
(n＝35)	穩定疾病	17(48.6)	13
	發展疾病	9(25.7)	2
non-Sq(Driver wt)	完全或部分起效	12(16.9)	12
(n＝71)	穩定疾病	26(36.6)	21
	發展疾病	33(46.5)	3
Driver mt＋	完全或部分起效	1(0.5)	1
(n＝20)	穩定疾病	4(20)	1
	發展疾病	15(79.5)	2

客觀之應答及預測式之結果表示於上述表。非應答者型及應答者型

表示分別依據預測式計算之結果未達192及192以上之患者。Sq意指鱗狀細胞癌。Driver wt意指EGFR及ALK為野生型。包含Driver mt＋保有EGFR活化變異之19人患者及保有ALK融合基因變異之1人患者。

【0186】

如以下之表5所示，明確藉由多變數解析，預測式作為PFS及與OS相關之獨立因子發揮功能。

[表5]

總存活(OS)		單變量分析		多變量分析		
		1年存活率(%)	p-值	HR	95%CI	p-值
年齡	≤69/＞69	56/63	0.75	1.03	0.78-1.35	0.83
性別	男性/女性	59/57	0.83	1.11	0.80-1.57	0.52
PS	0/1或2或3	78/39	＜0.01	0.69	0.52-0.90	＜0.01
X^2/Y	高/低	81/34	＜0.01	0.46	0.34-0.61	＜0.01

無發展存活(PFS)		單變量分析		多變量分析		
		1年存活率(%)	p-值	HR	95%CI	p-值
年齡	≤69/＞69	29/27	0.83	1.08	0.87-1.36	0.45
性別	男性/女性	31/20	0.04	0.87	0.68-1.13	0.30
PS	0/1或2或3	32/23	0.04	0.91	0.73-1.14	0.44
X^2/Y	高/低	46/11	＜0.01	0.44	0.34-0.56	＜0.01

縮略語：PS，性能狀態；HR，風險比率；95%CI，95%可靠區間。

PS意指性能狀態。HR意指危險比率。95%CI意指95%可靠區間。

【0187】

(實施例6：$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之部分集合與其他T細胞部分群)

關於CD62L之單一標記可如何區別預測PD-1遮斷療法之抗腫瘤應答之$CD4^{+}$T細胞之部分群，依然不明。因此，為規定$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之部分集合，對$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之部分集合與其他T細胞部分群之關聯進行調查，本發明者除FCM分析外，進行質譜流式細胞術及微陣列分析。首先，對T細胞部分集合之比率之間之相關進行分析。CCR7與

CD45RA均用作用以區別$CCR7^+CD45RA^+$初始T細胞、$CCR7^+CD45RA^-$中央記憶細胞(CM)、$CCR7^-CD45RA^-$效應記憶T細胞(EM)、及$CCR7^-CD45RA^+$效應T細胞(EMRA)之基準。因此，本發明者對該等與$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分群之相關進行調查。$CD8^+$T細胞由CD45RA與CCR7之表現清楚分類成4個部分群，末梢血液中之$CD4^+$T細胞表示欠缺$CD45RA^+CCR7^-$部分群而不同之圖案(圖11a、b)。$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之比率與$CCR7^-CD45RA^-$EM部分群正相關($P < 0.0001$)，但與其他$CCR7^+CD45RA^{-/+}$部分群有意負相關(圖11c、d)。$CCR7^-CD45RA^-CD4^+$T細胞之部分群與$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分群包含類似之T細胞之部分集合。然而，納武單抗治療後之臨床成績與$CCR7^-CD45RA^-CD4^+$T細胞之比率不關聯(圖17a、b)。其次，本發明者對與類型1(Th1)T細胞、類型2(Th2)T細胞、及類型17(Th17)輔助T細胞、以及T濾胞性輔助(Tfh)細胞之相關進行調查。$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分集合與$CXCR3^+CCR4^-CCR6^-$之古典Th1部分集合強相關($P < 0.0001$)，與$CXCR3^-CCR4^+CCR6^-$之Th2部分群負相關(圖11e-h))($P = 0.0013$)。$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分集合亦與$CD8^+$T細胞正相關(圖11i))($P < 0.0001$)，亦與效應$CD8^+$T細胞之部分集合之比率正相關(圖11j))($P = 0.0091$)。有意思為$CCR7^-CD45RA^-CD4^+$部分群與Th1部分集合弱相關($P = 0.01$)，但與Th2群不相關(圖17c-e))。與該等結果吻合明確，藉由質譜流式細胞術分析，$CD62L^{low}CD4^+$叢與$CCR7^-CD4^+$叢不相同(圖12a)。明確對圈選之$CD4^+CD3^+$T細胞無監督學習藉由叢分析，$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分群之大部分屬於$CD27^-T\text{-}bet^+FOXP3^-CXCR3^+CCR4^-CCR6^-$部分群。另一方面，$CD45RA^-CCR7^-$部分群更寬，包含$CD27^+$、$T\text{-}bet^-$、及$FOXP3^+$之部分群。為表示分子之平均

表現量，進行熱圖分析，結果與$CD45RA^{-}CCR7^{-}CD4^{+}$T細胞比較，發現$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞中有意較強表現T-bet及CXCR3，CD27有意較弱表現(圖12b、c)。並非$CD45RA^{-}CCR7^{-}$而藉由稱為$CD62L^{low}$之單一標記，可區別比較同質之$CD62L^{low}CD45RA^{-}CCR7^{-}CD27^{-}$T-$bet^{+}CXCR3^{+}CD4^{+}$T細胞之部分群。本發明者對$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞與PD-1、LAG-3、及CTLA-4之表現之相關進行調查。並非$CCR7^{-}CD45RA^{-}CD4^{+}$T細胞，$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞與$CD62L^{low}CD4^{+}$細胞中之PD-1及LAG-3之表現正相關，亦與$CD8^{+}T_{EMRA}$細胞中之PD-1之表現正相關(圖13a-c、圖18a-c)。並且，與$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞中之CTLA-4之表現負相關(圖13d、圖18d)。

【0188】

(實施例7：應答患者與非應答患者中之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之基因表現)

其次，本發明者進行微陣列分析，對應答患者與非應答患者之間之分子等級下之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之不同進行調查。因此，首先，對$CD62L^{high}CD4^{+}$T細胞與$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞中之基因表現之不同進行明確。如此，$CD62L^{high}CD4^{+}$T細胞與$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞具有不同之基因表現譜(圖14a)。一般認為與以前之報告吻合，$CD62L^{high}CD4^{+}$T細胞之大部分為初始T細胞。其原因在於，於全部患者之$CD62L^{high}CD4^{+}$T細胞中，較強表現C-C chemokine receptor type 7(CCR7)、CD28及transcription factor 7(TCF7)之基因。$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞較強表現極光激酶A(AURKA)、C-C motif chemokine ligand 17(CCL17)、顆粒酶A及H(GZMA及GZMH)、NADH去氫酶2(ND2)及interleukin 21(IL-21)。並且，將源自PR(部分起效)及SD(穩定)、PR及PD(進行)、SD及PD、

PR+SD及PD、以及PR及SD+PD之細胞間比較之作為印記之基因(分別為1884、1826、1410、1167及1513基因)與全部3458基因合併。該等之中，關於作為與T細胞免疫關聯已知之53之基因之內之30之表現，就對納武單抗治療之應答之觀點表示(圖14b)。其表示C-type lectin domain family 2 member A(CLEC2A)、interleukin 7(IL7)、transforming growth factor beta receptor 3(TGFBR3)、Interferon alfa(IFNA)、C-X-C chemokine receptor type 3(CXCR3)及histone deacetylase 9(HDAC9)於源自應答者之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞中優先表現。

【0189】

(實施例8：納武單抗治療後變化)

測定納武單抗(Nivolumab)治療之前後之各種各樣標記之變化。作為試驗之細胞比率，使用$CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞比率、$CD28^{+}CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞比率、$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率、$ICOS^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率、及$LAG3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率。該等之中，$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率最良好相關，納武單抗治療後有意減少(P＝0.0001)(圖5)。

【0190】

其次，自納武單抗治療前及治療4週後之起效群(應答者 圖6左)及無效群(非應答者 圖6右)製備$CD4^{+}$T細胞，試驗$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率。其結果，起效群下之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率之降低較無效群下之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率之降低更良好相關(圖6起效群P＝0.0016、無效群P＝0.32)。該起效群之相關關係較$LAG3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率之情形之相關關係、或$CD28^{+}CD62L^{low}CD8^{+}$T細胞比率之情形之相關關係

更良好(資料未表示。

【0191】

其次，自納武單抗治療開始後12～92週之患者群製備PBMC。具體而言，分別關於自治療開始平均63.3週後(28～92週)於治療開始後獲得治療耐性之患者群之6名(獲得性耐性 圖7圖表中央)、及自治療開始平均64.5週後(12～92週)於治療開始後依然對治療有應答性之患者群之8名(持續應答 圖7圖表左)，製備PBMC。作為對照，於治療開始時間點，自治療耐性之患者群之5名(原發耐性 圖7圖表右)製備PBMC。表示將$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率(即，總$CD4^{+}$T細胞群中之$CD62L^{low}$T細胞之比率、圖7左之圖表)、以及$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率設為「X」，將$CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率(即，總$CD4^{+}$T細胞群中之$CD25^{+}FOXP3^{+}$T細胞之比率)設為「Y」時之X^2/Y(圖7右之圖表)。將$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率(圖7左)及$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率設為「X」且將$CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率設為「Y」時之X^2/Y(圖7右)之任一者中，治療開始後依然對治療有應答性之患者群中表示優勢較高之值。該結果關於如納武單抗般之檢查點抑制劑之治療後是否依然對治療有應答性之患者，判明將$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率及$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率設為「X」且將$CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率設為「Y」時之X^2/Y之任一者為良好之預測指標。於以$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率為指標之情形時，P＝0.0088，於以X^2/Y為指標之情形時，P＝0.017。

【0192】

(實施例9：對長期無惡化存活有特徵之標記)

如前所述，可知圖1中亦可見之長期無惡化存活群於圖2之無惡化存

活曲線中，構成18個月以後可見之長尾(Tail Plateau)。因此，本發明者將無惡化存活時間為＞500天之患者定義為長期應答者，將當初應答治療但獲得耐性，納武單抗療法後500天以內呈現疾病之發展之患者定義為短期應答者。

納武單抗治療開始後500天以上之源自長期無惡化存活群之患者之PBMC及治療開始時為起效群，但製備其後表示惡化之患者群之PBMC，比較兩者。將其結果示於圖8。圖8係關於長期無惡化存活群(LR)、短期起效群(SR)、及無效群(NR)，表示$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率之圖表(圖8左)，及將$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率設為「X」且將$CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率設為「Y」時之X^2/Y的圖表(圖8右)。長期無惡化存活群(LR)表示500天以上未表示惡化之患者群。短期起效群(SR)表示自治療開始至少9週為部分起效群(PR)或穩定群(SD)，但其後疾病發展之患者群。無效群(NR)表示自納武單抗治療開始後9週以內疾病發展之患者群。統計學處理係使用作為Student之對應之t檢定。

【0193】

將$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率(圖8左)、及$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率設為「X」，將$CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率設為「Y」時之X^2/Y(圖8右)之任一者均為預測長期無惡化存活群(LR)及短期起效群(SR)優異之指標，因此判明為預測長期存活之優異之指標。

【0194】

根據該結果，若計算500天無惡化存活作為長期存活者，則於$\%CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞＞35.3%之情形時，達成感度50%、特異度88.1%，$P<0.0001$。於設為$X^2/Y>404.5$之情形時，達成感度62.5%、特

異度84.2%，P＜0.0001。

【0195】

若進而增加樣品將預測式之閾值設為以ROC曲線之相似度比最大之點的323.5，則感度與特異度分別為68.2%及81.7%(圖15)。

【0196】

根據上述結果，於X^2/Y為一定之數值以上之情形(例如，X^2/Y＞323.5或X^2/Y＞404.5等)，預測藉由癌症免疫療法之長期存活。

【0197】

亦如WO2018/147291所記載，於X^2/Y未達一定之數值之情形時，預測為無效群。因此，於藉由癌症免疫療法進行治療之情形時，使用X($CD62L^{low}CD4^+$細胞比率)及Y($CD25^+FOXP3^+CD4^+$T細胞比率)，預先決定常數「α」，於X^2/Y＜α之情形時，無法期待藉由癌症免疫療法之效果，及/或判斷為應變更成其他治療法，及/或與其他治療法併用。進而，除「α」外預先決定「β」，於β＜X^2/Y之情形時，預測藉由癌症免疫療法之長期存活，故而例如可以一次投予結束，或者，可判斷為應以一次投予結束。或者，該等中間即α≦X^2/Y≦β可相應獲得藉由癌症免疫療法之效果，為獲得長期存活，可判斷為進而繼續治療，或應研究與其他治療法之併用。

【0198】

來自ROC曲線之截止值之決定可使用該技術領域中公知之方法。例如，除採用上述「使相似度比最大之值」作為閾值之方法外，存在採用來自圖表之左上邊之距離最小之點之值的方法、採用Youden Index(感度＋特異度－1)為最大之點之值的方法(http://www.med.osaka-

u.ac.jp/pub/kid/clinicaljournalclub6.html 、 http://www.snap-tck.com/room04/c01/stat/stat09/stat0902.html)。

【0199】

(考察1)

一般認為$CD62L^{low}CD4^{+}$細胞亞群降低對二次淋巴器官之導向分子之表現，為與腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群。又，一般認為$ICOS^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群亦為與腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群。$HLA\text{-}DR^{+}CD141^{+}CD11c^{+}$樹狀細胞亞群為起因於$CD4^{+}$T細胞群中之導向分子之表現降低之細胞亞群之增加而增加之樹狀細胞亞群，因此一般認為與腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群。

【0200】

由上述之結果暗示，藉由使用與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^{+}$T細胞亞群及/或與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群，可預測於癌症免疫療法下之長期存活。

【0201】

又，如實施例8及實施例9所示，使用將$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率、及$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞比率設為「X」，將$CD25^{+}FOXP3^{+}CD4^{+}$T細胞比率設為「Y」時之X^2/Y，可選擇於癌症免疫療法後繼續起效群之患者。

【0202】

具有$CD62L^{low}CD4^{+}$細胞亞群強正相關之T細胞亞群係類型1輔助$CD4^{+}$T細胞(Th1)、效應記憶$CD4^{+}$T細胞、$CD8^{+}$T細胞、效應$CD8^{+}$T細胞。該等係於細胞性免疫中對殺細胞功能重要之細胞亞群。另一方面，具

有負相關者係類型2輔助$CD4^+$T細胞(Th2)、控制性T細胞。該等作為抑制細胞性免疫之細胞亞群而已知。藉此，$CD62L^{low}CD4^+$細胞亞群之增加表示抗腫瘤細胞性免疫之活化，表示減少妨礙其之細胞亞群。又，$CD62L^{low}CD4^+$細胞亞群與$CD4^+$T細胞、$CD8^+$T細胞上之LAG3、ICOS、PD-1、CTLA-4表現具有有意相關關係，藉此控制其抗腫瘤免疫功能。具體而言，$CD62L^{low}CD4^+$細胞亞群之增加與PD-1、LAG-3、ICOS表現增加相關，與CTLA-4表現減少相關。一般認為其表示抗腫瘤免疫主要由PD-1、LAG-3控制，藉此與該等免疫檢查點抑制治療之有效性關聯。進而，$HLA\text{-}DR^+CD141^+CD11c^+$樹狀細胞亞群與$CD62L^{low}CD4^+$細胞亞群具有正相關關係。一般認為其藉由活化之樹狀細胞表現出MHCclassII拘束性抗原，而增加識別MHCclassII拘束性抗原之$CD62L^{low}CD4^+$細胞亞群，為與腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群。一般認為$HLA\text{-}DR^+CD141^+CD11c^+$樹狀細胞亞群為與腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群。

【0203】

(考察2)

關於癌症免疫療法之研究可對腫瘤微小環境中之$CD8^+$T細胞照射焦點。其原因在於，CTL自$CD8^+$T細胞分化，藉由腫瘤抗原之識別而誘發腫瘤細胞之死。然而，發明者等人，證實末梢血液中之$CD4^+$T細胞之免疫狀態係決定NSCLC患者中之PD-1遮斷療法之臨床成績的重要之因子，並且從屬於$CD62L^{low}$T細胞之比率及$CD25^+FOXP3^+CD4^+$T細胞之比率之間之比率的式不僅區別非應答者亦區別長期存活者。藉由支援$CD4^+$T細胞而促進CTL之引發、轉移能力、毒殺活性、及存活，故而蓄積有效之抗腫瘤免

疫表示必需有$CD4^+$T細胞之證據。並且，為增強CTL之產生、傳遞、及毒殺活性，必須$CD4^+$T細胞於全身存在。使用質譜流式細胞術Spitzer等(Spitzer MH et al., Cell 2017; 168(3): 487-502 e15)對確立足夠根除腫瘤之抗腫瘤免疫之小鼠之腫瘤浸潤淋巴球、腫瘤流入區域淋巴結、末梢血液、脾臟、及骨髓進行調查，發現$CD62L^{low}CD27^-T\text{-}bet^+CD44^+CD69^+CD90^+CD4^+$T細胞叢於全部調查部位非常濃縮，以抗腫瘤應答為媒介。他們亦證實經由末梢血液之抗腫瘤T細胞之繼續吸收於持續抗腫瘤應答中係必需。另一方面，Wei等人(Wei SC et al., Cell 2017; 170(6): 1120-33e17對黑色素瘤浸潤淋巴球進行調查，證實幾乎相同表現型$CD4^+$T細胞($CD62L^{low}CD27^-FOXP3^-CD44^+CXCR3^+ICOS^+T\text{-}bet^+$)與對免疫檢查點抑制劑之應答相關。與該等研究吻合，本發明者之藉由質譜流式細胞術之研究中，表示$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之大部分於$CD4^+$群中為$T\text{-}bet^+$、$CD27^-$、$FOXP3^-$且$CXCR3^+$。另一方面，於非應答者與應答者之間未表示差異之$CCR7^-CD4^+$T細胞之部分群包含範圍寬於$T\text{-}bet^-$、$CD27^+$、及$FOXP3^+$之部分群等之部分群。$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分群與$CXCR3^+CCR4^-CCR6^-$細胞強相關，即，$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分群實現細胞免疫中作為Th1細胞之重要的作用。因此，$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分群與效應$CD8^+$T細胞之比率正相關。有意思為$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分群與PD-1之表現正相關，但與CTLA-4之表現負相關。因此，一般認為$CD62L^{low}CD27^-FOXP3^-CXCR3^+T\text{-}bet^+CD4^+$T細胞之部分群構成包含Th1T細胞及效應$CD8^+$T細胞之細胞免疫性T細胞網絡，該等細胞顯示並非CTLA-4而由PD-1調節。

【0204】

預料外的是納武單抗療法後，觀察到$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之比率於應答患者中減少，但於非應答患者中未減少。其原因在於，證實有效之抗PD-1療法後，末梢血液中$PD\text{-}1^{+}$效應$CD8^{+}$T細胞增加。然而，Wei等人(Wei SC et al., Cell 2017; 170(6): 1120-33 e17證實PD-1遮斷療法僅增加黑色素瘤浸潤淋巴球內之$CD8^{+}$抗腫瘤T細胞叢，未減少$CD4^{+}$抗腫瘤T細胞叢。因此，有利用PD-1遮斷療法無法促進抗腫瘤$CD4^{+}$T細胞之增殖之可能性。以前報告有納武單抗療法後之應答患者中腫瘤基因變異量(tumor-mutation burden)減少。有效之PD-1遮斷療法可能使免疫編輯程式活化，亦帶來以較高之基因變異量為特徵之癌純系之減少。因此，本發明者之發現有可能表示作為癌症相關抗原之喪失之結果產生的特定之效應T細胞喪失。

僅保持$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之患者於納武單抗療法期間顯示持續之抗腫瘤應答，故而獲得耐性之根本之機制之一包含腫瘤相關抗原之喪失，可能使$CD4^{+}$T細胞之支援枯竭。由本發明者之研究可知，納武單抗療法前顯示較高之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之比率、維持$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞部分群之患者有疾病未發展，存活500天以上之傾向。因此，有希望之療法必然伴隨治療(例如，抗CTLA-4療法)引起之$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞部分群之增加、以及末梢血液T細胞之部分群之監視。

【0205】

藉由基因表現分析，明確於$CD62L^{high}$T細胞與$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞之間基因表現譜不同(圖14a)。$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞表現編碼極光激酶A、CD101、顆粒酶A及H、ND2以及IL-21之基因。極光激酶A於有絲分裂細胞中於G2-M期表現，對維持T細胞中之TCR參與後之Lck活性為必

需，CD101於藉由CD3而活化之T細胞表現。顆粒酶A及H於CLT及自然殺手細胞等具有毒殺活性之細胞中表現。報告有活化之$CD4^+$T細胞可表現顆粒酶，可以抗腫瘤應答為媒介(Hirschhorn-Cymerman D et al., J Exp Med 2012; 209 (11): 2113-26)。ND2係NADH 去氫酶酵素之線粒體編碼之7個次單元中之一。證實IL-21增強、維持$CD8^+$T細胞之應答，帶來持續性抗腫瘤免疫。總結：$CD62L^{low}CD4^+$T細胞之部分群包含藉由TCR參與之活化後增殖之T細胞，該T細胞顯示效應功能，增強$CD8^+$T細胞之毒殺活性。尤其CCL19、IL7、CXCR3、CLEC2A、TGFBR3、及HDAC9等一部分之基因於源自PR及/或SD之$CD62L^{low}CD4^+$T細胞中優先表現(圖14b))。CCL19結合於CCR7，引誘包含樹狀細胞及$CCR7^+$中央記憶細胞之免疫系之一定之細胞。IL-7(關於T細胞增殖之非冗長之細胞激素)之訊號傳遞促進抗腫瘤T細胞免疫。有趣的是，報告有CAR-T細胞中之IL-7及CCL19之表現改善免疫細胞之浸潤及腫瘤中之CAR-T之存活(Adachi K et al., Nat Biotechnol 2018; 36(4): 346-51)。CLEC2A係使由TCR刺激之T細胞之增殖藉由增加其存活率而增強。TGF β具有對複數個類型之免疫細胞有影響之範圍較寬之調節活性。可溶性TGFBR3可能抑制TGF β訊號傳遞。HDAC9控制FOXP3表現來抑制Treg功能。因此，該等分子可能實現促進T細胞之活化，抑制調節機制，並且增加抗腫瘤性效應T細胞之量之作用。該等可能代表增強抗腫瘤免疫療法之有希望之標的。

【0206】

作為結論，發明者證實使用末梢血液之全身性$CD4^+$T細胞免疫之監控對預測抗PD-1療法之應答有用。本發明者開發了可作為用以基於$CD62L^{low}CD4^+$T細胞及Treg之比率預測治療成績之生物標記起作用之

式。本發明者之發現支援用於全部潛在性應答患者之抗PD-1療法之準備，提供一種關於呈現不同$CD4^+$T細胞免疫狀態之患者之新的治療策略之基礎，故而具有重要之臨床上之意義。

【0207】

根據上述結果，表示可藉由使用與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群及/或與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群，而預測癌症免疫療法下之長期存活。

【0208】

(實施例10：帕博利珠單抗之治療)

如以下確認使用帕博利珠單抗之治療之情形時亦獲得與納武單抗治療同樣之結果。

10-1.材料及方法

(1)患者

以下之實驗係以18歲以上之IV或IIIB-C期之PD之NSCLC患者中PD-L1之TPS(Tumor Proportion Score，腫瘤比率分數)為50%以上、無EGFR變異、ALK易位者54名為對象，於單一設施(埼玉醫科大學國際醫療中心)中，自2017年3月至2018年11月進行。PD-L1之TPS係使用PD-L1 IHC 22C3 pharmaDx，依據常法進行。

對患者作為第一線治療每3週投予帕博利珠單抗200 mg/kg之用量。獲得受到埼玉醫科大學國際醫療中心之臨床試驗審查委員會認可之書面知情同意後，採取試樣。

除去無法評價之5名，對49名患者進行解析。合併完全起效(complete response;CR)及部分起效(partial response;PR)之總起效率(overall response

rate;ORR)為45.7%，合併完全起效(CR)、部分起效(PR)及穩定(stable disease;SD)之病情控制率(disease control rate;DCR)為73.9%(圖21A)。

(2)與上述實施例1～9之(材料及方法)同樣進行血液試樣之分析、及(4)統計分析。

10-2.帕博利珠單抗治療下之經過

將藉由與實施例1同樣之方法製作之無惡化存活(PFS)曲線與總存活(OS)曲線分別示於圖21B及圖21C。PFS曲線係490天以後、OS曲線係637天以後成為長尾。以後之分析中，將分別達成長尾之群作為長期存活群。

10-3.FACS Calibur解析

藉由與實施例2同樣之方法進行。取各種細胞亞群之比，將調查該比與PFS之相關的結果示於表6A，又，將調查與OS之相關的結果示於表6B。

[表6A]

A.

	PFS vs. CD4	PFS vs. CD62Llow /CD4＋CD3＋	PFS vs. CD62LlowCD4＋ /CD3＋	PFS vs. CCR7＋CD45RA＋ /CD4＋CD3＋	PFS vs. CCR7＋CD45RA－ /CD4＋CD3＋	PFS vs. CCR7－CD45RA＋ /CD4＋CD3＋	PFS vs. CCR7－CD45RA－ /CD4＋CD3＋
皮爾遜r	-0.01606	0.4885	0.527	-0.3445	0.03298	0.1314	0.4463
95%信賴區間	-0.2959至0.2663	0.2403至0.6767	0.2885至0.7039	-0.5704至-0.07006	-0.2505至0.3113	-0.1556至0.3979	0.1888至0.6464
R平方	0.0002579	0.2386	0.2777	0.1187	0.001088	0.01726	0.1992
P值(雙尾)	0.9128	0.0004	0.0001	0.0154	0.822	0.3682	0.0013
P值總結	ns	***	***	*	ns	ns	**
有意義？(α＝0.05)	否	是	是	是	否	否	是
XY對之數		49	49	49	49	49	49

49	PFS vs. CD8＋	PFS vs. CD62Llow /CD8＋CD3＋	PFS vs. CCR7＋CD45RA＋ /CD8＋	PFS vs. CCR7＋CD45RA－ /CD8＋	PFS vs. CCR7－CD45RA＋ /CD8＋	PFS vs. CCR7－CD45RA－ /CD8＋
皮爾遜r	-0.07892	-0.0829	-0.1024	0.1377	-0.1275	0.1812
95%信賴區間	-0.3523至0.2069	-0.3558至0.2030	-0.3728至0.1841	-0.1493至0.4033	-0.3946至0.1594	-0.1054至0.4400
R平方	0.006228	0.006873	0.01048	0.01896	0.01626	0.03283
P值(雙尾)	0.5899	0.5712	0.4839	0.3455	0.3826	0.2128
P值總結	ns	ns	ns	ns	ns	ns
有意義？ (α＝0.05)	否	否	否	否	否	否
XY對之數		49	49	49	49	49

	PFS vs. CXCR5＋ /EM＋CM CD4＋	PFS vs. CXCR3＋CCR6－ /EM＋CM CD4＋	PFS vs. CCR4＋CXCR3－ CCR6－ /EM＋CM CD4＋	PFS vs. CXCR3－CCR6＋ /EM＋CM CD4＋	PFS vs. CD25＋Foxp3＋ /CD4＋
皮爾遜r	0.1555	0.1264	-0.3015	0.2637	-0.1569
95%信賴區間	-0.1315至0.4184	-0.1605至0.3936	-0.5372至-0.02221	-0.01885至0.5073	-0.4195至0.1301
R平方	0.02417	0.01597	0.09091	0.06956	0.0246
P值(雙尾)	0.2861	0.3869	0.0353	0.0671	0.2818
P值總結	ns	ns	*	ns	ns
有意義？(α＝0.05)	否	否	是	否	否
XY對之數		49	49	49	49

[表6B]

B.

	OS vs. CD4	OS vs. CD62Llow /CD4＋CD3＋	OS vs. CD62LlowCD4＋ /CD3＋	OS vs. CCR7＋CD45RA＋ /CD4＋CD3＋	OS vs. CCR7＋CD45RA－ /CD4＋CD3＋	OS vs. CCR7－CD45RA＋ /CD4＋CD3＋	OS vs. CCR7－CD45RA－ /CD4＋CD3＋
皮爾遜r	0.08876	0.36664	0.3788	-0.1914	-0.09773	0.02026	0.3406
95%信賴區間	-0.1974至0.3610	0.09496至0.5871	0.1092至0.5964	-0.4485至0.09490	-0.3688至0.1887	-0.2624至0.2997	0.06567至0.5674
R平方	0.007879	0.1342	0.1435	0.03663	0.009551	0.0004103	0.116
P值(雙尾)	0.5442	0.0096	0.0073	0.1877	0.5041	0.8901	0.0166
P值總結	ns	**	**	ns	ns	ns	*
有意義？ (α＝0.05)	否	是	是	否	否	否	是
XY對之數		49	49	49	49	49	49

	OS vs. CD8＋	OS vs. CD62Llow /CD8＋CD3＋	OS vs. CCR7＋CD45RA＋ /CD8＋	OS vs. CCR7＋CD45RA－ /CD8＋	OS vs. CCR7－CD45RA＋ /CD8＋	OS vs. CCR7－CD45RA－ /CD8＋
皮爾遜r	-0.1509	-0.1546	0.07195	0.09578	-0.179	0.0643
95%信賴區間	-0.4145至0.1360	-0.4177至0.1323	-0.2136至0.3461	-0.1905至0.3671	-0.4381至0.1076	-0.2209至0.3394
R平方	0.02278	0.02391	0.005176	0.009174	0.03203	0.004135
P值(雙尾)	0.3006	0.2887	0.6232	0.5127	0.2185	0.6607
P值總結	ns	ns	ns	ns	ns	ns
有意義？(α＝0.05)	否	否	否	否	否	否
XY對之數		49	49	49	49	49

	OS vs. CXCR5＋ /EM＋CM CD4＋	OS vs. CXCR3＋CCR6－ /EM＋CM CD4＋	OS vs. CCR4＋CXCR3－ CCR6－ /EM＋CM CD4	OS vs. CXCR3－CCR6＋ /EM＋CM CD4	OS vs. CD25＋Foxp3＋ /CD4＋
皮爾遜r	0.1847	0.08262	-0.3053	0.2268	-0.2237
95%信賴區間	-0.1018至0.4429	-0.2033至0.3556	-0.5401至-0.02633	-0.05815至0.4775	-0.4750至0.06132
R平方	0.03412	0.006826	0.09319	0.05142	0.05006
P值(雙尾)	0.2039	0.5725	0.0329	0.1172	0.1223
P值總結	ns	ns	*	ns	ns
有意義？(α＝0.05)	否	否	是	否	否
XY對之數		49	49	49	49

$CD62L^{Low}/CD4^{+}CD3^{+}$ 、 $CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$ 、 $CCR7^{-}CD45RA^{-}/CD4^{+}$發現有意相關，但於$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$發現最強相關，與h2可見負相關。

又，將PFS曲線下之長期存活群中之細胞亞群之比與OS曲線下之長期存活群中之細胞亞群之比及非長期存活群中之細胞亞群之比進行比較的結果示於表7。

[表7]

	CD4＋	**CD62Llow/CD4＋**	**CD62Llow**	CTLA-4	ICOS	LAG3	PD-1
	/CD3＋	**CD3＋**	**/CD4＋CD3＋**	/CD62LlowCD4	/CD62LlowCD4	CD62LlowCD4	/CD62LlowCD4
P值(雙尾)之%	0.92	**0.000032**	**0.0026**	0.16	0.061	0.35	0.89
			CCR7－CD45RA＋(EMRA)	CTLA－4	ICOS	LAG3	PD-1
			/CD4＋CD3＋	/CCR7－CD45RA＋CD4	/CCR7－CD45RA＋CD4	/CCR7－CD45RA＋CD4	/CCR7－CD45RA＋CD4
P值(雙尾) 之%			0.99	0.47	0.65	0.85	0.99
			CCR7－CD45RA＋(CM)	CTLA-4	ICOS	LAG3	PD-1
			/CD4＋CD3＋	/CCR7－CD45RA＋CD4	/CCR7－CD45RA＋CD4	/CCR7－CD45RA＋CD4	/CCR7－CD45RA－CD4
P值(雙尾) 之%			0.58	0.088	0.057	0.27	0.83
			CCR7－CD45RA－(EM)	CTLA-4	ICOS	LAG3	PD-1
			/CD4＋CD3＋	/CCR7－CD45RA－CD4	/CCR7－CD45RA－CD4	/CCR7－CD45RA－CD4	/CCR7－CD45RA－CD4
P值(雙尾)之%			**0.0063**	0.12	0.062	0.39	0.64
	CD8＋	CD62LlowCD8＋	CD62Llow	CTLA-4	ICOS	LAG3	PD-1
	/CD3＋	/CD3＋	/CD8＋CD3＋	/CD62LlowCD8	/CD62LlowCD8	/CD62LlowCD8	/CD62LlowCD8
P值(雙尾)之%	0.77	0.55	0.93	0.089	0.28	0.22	0.23
			CCR7－CD45RA＋(EMRA)	CTLA-4	ICOS	LAG3	PD-1
			/CD8＋	/CCR7－CD45RA＋CD8	/CCR7－CD45RA＋CD8	/CCR7－CD45RA＋CD8	/CCR7－CD45RA＋CD8
P值(雙尾)之%			0.29	0.10	0.31	0.35	0.36
			CCR7＋CD45RA－(CM)	CTLA-4	ICOS	LAG3	PD-1
			/CD8＋	/CCR7－CD45RA＋CD8	/CCR7－CD45RA＋CD8	/CCR7－CD45RA＋CD8	/CCR7－CD45RA＋CD8
P值(雙尾)之%			0.57	0.83	0.27	0.14	0.22
			CCR7－CD45RA－(EM)	CTLA-4	ICOS	LAG3	PD-1
			/CD8＋	/CCR7－CD45RA－CD8	CCR7－CD45RA－CD8	/CCR7－CD45RA－CD8	/CCR7－CD45RA－CD8
P值(雙尾)之%			**0.013**	0.10	0.11	0.17	0.13
		CXCR3＋CCR4－CCR6－	**CXCR3－CCR4＋CCR6－**	CXCR3－CCR4＋CCR6＋			
		(Th1)	**(Th2)**	(Th17)	nTreg	eTreg	CD25＋Foxp3(Treg)
		/EM＋CM CD4＋	**/EM＋CM CD4**	/EM＋CM CD4	/CD4＋	/CD4＋	/CD4＋
P值(雙尾)之%		0.33	**0.016**	0.44	0.48	0.52	0.42

PFS曲線不下降之到達長尾之長期起效患者與並非如此之患者之比較資料

$CD62L^{Low}CD4^{+}$與$CCR7^{-}CD45RA^{-}/CD4^{+}$、$CCR7^{-}CD45RA^{-}/CD8^{+}$存在有意義差，但最大有意義差存在於$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$

$CD62L^{Low}CD4^{+}/CD3^{+}$ 、 $CD62L^{low}/CD4^{+}CD3^{+}$ 、 $CCR7^{-}CD45RA^{-}/CD4^{+}CD3^{+}$ 、 $CCR7^{-}CD45RA^{-}/CD8^{+}$ 存在有意義差，但於$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$發現最強相關。

10-4.ROC解析及PFS、OS繪圖

藉由與實施例3同樣之方法進行。將以$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$為橫軸且以PFS或OS為縱軸繪圖之結果分別表示於圖21D及圖21E。

確認$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$與PFS、OS相關。關於PFS＜490之群與PFS ≧ 490 之群、OS ＜ 637 之群與OS ≧ 637之群，將對$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$繪圖之結果分別示於圖21F及圖21H。均確認到相關。

根據圖21F及圖21H之結果，分別將關於PFS以$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$＞17.6為閾值進行ROC解析之結果示於圖21G，將關於OS以

$CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$＞15.6為閾值進行ROC解析之結果示於圖21I。

PFS係p值0.0002、感度72.7%、特異度86.7%、AUC0.88，OS係p值0.0065、感度66.7%、特異度81.8%、AUC0.77，任一者均良好。$CD62L^{low}CD4^{+}CD3^{+}$細胞群之比率存在以$CD4^{+}CD3^{+}$為母群之情形($CD62L^{low}/CD4^{+}CD3^{+}$)、及以$CD3^{+}$為母群之情形($CD62L^{low}CD4^{+}/CD3^{+}$)(分子所記載之細胞具備所有分母所記載之細胞之特徵)，任一者均顯示同樣之結果。再者，上述結果顯示：與以$CD4^{+}CD3^{+}$為母群之情形相比，以$CD3^{+}$為母群之情形感度及特異度更良好。

10-5.藉由帕博利珠單抗之第一線治療與藉由納武單抗之第二線治療之比較

關於藉由帕博利珠單抗之第一線治療之患者(●)及藉由納武單抗之第二線治療之患者(○)，將以$CD62L^{low}/CD4^{+}$為橫軸且以PFS或OS為縱軸繪圖之結果分別示於圖22A及圖22B。

帕博利珠單抗治療群之PFS良好，但關於PFS、OS，每一$CD62L^{low}/CD4^{+}$之PFS之增加比率相同，可知若以$CD62L^{low}/CD4^{+}$為指標評價，則療法之治療效果顯示與納武單抗非常相似之傾向。其結果表示本發明提供所有癌症免疫療法(例如，所有免疫檢查點抑制療法)下之長期存活預測。

[產業上之可利用性]

【0209】

本發明可利用於癌症治療中。藉由本發明，可表示於癌症免疫療法前是否為長期存活型免疫狀態。又，藉由本發明，可表示癌症免疫療法開始後，長期存活型免疫狀態持續。藉由該等，可適當進行併用療法之必要

性之有無之決定、併用療法開始時期之決定、或者併用療法之中斷/中止時期之判斷。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種方法，其係將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標者，且

包含：分析自該受驗體獲得之該樣品中之細胞亞群之組成的步驟，

藉由該樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+T$細胞亞群之量與基準之比較，而預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活。

【請求項2】

一種方法，其係將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標者，且

包含：分析自該受驗體獲得之該樣品中之細胞亞群之組成的步驟，

藉由該樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量與基準之比較，而預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活。

【請求項3】

一種方法，其係將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標者，且

包含：分析自該受驗體獲得之該樣品中之細胞亞群之組成的步驟，

藉由該樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+T$細胞亞群之量與基準之比較，而預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之方法，其中藉由上述樣品中之選自由與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量及與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量所組成之群之至少兩個量與基準之比較，而預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活。

【請求項5】

如請求項1或4之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群係包含於$CD62L^{low}CD4^+$T細胞群之細胞亞群。

【請求項6】

如請求項5之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群係$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群。

【請求項7】

如請求項5之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群係$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群。

【請求項8】

如請求項2或4之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群係$HLA\text{-}DR^+CD141^+CD11c^+$細胞亞群。

【請求項9】

如請求項3或4之方法，其中與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群係包含於$CD62L^{low}CD8^+$T細胞群之細胞亞群。

【請求項10】

如請求項9之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群係$CD137^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群。

【請求項11】

一種方法，其係將針對選自由以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+$T細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+$T細胞亞群之量、

控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、及

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量

所組成之群之量(X、Y)的相對值作為該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活預測之指標者，且

包含：測定該X之步驟，及

測定該Y之步驟，

使用X相對於Y之相對值與基準之比較作為用以預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活之指標。

【請求項12】

如請求項11之方法，其中上述量(X)及(Y)分別選自由以下：

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量、

$CD137^+CD8^+$T細胞亞群之量、及

$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群。

【請求項13】

如請求項11之方法，其中上述量(X)係$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量，

及(Y)係$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量。

【請求項14】

如請求項11至13中任一項之方法，其中上述相對值為X/Y。

【請求項15】

如請求項11至13中任一項之方法，其中上述相對值為X^2/Y。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之方法，其中上述樣品係末梢血液樣品。

【請求項17】

如請求項1至16中任一項之方法，其中上述基準係上述癌症免疫療法前之上述受驗體之樣品中之上述細胞亞群之量、或預先決定之值。

【請求項18】

如請求項1至17中任一項之方法，其中上述樣品中之上述細胞亞群之量多於上述基準表示就上述受驗體預測到癌症免疫療法下之長期存活。

【請求項19】

如請求項1至17中任一項之方法，其中上述樣品中之上述細胞亞群之量少於上述基準表示就上述受驗體未預測到癌症免疫療法下之長期存活。

【請求項20】

如請求項1至19中任一項之方法，其中就上述受驗體未預測到癌症免疫療法下之長期存活之情形時，進而表示應對該受驗體實施併用療法。

【請求項21】

一種方法，其係如請求項1至20中任一項之方法，其進而規定為將自受驗體於複數個時間點獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為用以預測該受驗體之癌症免疫療法下之長期存活之指標的方法，且包含：分析自該受驗體於複數個時間點獲得之樣品中之細胞亞群之組成的步驟。

【請求項22】

如請求項15之方法，其中於上述X^2/Y為約324以上之情形時，預測長期存活。

【請求項23】

一種藥學組合物，其特徵在於包含用以處置受驗體中之癌症之免疫檢查點抑制劑，且

該藥學組合物係投予至藉由如請求項1至18或21至22中任一項之方法就該受驗體預測到癌症免疫療法下之長期存活之受驗體。

【請求項24】

如請求項23之藥學組合物，其中上述免疫檢查點抑制劑係PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

【請求項25】

一種組合醫藥，其特徵在於包含用以處置受驗體中之癌症之免疫檢查點抑制劑，且

該組合醫藥係投予至藉由如請求項1至22中任一項之方法就該受驗體未預測到癌症免疫療法下之長期存活之受驗體。

【請求項26】

如請求項25之組合醫藥，其中上述免疫檢查點抑制劑係PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

【請求項27】

如請求項25之組合醫藥，其包含選自由化學療法劑及另外癌症免疫療法所組成之群之醫藥。

【請求項28】

一種套組，其係用以判定就受驗體是否預測到癌症免疫療法下之長期存活者，且

包含對於選自由

・CD4及CD62L之組合、

・CD4及CCR7之組合、

・CD4、CD62L及LAG-3之組合、

・CD4、CD62L及ICOS之組合、

・CD4、CD62L及CD25之組合、

・CD4、CD127及CD25之組合、

・CD4、CD45RA及Foxp3之組合、

・CD4、CD25及Foxp3之組合、

・CD11c、CD141及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD141及CD80之組合、

・CD11c、CD123及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD123及CD80之組合、

・CD8及CD62L之組合、

・CD8及CD137之組合、以及

・CD28、CD62L及CD8之組合

所組成之群之標記之組合的檢測劑。

【請求項29】

一種套組，其係用以判定就受驗體是否癌症免疫療法中必需治療介入者，且

包含對於選自由

・CD4及CD62L之組合、

・CD4及CCR7之組合、

・CD4、CD62L及LAG-3之組合、

・CD4、CD62L及ICOS之組合、

・CD4、CD62L及CD25之組合、

・CD4、CD127及CD25之組合、

・CD4、CD45RA及Foxp3之組合、

・CD4、CD25及Foxp3之組合、

・CD11c、CD141及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD141及CD80之組合、

・CD11c、CD123及HLA-DR之組合、

・CD11c、CD123及CD80之組合、

・CD8及CD62L之組合、

・CD8及CD137之組合、以及

・CD28、CD62L及CD8之組合

所組成之群之標記之組合的檢測劑。

【請求項30】

一種方法，其係將自受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為就該受驗體之癌症免疫療法中必需治療介入之指標者，且

包含：分析自該受驗體獲得之該樣品中之細胞亞群之組成的步驟，

藉由該樣品中之與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+T$細胞亞群之量與基準之比較，而提供就該受驗體之癌症免疫療法中必需治療介入之指標。

【請求項31】

如請求項30之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+T$細胞亞群係包含於$CD62L^{low}CD4^+T$細胞群之細胞亞群。

【請求項32】

如請求項30之方法，其中上述與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+T$細胞亞群係$CD62L^{low}CD4^+T$細胞亞群。

【請求項33】

一種方法，其係將針對選自由以下：

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD4^+T$細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之藉由$CD4^+T$細胞之樹狀細胞刺激相關之樹狀細胞亞群之量、

與抗腫瘤免疫應答下之樹狀細胞刺激相關之$CD8^+T$細胞亞群之量、

控制性T細胞或與控制性T細胞相關之$CD4^+$T細胞亞群之量、及

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量

所組成之群之量(X、Y)之相對值作為就該受驗體之癌症免疫療法中必需治療介入之指標者，且

包含：測定該X之步驟，及

測定該Y之步驟，

將X相對於Y之相對值與基準之比較作為就該受驗體之癌症免疫療法中必需治療介入之指標。

【請求項34】

如請求項33之方法，其中上述量(X)及(Y)分別選自由以下：

$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$CCR7^-CD4^+$T細胞亞群之量、

$LAG\text{-}3^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$PD\text{-}1^+CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量、

$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量、

$HLA\text{-}DR^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD80^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD86^+$樹狀細胞亞群之量、

$PD\text{-}L1^+$樹狀細胞亞群之量、

$CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量、

$CD137^+CD8^+$T細胞亞群之量、及

$CD28^+CD62L^{low}CD8^+$T細胞亞群之量

所組成之群。

【請求項35】

如請求項33之方法，其中上述量(X)係$CD62L^{low}CD4^{+}$T細胞亞群之量，

及(Y)係$Foxp3^{+}CD25^{+}CD4^{+}$T細胞亞群之量。

【請求項36】

如請求項33至35中任一項之方法，其中上述相對值為X/Y。

【請求項37】

如請求項33至35中任一項之方法，其中上述相對值為X^2/Y。

【請求項38】

如請求項30至37中任一項之方法，其中上述治療介入為放射線治療。

【請求項39】

如請求項30至37中任一項之方法，其中上述治療介入係化學療法劑治療。

【請求項40】

如請求項37之方法，其中上述X^2/Y約未達324係必需治療介入之指標。

【請求項41】

如請求項37之方法，其中上述X^2/Y約174以上且約未達324係必需治療介入之指標，該治療介入包含除投予之癌症免疫療法外，進行化學療法、放射線療法、外科程序、或溫熱療法，或進行另外癌症免疫療法。

【請求項42】

如請求項37之方法，其中上述X^2/Y約未達174係必需治療介入之指標，該治療介入包含中止投予之癌症免疫療法，或除投予之癌症免疫療法外，進行化學療法、放射線療法、外科程序、或溫熱療法，或進行另外癌症免疫療法。

【請求項43】

一種組合醫藥，其特徵在於包含用以處置受驗體中之癌症之免疫檢查點抑制劑，且

該組合醫藥係投予至藉由如請求項30至42中任一項之方法判斷為於該受驗體中癌症免疫療法中必需治療介入之受驗體。

【請求項44】

如請求項43之組合醫藥，其中上述免疫檢查點抑制劑係PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

【請求項45】

如請求項43之組合醫藥，其包含選自由化學療法劑及另外癌症免疫療法所組成之群之醫藥。

【請求項46】

一種方法，其係將自治療前之作為癌症患者之受驗體獲得之樣品中之細胞亞群之組成作為決定對於該受驗體之治療方針之指標者，且包含以下：

測定自該受驗體獲得之該樣品中之$CD62L^{low}CD4^+$T細胞亞群之量(X)及$Foxp3^+CD25^+CD4^+$T細胞亞群之量(Y)的步驟，及

求出相對值X^2/Y之步驟，

進而包含選自由以下步驟所組成之群之步驟：

(a)關於相對值X^2/Y設定閾值α，於該X^2/Y未達閾值α時，判斷受檢體為對於癌症免疫療法之不應答者的步驟；

(b)關於相對值X^2/Y設定閾值α及β，此處α＜β，並且於該X^2/Y為閾值α以上且未達閾值β之情形時，判斷受檢體為對於癌症免疫療法之短期應答者的步驟；以及

(c)關於相對值X^2/Y設定閾值β，於該X^2/Y為閾值β以上之情形時，判斷受檢體為對於癌症免疫療法之長期應答者的步驟。

【請求項47】

如請求項46之方法，其中上述閾值β係較上述閾值α大至少50之值。

【請求項48】

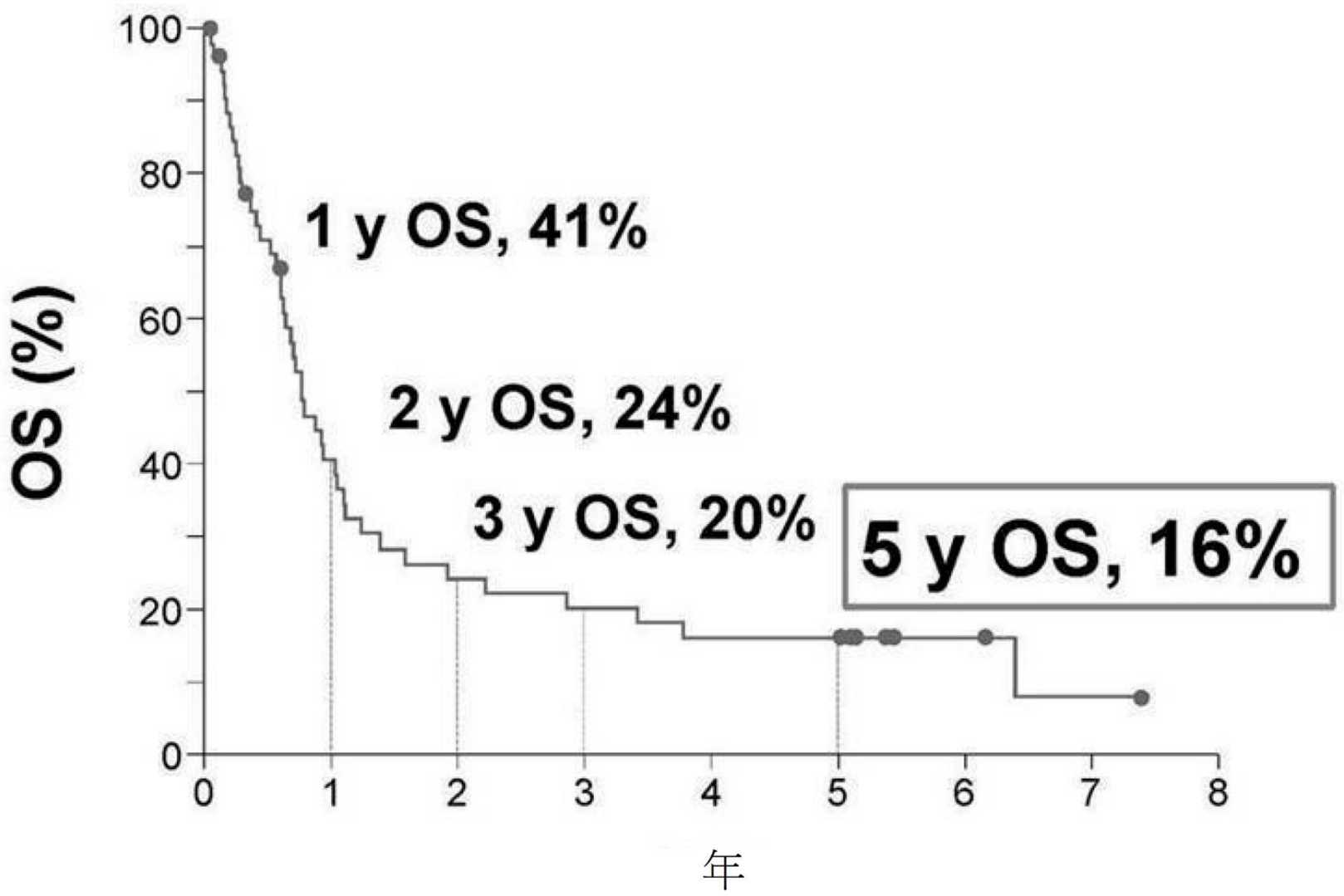
如請求項47之方法，其中上述閾值α係100～400之範圍內之值，

上述閾值β係150～450之範圍內之值。

【請求項49】

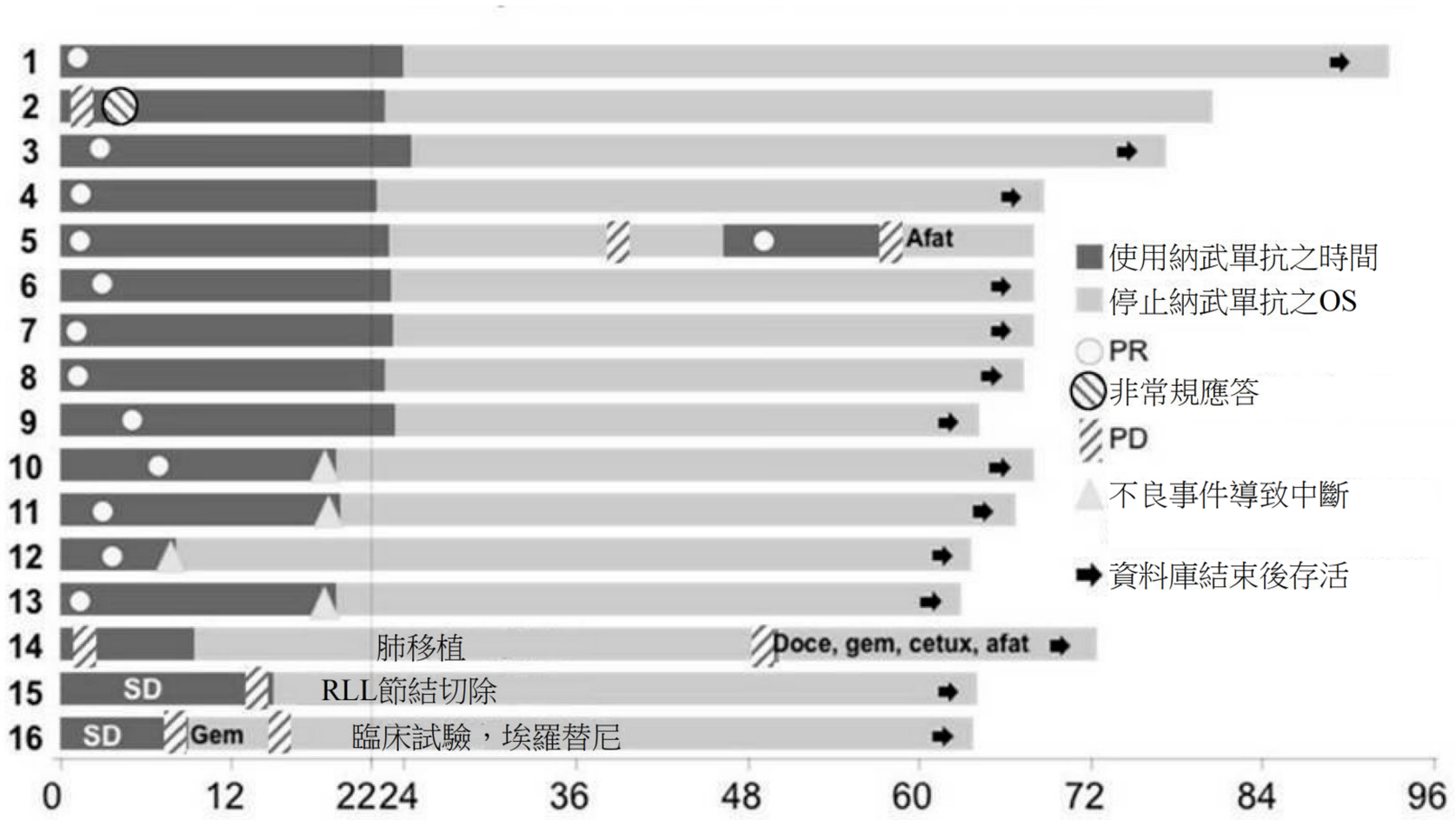
一種製品，其包含記載有如請求項46至48中任一項之方法之隨附文件、及免疫檢查點抑制劑。

【發明圖式】

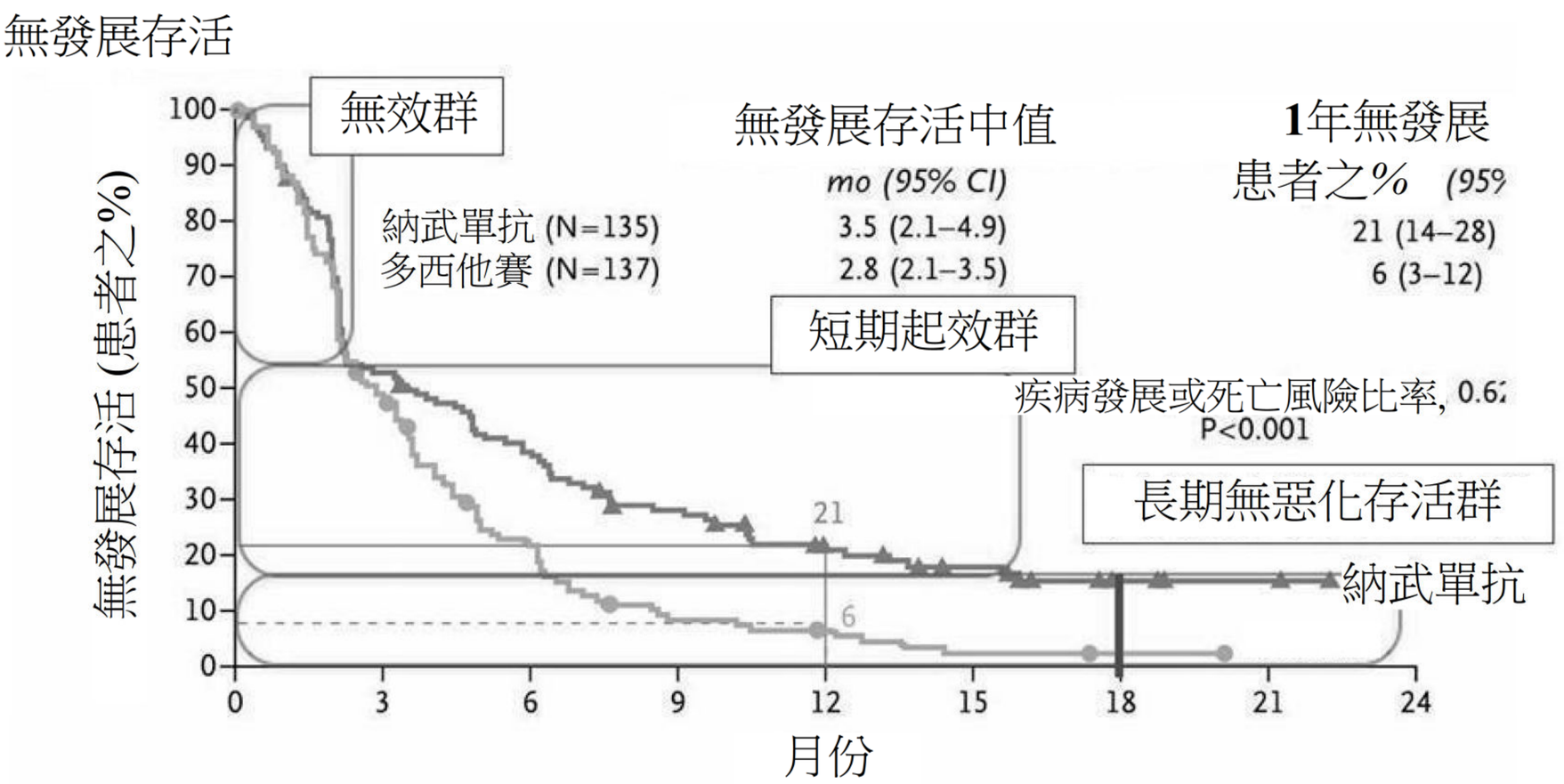


【圖1A】

5年存活者之後續治療(n＝16)
CA209-003 5年更新：第1階段納武單抗於晚期NSCLC中

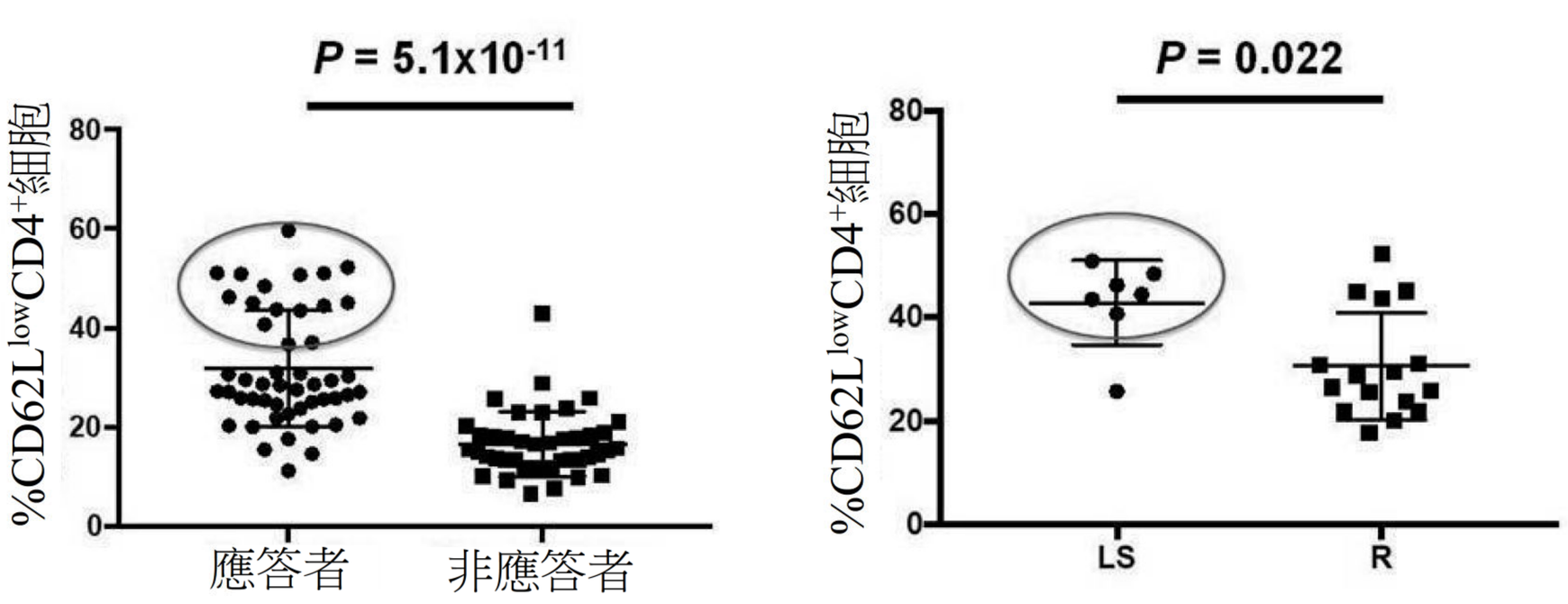


【圖1B】

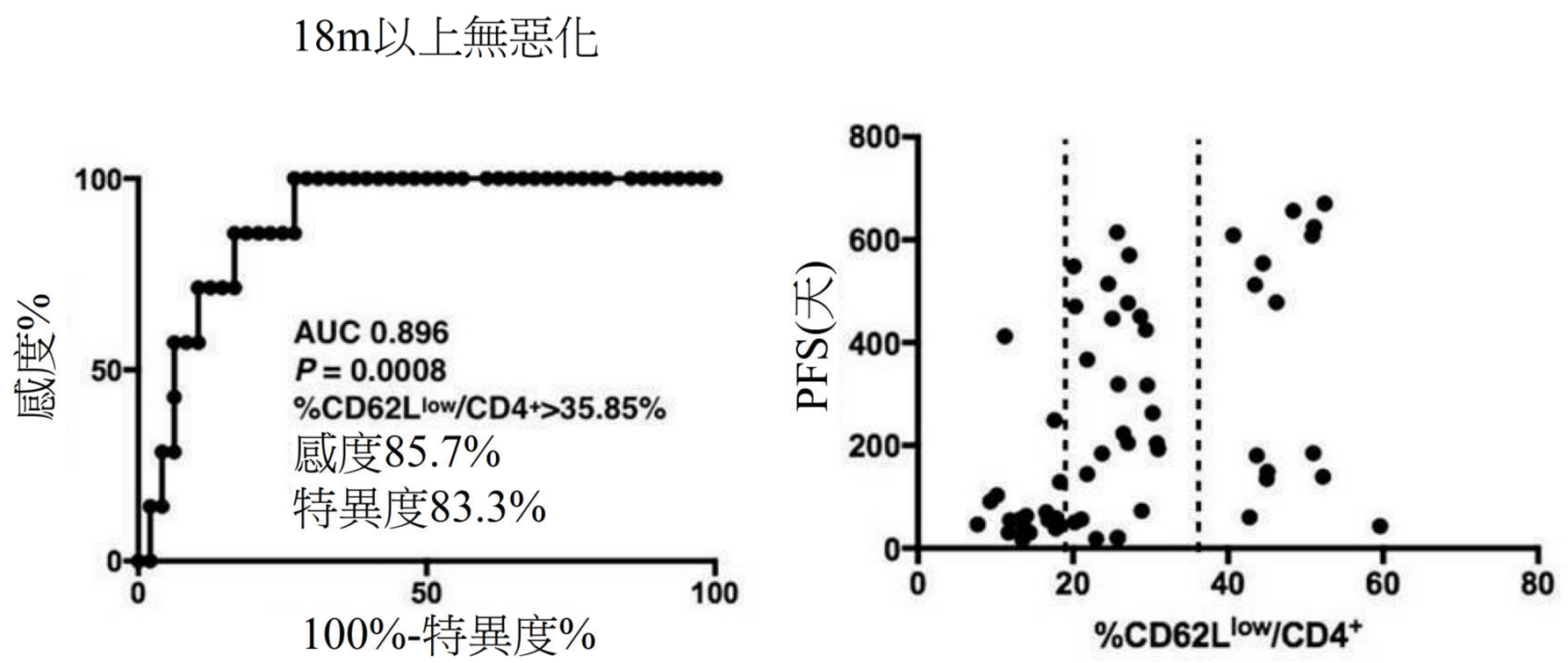


【圖2】

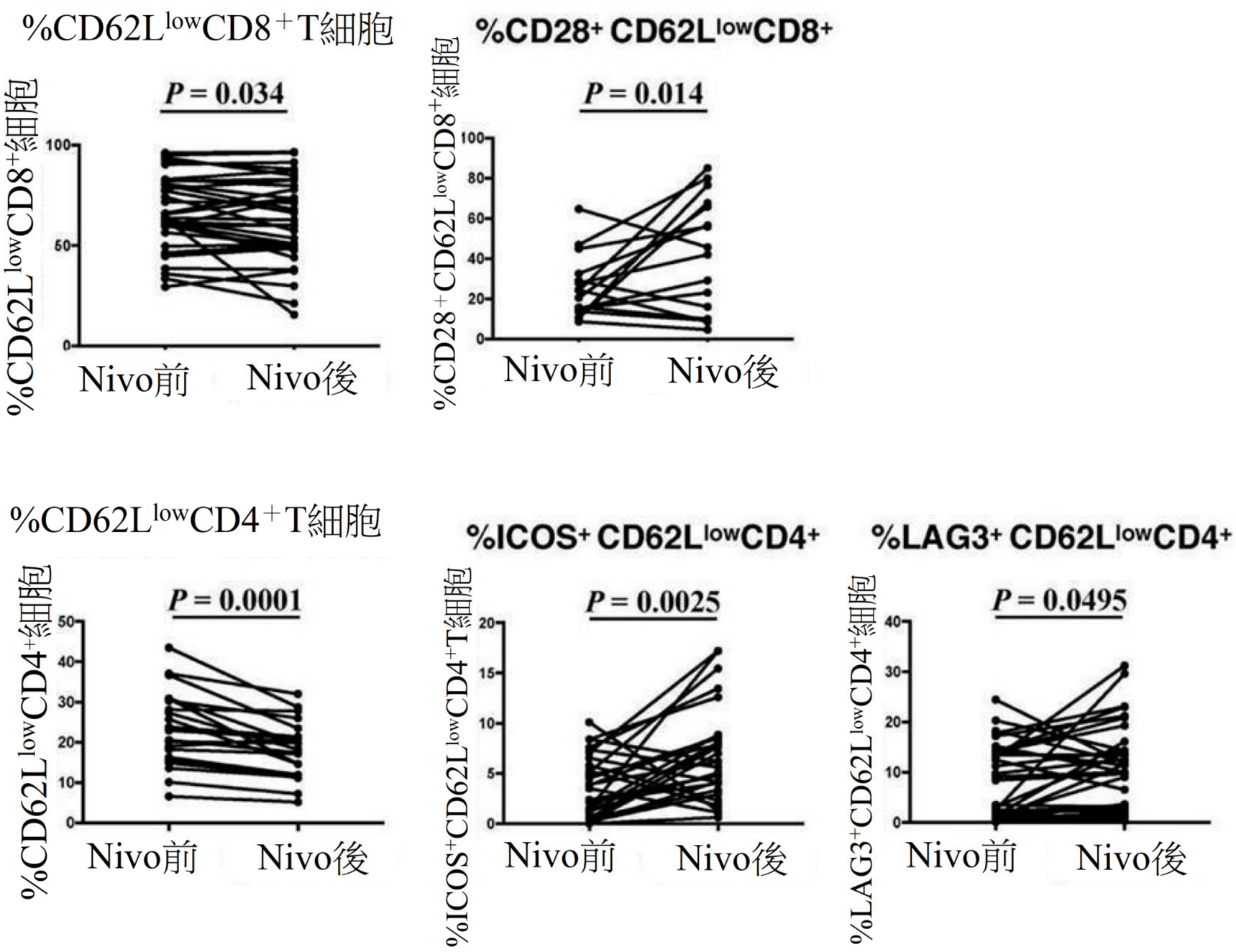
LS：＞**18m**無惡化長期存活群
R：暫時起效後病情惡化群



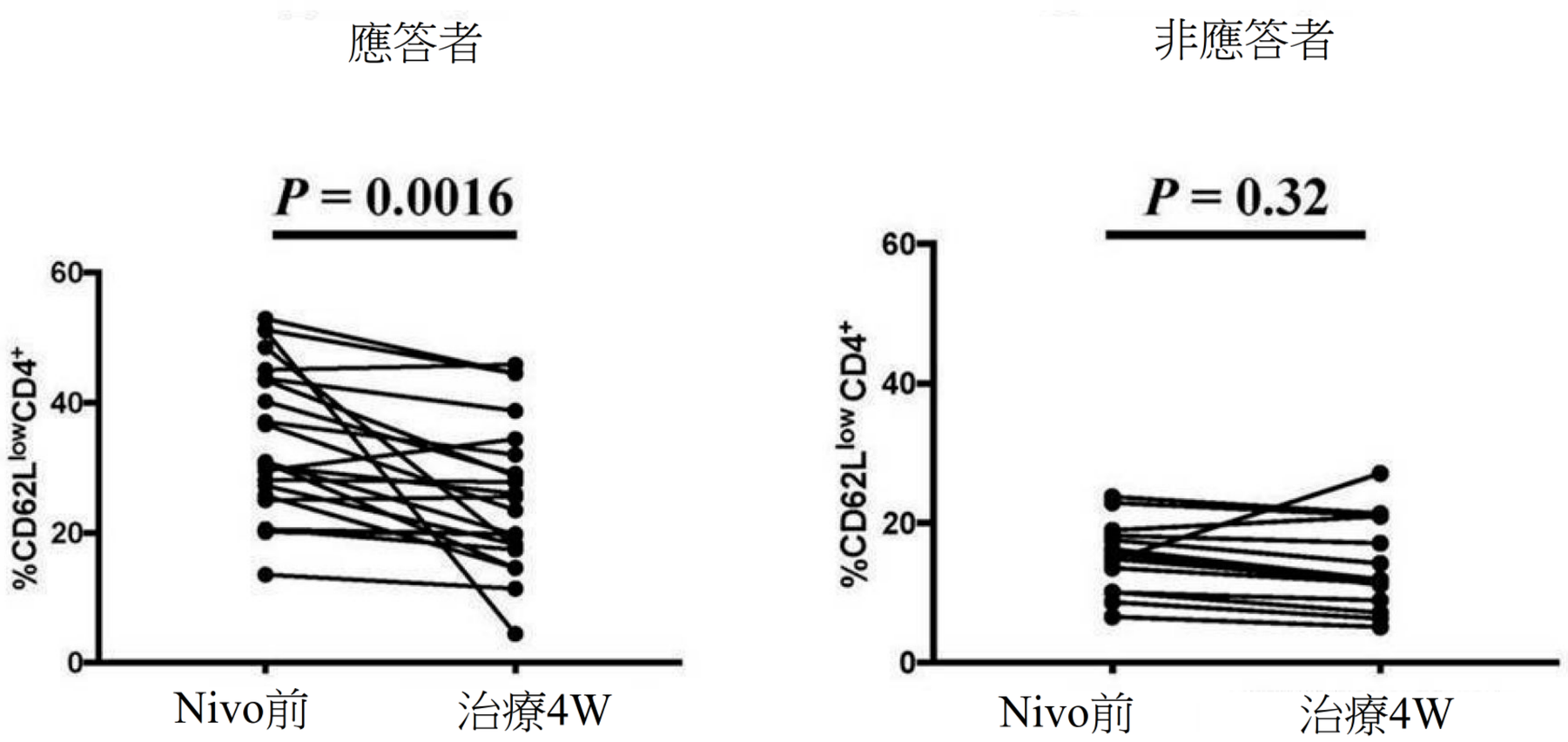
【圖3】


18m以上無惡化
感度%
100
50
0
0
50
100
100%-特異度%
AUC 0.896
P = 0.0008
%CD62Llow/CD4+>35.85%
感度85.7%
特異度83.3%
PFS(天)
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
%CD62Llow/CD4+

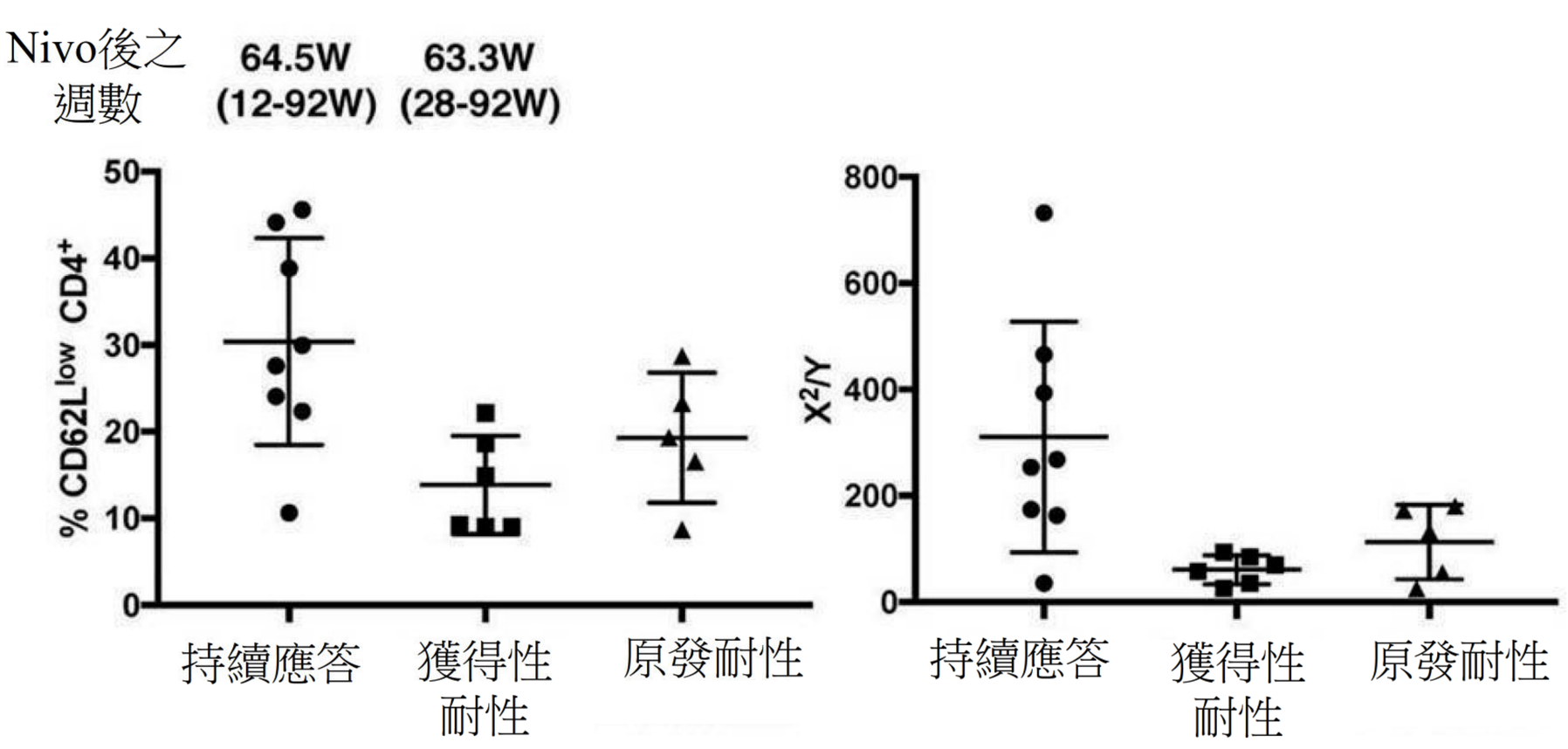
【圖4】


%CD62LlowCD8+T細胞
P = 0.034
%CD62LlowCD8+細胞
100
50
0
Nivo前
Nivo後
%CD28+ CD62LlowCD8+
P = 0.014
%CD28+CD62LlowCD8+細胞
100
80
60
40
20
0
Nivo前
Nivo後
%CD62LlowCD4+T細胞
P = 0.0001
%CD62LlowCD4+細胞
50
40
30
20
10
0
Nivo前
Nivo後
%ICOS+ CD62LlowCD4+
P = 0.0025
%ICOS+CD62LlowCD4+T細胞
20
15
10
5
0
Nivo前
Nivo後
%LAG3+ CD62LlowCD4+
P = 0.0495
%LAG3+CD62LlowCD4+細胞
40
30
20
10
0
Nivo前
Nivo後

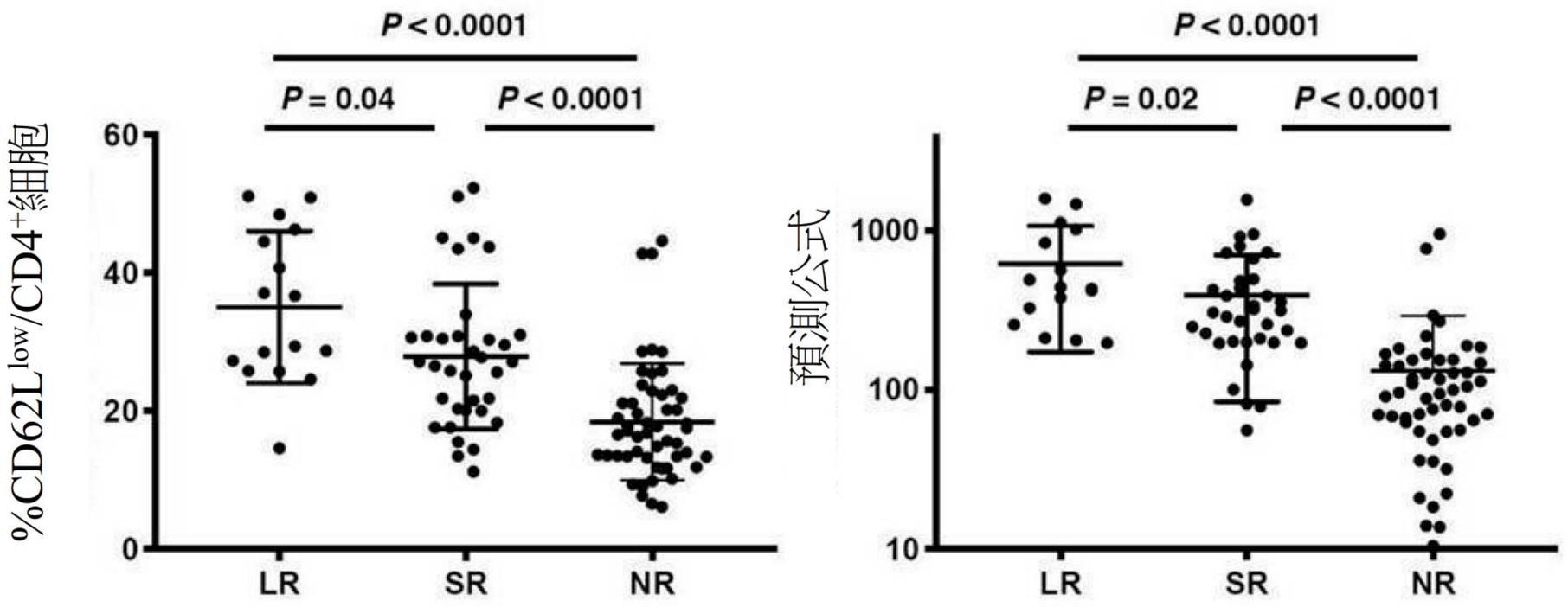
【圖5】


應答者
非應答者
P = 0.0016
P = 0.32
%CD62L low CD4+
60
40
20
0
Nivo前
治療4W

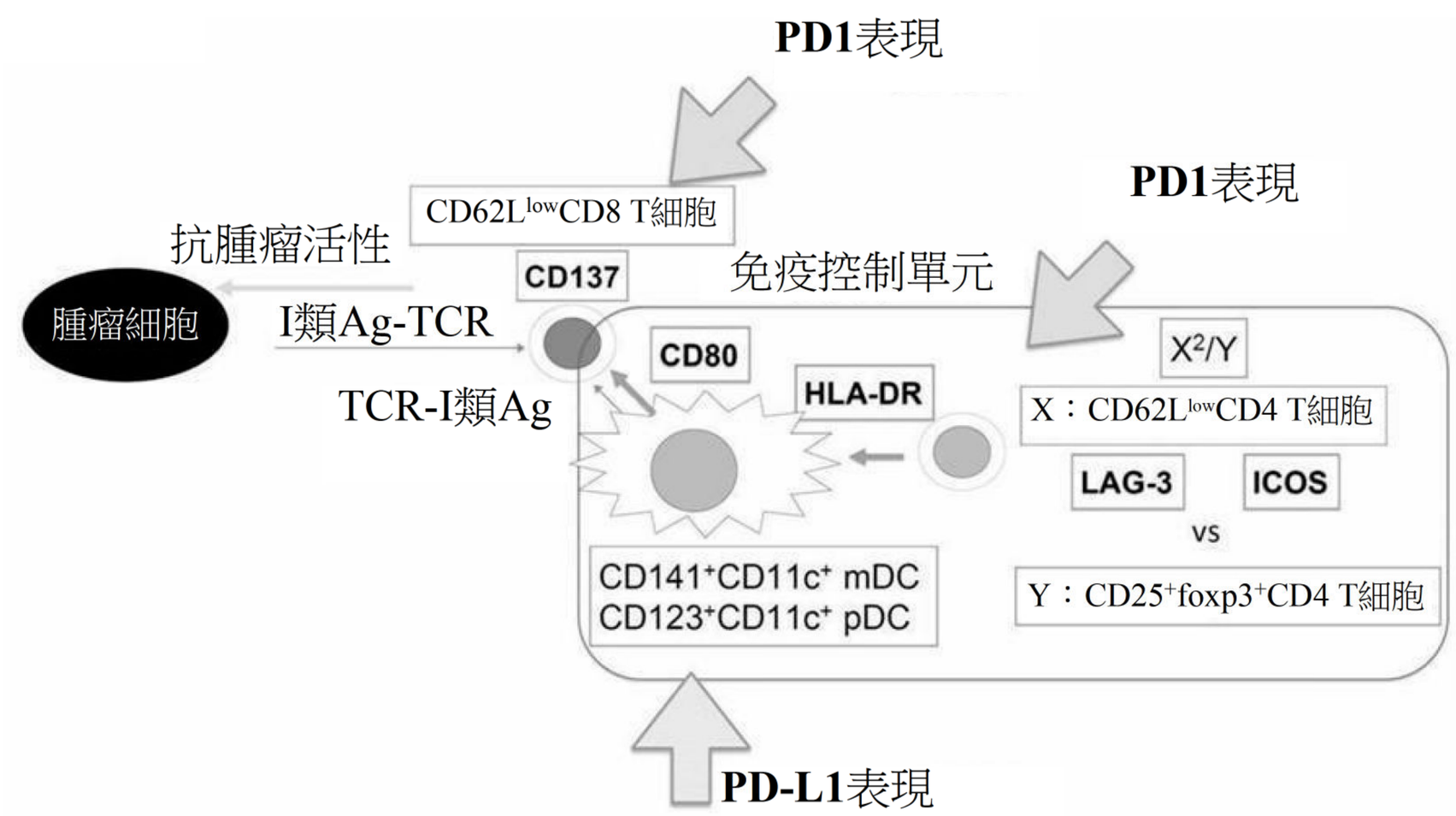
【圖6】


Nivo後之
週數
64.5W
(12-92W)
63.3W
(28-92W)
% CD62L low CD4+
X²/Y
持續應答
獲得性
耐性
原發耐性

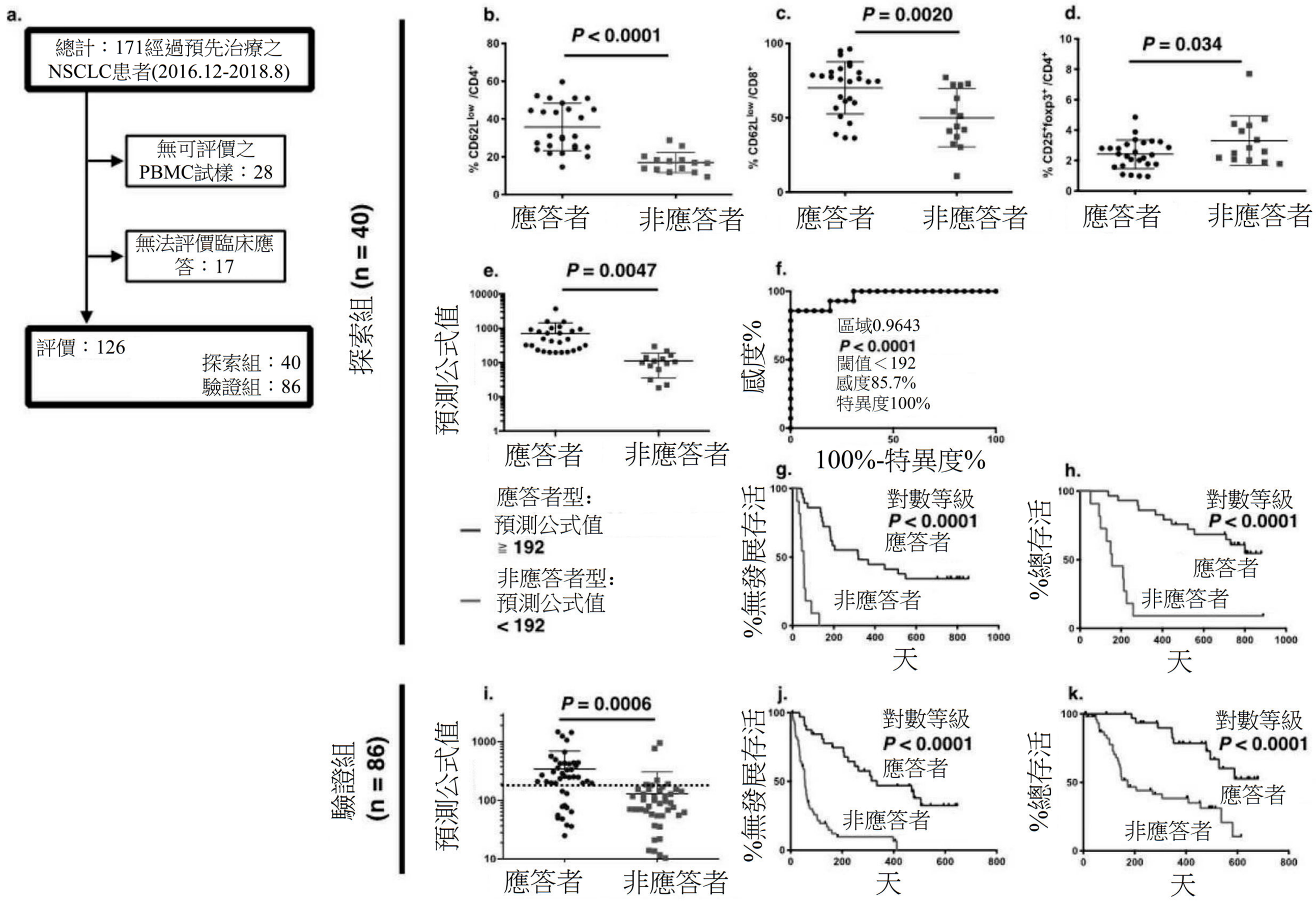
【圖7】


P < 0.0001
P = 0.04
P < 0.0001
%CD62L low/CD4+細胞
60
40
20
0
LR
SR
NR
P < 0.0001
P = 0.02
P < 0.0001
預測公式
1000
100
10
LR
SR
NR

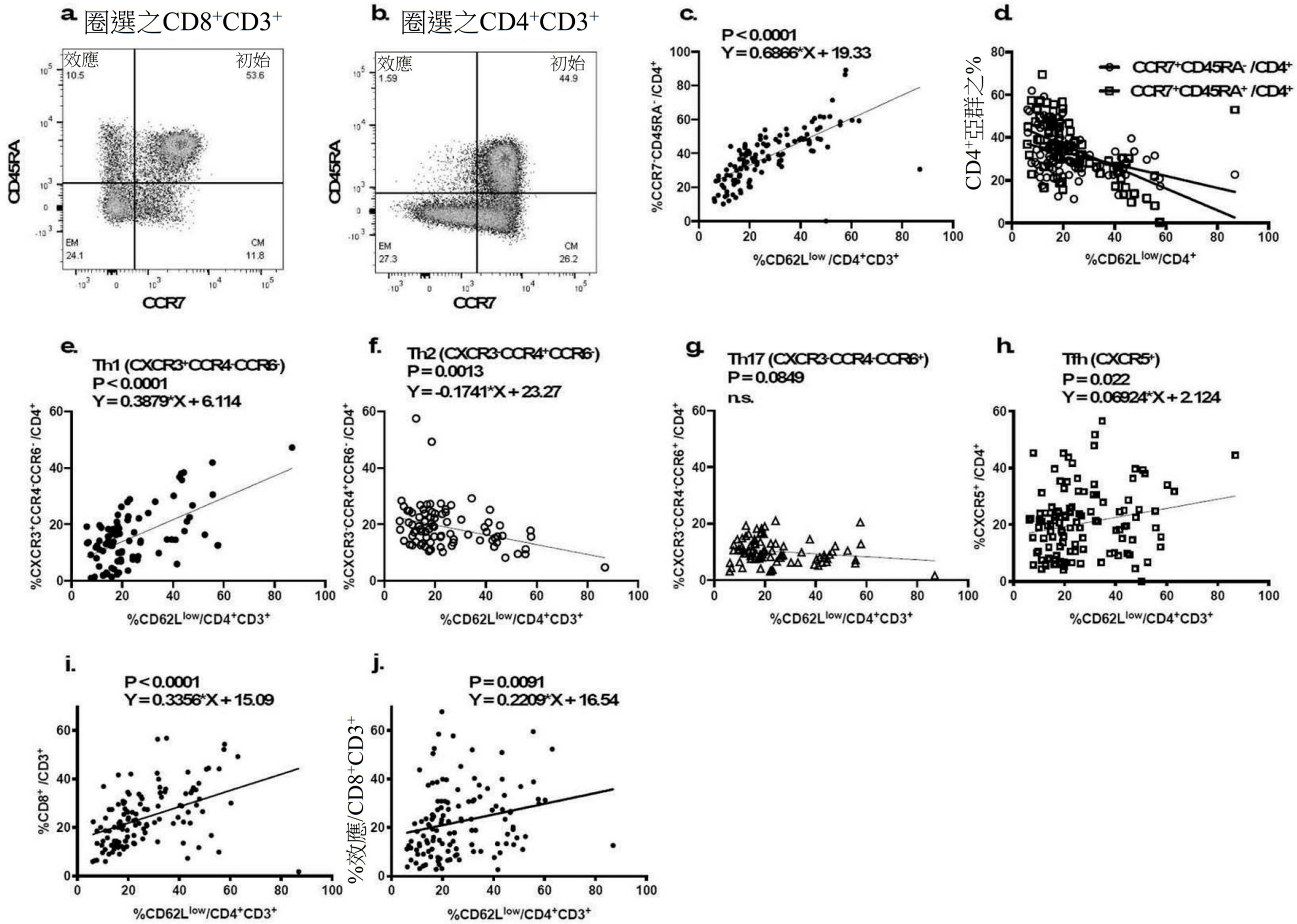
【圖8】


PD1表現
PD1表現
CD62L lowCD8 T細胞
抗腫瘤活性
免疫控制單元
CD137
腫瘤細胞
I類Ag-TCR
CD80
HLA-DR
TCR-I類Ag
X²/Y
X：CD62L lowCD4 T細胞
LAG-3
ICOS
VS
CD141+CD11c+ mDC
CD123+CD11c+ pDC
Y：CD25+foxp3+CD4 T細胞
PD-L1表現

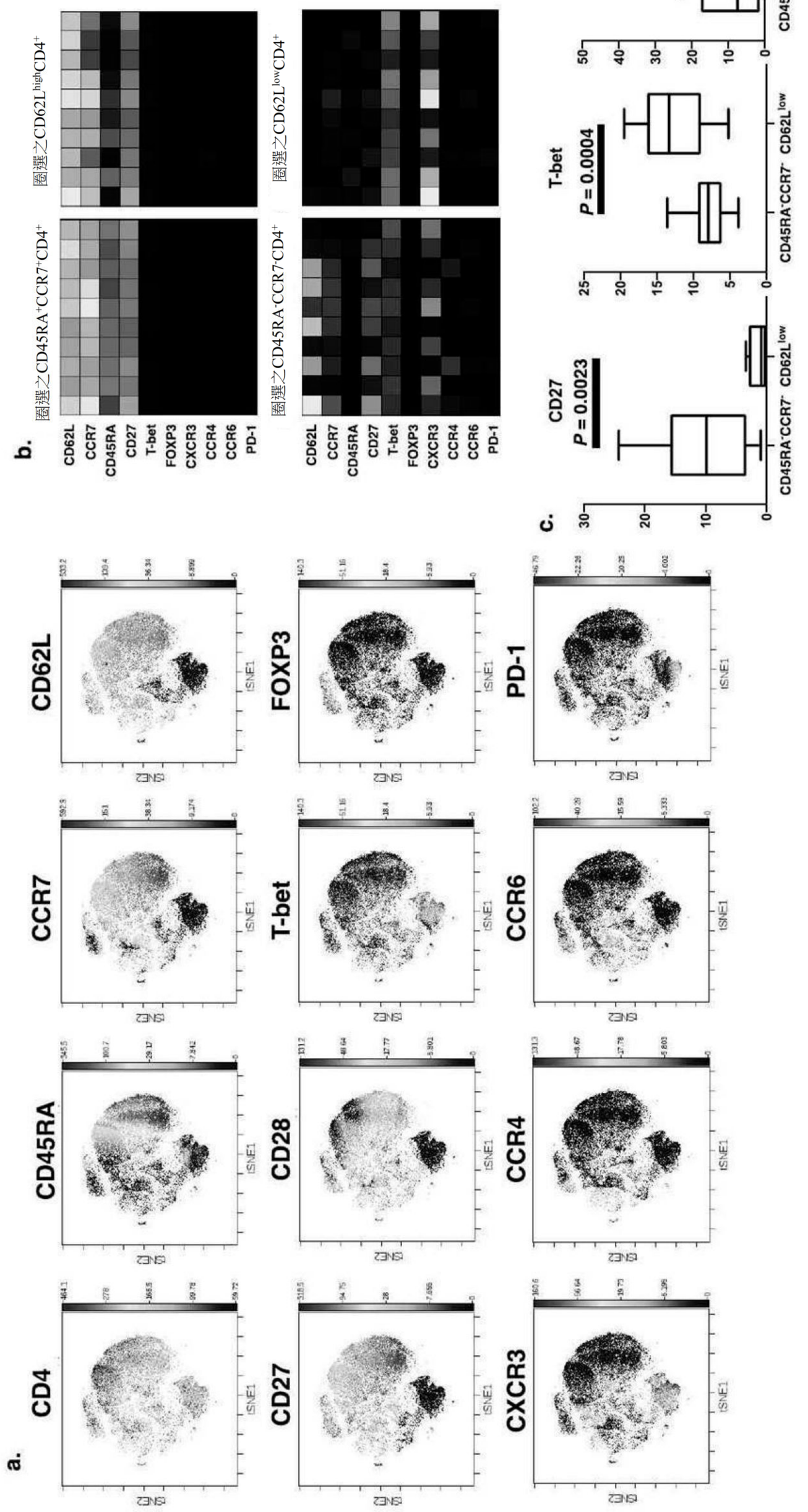
【圖9】


a.
總計：171經過預先治療之NSCLC患者(2016.12-2018.8)
無可評價之PBMC試樣：28
無法評價臨床應答：17
評價：126
探索組：40
驗證組：86
探索組 (n = 40)
b.
P < 0.0001
% CD62L^low /CD4^+
應答者
非應答者
c.
P = 0.0020
% CD62L^low /CD8^+
應答者
非應答者
d.
P = 0.034
% CD25^+foxp3^+ /CD4^+
應答者
非應答者
e.
P = 0.0047
預測公式值
應答者
非應答者
f.
區域0.9643
P < 0.0001
閾值＜192
感度85.7%
特異度100%
感度%
100%-特異度%
g.
對數等級
P < 0.0001
應答者
非應答者
%無發展存活
天
h.
對數等級
P < 0.0001
應答者
非應答者
%總存活
天
應答者型：
預測公式值
≧ 192
非應答者型：
預測公式值
< 192
驗證組 (n = 86)
i.
P = 0.0006
預測公式值
應答者
非應答者
j.
對數等級
P < 0.0001
應答者
非應答者
%無發展存活
天
k.
對數等級
P < 0.0001
應答者
非應答者
%總存活
天

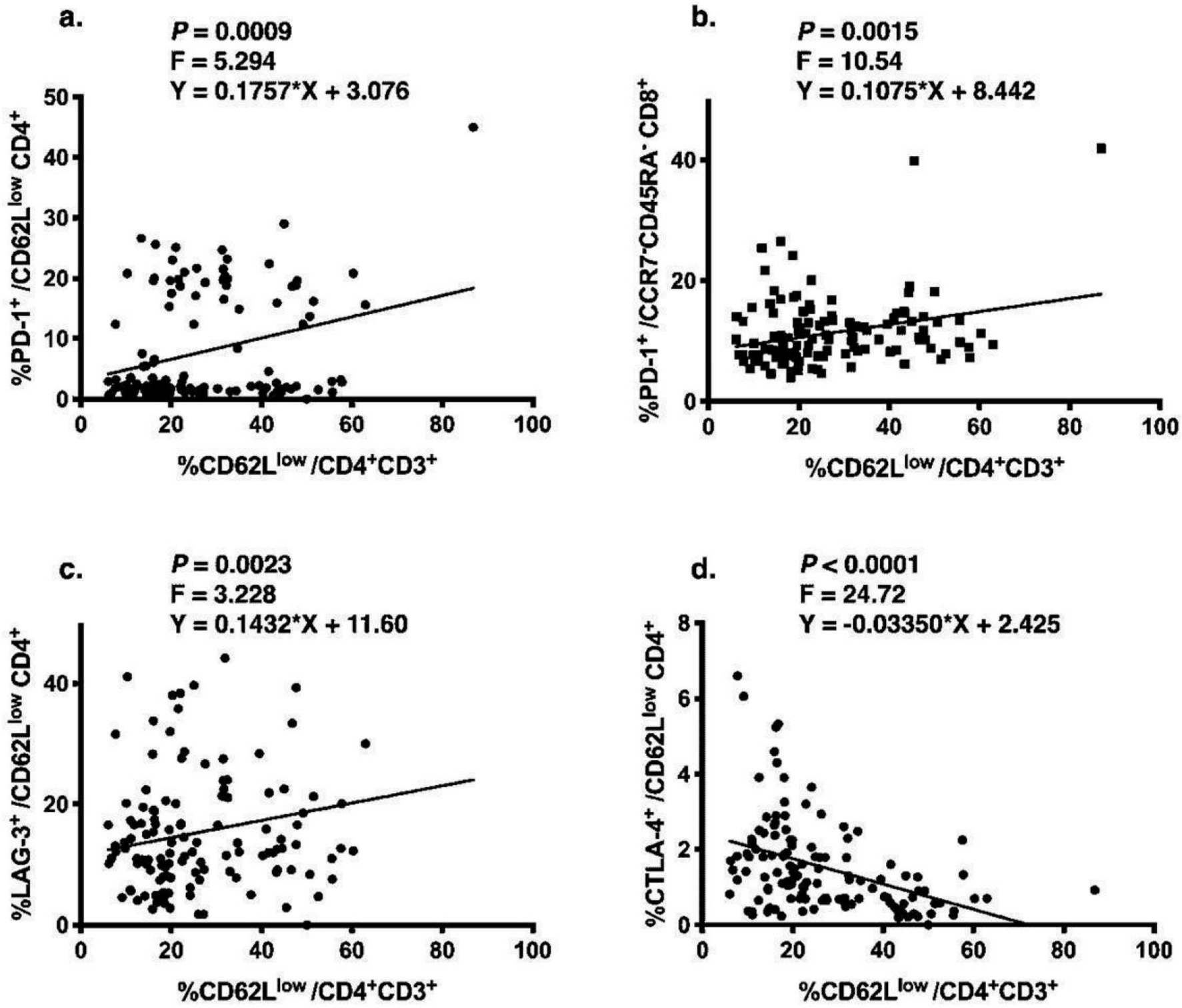
【圖10】


a. 圈選之CD8+CD3+
效應 10.5
初始 53.6
EM 24.1
CM 11.8
CD45RA
CCR7
b. 圈選之CD4+CD3+
效應 1.59
初始 44.9
EM 27.3
CM 26.2
CD45RA
CCR7
c.
P<0.0001
Y=0.6866*X+19.33
%CCR7-CD45RA- /CD4+
%CD62Llow /CD4+CD3+
d.
CCR7+CD45RA- /CD4+
CCR7+CD45RA+ /CD4+
CD4+亞群之%
%CD62Llow/CD4+
e.
Th1 (CXCR3+CCR4-CCR6-)
P<0.0001
Y=0.3879*X+6.114
%CXCR3+CCR4-CCR6- /CD4+
%CD62Llow/CD4+CD3+
f.
Th2 (CXCR3-CCR4+CCR6-)
P=0.0013
Y=-0.1741*X+23.27
%CXCR3-CCR4+CCR6- /CD4+
%CD62Llow/CD4+CD3+
g.
Th17 (CXCR3-CCR4-CCR6+)
P=0.0849
n.s.
%CXCR3-CCR4-CCR6+ /CD4+
%CD62Llow/CD4+CD3+
h.
Tfh (CXCR5+)
P=0.022
Y=0.06924*X+2.124
%CXCR5+ /CD4+
%CD62Llow/CD4+CD3+
i.
P<0.0001
Y=0.3356*X+15.09
%CD8+ /CD3+
%CD62Llow/CD4+CD3+
j.
P=0.0091
Y=0.2209*X+16.54
%效應/CD8+CD3+
%CD62Llow/CD4+CD3+

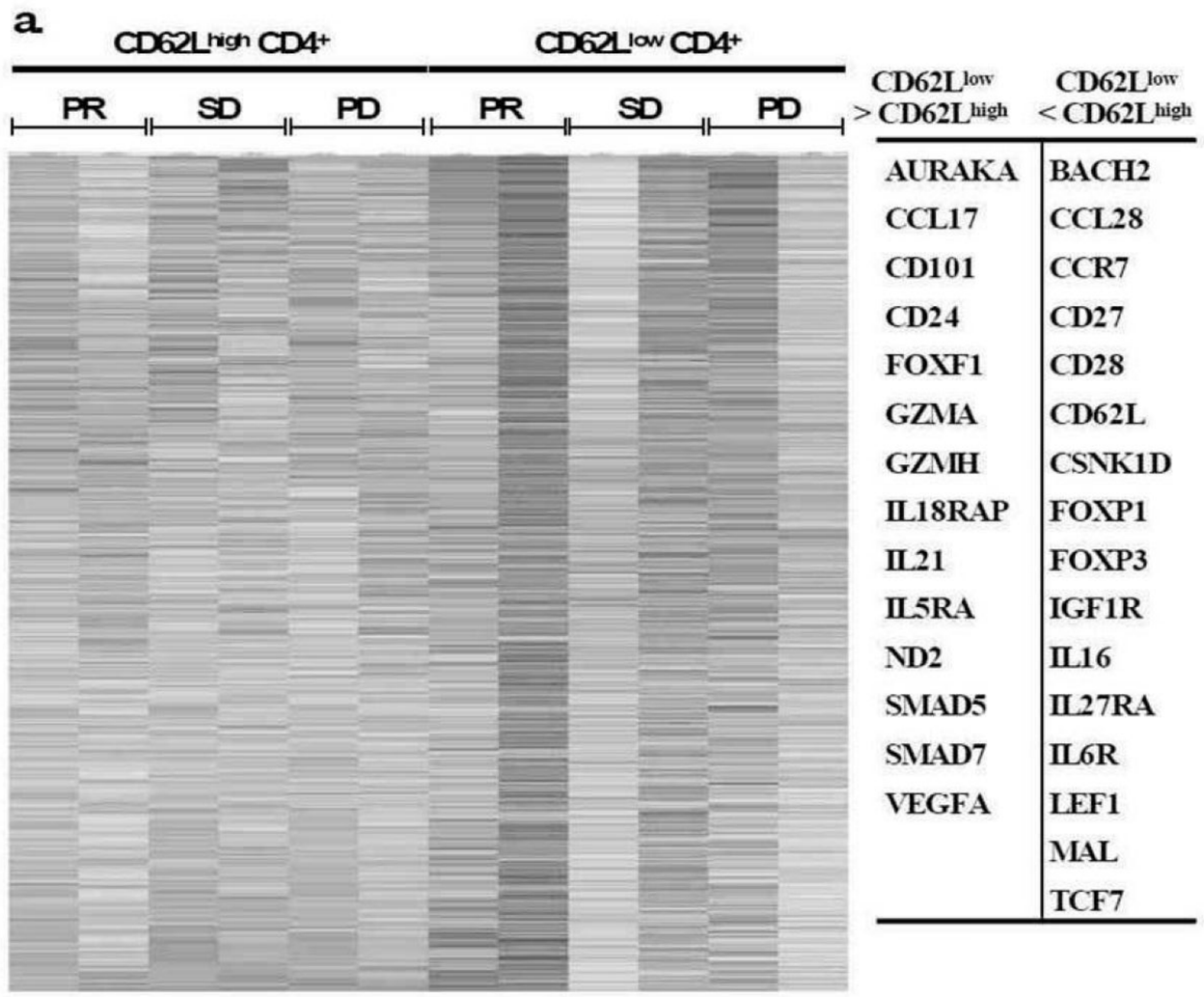
【圖11】


a.
CD4
CD27
CXCR3
CD45RA
CCR7
T-bet
CCR6
CD28
CCR4
CD62L
FOXP3
PD-1
tSNE1
tSNE2
b.
圈選之CD45RA+CCR7+CD4+
圈選之CD45RA-CCR7-CD4+
CD62L
CCR7
CD45RA
CD27
T-bet
FOXP3
CXCR3
CCR4
CCR6
PD-1
c.
CD27
P = 0.0023
T-bet
P = 0.0004
CXCR3
P = 0.014
CD45RA+CCR7+ CD62L low
CD45RA-CCR7- CD62L low
CD45RA-CCR7- CD62L low

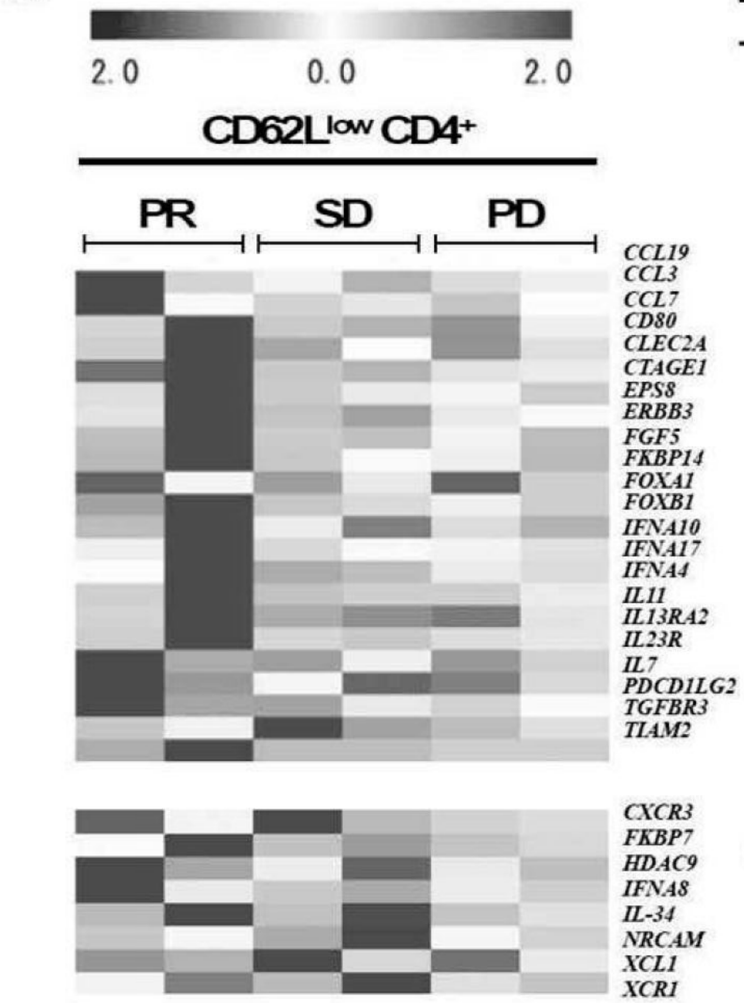
【圖12】


a.
P = 0.0009
F = 5.294
Y = 0.1757*X + 3.076
%PD-1+ /CD62Llow CD4+
%CD62Llow /CD4+CD3+
b.
P = 0.0015
F = 10.54
Y = 0.1075*X + 8.442
%PD-1+ /CCR7-CD45RA- CD8+
%CD62Llow /CD4+CD3+
c.
P = 0.0023
F = 3.228
Y = 0.1432*X + 11.60
%LAG-3+ /CD62Llow CD4+
%CD62Llow /CD4+CD3+
d.
P < 0.0001
F = 24.72
Y = -0.03350*X + 2.425
%CTLA-4+ /CD62Llow CD4+
%CD62Llow /CD4+CD3+

【圖13】

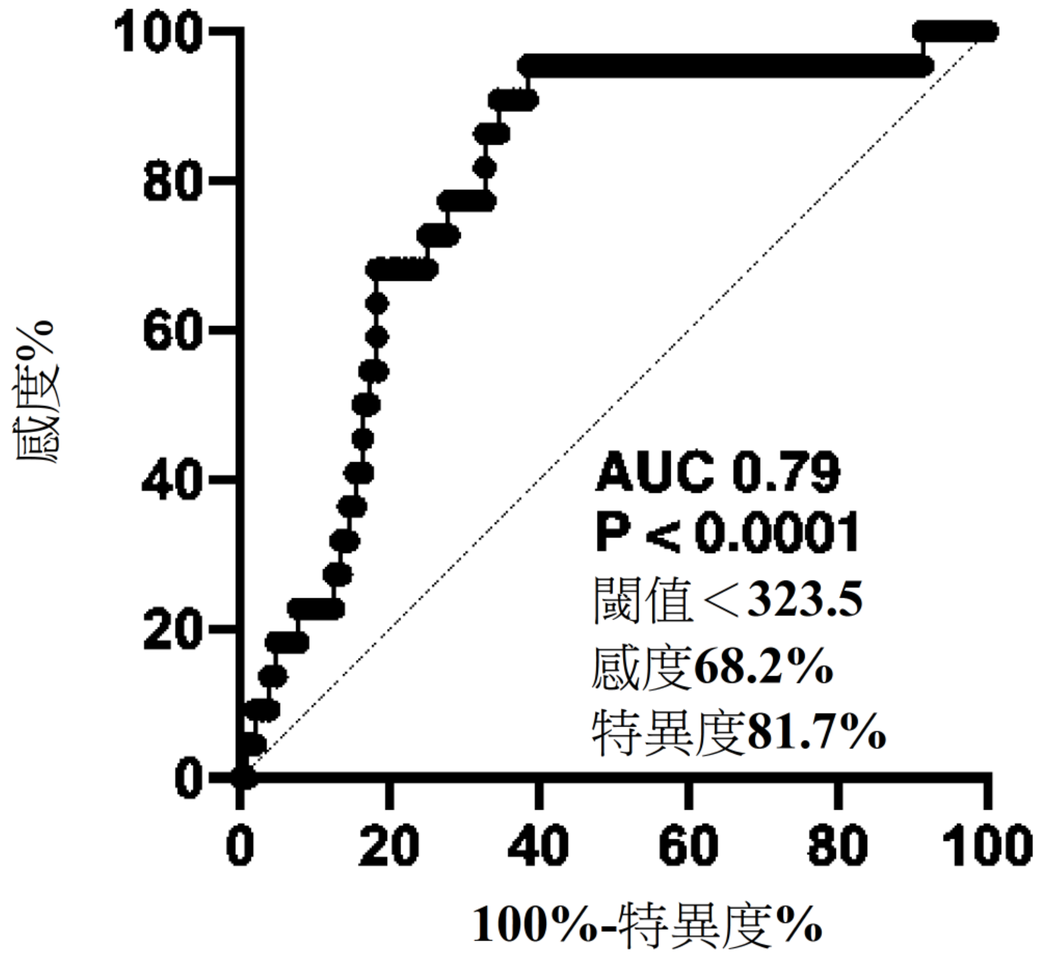


CD62L^{low} > CD62L^{high}	CD62L^{low} < CD62L^{high}
AURAKA	BACH2
CCL17	CCL28
CD101	CCR7
CD24	CD27
FOXF1	CD28
GZMA	CD62L
GZMH	CSNK1D
IL18RAP	FOXP1
IL21	FOXP3
IL5RA	IGF1R
ND2	IL16
SMAD5	IL27RA
SMAD7	IL6R
VEGFA	LEF1
	MAL
	TCF7

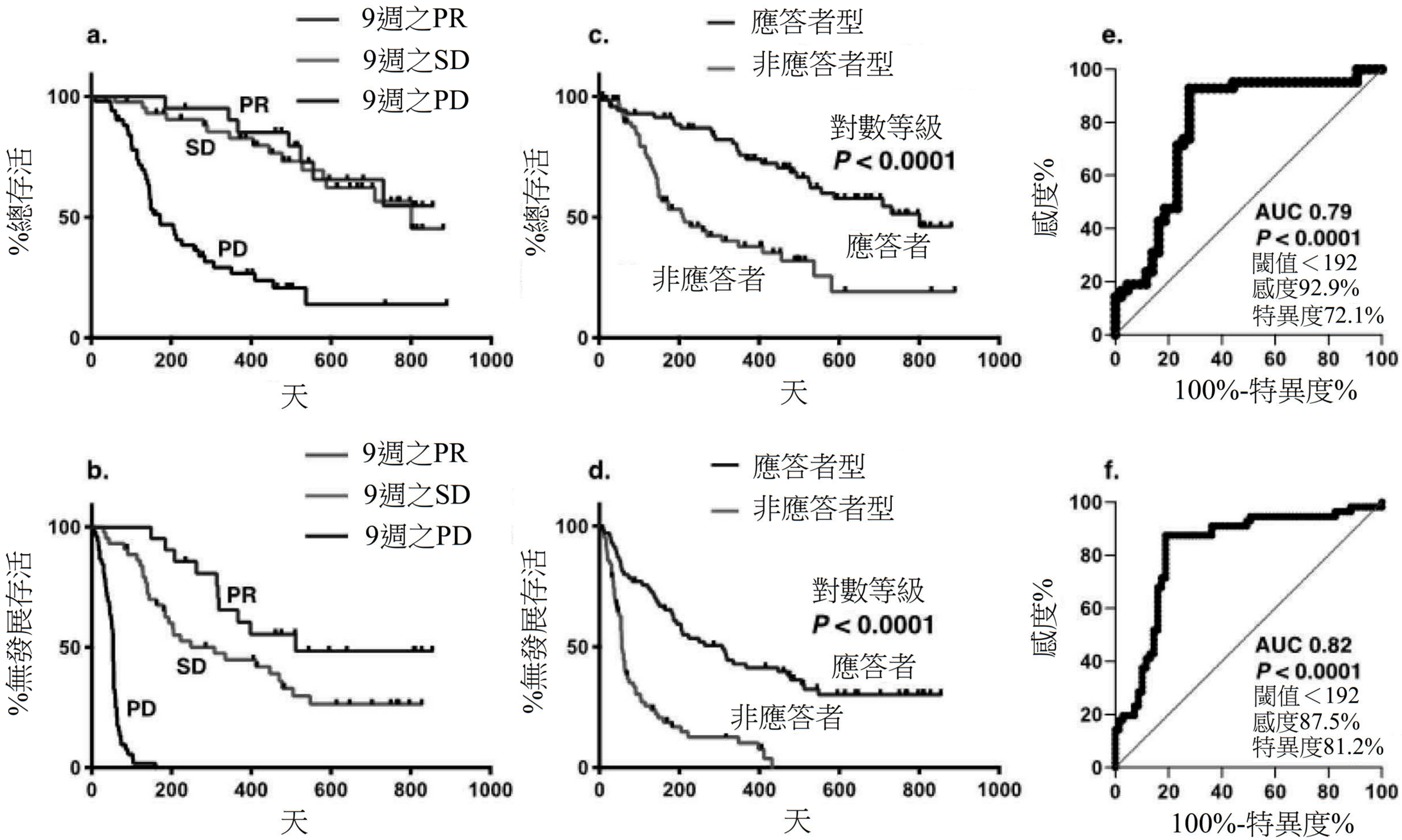


	PR > PD	PR > SD	PR+SD > PD
CCL19		+	
CCL3	+	+	+
CCL7		+	
CD80	+	+	
CLEC2A	+	+	+
CTAGE1	+	+	+
EPS8	+	+	
ERBB3	+	+	+
FGF5	+	+	
FKBP14		+	
FOXA1	+	+	+
FOXB1	+		
IFNA10	+	+	+
IFNA17		+	
IFNA4	+	+	+
IL11		+	
IL13RA2	+	+	+
IL23R	+	+	
IL7		+	
PDCD1LG2	+	+	
TGFBR3	+		+
TIAM2	+	+	
CXCR3	+		+
FKBP7	+		+
HDAC9	+		+
IFNA8	+		+
IL34	+		+
NRCAM			+
XCL1	+		+
XCR1			+

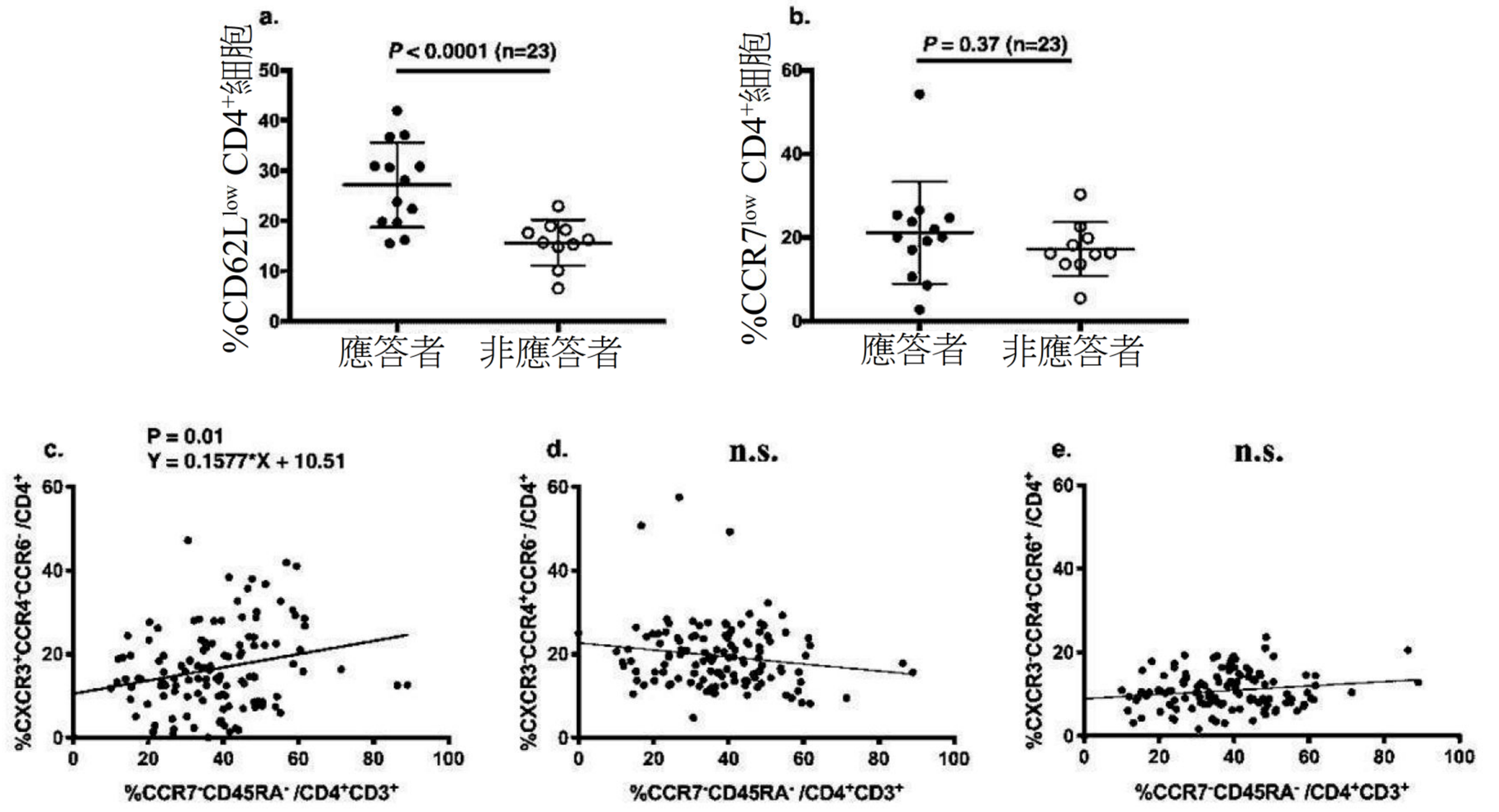
【圖14】


100
80
60
40
20
0
感度%
0
20
40
60
80
100
100%-特異度%
AUC 0.79
P < 0.0001
閾值＜323.5
感度68.2%
特異度81.7%

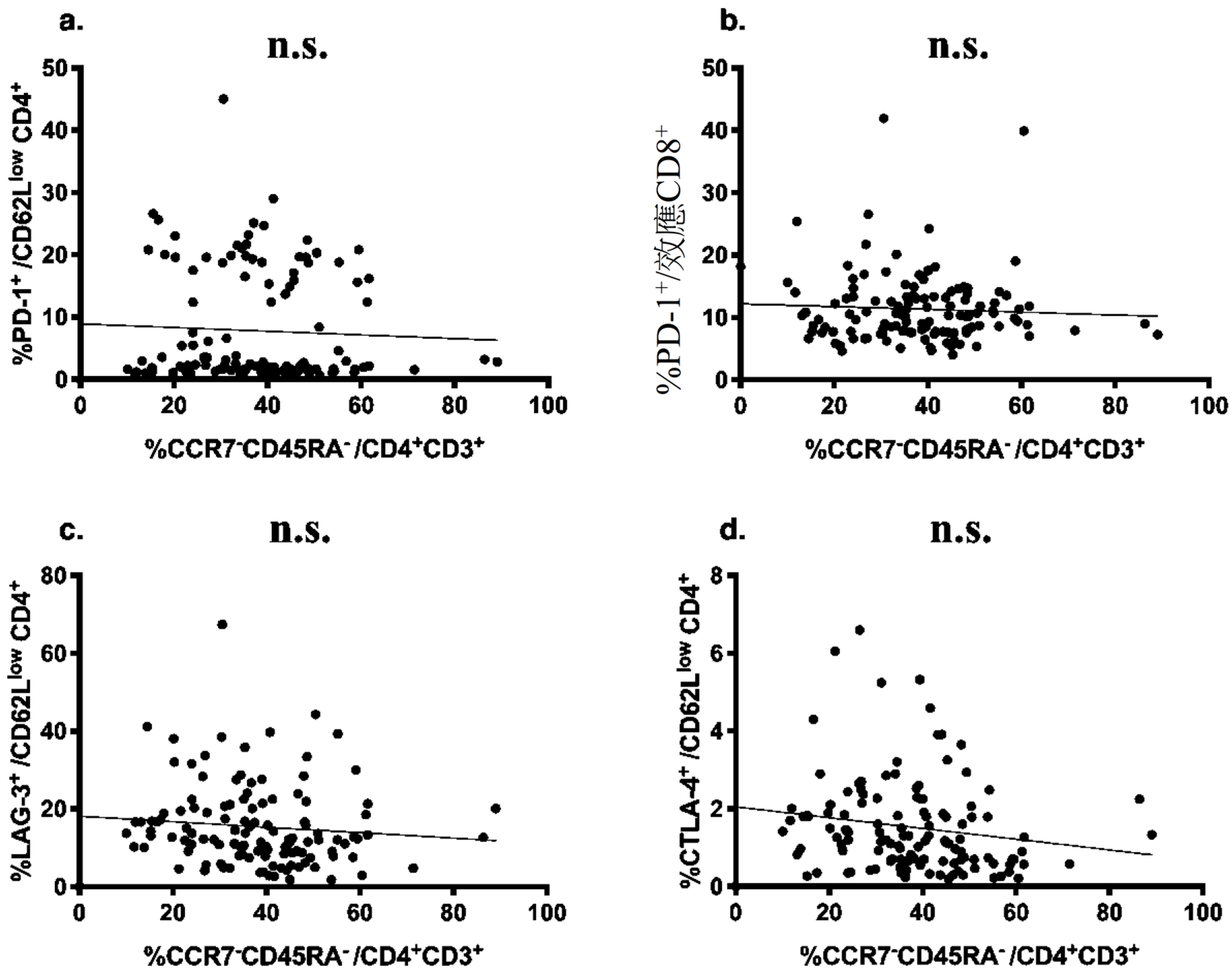
【圖15】


a.
9週之PR
9週之SD
9週之PD
PR
SD
PD
%總存活
天
b.
%無發展存活
c.
應答者型
非應答者型
對數等級
P < 0.0001
應答者
非應答者
d.
e.
感度%
AUC 0.79
P < 0.0001
閾值＜192
感度92.9%
特異度72.1%
100%-特異度%
f.
AUC 0.82
P < 0.0001
閾值＜192
感度87.5%
特異度81.2%

【圖16】

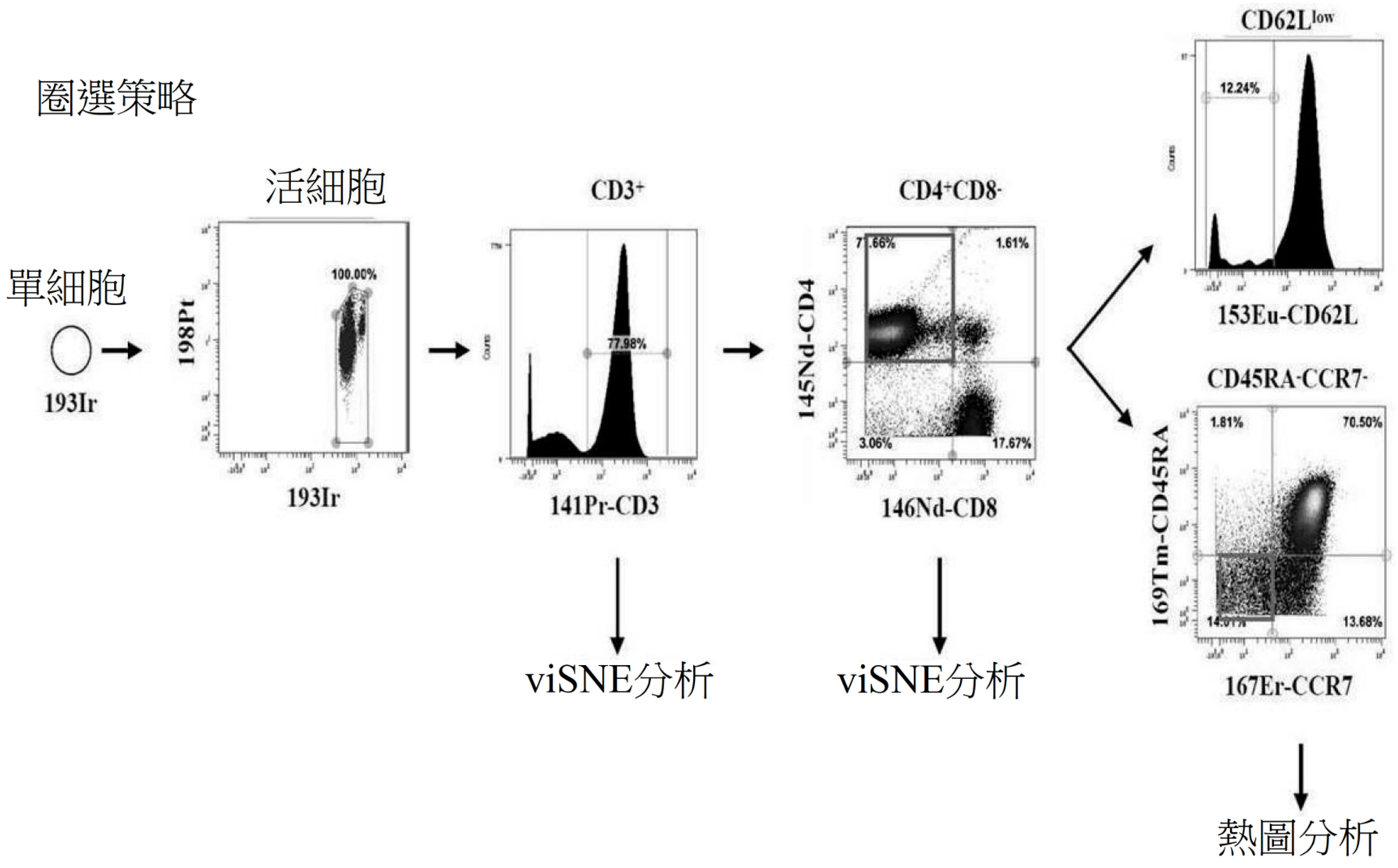

a.
P < 0.0001 (n=23)
%CD62L^low CD4^+細胞
應答者
非應答者
b.
P = 0.37 (n=23)
%CCR7^low CD4^+細胞
應答者
非應答者
c.
P = 0.01
Y = 0.1577*X + 10.51
%CXCR3^+CCR4^-CCR6^- /CD4^+
%CCR7^-CD45RA^- /CD4^+CD3^+
d.
n.s.
%CXCR3^-CCR4^+CCR6^- /CD4^+
%CCR7^-CD45RA^- /CD4^+CD3^+
e.
n.s.
%CXCR3^-CCR4^-CCR6^+ /CD4^+
%CCR7^-CD45RA^- /CD4^+CD3^+

【圖17】

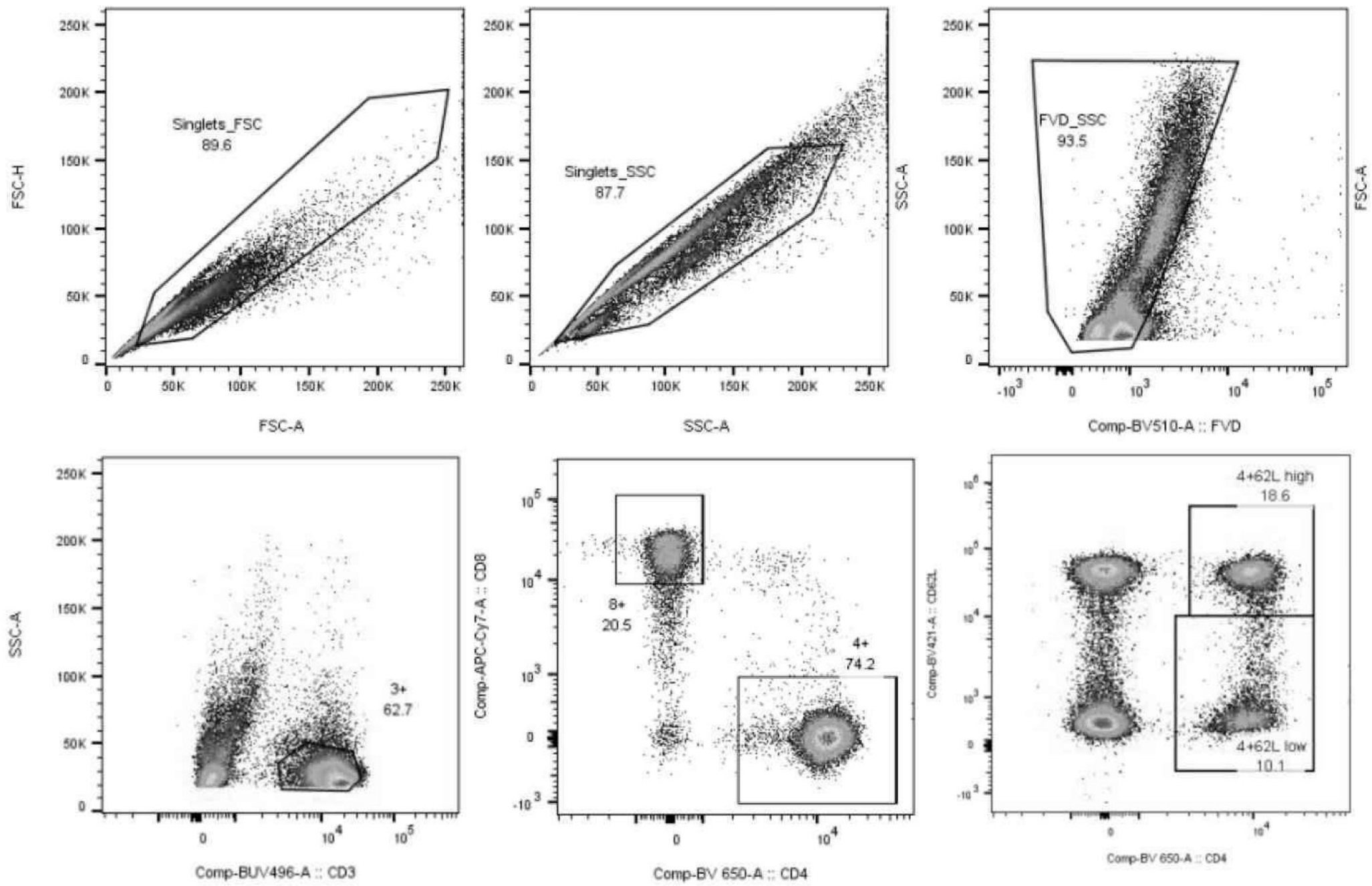

a.
n.s.
%PD-1^+ /CD62L^low CD4^+
%CCR7^-CD45RA^- /CD4^+CD3^+
b.
n.s.
%PD-1^+/效應CD
%CCR7^-CD45RA^- /CD4^+CD3^+
c.
n.s.
%LAG-3^+ /CD62L^low CD4^+
%CCR7^-CD45RA^- /CD4^+CD3^+
d.
n.s.
%CTLA-4^+ /CD62L^low CD4^+
%CCR7^-CD45RA^- /CD4^+CD3^+

【圖18】

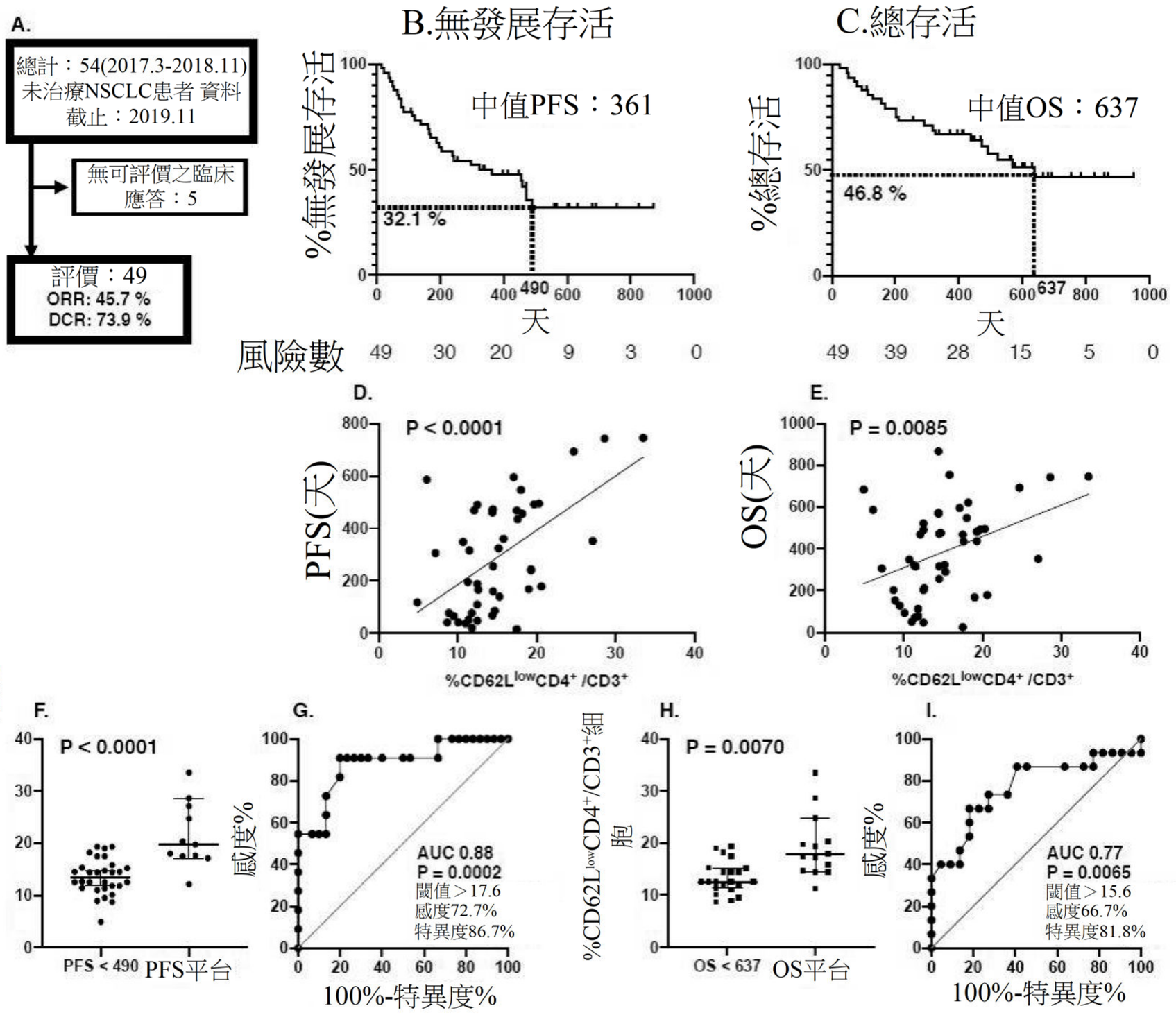
圈選策略


活細胞
CD3+
CD4+CD8-
CD62Llow
單細胞
193Ir
198Pt
100.00%
193Ir
77.98%
141Pr-CD3
71.66%
1.61%
3.06%
17.67%
145Nd-CD4
146Nd-CD8
12.24%
153Eu-CD62L
CD45RA-CCR7-
1.81%
70.50%
14.91%
13.68%
169Tm-CD45RA
167Er-CCR7
viSNE分析
viSNE分析
熱圖分析

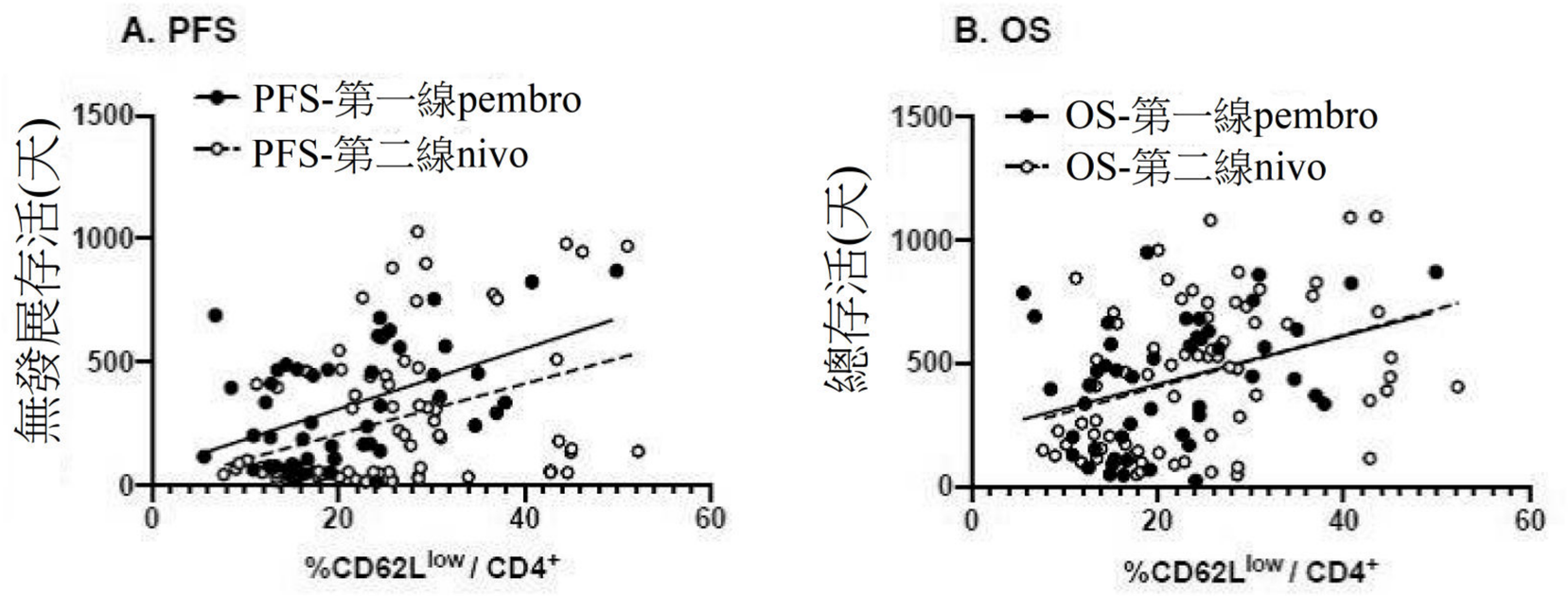
【圖19】


Singlets_FSC
89.6
FSC-H
FSC-A
Singlets_SSC
87.7
SSC-A
SSC-A
FVD_SSC
93.5
Comp-BV510-A :: FVD
FSC-A
FVD_FSC
75.7
Comp-BV510-A :: FVD
3+
62.7
SSC-A
Comp-BUV496-A :: CD3
8+
20.5
4+
74.2
Comp-APC-Cy7-A :: CD8
Comp-BV 650-A :: CD4
4+62L high
18.6
4+62L low
10.1
Comp-BV421-A :: CD62L
Comp-BV 650-A :: CD4

【圖20】



【圖21】



第一線pembro
P = 0.0004, Y = 12.25 x X + 64.93
第二線nivo
P = 0.0005, Y = 10.23 x X + 3.501

斜率：P＝0.66
Y截距：P＝0.020

第一線pembro
P = 0.0096, Y = 9.806 x X + 219.5
第二線nivo
P = 0.0015, Y = 10.49 x X + 195.5

斜率：P＝0.89
Y截距：P＝0.86

【圖22】