



(10) 申请公布号 CN 119053859 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 29

(21) 申请号 202380032125.X

(22) 申请日 2023.03.30

(30) 优先权数据

2022-060165 2022.03.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/013323 2023.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/190942 JA 2023.10.05

(71) 申请人 学校法人顺天堂

地址 日本国东京都文京区本乡2-1-1

申请人 顺天生化股份有限公司

(72) 发明人 内田浩一郎 竹田和由 前原由依

河合文隆

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

专利代理师 李晓

(51) Int. Cl.

G01N 33/15 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 31/706 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书5页 说明书31页 附图6页

(54) 发明名称

评价诱导型抑制性T细胞制剂的品质的方法

(57) 摘要

根据本公开,提供由免疫耐受诱导的排斥反应的治疗优化。根据本公开,提供一种评价药剂的品质的方法,所述药剂为对接受了活体肝移植的患者给予的用于达到免疫耐受的药剂,其中,所述方法包括以下步骤:(a) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞和从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞进行混合培养的步骤;(b) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞、从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞和用于在该患者中达到免疫耐受的药剂进行混合培养的步骤;(c) 对步骤(a)和(b)中的细胞因子产生进行测定的步骤,在步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的情况时,将该药剂视为免疫耐受疗法用的药剂。

1. 一种评价药剂品质的方法,所述药剂为对接受了活体肝移植的患者给予的用于达到免疫耐受的药剂,其中,所述方法包括以下步骤:

(a) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞和从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞进行混合培养的步骤;

(b) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞、从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞和用于在该患者中达到免疫耐受的药剂进行混合培养的步骤;

(c) 对步骤(a)和(b)中的细胞因子产生进行测定的步骤,

在步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的情况时,将该药剂视为免疫耐受疗法用的药剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述患者接受免疫抑制剂的给予。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述药剂为抑制在某细胞的细胞表面上表达的CD80和/或CD86与在其他细胞的细胞表面上表达的CD28之间的相互作用的抑制因子。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其中,所述药剂为诱导型抑制性T细胞制剂,该诱导型抑制性T细胞制剂通过将来自所述活体肝移植的患者和供体的外周血淋巴细胞在CD80抗体和/或CD86抗体的存在下进行共培养而得到。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其特征在于,在步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的情况时,变更针对所述患者的所述免疫耐受疗法。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,

(i) 在步骤(b)中的促炎性细胞因子产生与步骤(a)相比上升的情况时,增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法,和/或

(ii) 在步骤(b)中的抗炎性细胞因子产生与步骤(a)相比降低的情况时,增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,所述外周血淋巴细胞用CFSE染色。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的方法,其特征在于,在步骤(a)和(b)中,使用从所述供体采集的B细胞来代替从所述供体采集的外周血淋巴细胞。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法在所述活体肝移植后的至少约第3天~约第6天以内进行。

10. 根据权利要求1~9中任一项所述的方法,其中,所述细胞因子包括IFN γ 、TNF、IL-2、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-10和/或TGF β 。

11. 一种用于在患者中达到免疫耐受的方法,所述方法包括以下步骤:

通过单采术从供体收集淋巴细胞的步骤;

通过单采术从患者收集淋巴细胞的步骤;

将来自该供体的肝脏或其一部分向该患者进行活体肝移植的步骤;

在该活体肝移植后,对该患者进行的以下步骤:

进行肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的连续给予以及对活体肝移植的排斥反应进行免疫监测和/或进行定期肝活检的步骤;

在该活体肝移植后,对该患者给予第二免疫抑制剂的步骤;

在给与该第二免疫抑制剂后,对该患者给予用于在该患者中达到免疫耐受的药剂的步骤;

将该肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的给予量逐步减量的步骤。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述方法为通过针对所述排斥反应的免疫监测和/或定期肝活检,确定是否确认达到免疫耐受或转为现有的免疫抑制疗法,

在所述第一免疫抑制剂的给予中止后规定期间内,随时间经过观察患者的全身状态和/或血液生化检查值,与此同时通过在所述第一免疫抑制剂的给予中止后经过规定期间的时段的肝活检,最终确定所述第一免疫抑制剂的给予中止,

进一步,在所述第一免疫抑制剂的给予中止后继续保持稳定的肝功能值且通过肝活检无法确认到在病理学上应治疗的排斥反应的状态规定期间以上时,确定该患者已达到可操作性耐受。

13. 一种用于在患者中达到免疫耐受的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

在移植14天前~3天前通过单采术从供体收集淋巴细胞的步骤;

在移植1天前通过单采术从患者收集淋巴细胞的步骤;

将来自该供体的肝脏或其一部分向该患者进行活体肝移植的步骤;

在该活体肝移植后,对该患者进行的以下步骤:

进行肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和钙调磷酸酶抑制剂的连续给予以及对该活体肝移植的排斥反应进行免疫监测和/或进行定期肝活检的步骤;

在肝移植后第4~6天,对该患者给予20~50mg/kg的环磷酰胺的步骤;

在肝移植后第9天~第11天中的任一时段,对该患者给予用于在该患者中达到免疫耐受的药剂的步骤;

在至少移植后13周,将该钙调磷酸酶抑制剂的给予量减量的步骤,

所述方法通过针对该排斥反应的免疫监测和/或定期肝活检,确定是否确认达到免疫耐受或转为现有的免疫抑制疗法,

在该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止后至少52周内,随时间经过观察患者的全身状态和/或血液生化检查值,与此同时通过在该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止后至少第52周的时段的肝活检,最终确定该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止,

进一步,在该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止后继续维持稳定的肝功能值且通过肝活检无法确认到在病理学上应治疗的排斥反应的状态52周以上时,确定该患者已达到可操作性耐受。

14. 根据权利要求11~13中任一项所述的方法,其中,至少在所述活体肝移植后4周内中止对所述患者给予所述肾上腺皮质类固醇和代谢拮抗剂。

15. 根据权利要求11~14中任一项所述的方法,其中,至少在所述活体肝移植后26周内中止对所述患者给予所述肾上腺皮质类固醇和代谢拮抗剂。

16. 根据权利要求11~15中任一项所述的方法,其中,至少在所述活体肝移植后78周内中止对所述患者给予所述钙调磷酸酶抑制剂。

17. 根据权利要求11~16中任一项所述的方法,其中,所述药剂为抑制在某细胞的细胞表面上表达的CD80和/或CD86与在其他细胞的细胞表面上表达的CD28之间的相互作用的抑制因子。

18. 根据权利要求11~17中任一项所述的方法,其中,所述药剂为诱导型抑制性T细胞制剂,该诱导型抑制性T细胞制剂通过将来自所述活体肝移植的患者和供体的外周血淋巴

细胞在CD80抗体和/或CD86抗体的存在下进行共培养而得到。

19. 一种用于将免疫耐受疗法中的免疫抑制剂的给予量减量的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 对于肾上腺皮质类固醇,按照以下日程给予的步骤;

在再灌注时的给予;

进行肝移植后的给予和给予量的减量,在规定期间内结束给予,在该规定期间内不能结束给予的情况下,使用任意的减量方法结束给予,

(2) 对于代谢拮抗剂,按照以下日程给予的步骤;

肝移植后的给予;

在肝移植后的规定期间以内结束给予,

在肝移植后规定期间以内不能结束给予的情况时,使用任意的减量方法结束给予,

根据需要,可以以肝移植后1周为目标增加给予量,这时,其特征在于,进行逐步减量,

(3) 对于第一免疫抑制剂,按照以下日程给予的步骤;

(3-1) 肝移植后规定期间(给予量调整期间)

从肝移植当天或肝移植后1天起开始给予,分别以以下的血中谷浓度为目标:

给予开始~肝移植后的第一规定期间的规定的血中谷浓度;

肝移植后第一规定期间后的第二规定期间的规定的血中谷浓度,

(3-2) 肝移植后26周后(第一免疫抑制剂的减量期间)

在肝移植后第一规定期间(减量1)内,调整用法/用量以维持规定的血中谷浓度;

在肝移植后第二规定期间(减量2)起,维持(减量1)的用量,给予次数按照减量日程逐步减量,

(3-3) 根据需要,延长第一免疫抑制剂的减量期间,

各减量在已确认不存在排斥反应时执行。

20. 一种用于将免疫耐受疗法中的免疫抑制剂减量的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 对于肾上腺皮质类固醇,按照以下日程给予的步骤;

在再灌注时给予1000mg;

从肝移植后1天起在1周内以20mg/天给予,

以5mg/天每周减量,在肝移植后4周以内结束给予,

在肝移植后4周以内不能结束给予的情况时,使用任意的减量方法在肝移植后26周为止结束给予,

(2) 对于代谢拮抗剂,按照以下日程给予的步骤;

从肝移植后1天起1天分2次以合计500mg/天给予,

在肝移植后4周以内结束给予,

在肝移植后4周以内不能结束给予的情况时,使用任意的减量方法在肝移植后26周为止结束给予,

根据需要,可以以肝移植后1周为目标增量至1000~2000mg/天,这时逐步减量以500mg/天进行,

(3) 对于钙调磷酸酶抑制剂,按照以下日程给予的步骤;

(3-1) 肝移植后0天~肝移植后26周(钙调磷酸酶抑制剂的给予量调整期间)

从肝移植当天或肝移植后1天起开始以口服或持续静脉注射给予,以以下的血中谷浓度为目标:

给予开始~肝移植后13周:他克莫司8~12ng/mL或环孢素200~300ng/mL;

肝移植后13周~肝移植后26周:他克莫司5~8ng/mL或环孢素125~200ng/mL,

(3-2) 肝移植后26周后(钙调磷酸酶抑制剂的减量期间)

在肝移植后26周(减量1)内,以1天1次的给予次数,调整用法/用量以维持他克莫司3~5ng/mL或环孢素75~125ng/mL的血中谷浓度;

在肝移植后39周(减量2)起,维持肝移植后26周(减量1)的用量,给予次数按照钙调磷酸酶抑制剂的减量日程(减量2:周3次;减量3:周2次;减量4:周1次;减量5:停用)逐步减量,

(3-3) 根据需要,钙调磷酸酶抑制剂的减量期间可延长合计13周,

各减量在已确认不存在排斥反应时执行。

21. 根据权利要求19或20所述的方法,其中,所述排斥反应通过如下确定是否存在:

(1) 发热或全身倦怠感等身体表现,和/或

(2) 血液生化检查中的T-Bil/AST/ALT/ γ -GTP中的任一个增加至最近来院时数据的2倍以上。

22. 一种用于在免疫耐受疗法中通过定期肝活检确认有无排斥反应的方法,所述方法包括以下步骤:

对在肝移植日从移植肝采集对照用肝组织的样本和从肝移植后的定期肝活检中得到的样本进行组织诊断的步骤,以及

在该组织诊断的结果中急性排斥反应的整体评价得到规定中止标准中的任一结果时,判断为“具有在病理学上应治疗的排斥反应”,立即开始针对排斥反应的治疗,中止免疫耐受疗法的步骤。

23. 一种用于在免疫耐受疗法中通过定期肝活检确认有无排斥反应的方法,所述方法包括以下步骤:

对在肝移植日从移植肝采集对照用肝组织的样本以及从肝移植后26周、减量5的4周后和52周后的定期肝活检得到的样本,按照Banff标准(2016年)和Venturi(2012年)进行评分的组织诊断的步骤,以及

在该组织诊断的结果中得到急性排斥反应的整体评价为“中度以上”、慢性排斥反应的整体评价为“有”和肝纤维化的评分为“2分以上”中的任一结果的情况时,判断为“具有在病理学上应治疗的排斥反应”,立即开始针对排斥反应的治疗,中止免疫耐受疗法的步骤。

24. 一种用于在接受了活体肝移植的患者中达到免疫耐受的方法,其使用品质经评价过的用于达到免疫耐受的药剂,所述方法包括以下步骤:

(a) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞和从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞进行混合培养的步骤;

(b) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞、从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞和用于在该患者中达到免疫耐受的药剂进行混合培养的步骤;

(c) 对步骤(a)和(b)中的细胞因子产生进行测定的步骤;

(d) 在该活体肝移植后,对该患者进行的以下步骤:

进行肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的连续给予以及对该活体肝移

植的排斥反应进行免疫监测和/或进行定期肝活检的步骤;

(e) 在该活体肝移植后,对该患者单次给予第二免疫抑制剂的步骤;

(f) 在给与该第二免疫抑制剂后,对该患者给予步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的药剂的步骤;

将该肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的给予量逐步减量的步骤。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中,所述患者接受免疫抑制剂的给予。

26. 根据权利要求24或25所述的方法,其中,所述药剂为抑制在某细胞的细胞表面上表达的CD80和/或CD86与在其他细胞的细胞表面上表达的CD28之间的相互作用的抑制因子。

27. 根据权利要求24~26中任一项所述的方法,其中,所述药剂为诱导型抑制性T细胞制剂,该诱导型抑制性T细胞制剂通过将来自所述活体肝移植的患者和供体的外周血淋巴细胞在CD80抗体和/或CD86抗体的存在下进行共培养而得到。

28. 根据权利要求24~27中任一项所述的方法,其特征在于,在步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的情况时,变更针对所述患者的所述免疫耐受疗法。

29. 根据权利要求24~28中任一项所述的方法,其特征在于,

(i) 在步骤(b)中的促炎性细胞因子产生与步骤(a)相比上升的情况时,增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法,和/或

(ii) 在步骤(b)中的抗炎性细胞因子产生与步骤(a)相比降低的情况时,增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法。

30. 根据权利要求24~29中任一项所述的方法,其中,所述外周血淋巴细胞用CFSE染色。

31. 根据权利要求24~30中任一项所述的方法,其特征在于,在步骤(a)和(b)中,使用从所述供体采集的B细胞来代替从所述供体采集的外周血淋巴细胞。

32. 根据权利要求24~31中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法在所述活体肝移植后的至少约第3天~约第6天以内进行。

33. 根据权利要求24~32中任一项所述的方法,其中,所述细胞因子包括IFN γ 、TNF、IL-2、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-10和/或TGF β 。

评价诱导型抑制性T细胞制剂的品质的方法

技术领域

[0001] 肝脏移植作为对于肝衰竭晚期患者的终极治疗法而广泛普及。在1963年进行了世界第一例的临床肝移植,但迄今为止约30万件以上,目前每年除日本外的世界计数25,000例以上的病例,日本也计数约400例的病例。该肝移植的发展取决于手术技能、器官保存、术前术后管理等的进步,但其中为了抑制移植后的排斥反应而使用的免疫抑制剂的改良有很大贡献。通过迄今为止所使用的硫唑嘌呤(Azathioprine)(1960~70年代)、环孢素(Ciclosporin)(1980年代)、他克莫司(Tacrolimus)(1990年代以后),1年和5年患者存活率分别显著提高至约35%和20%、约70%和60%及约80%和70%。

发明内容

解决问题的手段

[0002] 本公开中,为了诱导即使中止免疫抑制剂,移植片仍正常地发挥作用、即所谓的免疫耐受,发现了确定诱导型抑制性T细胞的标准并评价其品质的方法,此外确立了使用该诱导型抑制性T细胞用于达到免疫耐受的方法。

[0003] 因此,本公开的技术提供一种免疫耐受的诱导,其避免由一直暴露于感染症、致癌、代谢性疾病的恶化等药剂引起的副作用等危险性的免疫抑制剂引起的治疗,即使中止免疫抑制剂,移植片也能正常地发挥作用。

[0004] 本发明人专心努力之结果,关于用以减弱器官移植患者中的免疫排斥反应而经由抗CD80和抗CD86抗体处理诱导供体抗原选择性的免疫耐受的细胞及其抑制分子机制,提供一种在临床上实际使用上最佳的技术,该技术包括在人患者中适合的制法。

[0005] 由本公开提供的诱导型抑制性T细胞制剂包含通过将患者外周血单个核细胞在抗CD80抗体和抗CD86抗体的存在下,与经放射线照射的供体外周血单个核细胞共培养而诱导的诱导型抑制性T细胞。本公开的制剂所含的诱导型抑制性T细胞的构成成分是以T淋巴细胞为中心的单个核细胞,其中主要为CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞。本公开的制剂的有效成分为CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞(调节性CD4⁺T细胞)和CD8⁺CD45RA⁻T细胞(抑制性CD8⁺T细胞)。

[0006] 当将本公开的制剂给予器官移植患者时,与在供体器官中表达的HLA-I类和II类抗原反应的效应CD4⁺T细胞和效应CD8⁺T细胞的活化被抑制,被诱导为新的调节性CD4⁺T细胞和抑制性CD8⁺T细胞。其结果,供体HLA抗原特异性的免疫排斥反应持续减弱,可以使免疫抑制剂的使用量减少或停用。

[0007] 因此,本公开提供以下项目。

(项目1)

一种评价药剂品质的方法,所述药剂为对接受了活体肝移植的患者给予的用于达到免疫耐受的药剂,其中,所述方法包括以下步骤:

(a) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞和从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞进行混合培养的步骤;

(b) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞、从该活体肝移植的供体

采集的外周血淋巴细胞和用于在该患者中达到免疫耐受的药剂进行混合培养的步骤；

(c) 对步骤(a)和(b)中的细胞因子产生进行测定的步骤，

在步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的情况时，将该药剂视为免疫耐受疗法用的药剂。

(项目2)

根据上述项目所述的方法，其中，所述患者接受免疫抑制剂的给予。

(项目3)

根据上述项目中任一项所述的方法，其中，所述药剂为抑制在某细胞的细胞表面上表达的CD80和/或CD86与在其他细胞的细胞表面上表达的CD28之间的相互作用的抑制因子。

(项目4)

根据上述项目中任一项所述的方法，其中，所述药剂为诱导型抑制性T细胞制剂，该诱导型抑制性T细胞制剂通过将来自所述活体肝移植的患者和供体的外周血淋巴细胞在CD80抗体和/或CD86抗体的存在下进行共培养而得到。

(项目5)

根据上述项目中任一项所述的方法，其特征在于，在步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的情况时，变更针对所述患者的所述免疫耐受疗法。

(项目6)

根据上述项目中任一项所述的方法，其特征在于，

(i) 在步骤(b)中的促炎性细胞因子产生与步骤(a)相比上升的情况时，增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法，和/或

(ii) 在步骤(b)中的抗炎性细胞因子产生与步骤(a)相比降低的情况时，增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法。

(项目7)

根据上述项目中任一项所述的方法，其中，所述外周血淋巴细胞被CFSE染色。

(项目8)

根据上述项目中任一项所述的方法，其特征在于，在步骤(a)和(b)中，使用从所述供体采集的B细胞来代替从所述供体采集的外周血淋巴细胞。

(项目9)

根据上述项目中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法在所述活体肝移植后的至少约第3天~约第6天以内进行。

(项目10)

根据上述项目中任一项所述的方法，其中，所述细胞因子包括IFN γ 、TNF、IL-2、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-10和/或TGF β 。

(项目A1)

一种用于在患者中达到免疫耐受的方法，所述方法包括以下步骤：

通过单采术(Apheresis)从供体收集淋巴细胞的步骤；

通过单采术从患者收集淋巴细胞的步骤；

将来自该供体的肝脏或其一部分向该患者进行活体肝移植的步骤；

在该活体肝移植后,对该患者进行的以下步骤:

进行肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的连续给予以及对该活体肝移植的排斥反应进行免疫监测和/或进行定期肝活检的步骤;

在该活体肝移植后,对该患者给予第二免疫抑制剂的步骤;

在给与该第二免疫抑制剂后,对该患者给予用于在该患者中达到免疫耐受的药剂的步骤;

将该肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的给予量逐步减量的步骤。

(项目A2)

根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法通过针对所述排斥反应的免疫监测和/或定期肝活检,确定是否确认达到免疫耐受或转为现有的免疫抑制疗法,

在所述第一免疫抑制剂的给予中止后规定期间内,随时间经过观察患者的全身状态和/或血液生化检查值,与此同时通过在所述第一免疫抑制剂的给予中止后经过规定期间的时段的肝活检,最终确定所述第一免疫抑制剂的给予中止,

进一步,在所述第一免疫抑制剂的给予中止后继续保持稳定的肝功能值且通过肝活检无法确认到在病理学上应治疗的排斥反应的状态规定期间以上时,确定该患者已达到可操作性耐受(Operational tolerance)。

(项目A3)

一种用于在患者中达到免疫耐受的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

在移植14天前~3天前通过单采术从供体收集淋巴细胞的步骤;

在移植1天前通过单采术从患者收集淋巴细胞的步骤;

将来自该供体的肝脏或其一部分向该患者进行活体肝移植的步骤;

以及在该活体肝移植后,对该患者进行的以下步骤:

进行肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和钙调磷酸酶抑制剂的连续给予以及对该活体肝移植的排斥反应进行免疫监测和/或进行定期肝活检的步骤;

在肝移植后第4~6天,对该患者给予20~50mg/kg的环磷酰胺的步骤;

在肝移植后第9天~第11天中的任一时段,对该患者给予用于在该患者中达到免疫耐受的药剂的步骤;

在至少移植后13周,将该钙调磷酸酶抑制剂的给予量减量的步骤;

所述方法通过针对该排斥反应的免疫监测和/或定期肝活检,确定是否确认达到免疫耐受或转为现有的免疫抑制疗法,

在该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止后至少52周内,随时间经过观察患者的全身状态和/或血液生化检查值,与此同时通过在该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止后至少第52周的时段的肝活检,最终确定该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止,

进一步,在该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止后继续维持稳定的肝功能值且通过肝活检无法确认到在病理学上应治疗的排斥反应的状态52周以上时,确定该患者已达到可操作性耐受。

(项目A4)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,至少在所述活体肝移植后4周以内中止

对所述患者给予所述肾上腺皮质类固醇和代谢拮抗剂。

(项目A5)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,至少在所述活体肝移植后26周以内中止对所述患者给予所述肾上腺皮质类固醇和代谢拮抗剂。

(项目A6)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,至少在所述活体肝移植后78周以内中止对所述患者给予所述钙调磷酸酶抑制剂。

(项目A7)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述药剂为抑制在某细胞的细胞表面上表达的CD80和/或CD86与在其他细胞的细胞表面上表达的CD28之间的相互作用的抑制因子。

(项目A8)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述药剂为诱导型抑制性T细胞制剂,该诱导型抑制性T细胞制剂通过将来自所述活体肝移植的患者和供体的外周血淋巴细胞在CD80抗体和/或CD86抗体的存在下进行共培养而得到。

(项目B1)

一种用于将免疫耐受疗法中的免疫抑制剂的给予量减量的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 对于肾上腺皮质类固醇,按照以下日程给予的步骤;

在再灌注时的给予;

进行肝移植后的给予和给予量的减量,在规定期间内结束给予,在该规定期间内不能结束给予时,使用任意的减量方法结束给予,

(2) 对于代谢拮抗剂,按照以下日程给予的步骤;

肝移植后的给予;

在肝移植后的规定期间以内结束给予,

在肝移植后规定期间以内不能结束给予时,使用任意的减量方法结束给予,

根据需要,可以以肝移植后1周为目标增加给予量,这时其特征在于,进行逐步减量,

(3) 对于第一免疫抑制剂,按照以下日程给予的步骤;

(3-1) 肝移植后规定期间(给予量调整期间)

从肝移植当天或肝移植后1天起开始给予,分别以以下的血中谷浓度为目标:

给予开始~肝移植后的第一规定期间的规定的血中谷浓度;

肝移植后第一规定期间后的第二规定期间的规定的血中谷浓度,

(3-2) 肝移植后26周后(第一免疫抑制剂的减量期间)

在肝移植后第一规定期间(减量1)内,调整用法/用量以维持规定的血中谷浓度;

在肝移植后第二规定期间(减量2)起,维持(减量1)的用量,给予次数按照减量日程逐步减量,

(3-3) 根据需要,延长第一免疫抑制剂的减量期间,

其中,各减量在已确认不存在排斥反应时执行。

(项目B2)

一种用于将免疫耐受疗法中的免疫抑制剂减量的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 对于肾上腺皮质类固醇,按照以下日程给予的步骤;

在再灌注时给予1000mg;

从肝移植后1天起在1周内以20mg/天给予,

以5mg/天每周减量,在肝移植后4周以内结束给予,

在肝移植后4周以内不能结束给予时,使用任意的减量方法在肝移植后26周为止结束给予,

(2) 对于代谢拮抗剂,按照以下日程给予的步骤;

从肝移植后1天起1天分2次以合计500mg/天给予,

在肝移植后4周以内结束给予,

在肝移植后4周以内不能结束给予时,使用任意的减量方法在肝移植后26周为止结束给予,

根据需要,可以以肝移植后1周为目标增量至1000~2000mg/天,此时逐步减量以500mg/天进行,

(3) 对于钙调磷酸酶抑制剂,按照以下日程给予的步骤;

(3-1) 肝移植后0天~肝移植后26周(钙调磷酸酶抑制剂的给予量调整期间)

从肝移植当天或肝移植后1天起开始以口服或持续静脉注射给予,以以下的血中谷浓度为目标:

给予开始~肝移植后13周:他克莫司8~12ng/mL或环孢素200~300ng/mL;

肝移植后13周~肝移植后26周:他克莫司5~8ng/mL或环孢素125~200ng/mL,

(3-2) 肝移植后26周后(钙调磷酸酶抑制剂的减量期间)

在肝移植后26周(减量1)内,以1天1次的给予次数调整用法/用量以维持他克莫司3~5ng/mL或环孢素75~125ng/mL的血中谷浓度;

在肝移植后39周(减量2)之后,维持肝移植后26周(减量1)的用量,将给予次数按照钙调磷酸酶抑制剂的减量日程(减量2:周3次;减量3:周2次;减量4:周1次;减量5:停用)逐步减量,

(3-3) 根据需要,钙调磷酸酶抑制剂的减量期间可延长合计13周,

其中,各减量在已确认不存在排斥反应时执行。

(项目B3)

根据上述中任一项所述的方法,其中,所述排斥反应通过如下确定是否存在:

(1) 发热或全身倦怠感等身体表现,和/或

(2) 血液生化检查中的T-Bil/AST/ALT/ γ -GTP中的任一个增加至最近来院时数据的2倍以上。

(项目C1)

一种用于在免疫耐受疗法中通过定期肝活检确认有无排斥反应的方法,所述方法包括以下步骤:

对在肝移植日从移植肝采集对照用肝组织的样本和从肝移植后的定期肝活检中得到的样本进行组织诊断的步骤,以及

在该组织诊断的结果中急性排斥反应的整体评价得到规定中止标准中的任一结果时,判断为“具有在病理学上应治疗的排斥反应”,立即开始针对排斥反应的治疗,中止免疫耐受疗法的步骤。

(项目C2)

一种用于在免疫耐受疗法中通过定期肝活检确认有无排斥反应的方法,所述方法包括以下步骤:

对在肝移植日从移植肝采集对照用肝组织的样本以及从肝移植后26周、减量5的4周后和52周后的定期肝活检得到的样本,按照Banff标准(2016年)和Venturi(2012年)进行评分的组织诊断的步骤,以及

在该组织诊断的结果中得到急性排斥反应的整体评价为“中度以上”、慢性排斥反应的整体评价为“有”和肝纤维化的评分为“2以上”中的任一结果时,判断为“具有在病理学上应治疗的排斥反应”,立即开始针对排斥反应的治疗,中止免疫耐受疗法的步骤。

(项目D1)

一种用于在接受了活体肝移植的患者中达到免疫耐受的方法,其使用品质经评价过的用于达到免疫耐受的药剂,所述方法包括以下步骤:

(a) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞和从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞进行混合培养的步骤;

(b) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞、从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞和用于在该患者中达到免疫耐受的药剂进行混合培养的步骤;

(c) 对步骤(a)和(b)中的细胞因子产生进行测定的步骤;

(d) 在该活体肝移植后,对该患者进行的以下步骤:

进行肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的连续给予以及对该活体肝移植的排斥反应进行免疫监测和/或进行定期肝活检的步骤;

(e) 在该活体肝移植后,对该患者单次给予第二免疫抑制剂的步骤;

(f) 在给与该第二免疫抑制剂后,对该患者给予步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的药剂的步骤;

将该肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的给予量逐步减量的步骤。

(项目D2)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述患者接受免疫抑制剂的给予。

(项目D3)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述药剂为抑制在某细胞的细胞表面上表达的CD80和/或CD86与在其他细胞的细胞表面上表达的CD28之间的相互作用的抑制因子。

(项目D4)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述药剂为诱导型抑制性T细胞制剂,该诱导型抑制性T细胞制剂通过将来自所述活体肝移植的患者和供体的外周血淋巴细胞在CD80抗体和/或CD86抗体的存在下进行共培养而得到。

(项目D5)

根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在於,在步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的情况时,变更针对所述患者的所述免疫耐受疗法。

(项目D6)

根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在於,

(i) 在步骤(b)中的促炎性细胞因子产生与步骤(a)相比上升的情况时,增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法,和/或

(ii) 在步骤(b)中的抗炎性细胞因子产生与步骤(a)相比降低的情况时,增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法。

(项目D7)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述外周血淋巴细胞用CFSE染色。

(项目D8)

根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在於,在步骤(a)和(b)中,使用从所述供体采集的B细胞来代替从所述供体采集的外周血淋巴细胞。

(项目D9)

根据上述项目中任一项所述的方法,其特征在於,所述方法在所述活体肝移植后的至少约第3天~约第6天以内进行。

(项目D10)

根据上述项目中任一项所述的方法,其中,所述细胞因子包括IFN γ 、TNF、IL-2、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-10和/或TGF β 。

(项目E1)

一种对接受了活体肝移植的患者给予的用于达到免疫耐受的药剂,其中,该药剂是品质通过上述项目中任一项所述的方法得到评价的药剂。

(项目F1)

一种用于在接受了活体肝移植的在患者中将免疫耐受疗法中的免疫抑制剂的给予量减量的方法,其使用品质经评价过的用于达到免疫耐受的药剂,所述方法包括上述项目中任一项所述的方法的步骤。

[0008] 本发明中,上述一个或多个特征除了明确示出的组合之外,可有意识地进一步组合来提供。本领域技术人员如果根据需要进行理解以下详细的说明,则可认识到本发明的进一步的实施方式和优点。

[0009] 图1A表示利用MLR的细胞加工物的免疫反应抑制能力评价。将来自患者的细胞与经放射线照射的来自供体的细胞以相同数、将细胞加工物以来自患者的细胞数:细胞加工物=1:1/2、1:1/4、1:1/8或1:1/16的比例混合进行培养后,将培养上清中的IFN γ 浓度利用ELISA进行测定。图1A~C分别表示独立的3次结果。

图1B表示利用MLR的细胞加工物的免疫反应抑制能力评价。将来自患者的细胞与经放射线照射的来自供体的细胞以相同数、将细胞加工物以来自患者的细胞数:细胞加工物=1:1/2、1:1/4、1:1/8或1:1/16的比例混合进行培养后,将培养上清中的IFN γ 浓度利用ELISA进行测定。图1A~C分别表示独立的3次结果。

图1C表示利用MLR的细胞加工物的免疫反应抑制能力评价。将来自患者的细胞与经放射线照射的来自供体的细胞以相同数、将细胞加工物以来自患者的细胞数:细胞加工

物=1:1/2、1:1/4、1:1/8或1:1/16的比例混合进行培养后,将培养上清中的IFN γ 浓度利用ELISA进行测定。图1A~C分别表示独立的3次结果。

图2是表示使用本公开的一个实施方式的诱导型抑制性T细胞制剂,用于达到活体肝移植后的患者的免疫抑制剂减量的整体像的示意图。

图3A是在使用本公开的一个实施方式的诱导型抑制性T细胞制剂进行活体肝移植后的患者的免疫抑制剂的减量时,从活体肝移植起至免疫抑制剂减量为止的患者的日程的一例。图中,“JB-101”表示本公开的诱导型抑制性T细胞制剂,“JB-CPA”表示注射用安道生(Endoxan)。图中的注释如下所示,在图3A和B中共通。※:不可与本公开的诱导型抑制性T细胞制剂的输注同日实施。◎:在外周血单个核细胞采集前和采集后实施。但在采集后无需测定体重。此外,外周血单个核细胞采集前的检查项目可利用前一天的检查数据。●:在肝移植、给予注射用安道生(endoxan)或本公开的诱导型抑制性T细胞制剂输注前实施。在免疫抑制疗法与肝移植日同一天开始的情况时,原则上在肝移植后、类固醇以外的免疫抑制剂的给予开始前实施。△:根据医生等判断,确定给予量等。▲:在供体肝移植采集时(有后台(Back table)时可以)实施。☆:在可能的情况时,根据医生的判断来实施。※a:关于筛查时的检查项目,在有肝移植前8周以内的检查数据时,在患者同意的基础上,可利用该检查数据。但组织相容性试验、病毒检查1、病毒检查2、真菌检查、B型或C型肝炎检查、抗HLA抗体在作为针对活体肝移植的适宜性检查进行实施时,可以在超过肝移植前8周利用该检查数据。※b:减量的时机可以合计延长13周,但从最近的减量时段起相距13周以上后进行下一次减量。※c:除了观察患者的全身状态之外,还实施血液生化检查和肝活检,进行停用免疫抑制剂的最终确认。※d:表示在给予注射用安道生后中止时的检查项目。※e:在与规定观察日重合是,可使用规定观察日的检查结果,省略重复项目。分多天实施时,原则上在1周内实施。※f:除了免疫抑制疗法开始日之外,在将要给予规定的钙调磷酸酶抑制剂前采血,测定血中谷浓度(至少从上次给予起相距12小时以上后采血。※g:怀疑有排斥反应时的肝活检和其组织诊断可以在各实施医疗机构内进行。

图3B是在使用本公开的一个实施方式的诱导型抑制性T细胞制剂进行活体肝移植后的患者的免疫抑制剂的减量时,从活体肝移植起至免疫抑制剂减量为止的患者的日程的一例。

图3C是在使用本公开的一个实施方式的诱导型抑制性T细胞制剂进行活体肝移植后的患者的免疫抑制剂的减量时,从活体肝移植起至免疫抑制剂减量为止的供体的日程的一例。图中的注释如下所示。●:在单采术开始前和结束后实施。但在结束后无需测定体重。※a:关于筛查时的检查项目,在有为移植前8周以内的检查数据时,基于供体的同意,可利用该检查数据。但组织相容性试验、病毒检查在作为针对活体肝移植的适宜性检查实施时,可以在超过肝移植前8周利用该检查数据。※b:在单采术实施后(包括中断)结束或中止临床试验时,在单采术实施后7天(允许范围:+7)实施规定的检查。※c:在闭经后经过12个月及摘出子宫或两卵巢的情况时,不需要检查。

图4是表示使用一个实施方式的本公开的一个实施方式的诱导型抑制性T细胞制剂时的免疫抑制剂的给予/减量日程(免疫抑制剂的给予量调整/减量期间)的示意图。

具体实施方式

[0010] 以下示出最佳方式并对本公开进行说明。在整个本说明书中,单数形式的表现只要没有特别声明,则应理解为还包括其复数形式的概念。因此,单数形式的冠词(例如,英语的情况时为“a”,“an”,“the”等)只要没有特别声明,则应理解为还包括其复数形式的概念。另外,本说明书中使用的术语只要没有特别声明,则应理解为以该领域中通常使用的含义来使用。因此,除非另有定义,否则本说明书中使用的全部专业术语和科学技术术语具有与本发明所属领域的本领域技术人员的通常理解相同的含义。如有冲突,则以本说明书(包括定义)为准。

[0011] 在以下表中示出本说明书中使用的简称或名称的正式名称或其内容。

[表1]

缩写	英语	中文(术语说明)
ALT	Alanine aminotransferase	丙氨酸氨基转移酶
AST	Aspartate aminotransferase	天冬氨酸氨基转移酶
CD4	Cluster of differentiation 4	辅助 T 细胞的细胞表面抗原
CD8	Cluster of differentiation 8	细胞毒性 T 细胞的细胞表面抗原
CD25	Cluster of differentiation 25	—
CD45RA	Cluster of differentiation 45 RA	—
CD80	Cluster of differentiation 80	存在于抗原呈递细胞上的共刺激因子
CD86	Cluster of differentiation 86	存在于抗原呈递细胞上的共刺激因子
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4	细胞色素 P450 3A4
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
FoxP3	Forkhead boxprotein P3	调节性 T 细胞的主要转录因子
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor	粒细胞集落刺激因子
GCP	Good Clinical Practice	与临床试验的实施的的标准相关的日本厚生劳动省令
HLA	Human leukocyte antigen	人类白细胞抗原
JB-101	—	含有来自自身外周血在体外(ex vivo)培养的供体抗原特异性诱导型抑制性 T 细胞的本公开的细胞制剂
JB-CPA	—	注射用环磷酰胺水合物(注射用安道生®500mg)
MLR	Mixed lymphocyte reaction	混合淋巴细胞培养
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
RAI	Rejection activity index	—
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
T-Bil	Total bilirubin	总胆红素
γ-GTP	γ-Glutamyl transpeptidase	γ-谷氨酰转肽酶

(术语的定义)

本说明书中,“约”是指本在说明书中使用时后续的数值的±10%,但在本说明书中,即便在无“约”的情况时,也同样地理解为是指后续的数值的±10%。本说明书中,“%”的表示只要没有特别说明,则是指重量/体积(w/v)%。

[0012] 本说明书中,“免疫耐受”是指未表现出针对特定抗原的特异性免疫反应或特异性免疫反应受到抑制的状态。免疫耐受也可以是指免疫细胞(特别是T细胞)未表现出针对特定抗原的特异性免疫反应或特异性免疫反应受到抑制的状态,以及人未表现出针对特定抗

原的特异性免疫反应或特异性免疫反应受到抑制的状态中的两者或任一者。通过诱发免疫耐受,从而能够进行针对免疫对排斥反应的处置或能够进行针对变态反应的治疗,因此受到了关注。本说明书中,“失能”(anergy)是指在由抗原呈递细胞呈递抗原时未输入共刺激,从而即使在该下次存在共刺激条件下被刺激也无法发生反应的状态。因此,在本说明书中“诱导型抑制性细胞”或“失能细胞”是指产生了免疫耐受的(免疫不应答的)细胞,“诱导型抑制性T细胞”或“失能T细胞”是产生了免疫耐受的(免疫不应答的)T细胞,除了未被活化之外,还包括再次遇到相同的抗原时无反应的T细胞。此外,本说明书中,“诱导免疫耐受的PBMC(或T细胞)”与“诱导型抑制性T细胞”与“失能的PBMC(或T细胞)”含义相同。

[0013] 本说明书中,“受试对象”(英语为subject,有时也表述为“对象”)或“患者”包括饲养动物(例如,牛、绵羊、猫、狗、马)、灵长类(例如,人、以及猴子等非人灵长类)、兔子以及啮齿类(例如小鼠和大鼠)。在特定的实施方式中,受试对象或患者为人。

[0014] 本公开的制剂的对象疾病是对接受了活体间同种器官移植的患者所具有的供体器官的免疫排斥反应。例举一例时,除了活体肝脏移植以外,还以活体肾脏移植、活体肺移植等所伴随的免疫排斥反应为对象。

[0015] 根据本公开的制剂,在给予了通过能够抑制CD80和/或CD86与CD28之间的相互作用的抗体等抑制因子而诱导了针对特定抗原的失能的细胞的受试对象(受体)中,即使在诱导了失能的该细胞从受试对象中消失后,也在至少一定期间(例如,数月、或1年、或3年以上)内维持针对特定抗原的免疫耐受的状态,而能够获得永久性免疫耐受(感染性免疫耐受)。这意味着在给予诱导了失能的细胞的受试对象(受体)的活体内,在可诱导失能的其他细胞中新诱导失能、即诱导感染性免疫耐受。

[0016] 本说明书中,“药剂”、“剂”或“因子”(在英语中均相当于agent)在广义上可以互换使用,只要能够实现预期目标,就可以是任何物质或其他要素(例如,光、辐射能、热、电等能量)。作为这样的物质,例如可举出:蛋白质、多肽、寡肽、肽、多核苷酸、寡核苷酸、核苷酸、核酸(例如,包括cDNA、基因组DNA这样的DNA、mRNA这样的RNA)、多糖、寡糖、脂质、有机小分子(例如,激素、配体、信息传递物质、其他有机小分子化合物、通过组合化学合成的分子、能用作药物的小分子(例如,小分子配体等)等)、它们的复合分子,但限定于这些。

[0017] 本说明书中,“抑制因子”是指能够抑制规定作用(例如,相互作用、信号传递等)的所有种类的小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖等。虽不希望被特定的理论约束,但本公开中,通过阻断细胞表面的CD80和/或CD86与CD28之间的相互作用,抑制CD28共刺激信号,从而诱导T细胞失能。本公开中,用于阻断CD80和/或CD86与CD28之间的相互作用的抑制因子选自小分子、蛋白质、核酸、脂质、糖和它们的组合组成的组。在一个方面,上述蛋白质为抗体或其变体、或细胞表面分子或其变体。在另一方面,上述抗体的变体为抗原结合片段。在另一方面,上述细胞表面分子的变体为融合蛋白。在另一方面,上述抑制因子选自抗CD80抗体、抗CD86抗体、针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白、CD28-Ig融合蛋白组成的组。在另一方面,上述CTLA4-Ig融合蛋白为阿巴西普(Abatacept)或贝拉西普(Belatacept)。此外,还设想与间接抑制上述相互作用的因子(例如,信号传递的上游或下游信号的抑制因子)组合使用。

[0018] 本说明书中,广义的“抗体”是指能与抗原上的特定表位特异性结合的分子或其群体。本说明书中的广义的“抗体”可以是全长抗体(即具有Fc部分的抗体),也可以是缺失Fc

部分的抗体。缺失Fc部分的抗体只要能与目标抗原结合即可,作为这样的抗体,例如可举出:Fab抗体、 $F(ab')_2$ 抗体、Fab'抗体、Fv抗体、scFv抗体等,但不限于这些。抗体可以是任意类型的抗体,即,可以是该领域中公知的免疫球蛋白。在示例性的实施方式中,抗体是同种型IgA、IgD、IgE、IgG或IgM型的抗体。在示例性的实施方式中,本说明书中记载的抗体包含1个或多个 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和/或 μ 重链。在示例性的实施方式中,本说明书中记载的抗体包含1个或多个 κ 或轻链。在示例性的形态中,抗体为IgG抗体,是4个人类亚型: IgG1、IgG2、IgG3和IgG4中之一。此外,作为设想在本公开中使用的抗体,可举出:源自骆驼科动物的抗体(例如,VHH抗体)、源自鲨鱼的抗体(例如,单链抗体)、肽体(peptibody)、纳米抗体(nanobody、单域抗体)、微抗体(minibody)、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双链抗体(diabody)、三链抗体(triobody)、四链抗体(tetrabody)、串联二价(scFV)抗体、串联三价(scFV)抗体)等,这些在该领域中是公知的。例如,希望参照Kortt等人、*Biomol Eng.* 2001 18卷:95~108页、(2001年)和Todorovska等人、*J Immunol Methods.* 248卷:47~66页、(2001年)等。此外抗体包括抗体修饰物或抗体非修饰物。抗体修饰物可以是抗体与例如聚乙二醇等各种分子结合而成物。抗体修饰物可以通过使用公知的方法对抗体实施化学修饰而得到。关于人工制得的抗体和抗体的各种修饰/改造方法,也参照生化学(2016)第88卷第3号380~385页。

[0019] 本说明书中,狭义的“抗体”是指能与抗原上的特定表位特异性结合的免疫球蛋白或其群体,并将其变异体称为“抗体的变异体”。本说明书中的狭义的“抗体”可以是全长抗体(即具有Fc部分的抗体),本说明书中的“抗体的变异体”可以是上述抗体的缺失Fc部分的变异体。因此,本说明书中,狭义的抗体也可称为全长抗体,抗体的变异体也可称为全长抗体的变异体。缺失Fc部分的变异体只要能与目标抗原结合即可,作为这样的变异体,例如可举出:Fab抗体、 $F(ab')_2$ 抗体、Fab'抗体、Fv抗体、scFv抗体等,但不限于这些。此外抗体的变异体包括抗体修饰物或抗体非修饰物。抗体修饰物可以是抗体与例如聚乙二醇等各种分子结合而成物。抗体修饰物可以通过使用公知的方法对抗体实施化学修饰而得到。

[0020] 本说明书中,例如,为了诱导产生对抗原特异性的多克隆抗体,可以通过对哺乳类(例如,大鼠、小鼠、兔子、牛、猴子等)、鸟类等给予含目标抗原的免疫原而生成“多克隆抗体”。免疫原的给予可以注入1个以上的免疫剂,以及在所需的情况下可以注入佐剂(adjuvant)。佐剂有时也用于增强免疫应答,还可以包含弗氏佐剂(完全或不完全)、矿物凝胶(氢氧化铝等)或表面活性物质(溶血卵磷脂等)等。免疫方案在本技术领域中公知,有时根据所选择的宿主生物,通过诱发免疫应答的任意的方法来实施(蛋白质实验手册(日语原文:タンパク質実験ハンドブック),羊土社(2003):86-91.)。

[0021] 本说明书中,“单克隆抗体”包括如下情况:除了少量具有能自然产生的突变的抗体之外,构成群体的各个抗体实质上为对应于单一表位的相同抗体。或者,除了少量具有能自然产生的突变的抗体之外,构成群体的各个抗体可以是实质上相同的抗体。单克隆抗体具有高度特异性,与典型地包含对应于不同表位的不同抗体那样通常的多克隆抗体、和/或与典型地包含对应于相同表位的不同抗体那样通常的多克隆抗体不同。除了其特异性之外,单克隆抗体在可以由不被其它免疫球蛋白污染的杂交瘤培养而合成方面很有用。“单克隆”这样的描述可以示出实质上由均匀的抗体群体获得这一特征,但并不意味着必须通过特定的方法生产抗体。例如,单克隆抗体可以通过与“Kohler G, Milstein C., *Nature*. 1975 Aug 7; 256(5517): 495-497.”中公开的杂交瘤法同样的方法来制作。或者,单

克隆抗体还可以通过与美国专利第4816567号中记载那样的重组法同样的方法来制作。或者,单克隆抗体可以使用与“Clackson et al., Nature.1991Aug 15;352(6336):624-628.”、“Marks et al., J Mol Biol.1991Dec 5;222(3):581-597.”中记载那样的技术同样的方法从噬菌体抗体文库中分离。或者,还可以通过“蛋白质实验手册,羊土社(2003):92-96.”中记载的方法来制作。

[0022] 本公开的一个实施方式中,“嵌合抗体”例如是将异种生物之间的抗体的可变区与抗体的恒定区连接而成的抗体,能够通过基因重组技术而构建。小鼠-人嵌合抗体例如可以按照“Roguska et al., Proc Natl Acad Sci U S A.1994Feb 1;91(3):969-973.”中记载的方法来制作。用于制作小鼠-人嵌合抗体的基本方法,例如将存在于经克隆化的cDNA的小鼠前导序列和可变区序列与已经存在于哺乳类细胞的表达载体中的编码人源抗体恒定区的序列相连接。或者,也可以将存在于经克隆化的cDNA的小鼠前导序列和可变区序列与编码人源抗体恒定区的序列连接后,连接到哺乳类细胞表达载体。人源抗体恒定区的片段可以是任意的人源抗体的H链恒定区和人源抗体的L链恒定区的片段,例如关于人H链,可以举出:C γ 1、C γ 2、C γ 3或C γ 4,关于L链,可以举出:C λ 或C κ 。

[0023] 本公开的一个实施方式中,“人源化抗体”例如是具有源自非人类的1个以上的CDR和源自人免疫球蛋白的框架区(FR)、进一步具有源自人免疫球蛋白的恒定区并且与期望的抗原结合的抗体。抗体的人源化可以通过使用本技术领域已知的各种方法来实施(Almagro et al., Front Biosci.2008Jan 1;13:1619-1633.)。例如可举出:CDR移植(Ozaki et al., Blood.1999Jun1;93(11):3922-3930.)、Re-surfacing(Roguska et al., Proc Natl Acad Sci US A.1994Feb 1;91(3):969-973.)或FR shuffle(Damschroder et al., Mol Immunol.2007Apr;44(11):3049-3060. Epub 2007Jan 22.)等。为了修饰抗原结合(优选为了改善),可以将人FR区域的氨基酸残基替换为与来自CDR供体抗体的对应的残基。该FR置换可以通过本技术领域中公知的方法来实施(Riechmann et al., Nature.1988Mar24;332(6162):323-327.)。例如,可以通过CDR与FR残基的相互作用的模拟(modelling)来鉴定对于抗原结合重要的FR残基。或者,可以通过序列比较来鉴定特定位置处的异常FR残基。

[0024] 本公开的一个实施方式中,“人源抗体”例如是包含构成抗体的重链的可变区和恒定区、轻链的可变区和恒定区的区域源自编码人免疫球蛋白的基因的抗体。作为主要的制作方法,有:人源抗体作用转基因小鼠法、噬菌体展示法等。人源抗体作用转基因小鼠法中,如果在基因敲除了内源性Ig的小鼠中导入功能性的人的Ig基因,则代替小鼠抗体而产生具有多样化的抗原结合能的人源抗体。如果进一步对该小鼠进行免疫,则人单克隆抗体可以通过现有的杂交瘤法而得到。例如,可以按照“Lonberg et al., Int Rev Immunol.1995;13(1):65-93.”中记载的方法来制作。噬菌体展示法典型的是在作为大肠杆菌病毒之一的M13、T7等纤维状噬菌体的外壳蛋白(g3p、g10p等)的N末端侧以不丧失噬菌体感染性地将外源基因表达为融合蛋白的系统。例如,可以按照“Vaughan et al., Nat Biotechnol.1996Mar;14(3):309-314.”中记载的方法来制作。

[0025] 本公开的一个实施方式中,在制造本公开的制剂时,可以使用从给予本公开的组合物或制剂的受试对象(患者)得到的细胞或源自从该受试对象得到的细胞的细胞。本公开的一个实施方式中,本公开的制剂也可以使用产生免疫应答的受试对象本身所生成的抗

原、例如具有自身免疫疾病的受试对象中作为成为自身免疫疾病原因的受试对象本身所生成抗原的来自受试对象的抗原制造。本公开的一个实施方式中,本公开的制剂还可以使用作为能产生免疫应答的外源抗原的非源自受试对象的抗原制造。本公开的一个实施方式中,本公开的制剂还可以使用含有非源自受试对象的抗原的任意物质或作为物质的集合物的非源自受试对象的抗原的含有物(antigen-containing material)制造,例如可举出表达了非源自受试对象的抗原的细胞、细胞群体、组织等。

[0026] 已知在接受了器官、组织或细胞移植的受试对象或患者中,受试对象或患者的免疫系统会攻击所移植的器官、组织或细胞,而引起损伤或破坏的移植免疫排斥反应,本公开的一个实施方式中,本公开的组合物或制剂即使在这样的情况下也能够引起免疫耐受。

[0027] (优选的实施方式)

以下记载优选的实施方式的说明,但该实施方式是本发明的示例,应理解为本发明的范围不限于这样优选的实施方式。应理解为本领域技术人员参考以下那样的优选的实施例而能够容易地进行在本发明的范围内的改变、变更等。关于这些实施方式,本领域技术人员可以适当参考本说明书中的记载来组合任意的实施方式。此外,可理解本发明的以下的实施方式可以单独使用或将这些组合使用。

[0028] <诱导型抑制性T细胞制剂>

在一个方面,本公开提供一种诱导型抑制性T细胞制剂和其用法、用量等使用法,以及使用这些来评价药剂的品质的方法,所述药剂为对接受了活体肝移植的患者给予的用于达到免疫耐受的药剂。

[0029] 在一个实施方式中,本公开的诱导型抑制性T细胞通过将患者外周血单个核细胞在抗CD80抗体和抗CD86抗体的存在下与经放射线照射的供体外周血单个核细胞共培养进行诱导而得到。本公开的诱导型抑制性T细胞的构成成分是以T淋巴细胞为中心的单核细胞,其中主要为CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞。在一个实施方式中,本公开的诱导型抑制性T细胞的有效成分为CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T细胞(调节性CD4⁺T细胞)和CD8⁺CD45RA⁻T细胞(抑制性CD8⁺T细胞)。虽然并不受理论束缚,但是将本公开的诱导型抑制性T细胞给予器官移植患者时,与在供体器官中表达的HLA-I类和II类抗原反应的效应CD4⁺T细胞和效应CD8⁺T细胞的活化被抑制,被诱导为新的调节性CD4⁺T细胞和抑制性CD8⁺T细胞。其结果,可期待供体HLA抗原特异性的免疫排斥反应持续减弱,可以使免疫抑制剂的使用量减少或停用。

[0030] 本公开的诱导型抑制性T细胞可以在作为细胞培养加工设施的顺天堂大学大学院医学研究科研究基盘中心细胞处理室中制造。

[0031] 在一个实施方式中,本公开的诱导型抑制性T细胞可制成在一级包装1包装袋(100mL)中含有源自自身的诱导型抑制性T细胞的有核细胞例如含有约 5.0×10^5 个以上、约 5.0×10^6 个以上、约 5.0×10^7 个以上、约 5.0×10^8 个以上、约 5.0×10^9 个以上的液剂。在一个实施方式中,本公开的诱导型抑制性T细胞可以制成在将受试者外周血单个核细胞在抗CD80抗体和抗CD86抗体的存在下与经放射线照射的供体外周血单个核细胞共培养进行诱导而成的细胞。

[0032] 在一个实施方式中,本公开的诱导型抑制性T细胞只要起到免疫耐受的诱导效果,则保存方法及有效期间没有特别限制,例如作为保存方法,可设为约 $8 \pm 3^\circ\text{C}$ 、约 $7 \pm 3^\circ\text{C}$ 、约 $6 \pm 3^\circ\text{C}$ 、约 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 或约 $4 \pm 3^\circ\text{C}$ 。此外作为有效期间,例如可设为一级包装完成后约36小时以

内、约30小时以内、约24小时以内、约18小时以内、约12小时以内或约6小时以内。

[0033] 在一个实施方式中,本公开的诱导型抑制性T细胞的保管用的经一级包装的包装袋可以以1包装袋/袋被保管于二级包装容器中,进一步以1包装袋/袋与吸水片一起保管于最终包装容器中。可以在一级包装上粘贴记载有“治疗用途”、“制造编号”、“产品名称”、“含有细胞数”、“使用期限”、“保管条件”等的标签。

[0034] 本公开中,作为“用于达到免疫耐受的药剂”的一例,可以举出:“抑制在某细胞的细胞表面上表达的CD80和/或CD86与在其他细胞的细胞表面上表达的CD28之间的相互作用的抑制因子”,在这些中,除了抗CD80抗体、抗CD86抗体、它们的双抗体以外,可以举出针对CD80和/或CD86的抑制因子(例如,阿巴西普或贝拉西普、或在本说明书中所说明的诱导型抑制性T细胞)等,但不限于这些。

[0035] 本公开中,在一例中“抗CD80抗体”和“抗CD86抗体”可分别使用W02019/245037 (PCT/JP2019/024752)、W02014/186193 (PCT/US2014/037195) 等中记载的抗CD80抗体和抗CD86抗体。例如,作为抗CD80抗体和抗CD86抗体,也可以分别使用嵌合抗CD80抗体和嵌合抗CD86抗体。例如,作为抗CD80抗体和抗CD86抗体,也可以分别使用人抗CD80抗体和人抗CD86抗体。抗人CD80抗体可以为亚型IgG1。此外抗人CD86抗体也可以为亚型IgG1。编码抗CD80抗体和抗CD86抗体的质粒可以自己制作,也可以使用委托外部(例如,TPG Biologics, Inc. 中国台湾)而从CHO细胞表达,产生抗体并纯化而成物。也可以使用W02019/245037 (PCT/JP2019/024752)、W02014/186193 (PCT/US2014/037195) 等中具体记载的抗CD80抗体和抗CD86抗体以外的抗体。

[0036] 在其他实施方式中,“抗CD80抗体”和“抗CD86抗体”可以置换为能够抑制CD80和/或CD86与CD28之间的相互作用的任意的抑制因子。作为这样的抑制因子,除了抗CD80抗体、抗CD86抗体以外,还可举出针对CD80和CD86的双特异性抗体、抗CD28抗体或它们的抗原结合片段、CTLA4-Ig融合蛋白(例如,阿巴西普或贝拉西普)、CD28-Ig融合蛋白。贝拉西普例如可以从Bristol-Myers Squibb, New York, NY获得(最终浓度10 μ g/ml ~ 40 μ g/ml)。

[0037] 本公开的一个实施方式中,作为用于获得肝移植后的免疫耐受的诱导型抑制性T细胞输注疗法的预处置,可以给予安道生(Endoxan)。作为安道生,例如可以使用以下。

(1) 名称

- 商品名称:注射用安道生500mg
- 通用名称:注射用环磷酰胺(Cyclophosphamide)水合物

(2) 组成

作为预处置药而给予的“注射用环磷酰胺水合物(以下为环磷酰胺)”在1小药瓶(vial)中含有环磷酰胺水合物534.5mg(相当于无水环磷酰胺物500mg)。

(3) 保存方法

在28 $^{\circ}$ C(冰箱)下保存

(4) 包装和标识

含有环磷酰胺水合物534.5mg的小药瓶以1小药瓶/箱保管于白箱中。可以在内包装(小药瓶)和外包装箱(白箱)上粘贴记载有“治疗用途”、“制造编号”、“识别编码”、“使用期限”、“保管条件”等的标签。

[0038] <品质评价>

在本公开的一个方面,提供一种评价药剂品质的方法,所述药剂为对接受了活体肝移植的患者给予的用于达到免疫耐受的药剂,其中,所述方法包括以下步骤:

(a) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞和从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞进行混合培养的步骤;

(b) 将从该活体肝移植前的患者采集的外周血淋巴细胞、从该活体肝移植的供体采集的外周血淋巴细胞和用于在该患者中达到免疫耐受的药剂进行混合培养的步骤;

(c) 对步骤(a)和(b)中的细胞因子产生进行测定的步骤,

在步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的情况时,将该药剂视为免疫耐受疗法用的药剂。

[0039] 在一个实施方式中,本公开的方法中的患者可以在事先接受免疫抑制剂的给予,也可以是未接受免疫抑制剂的患者。

[0040] 在一个实施方式中,本公开的药剂可作为抑制在某细胞的细胞表面上表达的CD80和/或CD86与在其他细胞的细胞表面上表达的CD28的相互作用的抑制因子,例如,作为这样的药剂,可以举出:贝拉西普、阿巴西普和以下说明的诱导型抑制性T细胞制剂。在一个实施方式中,本公开的药剂可作为诱导型抑制性T细胞制剂,这种情况时,诱导型抑制性T细胞制剂可以将来自活体肝移植的患者和供体的外周血淋巴细胞在CD80抗体和/或CD86抗体的存在下共培养而得到。在一个实施方式中,作为可以在本公开的品质评价方法中使用的诱导型抑制性T细胞,可以举出在本公开的其他处说明的诱导型抑制性T细胞。

[0041] 本公开的一个实施方式中,在步骤(b)中的细胞因子产生与步骤(a)相比发生变化的情况时,可以变更针对所述患者的所述免疫耐受疗法,例如,(i)在步骤(b)中的促炎性细胞因子产生与步骤(a)相比上升的情况时,可以增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法。此外在其他实施方式中,(ii)在步骤(b)中的抗炎性细胞因子产生与步骤(a)相比降低的情况时,可以增加对所述患者给予的免疫抑制剂的量和/或中止针对所述患者的免疫耐受疗法。在一个实施方式中,在步骤(a)与步骤(b)相比较时,细胞因子产生的上升或降低可包括产生能够检测之差的情况。

[0042] 本公开的一个实施方式中,外周血淋巴细胞也可以用CFSE染色。此外在其他实施方式中,在步骤(a)和(b)中,也可以使用从供体采集的B细胞来代替从供体采集的外周血淋巴细胞。

[0043] 本公开的一个实施方式中,作为免疫抑制剂,没有特别限制,例如可以使用钙调磷酸酶抑制剂,作为钙调磷酸酶抑制剂,例如可以举出:他克莫司或环孢素。

[0044] 本公开的一个实施方式中,本公开的品质评价方法是用于对接受了活体肝移植的患者达到免疫耐受的评价方法,可以在任意的时段进行,例如可以在活体肝移植后、至少约第2天以内、约第4天以内、约第6天以内、约第8天以内或活体肝移植前进行。此外在一个实施方式中,本公开的方法也可以进行多次。

[0045] 在一个实施方式中,作为细胞因子,可以举出:IFN γ 、TNF、IL-2、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-10、TGF β 等,其中,作为炎症性细胞因子,可以举出:IL-17、IL-18等,作为抗炎性细胞因子,可以举出:IL-10、TGF β 等。

[0046] 评价对接受了活体肝移植的患者给予的用于达到免疫耐受的药剂的品质的方法中使用的细胞因子产生的测定例如可以使用ELISA法如下进行实施。

[0047] 1.1.样品的确认

ELISA中使用的样品确认培养上清的信息。

[0048] 1.2.ELISA用试剂的制备

全部试剂和使用的样品在使用前恢复至室温。

[0049] 1.2.1.洗涤缓冲液(Wash Buffer)的制备

用蒸馏水将洗涤缓冲浓缩液(Wash Buffer Concentrate)稀释25倍,制备洗涤缓冲液。

[0050] 1.2.2.校准稀释液(Calibrator Diluent)的制备

用蒸馏水将校准稀释液RD5P稀释5倍,制备校准稀释液RD5P(稀释比1:5)。

[0051] 1.2.3.标准贮备液(Standard Stock Solution)(10,000pg/mL)的制备

将人 γ 干扰素标准品(Human IFN- γ Standard)用小药瓶标签所记载量的蒸馏水溶解后,平稳地进行搅拌,静置最少15分钟,制备标准贮备液(10,000pg/mL)。

[0052] 1.2.4.标准稀释系列的制备

采集校准稀释液RD5P(稀释比1:5)900 μ L,与标准贮备液(10,000pg/mL)100 μ L混合,制备标准贮备液(1,000pg/mL)。使用校准稀释液RD5P(稀释比1:5),成倍稀释标准贮备液(1,000pg/mL),制备2倍稀释系列的标准溶液。此外,稀释系列溶液的制备中使用聚丙烯制试管。标准贮备液(1000pg/mL)用作标准的最高浓度点,校准稀释液RD5P(稀释比1:5)用作零点校准(Blank)。

[0053] 1.2.5.稀释样品的制备

样品用校准稀释液RD5P(稀释比1:5)稀释。将均匀混和的样品设置在离心分离机,以460G、5分钟、4 $^{\circ}$ C进行离心分离,将其上清液用于稀释。

[0054] 1.2.6.底物液(Substrate Solution)的制备

将显色剂(Color Reagent)A和显色剂B以等量进行混合,制备底物液。将制备的底物液避光保存,在制备后15分钟以内使用。制备液体量根据200 μ L/孔计算出所需量。

[0055] 1.2.7.分析(Assay)

1) 一次反应

a.制作酶标板布局(Plate Layout)。

b.将所需量的微孔板条(Microplate Strip)设置在酶标板架(Plate Frame)中(以下称为酶标板(Assay plate))。

c.以100 μ L/孔向酶标板中添加分析稀释液(Assay Diluent)RD1-63。

d.按照a.的酶标板布局,作为标准稀释系列、样品和Blank,以100 μ L/孔添加校准稀释液RD5P(稀释比1:5)。此外,本操作在从添加分析稀释液RD1-63添加后15分钟以内完成。

e.酶标板用封板膜(plate seal)覆盖,放入设定为25 $^{\circ}$ C的恒温振荡培养机箱内(室温),静置2小时进行孵育。

[0056] 2) 二次反应

a.从酶标板的各孔中除去添加的溶液,以400 μ L/孔的洗涤缓冲液最少洗涤4次。

b.将酶标板反扣在擦拭纸上而将残留的洗涤缓冲液全部除去,以200 μ L/孔添加IFN- γ 偶联物(Conjugate)。用新的封板膜覆盖,放入设定为25 $^{\circ}$ C的恒温振荡培养机箱内

(室温),静置2小时进行孵育。

[0057] 3) 显色

a. 从酶标板的各孔中除去添加的溶液,以400 μ L/孔的洗涤缓冲液最少洗涤4次。

b. 将酶标板反扣在擦拭纸上而将残留的洗涤缓冲液全部除去,以200 μ L/孔添加底物液。用新的封板膜覆盖,放入设定为25 $^{\circ}$ C的恒温振荡培养机箱内(室温),避光静置30分钟进行孵育。

c. 以50 μ L/孔向酶标板中添加终止液(Stop Solution)后,轻敲酶标板进行搅拌,确认孔内的溶液颜色由蓝色均匀地变为黄色。

[0058] 4) 测定

a. 使用设定为450nm/570nm的酶标仪(Microplate Reader),在30分钟以内测定各孔的OD。

b. 测定结束后,在软件上制作校准曲线,确认计算出各样品的IFN- γ 量,覆盖保存。

c. 打印测定结果,并导出数据。

[0059] 2. 解析

使用酶标仪的数据进行计算和图表制作。

[0060] 2.1. 各样品的IFN- γ 浓度的比较(pg/mL)

比较在酶标仪的软件上计算出的各样品的IFN- γ 量(pg/mL)。

[0061] 2.2. 以Allo为指标的IFN- γ 量的比例(%)的比较

使用在酶标仪的软件上计算出的样品的IFN- γ 量,计算出将Allo的IFN- γ 量设为100%时的各样品的IFN- γ 量的比例(%)并进行比较。

计算式如下所示。

各样品(未处理(Naive)和样品No. (1) ~ (4))的IFN- γ 量 \div Allo的IFN- γ 量 \times 100

此外,受体与供体的免疫反应较弱时,预料难以以Allo为指标的IFN- γ 量的比例(%)进行比较,因此使用将浓度调整为 4.0×10^6 细胞/mL的各细胞悬浮液和培养基实施共培养,将由这些培养上清计算出的结果作为参考处理。

[0062] 本公开的一个实施方式中,本公开的品质评价方法例如可以利用混合淋巴细胞反应(MLR)进行,作为一例,MLR可以如下进行。

[0063] 样本的确认

记录与MLR用样本相关的信息(下述项目为一例)。

- 样本识别信息(ID、制造编号等)
- 接收容器
- 细胞数
- 液体量

[0064] 1.1.1. 供体冷冻细胞和受体(recipient)冷冻细胞

记录冷冻保存的供体细胞和受体细胞的信息。

[0065] 1.2. 将供体冷冻细胞和受体冷冻细胞解冻。

1) 对于待解冻的冷冻冻存管1~2支,向15mL离心管中分注培养基13mL。

2) 将冷冻的冻存管浸渍于37 $^{\circ}$ C水浴中,在成为半解冻的时段提起。

- 3) 向在1) 中分注的13mL培养基转移解冻的细胞。
- 4) 在离心分离机中设置15mL离心管,以460G、5分钟、4°C进行离心分离。
- 5) 除去上清,在适量培养基中悬浮沉淀物。
- 6) 采集少量细胞悬浮液,用台盼蓝 (Trypan blue) 溶液稀释为2~100倍后,进行细胞计数 (Cell Counter)。
- 7) 根据在6) 的计数计算出活细胞浓度。计算式如下所示。

$$(\text{四分区合计的活细胞数}) \div 4 \times \text{稀释倍率} \times 10^4 = \text{活细胞浓度 (细胞/mL)}$$

[0066] 1.1.1. 细胞浓度调整

1) 细胞加工物可以基于由CPC提供的MLR用样本 (细胞加工物) 的细胞信息,使用培养基调整为任意的细胞浓度。例如,在一个实施方式中可以将浓度调整为总细胞浓度 2.0×10^5 细胞/mL、 4.0×10^5 细胞/mL、 2.0×10^6 细胞/mL、 4.0×10^6 细胞/mL、 2.0×10^7 细胞/mL、 4.0×10^7 细胞/mL等。

2) 受体细胞和供体细胞可以基于细胞计数的结果,使用培养基分别调整为任意的活细胞浓度。例如,在一个实施方式中可以将浓度调整为活细胞浓度 2.0×10^5 细胞/mL、 4.0×10^5 细胞/mL、 2.0×10^6 细胞/mL、 4.0×10^6 细胞/mL、 2.0×10^7 细胞/mL、 4.0×10^7 细胞/mL等。

[0067] 1.2. 开始共培养

1) 在一个实施方式中,使用将浓度调整为 2.0×10^6 细胞/mL的各细胞悬浮液和培养基,以表2的比例制备混合的细胞混合液 (Plate No.1)。此外,制备在下述的条件下实施。

2) 在一个实施方式中,使用将浓度调整为 4.0×10^6 细胞/mL的各细胞悬浮液和培养基,以表2的比例制备混合的细胞混合液 (Plate No.2)。此外,制备在下述的条件下实施。按混合的比例标注样品名,之后用样品名识别。

混合顺序可以为任意顺序。例如在一个实施方式中,可设为受体细胞→细胞加工物→培养基→供体细胞等。

将各细胞悬浮液以各孔独立地以250 μ L/孔接种到96孔圆底板的3孔中。

[表2]

样品		①	②	③	④
No.	名称	受体细胞	细胞加工物	培养基	供体细胞
—	Naive	100 μ L	—	150 μ L	—
—	Allo	100 μ L	—	50 μ L	100 μ L
(1)	1:1/2	100 μ L	50 μ L	—	100 μ L
(2)	1:1/4	100 μ L	25 μ L	25 μ L	100 μ L
(3)	1:1/8	100 μ L	12.5 μ L	37.5 μ L	100 μ L
(4)	1:1/16	100 μ L	6.25 μ L	43.75 μ L	100 μ L
—	A+D	—	100 μ L	50 μ L	100 μ L

3) 在CO₂培养箱中开始培养。

[0068] 1.1. 培养上清的回收 (共培养的开始)

在从培养开始起经过5天后实施。

1) 将培养中的96孔圆底板从CO₂培养箱中取出,确认未发生污染等异常,并结束培养。

2) 将以各样品每孔220 μ L的培养上清地各孔独立地回收到1.5mL的Eppendorf管

中。

※为了避免回收细胞团块,注意移液器吸头前端不接触底面

3) 回收的培养上清用作ELISA样品。此外,在回收当天不进行ELISA时,冷冻保存在生物医疗冷冻柜(Biomedical freezer)中。

[0069] 如上所述的MLR是评价淋巴细胞对非自身的反应性的方法,因此可用于评价诱导免疫耐受的本公开的诱导型抑制性T细胞的品质。例如,通过进行该试验,可以预测在给予本公开的诱导型抑制性T细胞后,能够在何种程度上抑制对患者移植器官的免疫反应。此外,在一个实施方式中,MLR试验中使用的来自患者和供体的淋巴细胞可以取一部分在本公开的诱导型抑制性T细胞的制造过程中获得物使用,因此能够不会因样本采集而对患者和供体造成追加负担地实施。

[0070] 本公开的一个实施方式中,上述说明的ELISA法可以按照现有公知的方法或试剂盒的使用说明书的流程来实施,关于MLR法,除了本说明书中记载的事项之外,也可以适当利用现有公知的方法或试剂盒的使用说明书的流程特征的一部分或全部。

[0071] <利用诱导型抑制性T细胞制剂的免疫耐受>

本公开的一个实施方式中,可以以活体肝移植患者为对象,以是否达到可操作性耐受(Operational tolerance)为指标来评价对本公开的诱导型抑制性T细胞的输注后的免疫耐受诱导能力(有效性)。

[0072] 因此,在本公开的一个方面,提供一种用于在患者中达到免疫耐受的方法,所述方法包括如下步骤:通过单采术从供体收集淋巴细胞的步骤;通过单采术从患者收集淋巴细胞的步骤;将来自该供体的肝脏或其一部分向该患者进行活体肝移植的步骤;以及在该活体肝移植后,对该患者进行的以下步骤:

进行肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的连续给予以及对该活体肝移植的排斥反应进行免疫监测和/或进行定期肝活检的步骤;在该活体肝移植后,对该患者给予第二免疫抑制剂的步骤;在给与该第二免疫抑制剂后,对该患者给予用于在该患者中达到免疫耐受的药剂的步骤;将该肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和第一免疫抑制剂的给予量逐步减量的步骤。

[0073] 另外,在本公开的一个实施方式中,可以通过针对所述排斥反应的免疫监测和/或定期肝活检,确定是否确认达到免疫耐受或转为现有的免疫抑制疗法。此外,在一个实施方式中,也可以通过在所述第一免疫抑制剂的给予中止后规定期间内,随时间经过观察患者的全身状态和/或血液生化检查值,与此同时在所述第一免疫抑制剂的给予中止后经过规定期间的时段的肝活检,最终确定所述第一免疫抑制剂的给予中止。此外,在其他实施方式中,还可以在稳定的肝功能值且通过肝活检无法确认在病理学上应治疗的排斥反应的状态在所述第一免疫抑制剂的给予中止后继续规定期间以上时,确定该患者已达到可操作性耐受。

[0074] 另外,在本公开的一个方面,提供一种用于在患者中达到免疫耐受的方法,其特征不在于,所述方法包括以下步骤:在移植14天前~3天前通过单采术从供体收集淋巴细胞的步骤;在移植1天前通过单采术从患者收集淋巴细胞的步骤;将来自该供体的肝脏或其一部分向该患者进行活体肝移植的步骤;以及在该活体肝移植后,对该患者进行的以下步骤:

进行肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂和钙调磷酸酶抑制剂的连续给予以及对该活

体肝移植的排斥反应进行免疫监测和/或进行定期肝活检的步骤;在肝移植后第4~6天,对该患者给予20~50mg/kg的环磷酰胺的步骤;在肝移植后第9天~第11天中的任一时段,对该患者给予用于在该患者中达到免疫耐受的药剂的步骤;在至少移植后13周,将该钙调磷酸酶抑制剂的给予量减量的步骤,其中,通过针对该排斥反应的免疫监测和/或定期肝活检,确定是否确认达到免疫耐受或转为现有的免疫抑制疗法,在该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止后至少52周内,随时间经过观察患者的全身状态和/或血液生化检查值,与此同时通过在该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止后至少第52周的时段的肝活检,最终确定该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止,进一步,在该钙调磷酸酶抑制剂的给予中止后继续维持稳定的肝功能值且通过肝活检无法确认到在病理学上应治疗的排斥反应的状态52周以上时,确定该患者已达到可操作性耐受。

[0075] 本公开的一个实施方式中,作为肾上腺皮质类固醇,没有特别限制,例如可以使用甲基泼尼松龙。此外在一个实施方式中,作为代谢拮抗剂,没有特别限制,例如可以使用霉酚酸酯。

[0076] 本公开的一个实施方式中,作为第一免疫抑制剂,没有特别限制,例如可以使用钙调磷酸酶抑制剂,作为钙调磷酸酶抑制剂,例如可以举出:他克莫司或环孢素。此外在一个实施方式中,作为第二免疫抑制剂,没有特别限制,例如可以举出:环磷酰胺。

[0077] 本公开的一个实施方式中,可以至少在活体肝移植后4周以内中止对患者给予肾上腺皮质类固醇和代谢拮抗剂。在另外的实施方式中,可以至少在活体肝移植后26周以内中止对患者给予肾上腺皮质类固醇和代谢拮抗剂。

[0078] 本公开的一个实施方式中,可以至少在活体肝移植后78周以内中止对患者给予钙调磷酸酶抑制剂。

[0079] 本公开的一个实施方式中,达到可操作性耐受可定义为如下状态:在肝移植后78周(最多91周)为止停用免疫抑制剂,然后稳定的肝功能值且通过肝活检无法确认在病理学上应治疗的排斥反应的状态在停用免疫抑制剂后继续52周以上。

[0080] 本公开的一个实施方式中,可以将按照免疫抑制剂的减量/停用方法在肝移植后26周后减量时的钙调磷酸酶抑制剂的减量开始时~停用时为止的给予量的变化、肾上腺皮质类固醇和代谢拮抗剂的停用持续期间用作有效性的次要评价项目。进一步地,在其他实施方式中,也可以评价免疫抑制剂、单采术、环磷酰胺的安全性。

[0081] 本公开的一个实施方式中,利用本公开的诱导型抑制性T细胞制剂的免疫耐受可以以接受活体肝移植的肝衰竭晚期患者为对象,由肝移植前观察期间、免疫抑制剂的给予量调整/减量期间和停用免疫抑制剂的确认期间构成。

[0082] 本公开的一个实施方式中,在肝移植前观察期间,在获得同意后,可以在与实施筛查检查同时从供体的肝移植14天前~3天前、在从受试者的肝移植前天,通过淋巴细胞单采术法采集外周血单个核细胞。将对采集的受试者外周血单个核细胞进行放射线照射而灭活的供体外周血单个核细胞(抗原)和抗CD80/抗CD86单克隆抗体一起培养10天,能够诱导本公开的诱导型抑制性T细胞。

[0083] 在一个实施方式中,在免疫抑制剂的给予量调整/减量期间,出于使体内淋巴细胞暂时减少的目的,可以在肝移植后5天给予环磷酰胺40mg/kg(根据需要减量至20mg/kg)。然后,可以将本公开的诱导型抑制性T细胞在肝移植后10天输注至受试者,对在肝移植后78周

(最长91周)为止的利用本公开的诱导型抑制性T细胞的免疫耐受诱导能力和安全性进行评价。在一个实施方式中,受试者可以在肝移植后在入院下管理至少4周。

[0084] 在一个实施方式中,本公开的方法中使用的免疫抑制剂没有特别限制,例如可以使用依据通常的肝移植后的药剂(肾上腺皮质类固醇、代谢拮抗剂、钙调磷酸酶抑制剂等),可以按照本公开的免疫抑制剂的减量/停用方法进行减量。

[0085] 肾上腺皮质类固醇和代谢拮抗剂霉酚酸酯的给予优选以肝移植后4周以内为目标中止给予。但根据受试者的状态等由医生等判断在肝移植后4周以内无法中止的情况时,可以在钙调磷酸酶抑制剂的减量开始前为止中止给予。从肝移植后4周起,通过以他克莫司为第一选择的钙调磷酸酶抑制剂单剂来维持免疫抑制,在肝移植后26周后,可以按照钙调磷酸酶抑制剂的减量日程,进行逐步减量,最终通过获得免疫耐受而停用免疫抑制剂。一个实施方式的免疫抑制剂的给予/减量日程示于图4。

[0086] 在一个实施方式中,在免疫抑制剂的停用确认期间,可以在停用免疫抑制剂后52周期间随时间经过观察受试者的全身状态、血液生化检查值等,并且在停用免疫抑制剂后52周时通过肝活检等,确认是否达到可操作性耐受。

[0087] <活体肝移植的实施方法>

在一个实施方式中,供体的肝移植术采集术和受试者的肝移植术、以及供体和受试者的术后管理法可以依据各实施医疗机构中进行的标准肝移植术和术后管理法。在一个实施方式中,将活体肝移植日作为Day0实施之后的检查与评价。

[0088] 诱导型抑制性T细胞制剂的输注预处理(给予安道生)

在一个实施方式中,安道生可以在诱导型抑制性T细胞制剂输注前作为减少受试者淋巴细胞的预处理而使用。医生等在肝移植后根据受试者的全身状态等研究是否给予安道生,在判断为适合的情况时,可以在肝移植后5天(Day5)费时23小时向受试者静脉滴注安道生。在一个实施方式中,安道生的标准给予量可设为约40mg/kg,但本剂为肝代谢的药剂,因此也可以在一边确认肝移植后的肝功能的变化,一边在约20~约40mg/kg的范围内调整用量。由于报告了在给予安道生后大量出现骨髓抑制效果白细胞减少/嗜中性粒细胞减少的病例,因此在其他实施方式中,医生等可以参考既往病例来调整使用量。

[0089] 另外,在一个实施方式中,作为针对安道生的副作用的对策,也可以采取如下措施。

[0090] 对于作为预处理药(安道生)的副作用而设想的恶心、呕吐,可预防性地在第1天(给予安道生前)给予塞米松9.9mg(相当于甲基泼尼松龙50mg),在第24天给予阿瑞匹坦(Aprepitant)125mg(或福沙吡坦(Fosaprepitant)150mg)和5-HT₃受体拮抗剂8mg(相当于甲基泼尼松龙40mg)。此外,由于阿瑞匹坦(或福沙吡坦)为CYP3A4的底物,具有轻度至中度的CYP3A4抑制(用量依赖性)和诱导作用,因此可能存在影响他克莫司的血中浓度,所以优选避免给予。此外,也可以实施用于抑制泌尿系统障碍(出血性膀胱炎、排尿困难等)出现的美司钠(Uromitexan)给予、其他预防性的支持疗法(抗生素等预防性给予)。

[0091] 在一个实施方式中,在给予安道生后嗜中性粒细胞数小于1000/mm³时,也可以使用G-CSF制剂。在给予安道生后无法给予诱导型抑制性T细胞制剂的情况时,在即便嗜中性粒细胞数小于1000/mm³也可见减少倾向且预测小于1000/mm³的情况时,可以进行G-CSF制剂的给予。但嗜中性粒细胞数增加至5000/mm³以上的情况时,优选根据症状进行减量或中止

给予。

[0092] <诱导型抑制性T细胞制剂的输注>

在一个实施方式中,医生等在给予安道生后,根据受试者的全身状态等研究是否输注诱导型抑制性T细胞制剂,在判断为适合的情况时,可以向受试者输注诱导型抑制性T细胞制剂。可以在诱导型抑制性T细胞制剂的输注时使用输血用过滤器,由于诱导型抑制性T细胞制剂的构成细胞会被去白细胞过滤器除去,因此优选不使用。

[0093] 在一个实施方式中,输注可以在低速度下开始,一边确认受试者的状态,一边提高给予速度,在30分钟左右完成诱导型抑制性T细胞制剂的给予。医生等在诱导型抑制性T细胞制剂的给予中一直观察受试者的状态,在出现难以控制血压下降等症状时,可以立即中断给予,并研究能否重新开始。在重新开始的情况下,在发生需要再次中断的状况时,可以中止之后的给予。

[0094] <免疫抑制剂的减量/停用和有无达到可操作性耐受的判断各免疫抑制剂的减量/停用方法(免疫抑制剂的给予量调整/减量期间)>

在本公开的一个方面,提供一种用于将免疫耐受疗法中的免疫抑制剂的给予量减量的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 对于肾上腺皮质类固醇,按照以下日程给予的步骤;

在再灌注时的给予;

进行肝移植后的给予和给予量的减量,在规定期间内结束给予,在该规定期间内不能结束给予时,使用任意的减量方法结束给予,

(2) 对于代谢拮抗剂,按照以下日程给予的步骤;

肝移植后的给予;

在肝移植后的规定期间以内结束给予,

在肝移植后规定期间以内不能结束给予的情况时,使用任意的减量方法结束给予,

根据需要,可以以肝移植后1周为目标增加给予量,这时,其特征在于,逐步进行减量,(3) 对于第一免疫抑制剂,按照以下日程给予的步骤;

(3-1) 肝移植后规定期间(给予量调整期间)

从肝移植当天或肝移植后1天起开始给予,分别以以下的血中谷浓度为目标:

给予开始~肝移植后的第一规定期间的规定的血中谷浓度;

肝移植后第一规定期间后的第二规定期间的规定的血中谷浓度,

(3-2) 肝移植后26周后(第一免疫抑制剂的减量期间)

在肝移植后第一规定期间(减量1)内,调整用法/用量以维持规定的血中谷浓度;

在肝移植后第二规定期间(减量2)起,维持(减量1)的用量,给予次数按照减量日程逐步减量,

(3-3) 根据需要,延长第一免疫抑制剂的减量期间,

其中,各减量在已确认不存在排斥反应时执行。

[0095] 在本公开的其他方面,提供一种用于将免疫耐受疗法中的免疫抑制剂减量的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 对于肾上腺皮质类固醇,按照以下日程给予的步骤;

在再灌注时给予1000mg；

从肝移植后1天起在1周内以20mg/天给予，

以5mg/天每周减量，在肝移植后4周以内结束给予，

在肝移植后4周以内不能结束给予的情况时，使用任意的减量方法在肝移植后26周为止结束给予，

(2) 对于代谢拮抗剂，按照以下日程给予的步骤；

从肝移植后1天起1天分2次以合计500mg/天给予，

在肝移植后4周以内结束给予，

在肝移植后4周以内不能结束给予的情况时，使用任意的减量方法在肝移植后26周为止结束给予，

根据需要，可以以肝移植后1周为目标增量至1000~2000mg/天，这时，逐步减量以500mg/天进行，

(3) 对于钙调磷酸酶抑制剂，按照以下日程给予的步骤；

(3-1) 肝移植后0天~肝移植后26周为止(钙调磷酸酶抑制剂的给予量调整期间)

从肝移植当天或肝移植后1天起开始以口服或持续静脉注射给予，以以下的血中谷浓度为目标：

给予开始~肝移植后13周：他克莫司8~12ng/mL或环孢素200~300ng/mL；

肝移植后13周~肝移植后26周：他克莫司5~8ng/mL或环孢素125~200ng/mL，

(3-2) 肝移植后26周后(钙调磷酸酶抑制剂的减量期间)

在肝移植后26周(减量1)，以1天1次的给予次数调整用法/用量以维持他克莫司3~5ng/mL或环孢素75~125ng/mL的血中谷浓度；

在肝移植后39周(减量2)之后，维持肝移植后26周(减量1)的用量，将给予次数按照钙调磷酸酶抑制剂的减量日程(减量2：周3次；减量3：周2次；减量4：周1次；减量5：停用)逐步减量，

(3-3) 根据需要，钙调磷酸酶抑制剂的减量期间可延长合计13周，

其中，各减量在已确认不存在排斥反应时执行。

[0096] 本公开的一个实施方式中的免疫抑制剂在给予量调整/减量期间的免疫抑制剂的给予/减量日程如图4所示。

[0097] 在一个实施方式中，可以在肝移植后实施以下的免疫抑制疗法。医生等可以在研究减量/停用的时机确认未观察到排斥反应的基础上，确定各免疫抑制剂的减量/停用。此外，在表现出由免疫抑制剂引起的副作用的情况时，可以根据需要减量。

[0098] 肾上腺皮质类固醇(甲基泼尼松龙等)

在一个实施方式中，原则上从肝移植日起根据受试者的状态由医生等判断进行给予，优选在肝移植后4周为止中止给予。在肝移植后4周以内不能结束给予的情况时，可以在肝移植后26周为止逐渐减量/结束。以下示出成为目标的给予/减量日程。

[0099] 在再灌注时给予甲基泼尼松龙1000mg，从肝移植第二天(Day1)起以20mg/天给予1周的甲基泼尼松龙。肾上腺皮质类固醇以1周为目标并以5mg/天进行减量，以肝移植后4周以内为目标中止给予。

[0100] 代谢拮抗剂(霉酚酸酯)

在一个实施方式中,原则上从肝移植第二天起根据受试者的状态由医生等判断进行给予,优选在肝移植后4周为止中止给予。在肝移植后4周以内不能结束给予的情况时,可以在肝移植后26周为止逐渐减量/结束。以下示出成为目标的给予/减量日程。

[0101] 从肝移植第二天 (Day1) 起给予霉酚酸酯500mg/天 (1天分2次)。以约1周Day7为目标增量至1000~2000mg/天,然后以每500mg/天逐步减量,以肝移植后4周以内为目标中止给予。

[0102] 钙调磷酸酶抑制剂(他克莫司环孢素)

在一个实施方式中,钙调磷酸酶抑制剂以他克莫司为第一选择,在因副作用等无法使用他克莫司的情况时,作为第二选择优选使用环孢素。但因感染症等由医生等判断为需要暂时停用钙调磷酸酶抑制剂的情况时,可以在合适的期间停用钙调磷酸酶抑制剂。

[0103] 钙调磷酸酶抑制剂的减量方法可以参考环孢素胶囊在骨髓移植时的用法/用量而设定。血中谷浓度的测定可以在将要给予规定的钙调磷酸酶抑制剂前采血并测定(至少从上次给予起相距12小时以上后采血/测定)。此外,从他克莫司替换为环孢素时的换算值可考虑术后经过天数和受试者的全身状态,由医生等进行综合判断而确定。

[0104] 1) 在肝移植后0天~26周为止的钙调磷酸酶抑制剂的给予量调整期间)

在一个实施方式中,可以在肝移植后0天或1天 (Day0或Day1) 起开始以口服或持续静脉注射给予,在肝移植后13周为止维持血中谷浓度[目标浓度:8~12ng/mL(他克莫司或、200~300ng/mL(环孢素)。在肝移植后26周为止,可以以血中谷浓度为他克莫司5~8ng/mL或环孢素125~200ng/mL为目标进行逐渐减量。在选择持续静脉注射的情况时,可以在从能够内服的时段起切换为口服给予(1天2次)。

[0105] 另外,在作为钙调磷酸酶抑制剂给予他克莫司的情况时,医生等可以原则上以出院1周前为目标将剂型变更为缓释性制剂,进行给予(1天1次)。但在因他克莫司的吸收不良、药物相互作用等医学上的原因而难以变更为缓释性制剂的情况时,可以进行普通制剂的给予。在给予普通制剂的情况时,优选以维持目标血中谷浓度的方式适当调节用法/用量,尽可能快速地将他克莫司切换为缓释性制剂。

[0106] 2) 肝移植后26周后(减量期间)

在肝移植后26周(减量1)内,可以维持血中谷浓度[目标浓度:35ng/mL(他克莫司)或75125ng/mL(环孢素)]。此外,在钙调磷酸酶抑制剂的给予量调整期间中无法将他克莫司变更为缓释性制剂的情况时,优选以继续维持目标血中谷浓度的方式适当调节用法/用量,尽可能快速地将他克莫司切换为缓释性制剂。

[0107] 在肝移植后39周(减量2)之后,可以维持肝移植后26周(减量1)的用量,以给予次数例如在肝移植后39周(减量2)为周3次、在肝移植后52周(减量3)为周2次、在肝移植后65周(减量4)为周1次、在肝移植后78周(减量5)停用等的方式逐步减量。给予环孢素或他克莫司普通制剂的情况时,可以以血中谷浓度为指标适当调节用法/用量而逐步减量。

[0108] 在一个实施方式中,在医生等因钙调磷酸酶抑制剂的副作用而判断钙调磷酸酶抑制剂需要减量时可以变更用量。这种情况时,也可设为不变更下次的来院日程。

[0109] 在一个实施方式中,在因副作用而将钙调磷酸酶抑制剂减量的情况时,可以根据医生等判断,在达到肝移植后78周(减量5)前停用免疫抑制剂。

[0110] 3) 钙调磷酸酶抑制剂减量时机的延长规定

在一个实施方式中,在医生等根据受试者的全身状态等判断为不可进行钙调磷酸酶抑制剂的减量或需要变更药剂(从他克莫司变更为环孢素)的情况时,可以将减量的时机合计延长13周。减量延长的次数没有限制,但总延长期间大于13周时,可以在该时段中止以停用免疫抑制剂为目的的减量,进行受试者所需的治疗。

[0111] <停用免疫抑制剂(钙调磷酸酶抑制剂)后52周有无停用持续(达到可操作性耐受的评价)>

在一个实施方式中,根据在停用免疫抑制剂(钙调磷酸酶抑制剂)后52周期间随时间经过观察受试者的全身状态、血液生化检查值,与此同时在停用免疫抑制剂后52周时段的肝活检等,能够最终确认停用免疫抑制剂。此外,在一个实施方式中,在稳定的肝功能值且通过肝活检无法确认在病理学上应治疗的排斥反应的状态在停用免疫抑制剂后继续52周以上的情况时,可判断为该病例达到可操作性耐受。

[0112] <排斥反应的定期确认、诊断和治疗及之后的应对排斥反应的定期确认(肝活检)>

在本公开的一个方面,提供一种用于在免疫耐受疗法中通过定期肝活检确认有无排斥反应的方法,所述方法包括以下步骤:对在肝移植日从移植肝采集对照用肝组织的样本和从肝移植后的定期肝活检中得到的样本进行组织诊断的步骤,以及在该组织诊断的结果中急性排斥反应的整体评价得到规定的中止标准中的任一结果时,判断为“具有在病理学上应治疗的排斥反应”,立即开始针对排斥反应的治疗,中止免疫耐受疗法的步骤。

[0113] 另外,在本公开的其他方面,提供一种用于在免疫耐受疗法中通过定期肝活检确认有无排斥反应的方法,所述方法包括以下步骤:对在肝移植日从移植肝采集对照用肝组织的样本以及从肝移植后26周、减量5的4周后和52周后的定期肝活检得到的样本,按照Banff标准(2016年)和Venturi(2012年)进行评分的组织诊断的步骤,以及在该组织诊断的结果中得到急性排斥反应的整体评价为“中度以上”、慢性排斥反应的整体评价为“有”和肝纤维化的评分为“2以上”中的任一结果的情况时,判断为“具有在病理学上应治疗的排斥反应”,立即开始针对排斥反应的治疗,中止免疫耐受疗法的步骤。

[0114] 在免疫抑制剂的减量/停用时,即使肝功能检查正常,也可能存在肝纤维化或慢性排斥。因此,可以通过定期肝活检确认有无排斥反应。此外,肝活检可考虑肝活检后的受试者安全性而在入院下(住一晚)实施。

[0115] 在一个实施方式中,可以在肝移植后26周、减量5的4周后和52周后进行定期肝活检。此外,在肝移植日从移植肝采集对照用肝组织。作为排斥反应的中央病理学诊断用,可使用16G的肝活检用针采集1样本份的肝组织,进行排斥反应的组织诊断。

[0116] 在一个实施方式中,通过肝活检采集的组织样本的组织诊断可以按照Banff标准(2016年)和Venturi(2012年)进行评分,并进行以下评价。

[0117] (1) Banff标准(2016年)

急性排斥反应

基于门静脉区和中央静脉周围的炎症程度,进行整体评价。进一步,按照表3的标准对门静脉区炎症、胆管的炎症性损伤和静脉内皮炎进行评分,将其总分表现为排斥活动指数(Rejection Activity Index, RAI)。

[表3]

评分标准 (整体评估):	无
	无法确定: 与同种异体反应有关的门管或中央静脉周围(perivenular)炎症细胞浸润, 但组织损伤程度不满足轻度急性排斥反应的诊断标准。
	轻度: 少数三联体或中央静脉周围区域出现排斥反应浸润, 通常轻微, 并且对于门管排斥型反应多数局限于门管区内, 对于出现孤立性中央静脉周围浸润的患者无融合性坏死或肝细胞脱失。
	中度: 排斥型浸润, 多数或全部门管区和/或中央静脉周围区域扩张, 仅限于少数中央静脉周围区域的融合性坏死/肝细胞脱失。
	重度: 在中度的基础上, 炎症扩展至门管区周围和/或中度至重度中央静脉周围炎症并延伸至肝实质, 并且伴随多数中央静脉周围区域的中央静脉周围肝细胞坏死有关。

RAI	
门管区炎症	<p>0分: 无;</p> <p>1分: 主要为淋巴细胞性炎症, 累及少数三联体, 但无明显扩大;</p> <p>2分: 含有淋巴细胞(偶见母细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞)的混合浸润导致的多数或全部三联体均扩张。如果出现多量嗜酸性粒细胞且伴有水肿且微血管内皮细胞肥大明显, 则应考虑急性抗体介导排斥反应(AMR);</p> <p>3分: 由含有母细胞和嗜酸性粒细胞的混合浸润导致的多数或全部三联体明显扩张, 且炎症侵犯至门管区周围实质。</p>
胆管炎性损伤	<p>0分: 无;</p> <p>1分: 少数胆管被炎症细胞围绕和浸润, 仅显示轻度反应性变化, 如上皮细胞的核质比增加;</p> <p>2分: 多数或全部胆管被炎症细胞浸润, 较多胆管出现退行性改变, 如细胞核多形性、极像素乱、上皮细胞质空泡化等;</p> <p>3分: 在2分的基础上, 多数或全部胆管均出现退行性改变或局灶性胆管腔破坏。</p>
静脉内皮炎症	<p>0分: 无;</p> <p>1分: 累及部分(但不是多数)门静脉和/或肝小静脉(hepatic venules)内皮下淋巴细胞浸润;</p> <p>2分: 累及多数或全部门静脉和/或肝小静脉的内皮下浸润, 伴有或不伴有累及少数中央静脉周围区域的融合性肝细胞坏死/脱失;</p> <p>3分: 在2分的基础上, 伴有中度或重度中央静脉周围炎症, 延伸至中央静脉周围实质, 且伴随多数中央静脉周围区域的中央静脉周围肝细胞坏死相关。</p>

[0118] 慢性排斥反应

胆管消失的程度、中央静脉纤维化的程度、动脉消失的程度和其他评价的结果按照表4的标准进行评价, 并基于该评价结果进行整体评价。*标记通常为仅在摘出肝中观察到的结构。

[表4]

评分标准 (整体评估)	无	
	早期的慢性排斥 (至少符合两条)	
	晚期的慢性排斥 (至少符合两条)	
结构	早期的慢性排斥	晚期的慢性排斥
小胆管 (<60 μm)	多数胆管出现衰老, <50%门管区出现胆管消失	≥50%门管区出现胆管消失, 其余胆管出现退行性改变
肝门管区小动脉	偶见<25%门管区出现动脉消失	>25%门管区出现动脉消失
终末肝静脉和III 区肝细胞	中央静脉周围单个核细胞炎症; III区肝细胞坏死和炎症; 轻度中央静脉周围纤维化	多种炎症; 局灶性静脉闭塞; 中到重度 (桥接状) 纤维化
其他	所谓“过渡性”肝炎和多灶性肝细胞坏死	肝窦泡沫细胞沉积、胆汁淤积
肝动脉主干分支 ※	内膜炎症, 局灶性泡沫细胞沉积, 但无管腔损伤	内膜泡沫细胞导致的管腔狭窄, 内膜纤维化增生
胆管主干分支※	炎症损伤和灶性泡沫细胞沉积	管壁纤维化

- [0119] (2)Venturi (2012年) 的评分
所移植的肝脏的纤维化程度按照表5的标准进行评分。
[表5]

推荐纤维化评分	
门管区	<p>0分：无纤维化；</p> <p>1分：少于50%的门管区出现非扩张性纤维化；</p> <p>2分：超过50%的门管区发生纤维化和/或扩为短纤维隔进入门管区周围实质；</p> <p>3分：多数或全部门管明显扩张，伴有桥接纤维化，扩张至其他门管区或中心区域，有或没有偶见结节。</p>
肝窦状隙 (1区、2区)	<p>0分：无纤维化；</p> <p>1分：少于50%的窦状隙出现少量纤维化，伴有薄的局灶性胶原沉积；</p> <p>2分：超过50%的窦状隙有少量纤维化，伴有薄的弥漫性胶原沉积，或者少于50%的窦状隙有较厚的局灶性纤维化；</p> <p>3分：厚的、明显的、弥漫性窦状隙纤维化。</p>
小叶中央静脉 (3区)	<p>0分：无纤维化；</p> <p>1分：少于50%的中央静脉（central veins）环状中央静脉周围纤维化，但未侵犯至肝静脉周围实质；</p> <p>2分：超过50%的中央区域出现环状中央静脉周围纤维化和/或扩展为短纤维隔进入中央静脉周围实质；</p> <p>3分：明显的小叶中央纤维化，并与其他中央区域和/或门管区桥接。</p>

[0120] (3) 在组织诊断结果中得到急性排斥反应的整体评价为“中度以上”、慢性排斥反应的整体评价为“有”和肝纤维化的评分为“2以上”中的任一结果的情况时，判断为“具有在病理学上应治疗的排斥反应”，可以立即开始针对排斥反应的治疗。

[0121] 排斥反应的确认

可以在肝移植后的计划内来院和计划外来院时确认排斥反应。以下示出确认步骤的目标。

[0122] 1) 身体表现

有发热、全身倦怠感等。

2) 血液生化检查

T-Bil/AST/ALT/ γ -GTP中的任一个比最近来院时数据上升2倍以上。但在即使为2倍以上也在施設标准值以内时，判断为是稳定的肝功能值。

3) 肝活检与病理学诊断

在观察到上述1)、2)的异常而怀疑有排斥反应的情况时，可以在实施医疗机构内进行肝活检和组织诊断。

4) 排斥反应的诊断

进行在病理学上应治疗的排斥反应有无的判断。由3)的结果判断有无排斥反应。

[0123] 在诊断为“具有在病理学上应治疗的排斥反应”的情况时，可以立即开始针对排斥反应的治疗。

[0124] 参考文献

在实施例等中作为基本技术参照以下的参考文献,并不是认可这些文献针对本发明构成了现有技术。这些内容作为参考而被引入。

1. Bashuda H, Kimikawa M, Seino K, Kato Y, Ono F, Shimizu A, et al. Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(7):1896-902.

2. Bashuda H, Shimizu A, Uchiyama M, Okumura K. Prolongation of renal allograft survival by anergic cells: advantages and limitations. *Clin Transplant*. 2010;24Suppl 22:6-10.

3. Luo Z, Gotoh M, Grochowicki T, Tanaka T, Kimura F, Kawashima H, et al. Anergic T cells generated in vitro suppress rejection response to islet allografts. *Transplantation*. 2000;69(10):2144-8.

4. Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, et al. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity*. 2012;36(2):262-75.

5. Davies JK, Barbon CM, Voskertchian A, Nadler LM, Guinan EC. Ex vivo alloanergization with belatacept: a strategy to selectively modulate alloresponses after transplantation. *Cell transplantation*. 2012;21(9):2047-61.

6. Davies JK, Gribben JG, Brennan LL, Yuk D, Nadler LM, Guinan EC. Outcome of alloanergized haploidentical bone marrow transplantation after ex vivo costimulatory blockade: results of 2 phase 1 studies. *Blood*. 2008;112(6):2232-41.

7. Davies JK, Nadler LM, Guinan EC. Expansion of allospecific regulatory T cells after anergized, mismatched bone marrow transplantation. *Science translational medicine*. 2009;1(1):1-3.

8. Davies JK, Yuk D, Nadler LM, Guinan EC. Induction of alloanergy in human donor T cells without loss of pathogen or tumor immunity. *Transplantation*. 2008;86(6):854-64.

[0125] (附注)

本说明书中,“或”在可以采用文章中所列举的事项的“至少1个以上”时使用。“或者”也是同样。本说明书中明确记载为“2个值的范围内”的情况时,该范围中还包括2个值本身。

[0126] 对于本说明书中引用的科学文献、专利、专利申请等参考文献,将其整体以与各自具体记载的内容相同程度地作为参考引入本说明书中。

[0127] 以上为了容易理解本发明而示出优选的实施方式进行了说明。以下基于实施例对本发明进行说明,但上述的说明和以下的实施例仅出于示例的目的而提供,并非出于限定本发明的目的而提供。因此,本发明的范围不限于本说明书中具体记载的实施方式或实施例,仅由权利要求书来限定。

实施例

[0128] 以下记载实施例。在以下的实施例中使用的人的处理获得了同意之后,根据需要遵循主管机关所规定的标准和赫尔辛基宣言,尊重ICH的标准,按照顺天堂大学所规定的伦理规定,并基于GCP来进行。遵守赫尔辛基宣言或ICH所提倡的标准及顺天堂大学伦理委员会所规定的各种标准。试剂类具体地使用了实施例中记载的制品,但也可以用其他制造商(富士REBIO株式会社、Sigma-Aldrich等)的相同品替代。

[0129] (实施例1:MLR和IFN- γ 定量ELISA)

将冷冻保存的来自供体的细胞解冻,在培养基中调整为 2.0×10^6 细胞/ml。同样地,将冷冻保存的来自患者的细胞解冻,在培养基中调整为 2.0×10^6 细胞/ml。

在培养基中将细胞加工物调整为2.0细胞/ml,以以下的比例混合细胞。

1. 仅来自患者的细胞;
2. 来自患者的细胞:来自供体的细胞=1:1;
3. 来自患者的细胞:来自供体的细胞:细胞加工物=1:1:1/2;
4. 来自患者的细胞:来自供体的细胞:细胞加工物=1:1:1/4;
5. 来自患者的细胞:来自供体的细胞:细胞加工物=1:1:1/8;
6. 来自患者的细胞:来自供体的细胞:细胞加工物=1:1:1/16。

[0130] 在37°C培养5天,回收培养上清。将该培养上清稀释5倍,用ELISA测定IFN γ 量。基于IFN γ 浓度,计算将上述2.的组作为100%的比例。将结果示于图1A~C中。

[0131] 图1A、B、C分别表示独立的3次制造中的结果。各图的左侧图表表示通过ELISA测定的IFN γ 浓度,右侧图表表示将仅将来自患者的细胞和来自供体的细胞进行混合培养的组(A11o)的培养上清中IFN γ 浓度设为100%时的比例。

[0132] 在图1A的制造例中,提示如下:即使加入细胞加工物也不能抑制IFN γ 的释放,细胞加工物的免疫反应抑制能力低。图1B和C中,认为细胞加工物的存在比越大,则IFN γ 浓度越少,细胞加工物的免疫反应抑制能力越高。

[0133] (实施例2:活体肝移植和免疫抑制)

使用本公开的诱导型抑制性T细胞制剂,用于达到活体肝移植后的患者的免疫抑制剂减量的整体像如图2所示。分别从供体和患者(受体)采集淋巴细胞,与CD80和CD86抗体共培养,从而得到本公开的诱导型抑制性T细胞制剂。作为CD80和CD86抗体,使用W02019/245037中公开的抗体。然后,将本公开的诱导型抑制性T细胞制剂给予至活体肝移植后的患者,进行免疫抑制剂的减量。

[0134] 从活体肝移植起至免疫抑制剂减量为止的日程如图3A~C所示的进行。图3A和B中表示患者的日程,图3C中表示供体的日程。

[0135] 免疫抑制剂的给予/减量(免疫抑制剂的给予量调整/减量期间)按照图4的日程进行。然后,确认是否达到免疫抑制剂的停用。

[0136] (实施例3:免疫耐受预测)

从移植前的患者和供体各采集约40mL的血液,分离血细胞。将一部分血细胞冷冻用于其后的MLR试验。

[0137] 将来自患者的血细胞和经放射线照射的来自供体的血细胞与CD80和CD86抗体共培养,从而得到本公开的诱导型抑制性T细胞。作为CD80和CD86抗体,使用W02019/245037中

公开的抗体。所得到的诱导型抑制性T细胞的抑制能力用MLR进行评价。

[0138] 通过实施上述试验,可以在实际进行诱导型抑制性T细胞的制造之前,预测所制造的诱导型抑制性T细胞针对供体细胞的反应性和/或抑制能力。由此,能够成为是否进行诱导型抑制性T细胞的制造、或是否进行诱导型抑制性T细胞的给予的指标。

[0139] (实施例4:活体肝移植和免疫抑制)

确认活体肝移植后的患者的免疫抑制。

患者在活体肝移植后第10天被给予诱导型抑制性T细胞,未出现与给予相伴的严重不良事件。免疫抑制剂根据协议,在移植后1个月以内从类固醇、钙调磷酸酶抑制剂(他克莫司)、代谢拮抗剂(CellCept)减量为他克莫司缓释性制剂1种,在移植后第36天出院。

[0140] 移植后6个月期间在临床上和病理学上均未观察到移植物损伤,因此积极地进入到将免疫抑制剂减量的阶段。免疫抑制剂可以在每3个月以7次/周→3次/周→2次/周→1次/周→0次/周的顺序减量,在移植后第628天完全中断减量。此外,在免疫抑制剂中断后第4周实施肝活检,以Banff标准评价的结果为未观察到潜在的病理学排斥反应的表现,提示能够安全地诱导免疫耐受。

[0141] (附注)

如上所述,使用本发明的优选的实施方式示例出了本发明,但可理解的是本发明应该仅通过权利要求书解释其范围。可理解的是,对于本说明书中引用的专利、专利申请和其它文献,其内容本身以与本说明书中具体记载的内容同样内容的方式作为参考引入本说明书中。本申请对2022年3月31日向日本国特许厅申请的日本特愿2022-60165提出优先权主张,其内容与其整体构成本申请的内容同样地作为参考被引入。

产业上的可利用性

[0142] 本公开提供一种评价诱导型抑制性T细胞制剂的品质的方法,并提供关于免疫耐受疗法的各种技术。

Day10 MLR

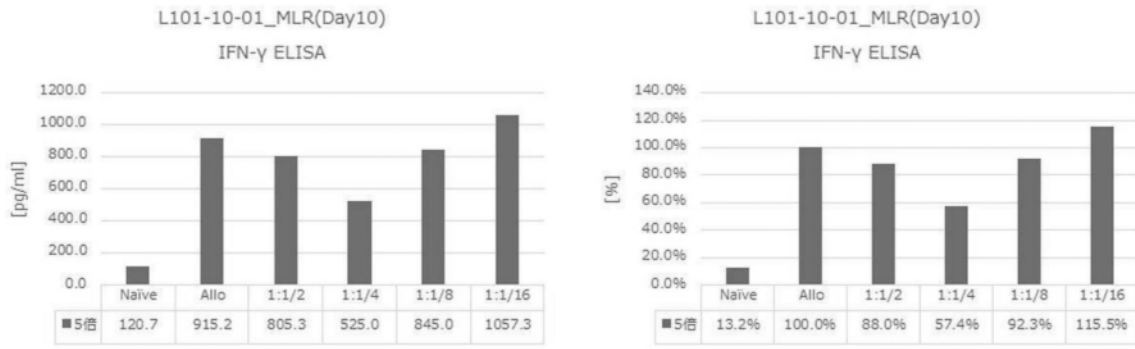


图1A

Day10 MLR



图1B

L103-10-03_MLR(Day10)_IFNγ 结果

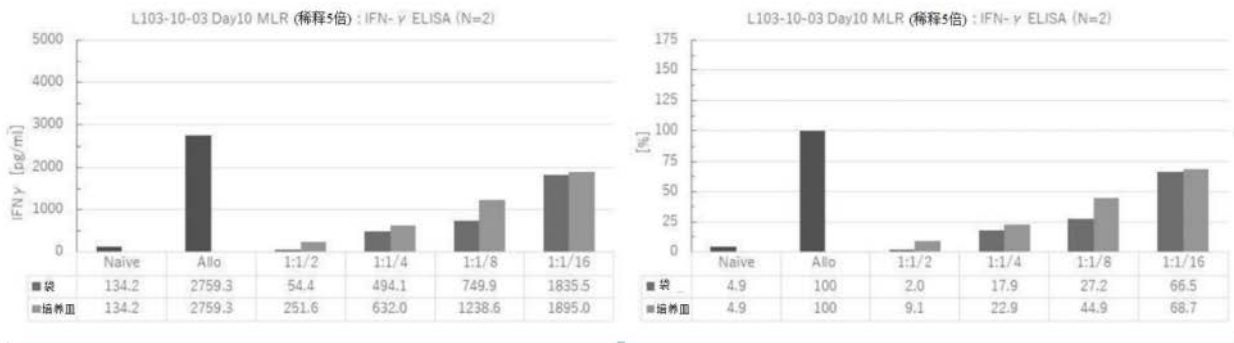


图1C

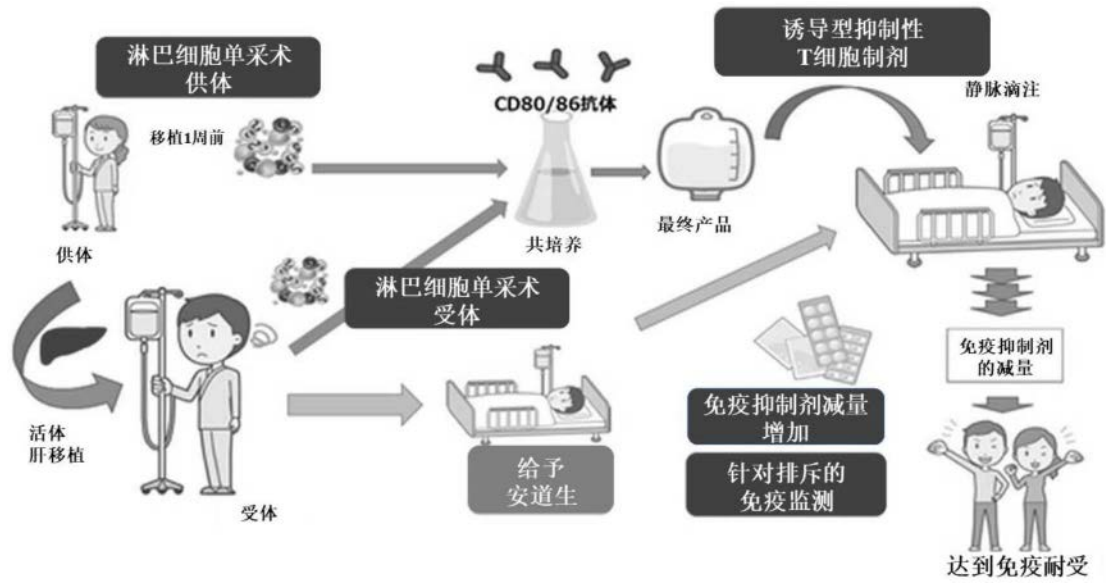


图2

观察/检查项目		筛查:	外周血单个核细胞采集日	肝移植术采取日	结束中止时:	受试者的肝活检日
肝移植后的经过<允许范围> (天)		-56~	-14~-3	0	-	-
获得同意	获得同意日	○				
登记	登记年月日	○				
供体基本信息	出生年月日、性别、身高、活体肝移植相关的器官供的同意日、是否适合提供器官、是否适合实施单采术、供体识别编号	○				
供体背景	合并症、既往病史	○				
身体表现	诊察(听扣诊、视诊、触诊、问诊等)、体重	○	●		○	
生命体征	体温、血压、脉搏	○	●		○	
单采术	单采术实施日、开始时刻、完成时刻、采取部位、采取次数、处理TBV(全血液量)次数		○			
肝移植术采取术				○		
临床检查	血液学检查: NBC、Hb、Hi、Ph、WBC分类计数(嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞)	○	●		○	
	血液生化学检查: T-Bil、AST、ALT、LDH、 γ -GTP、BUN、Cr、eGFR、CRP、Na、K、Cl、Ca、Mg、P	○	●		○	
	病毒检查: HBs 抗原、HIV 抗体	○				
	妊娠检查(仅女性)*: 尿hCG定性	○				
组织相容性试验	ABO 型检查、HLA 分型(I类: A、B、C, II类: DQ、DR、DP)、交叉配血试验[FCM法]	○				
不良事件	发现日、不良事件名称、病重程度、严重性、与本临床试验的步骤(单采术)的因果关系、否定与本临床试验的步骤有因果关系时其理由、用于治疗不良事件的处置、转归、转归日		○		○	
联合用药、联合疗法	药剂名称、用法/用量(1天给予量)、给予原因、(给予期间只有在认为必要时)、治疗方法名、实施原因(实施期间只有在认为必要时)		○		○	

图3C

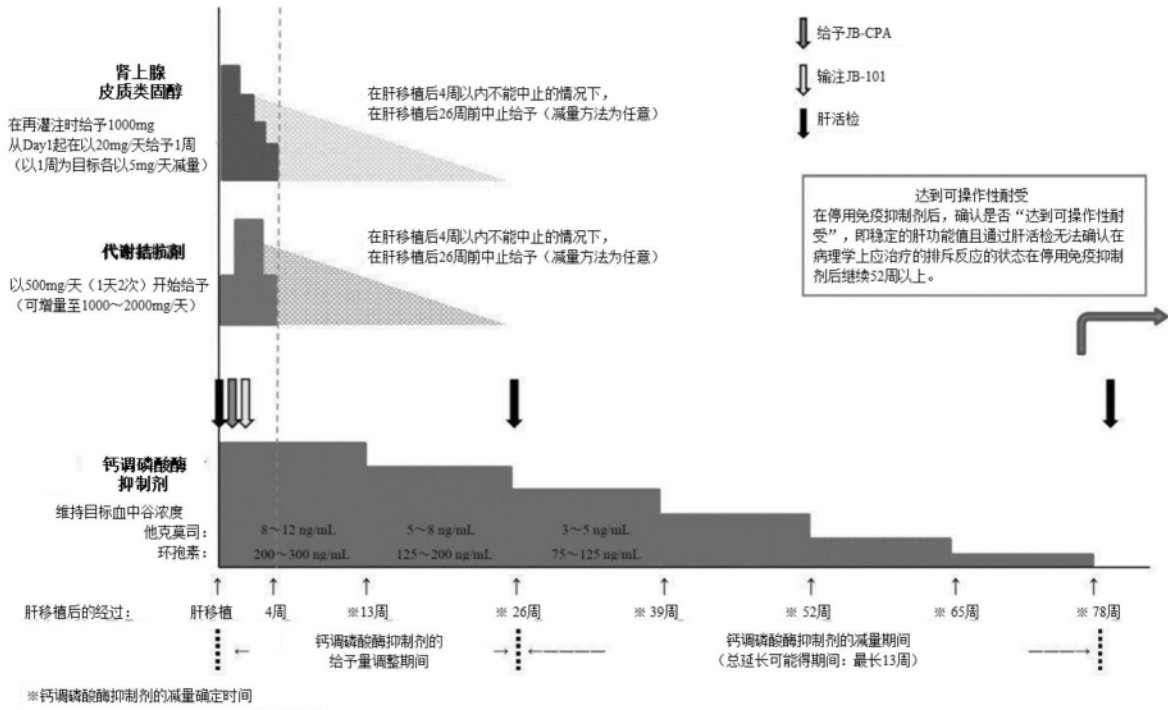


图4