

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-502258

(P2014-502258A)

(43) 公表日 平成26年1月30日(2014.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 L	4 C O 8 4
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 C O 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 7
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-535010 (P2013-535010)
 (86) (22) 出願日 平成23年10月18日 (2011.10.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年6月24日 (2013.6.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/056746
 (87) 国際公開番号 W02012/054509
 (87) 国際公開日 平成24年4月26日 (2012.4.26)
 (31) 優先権主張番号 61/405,696
 (32) 優先日 平成22年10月22日 (2010.10.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511071555
 ダナーファーバー キャンサー インステ
 イテュート, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 1 5-5 4 5 0, ポストン, ブルッ
 クライン アヴェニュー 4 5 0
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 キャンター, ハービー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 4 8 2, ウェルズリー, ペアード ウェ
 イ 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫反応を抑制するためにプログラムされた制御性T細胞の発見

(57) 【要約】

自己免疫疾患を処置する方法が提供される。前記方法は、インターロイキン15受容体 (I L 1 5 R) アゴニストの、自己免疫疾患の症状を改善するための有効な量での投与を含む。本発明はまた、エキソピボでの C D 4 4 + C D 1 2 2 + K i r + C D 8 + 制御性 T 細胞の増加および C D 4 4 + C D 1 2 2 + K i r + C D 8 + 制御性 T 細胞の投与により自己免疫疾患を処置する方法も含む。 C D 4 4 + C D 1 2 2 + K i r + C D 8 + 制御性 T 細胞を含む組成物も提供される。抗原に対する免疫反応を刺激するための方法も提供される。

。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己免疫疾患を処置するための方法であって、かかる処置を必要とする対象に、インターロイキン 15 受容体 (IL 15R) アゴニストを、自己免疫疾患の症状を改善するために有効な量で投与することを含む、前記方法。

【請求項 2】

自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス、慢性移植片対宿主病、関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、多発性硬化症、乾癬、炎症性腸疾患、シェーグレン症候群、グレーブス病、クローン病、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、過粘稠度症候群、原因不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症、POEMS 症候群、ミエローマ、マクロ

10

【請求項 3】

自己免疫疾患が自己抗原に対する抗体を伴い、かつ、対象が自己抗原に対する抗体を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

アゴニストが、配列番号 1 (IL 15) のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一の配列を含み、かつ、IL 15R に結合する IL 15 ポリペプチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

アゴニストが、抗 IL 15R 抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

アゴニストが、GS リンカーを介して可溶性 IL 15 受容体アルファ鎖に結合した IL 15 のヘテロ複合体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

対象における自己免疫疾患を処置するための方法であって、
 a. かかる処置を必要とする対象から T 細胞を単離すること (ここで単離された T 細胞は多数の CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性 T 細胞を含む)
 b. 単離された細胞を、IL 15 および IL 21 を含む培養培地中、コンカナバリン A で活性化され、かつ照射された同系 CD4 T 細胞の存在下で、CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性 T 細胞の数が少なくとも 5% 増加するまで生育させ、それによって、CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性 T 細胞で富化された細胞集団を製造すること、
 c. 対象に、該細胞集団からの CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性 T 細胞を、自己免疫疾患の症状を改善するのに有効な量で投与することを含む、前記方法。

30

【請求項 8】

CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性 T 細胞が Kir⁺ である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

CD8⁺ T 細胞が対象から単離されたものである、請求項 7 または請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

細胞集団からの CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性 T 細胞または CD44⁺CD122⁺Helios⁺Kir⁺CD8⁺制御性 T 細胞が、静脈内注射によって投与される、請求項 7 または請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

単離された細胞を、CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性 T 細胞の数または CD44⁺CD122⁺Helios⁺Kir⁺CD8⁺制御性 T 細胞の数が少なくとも 10% 増加するまで生育させる、請求項 7 または請求項 8 に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞またはCD44⁺CD122⁺Kir⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞で富化された細胞集団が、非CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞または、非CD44⁺CD122⁺Kir⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞の集団を除去することによってさらに富化される、請求項7または請求項8に記載の方法。

【請求項 1 3】

対象における自己免疫疾患を処置するための方法であって、

a. かかる処置を必要とする対象からT細胞を単離すること(ここで、単離されたT細胞は多数のCD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞を含む)、

10

b. 単離された細胞を、IL 15およびIL 21を含む培養培地中、コンカナバリンAで活性化され、かつ照射された同系CD4T細胞の存在下で、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞の数が少なくとも5%増加するまで生育させ、それによって、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞で富化された細胞集団を製造すること、

c. 対象に、該細胞集団からのCD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞を、自己免疫疾患の症状を改善するのに有効な量で投与すること

を含む、前記方法。

【請求項 1 4】

CD8⁺T細胞が対象から単離されたものである、請求項13に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

細胞集団からのCD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞が、静脈内注射によって投与される、請求項13に記載の方法。

【請求項 1 6】

単離された細胞を、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞の数が少なくとも10%増加するまで生育させる、請求項13に記載の方法。

【請求項 1 7】

CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞で富化された細胞集団が、非CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞の集団を除去することによってさらに富化される、請求項13に記載の方法。

30

【請求項 1 8】

CD8⁺細胞を含む組成物であって、該組成物におけるCD8⁺細胞の少なくとも5%がCD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞である、前記組成物。

【請求項 1 9】

CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞がKir⁺である、請求項18に記載の組成物。

【請求項 2 0】

CD8⁺細胞を含む組成物であって、該組成物におけるCD8⁺細胞の少なくとも5%がCD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞である、前記組成物。

【請求項 2 1】

組成物におけるCD8⁺細胞の少なくとも10%がCD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞またはCD44⁺CD122⁺Helios⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞である、請求項18または19に記載の組成物。

40

【請求項 2 2】

組成物におけるCD8⁺細胞の少なくとも10%がCD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞である、請求項20に記載の組成物。

【請求項 2 3】

請求項18~22のいずれか一項に記載の組成物と、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 2 4】

50

免疫抑制剤をさらに含む、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

抗原に対する免疫反応を刺激するための方法であって、前記抗原を有し、かつ、前記抗原に対する免疫刺激を必要とする対象に、 $CD44^+CD122^+CD8^+$ 制御性 T 細胞の増殖および / または活性を阻害する剤を、対象において前記抗原に対する免疫反応を刺激するのに有効な量で投与することを含み、ここで、 $CD44^+CD122^+CD8^+$ 制御性 T 細胞が $Helios^+$ および / または Kir^+ である、前記方法。

【請求項 2 6】

対象が病原体による感染を有し、該病原体が抗原を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

対象ががんを有し、該がんが抗原を含み、および該抗原が腫瘍抗原である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

抗原がワクチンにて対象に投与される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

剤が抗 IL 15 抗体である、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

$CD44^+CD122^+CD8^+$ 制御性 T 細胞が Kir^+ であり、剤が $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性 T 細胞に結合する抗体である、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 3 1】

$CD44^+CD122^+CD8^+$ 制御性 T 細胞が $Helios^+$ であり、剤が $Helios$ の発現および / または活性を阻害する、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

抗体が、
 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性 T 細胞上に存在する第 1 の表面マーカーに結合する第 1 の抗原結合ドメイン、および
 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性 T 細胞上に存在する第 2 の表面マーカーに結合する第 2 の抗原結合ドメイン
 を含む二重特異性抗体である、請求項 3 0 に記載の方法。

30

【請求項 3 3】

$CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性 T 細胞上にある第 1 および第 2 の表面マーカーが、 $CD44$ 、 $CD122$ 、 Kir および $CD8$ からなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

剤が抗 $CD8$ 抗体である、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

剤が、
 $CD44^+CD122^+CD8^+$ 制御性 T 細胞上に存在する第 1 の表面抗原に結合する第 1 の抗体の最適下用量、および
 $CD44^+CD122^+CD8^+$ 制御性 T 細胞上に存在する第 2 の表面抗原に結合する第 2 の抗体の最適下用量、
 を含む組成物であり、ここで、第 1 の表面抗原は第 2 の表面抗原とは異なる、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 6】

第 1 の抗体が、 $CD44$ 、 $CD122$ 、 Kir および $CD8$ からなる群から選択される抗原に結合し、第 2 の抗体が、 $CD44$ 、 $CD122$ 、 Kir および $CD8$ からなる群から選択される抗原に結合する、請求項 3 5 に記載の方法。

50

【請求項 37】

抗体が抗 K i r 抗体である、請求項 30 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2010年10月22日に提出された米国特許仮出願第61/405,696号に対して、米国特許法第119条(e)に基づく利益を主張し、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

連邦政府の支援を受けた研究

この発明は、NIH Grant AI 037562に基づく政府支援により行われた。したがって、政府はこの発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

病原体に対する保護免疫の誘導と自己寛容の維持との間のバランスを達成することは、適応免疫系の中心的な特徴である。胸腺でのネガティブセレクションは、自己ペプチドMHC産物に対して高い親和性を有するT細胞受容体(TCR)を発現する大部分のクローンを排除するが、このプロセスは不完全である。自己ペプチド-MHC複合体に反応する成熟した末梢T細胞のかなりのフラクションは、炎症刺激の状況で、エフェクター細胞に分化することがある(Bouneaud et al., 2000、Goldrath and Bevan, 1999、Slifka et al., 2003)。

【0003】

このプロセスは、細胞の除去(AICD)または不活化をもたらす不完全なまたは不良なTCRシグナリングによって制限されるが(Martin et al., 1999、Kearney et al., 1994)、これらの細胞内在性のメカニズムは、自己免疫障害の発症を防ぐために十分でないことがある(Anderton et al., 2001、Panoutsakopoulou et al., 2001)。自己寛容が、エフェクターT細胞と、制御性または抑制性細胞との間の阻害性の相互作用にも依存するという証拠が増えている(Littman and Rudensky, 2010)。しかしながら、自己抗体形成の発症および自己免疫疾患を阻害するように遺伝的にプログラムされた制御性T細胞は明らかにされていなかった。狼瘡および関節リウマチなどの自己免疫疾患の重篤性および幅広さのために、かかる疾患の効果的な処置に対して大きな必要性がある。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、一部の側面において、自己寛容の維持および自己免疫疾患の予防に不可欠なCD8⁺制御性T細胞の亜集団の発見に関する。一部の側面において、本発明は自己免疫疾患を処置するための方法を含む。該方法は、かかる処置を必要とする対象に、自己免疫疾患の症状を改善するために有効な量でインターロイキン15受容体(IL15R)アゴニストを投与することを含む。一部の態様において、自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス、慢性移植片対宿主病、関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、多発性硬化症、乾癬、炎症性腸疾患、シェーグレン症候群、グレーブス病、クローン病、ワルデンシュトレーママクログロブリン血症、過粘稠度症候群、原因不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症、POEMS症候群、ミエローマ、マクログロブリン血症および寒冷凝集素病からなる群から選択される。

【0005】

一部の態様において、自己免疫疾患は自己抗原に対する抗体を含み、対象は自己抗原に対する抗体を有する。一部の態様において、IL15Rアゴニストは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも90%同一の配列を含み、かつ、IL15Rに結合するIL15ポリペプチドである。一部の態様において、該アゴニストは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一の配列を含むIL15ポリペプチドである。一部の態様において、該アゴニストは配列番号1を含む

10

20

30

40

50

IL 15ポリペプチドである。一部の態様において、該アゴニストは、抗IL 15 R抗体または、その抗原結合フラグメントである。別の態様において、該アゴニストは、GSリンカーを介して可溶性IL 15受容体アルファ鎖に結合したIL 15のヘテロ複合体である。

【0006】

本発明の一側面によると、 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞を用いて、対象において自己免疫疾患を処置する方法が提供される。該方法は、かかる処置を必要とする対象からT細胞を単離すること（ここで、単離されたT細胞は多数の $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞を含む）、単離された細胞を、IL 15およびIL 21を含む培養培地中、コンカナバリンAで活性化され、かつ照射された同系CD4T細胞の存在下で、 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞の数が少なくとも5%増加するまで生育させ、それによって、 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞で富化された細胞集団を製造すること、および、対象に、該細胞集団からの $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞を、自己免疫疾患の症状を改善するのに有効な量で投与することを含む。前記細胞集団からの $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞は、対象に投与する前に、培養培地から分離される。

10

【0007】

一部の態様において、 $CD8^+$ T細胞は対象から単離されたものである。前記細胞集団からの $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞は、静脈内注射によって投与されてよい。一部の態様において、単離された細胞は、 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞の数が少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも100%増加するまで生育させる。 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞が富化された細胞集団は、非 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞の集団を除去することでさらに富化される。一部の態様においては、細胞集団からの $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞の一部が対象に投与される。一部の態様においては、細胞集団からのすべての $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞が対象に投与される。

20

【0008】

本発明の一部の側面によると、 $CD8^+$ 細胞を含む組成物（ここで、組成物における $CD8^+$ 細胞の少なくとも5%が $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞である）が提供される。一部の態様において、組成物における $CD8^+$ 細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも95%または100%は、 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞である。本発明は、一部の態様において、 $CD8^+$ 細胞の組成物（ここで、組成物における $CD8^+$ 細胞の少なくとも5%は $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞である）と、薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物を含む。一部の態様において、医薬組成物は、免疫抑制剤をさらに含む。

30

【0009】

本発明の一部の側面によると、抗原に対する免疫反応を刺激するための方法が提供される。この方法は、抗原を有し、かつ、抗原に対する免疫刺激を必要とする対象に、 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞の増殖および/または活性を阻害する剤を、対象において抗原に対する免疫反応を刺激するのに有効な量で投与することを含む。一部の態様において、対象は病原体による感染を有し、該病原体は抗原を含む。一部の態様において、対象はがんを有し、該がんは抗原を含み、該抗原は腫瘍抗原である。抗原は、対象にワクチンにて投与されてよい。

40

【0010】

$CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞の増殖および/または活性を阻害する剤は、抗IL 15抗体、 $CD44^+CD122^+Kir^+CD8^+$ 制御性T細胞

50

に結合する抗体、抗CD8抗体、または抗Kir抗体であってもよい。一部の態様において、抗体は、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞上に存在する第1の表面マーカーに結合する第1の抗原結合ドメインと、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞上にある第2の表面マーカーに結合する第2の抗原結合ドメインとを含む、二重特異性抗体である。CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞上の第1および第2の表面マーカーは、CD44、CD122、KirおよびCD8からなる群から選択されてよい。

【0011】

一部の態様において、剤は、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞上に存在する第1の表面抗原に結合する第1の抗体の最適下(sub-optimal)用量と、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞上に存在する第2の表面抗原に結合する第2の抗体の最適下用量とを含む組成物(ここで、第1の表面抗原は第2の表面抗原とは異なる)である。第1の抗体は、CD44、CD122、KirおよびCD8からなる群から選択される抗原に結合し、第2の抗体は、CD44、CD122、KirおよびCD8からなる群から選択される抗原に結合する。

10

【0012】

本発明のそれぞれの態様および側面は、独立して実行され得るか、または組み合され得る。また、本明細書で使用される表現および用語は説明のためであり、限定するものとして見なされるべきではない。本明細書における「包括する」、「含む」、または「有する」「含有する」、「包含する」、およびそれらの変形表現の使用は、その後リストされる項目およびそれらの均等物ならびに追加の項目を包含することを意味する。

20

【0013】

本発明のこれらおよび他の側面、ならびに様々な利点および有用性は、詳細な説明を参照することで明らかとなる。本発明のそれぞれの側面は、理解されるとおり、様々な態様を包含し得る。この出願において同定されるすべての文書は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1A】図1は、CD44⁺CD122⁺CD8⁺T細胞によるAb反応のQa¹依存性の抑制を示した図である。図1Aは、ナイーブおよびKLH/CF Aで免疫された(d8)WTまたはIL15^{-/-}マウスからのCD44⁺CD122⁺CD8⁺T細胞のパーセンテージおよび数を示す。CD3⁺CD8⁺細胞でゲーティングした後のFACSプロファイルを示す。

30

【0015】

【図1B】図1Bは、Rag2^{-/-}マウスへのB、CD4およびCD8細胞の移植後のAb反応を示す。2×10⁶個のWTナイーブB細胞を、B6.Qa¹(WT)またはB6.Qa¹(D227K)マウスからの1×10⁶個のCD25⁺除去CD4細胞とともにRag2^{-/-}宿主に移植した。KLH/CF Aで免疫したWT B6マウスから単離したCD44⁺CD122⁺またはCD44⁺CD122⁻CD8⁺T細胞も、これらのRag2^{-/-}マウスに、レシピエントがCF A中の100μgのNP19 KLHで腹腔内免疫される前に移植した。10日目に、マウスに、IFA中の50μgのNP19 KLHで腹腔内チャレンジを行い、NP特異的Ab反応を、7日後にELISAで測定した。図1Cは、CD8⁺Tregによる不良な阻害が自己抗体の生成につながることを示す。Rag2^{-/-}レシピエントで生成された抗サイログロブリンおよび抗インスリンAbを、50日目にELISAで測定した。

40

【0016】

【図2】図2は、CD44⁺CD122⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞が、Qa¹拘束性の抑制活性の原因であることを示した図である。図2A: WT B6マウスをCF A中の100μgのKLHで腹腔内免疫し、10日後にCD44、CD122、Ly49サブタイプ、CD8およびCD62Lの表面発現を分析した。数字は、それぞれの表面タンパク質

50

を発現する細胞のパーセンテージである。図2Bは、B、CD4およびCD8細胞のRag2^{-/-}宿主への移植後のAb反応を示す。2×10⁶個のWTナীবB細胞を、B6.Qa1(WT)またはB6.Qa1(D227K)マウスからの0.5×10⁶個のCD25⁺除去CD4細胞とともにRag2^{-/-}マウスに移植した。CD44⁺CD122⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞は、KLH/CF Aで免疫したWT B6マウスから単離し、0.15×10⁶個の細胞を、Rag2^{-/-}宿主に移植した。細胞移植後すぐに、Rag2^{-/-}レシピエントを、CF A中の100μgのNP19 KLHで腹腔内免疫した。10日目に、マウスに、IF A中の50μgのNP19 KLHで腹腔内チャレンジを行い、高親和性NP特異的Ab反応を、チャレンジの7日後にELISAで測定した。

10

【0017】

【図3】図3は、B6.Yaaマウスにおける、TFHおよびGC B細胞の増殖を示す。年齢適合(2ヶ月および8ヶ月)のWT B6およびB6.Yaaマウスからの脾臓細胞を、TFH細胞についてはCD4、ICOSおよびCD200抗体、および、GC B細胞についてはB220、IgMおよびFas抗体で染色した。TFHおよびGC B細胞の絶対数を、右のパネルに示す。

【0018】

【図4】図4は、B6.YaaマウスからのCD8⁺T細胞による、Ab反応抑制の低下を示した図である。WTナীবB細胞を、Qa1(WT)またはQa1(D227K)マウスからのCD25⁺除去CD4細胞とともにRag2^{-/-}宿主に移植した。KLH/CF Aで免疫したWTまたはB6.Yaaマウスから単離し、FACSでソートしたCD44⁺CD122⁺CD8⁺T細胞を、Rag2^{-/-}宿主に移植した。細胞移植後すぐに、Rag2^{-/-}レシピエントを、CF A中の100μgのNP19 KLHで腹腔内免疫し、20日後にIF A中の50μgのNP19 KLHで再度腹腔内免疫した。

20

【0019】

【図5】図5は、CD44⁺ICOSL⁺CD8⁺T細胞による抑制活性を示した図である。B、CD4およびCD8細胞のRag2^{-/-}宿主への移植後のAb反応である。2×10⁶個のWTナীবB細胞を、B6.Qa1(WT)またはB6.Qa1(D227K)マウスからの、0.5×10⁶個のCD25⁺除去CD4細胞とともにRag2^{-/-}マウスに移植した。CD44⁺ICOSL⁺CD8⁺T細胞は、KLH/CF Aで免疫したWT B6マウスの脾臓細胞から、FACSによりソートした。0.15×10⁶個のソートしたCD44⁺ICOSL⁺CD8⁺細胞を、Rag2^{-/-}宿主に移植した。細胞移植後すぐに、Rag2^{-/-}レシピエントを、CF A中の100μgのNP19 KLHで腹腔内免疫した。10日目に、マウスに、IF A中の50μgのNP19 KLHで腹腔内チャレンジを行い、高親和性NP特異的Ab反応を、チャレンジの7日後にELISAで測定した。

30

【0020】

【図6】図6は、ヒトIL-15のアミノ酸配列(配列番号1、NCBI参照配列:NP_00576.1)を示した図である。

【0021】

【図7】図7は、2×10⁵個のGM-CSF-照射(3500ラド)B16細胞によるワクチン接種が、WT B6マウスと比べ、Qa1(D227K)ノックインマウスへのB16腫瘍接種後の生存を増大させたことを示す。

40

【0022】

【図8A】図8は、CD44⁺CD122⁺Ly49⁺CD8⁺Treg細胞の遺伝子特性を示した図である。図8Aは、遺伝子マイクロアレイ解析による、Ly49⁺およびLy49⁻CD44⁺CD122⁺CD8⁺T細胞間の遺伝子発現プロファイルの比較を示す。B6.WTマウスは、CF A中のKLHで腹腔内免疫され、免疫の7日後に脾臓からLy49⁺およびLy49⁻CD8⁺T細胞を精製した。遺伝子発現は、Affymetrixマイクロアレイシステムを使用して解析し、示差的遺伝子発現は、Multiplot解析プログラムに

50

より評価した。Ly49⁻細胞に比べ、Ly49⁺細胞では、125遺伝子がアップレギュレートされ、42遺伝子がダウンレギュレートされていた。

【0023】

【図8B】図8Bは、RT-PCRによるHelios発現の検証を示す：遺伝子マイクロアレイ解析で、Ly49⁺CD8⁺T細胞において、5.3倍のHelios発現の増加が観察された。Ly49⁺およびLy49⁻CD8⁺T細胞から調製した無関係のcDNAを、Ly49⁺CD8⁺T細胞におけるHelios発現の増加をRT-PCRにより検証するために使用した。図8Cは、Ly49⁺CD8⁺T細胞において自然受容体が強くアップレギュレートされていることを示す：記憶型Ly49⁻CD8⁺T細胞と比較した、Ly49⁺CD8⁺T細胞の遺伝子発現プロファイリングにより、NK細胞で通常発現している受容体が、Ly49⁺T細胞においてmRNAレベルで顕著にアップレギュレートされることが明らかとなった。

10

【0024】

【図9A-B】図9は、Helios⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞の表現型特性を示した図である。図9Aでは、Ly49⁺CD8⁺T細胞のFACS解析により、Heliosが50%のLy49⁺CD8⁺T細胞で発現していることが明らかとなった。Helios⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞は、標的細胞の細胞接触依存性の認識に機能的な重要性を有し得る、より高いレベルのインテグリン発現(VLA-2およびVLA-4)も示す。図9Bは、Helios⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞の発達のためのIL-15の必要性を示す：IL-15欠損マウスは、Ly49⁺CD8⁺T細胞の劇的な減少を示す(WTではCD4⁺Cd122⁺CD8⁺T細胞の18.9%であるのに対し、IL-15^{-/-}マウスではCD4⁺CD12⁺CD8⁺T細胞の3%)。IL-15^{-/-}マウスからのLy49⁺CD8⁺T細胞はHeliosを発現しないが、これはHelios⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞の発達がIL-15依存性であることを示している。

20

【0025】

【図9C】図9Cは、IL-15応答性と、Ly49発現のレベルとの間の相関を示す：Helios⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞は、最もIL-15に感受性のCD8⁺T細胞に属する可能性がある。対応するHelios⁻Ly49⁺CD8⁺T細胞と比べ、Helios⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞は、より高レベルのCD122およびLy49を発現する。インビトロでのLy49⁺CD8⁺T細胞の刺激は、Ly49⁺発現がIL-15刺激の強さと密接に関係していることを示す。Helios⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞の極端な反応性は、細胞培養において微量のIL-15を用いるCD8⁺制御性T細胞のインビトロでの増加に活用することができる。

30

【0026】

【図9D】図9Dは、Helios欠損マウスが、Ly49^{hi}CD8⁺T細胞を欠くことを示す：我々は、Rag2^{-/-}マウスがHelios⁺WTまたはHelios⁻KO BM細胞で再構成される骨髓(BM)キメラを作出した。WT BM細胞により作出されるBMキメラは、CD4⁺CD122⁺およびCD4⁺CD122⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞を発達させるが、それらの頻度はWT B6マウスに類似している。しかしながら、Helios⁻KO BMキメラは、増加したCD4⁺CD122⁺CD8⁺T細胞およびLy49⁺CD8⁺T細胞の劇的な減少を示す。Helios発現のFACS解析は、Helios⁻KO遺伝子型を確認する。

40

【0027】

【図9E】図9Eは、Helios⁻KO BM細胞のレシピエントにおける、活性化されたCD4およびCD8⁺T細胞の増加を示す：Helios⁺WTおよびKO BMからの脾臓細胞のFACS解析により、Helios⁻KO BMキメラは、活性化されたCD4⁺T細胞(CD4⁺CD44⁺CD62L^{lo})の約2倍の増加、および活性化されたCD8⁺T細胞(CD8⁺CD44⁺CD62L^{lo})の約6倍の増加を有することが明らかとなった。

【0028】

50

【図9F】図9Fは、Helios欠損CD8⁺T細胞の損なわれた抑制活性を示す：Rag2^{-/-}マウスに、WT B6マウスからのB細胞、WT B6マウスからのCD25除去CD4⁺T細胞、および、Helios WTおよびKOのBMキメラから精製したLy49⁺CD8T細胞を移植した。Helios WTおよびKOのBMキメラは、CD8調製の7日前に、CFA中のKLHで腹腔内免疫した。Rag2^{-/-}宿主は、細胞移植後すぐに、NP19 KLH/CFAで腹腔内免疫した。WT Ly49⁺CD8T細胞を受けたRag2^{-/-}宿主は、抗NP Ab反応の効果的な抑制を示すが、Helios KO Ly49⁺CD8T細胞レシピエントは、CD8T細胞を受けなかったRag2^{-/-}マウスと同様のレベルの抗NP Ab反応を示す。

【0029】

【図10A-C】図10は、自己免疫疾患(CIAモデル)におけるCD8Tregを介した免疫療法を示した図である。図10Aは、CD8⁺Tregの注入によるCIAの予防を示す：WT B6マウスの脾臓細胞から、WT B細胞およびCD25除去CD4細胞をソートした。Ly49⁺およびLy49⁻CD8T細胞は、脾臓およびリンパ節からソートする。コラーゲンタイプII細胞をRag2^{-/-}Prfl^{-/-}マウスに移植した後、0日に関節炎を誘導し、21日に追加免疫した。CD8Tregを、21日および、加えて35日に注入した。CIAの進行をモニターした。ソートされたCD44⁺CD122⁺Ly49⁺またはLy49⁻CD8細胞を、2ng/mlのIL15/IL15R複合体の存在下で1週間培養した。図10Bでは、Rag2^{-/-}Prfl^{-/-}マウスに、B、CD4およびインビトロで増加させたCD8T細胞を移植し(0、21および35日)、CIAの進行をモニターした。図10Cは、CD8Tregの治療応用を示す：インビトロで増加させた1.5×10⁵個のLy49⁺CD8T細胞を、3.5の平均スコアで関節炎を発症したB6マウスに、0日および18日に移植した。5日から17日まで2日毎に、0.75mg/kgのメソトレキセート(MTX)を与えた。

【発明を実施するための形態】

【0030】

発明の詳細な説明

一側面において、本発明は、自己寛容の維持および自己免疫疾患の予防に対して不可欠なCD8⁺制御性T細胞の亜集団の発見に関する。これらのCD8T細胞は、免疫を活性化するよりはむしろ抑制するようにプログラムされており、免疫反応の不可欠な制御的要素であり、かつ、自己寛容を保証するものである。

【0031】

特殊化した(specialized)制御性CD8⁺T細胞は、CD4⁺濾胞性ヘルパーT細胞(TFH)の活性を、TFH細胞の表面に発現するクラスI MHCペプチドQa1(ヒト白血球抗原E(HLA E)のマウスホモログ)の認識を介して選択的に抑制し、自己抗体反応を弱める。これらのCD8⁺制御性T(Treg)細胞の表面表現型の分析は、これらが高いレベルのCD44およびCD122、比較的低いレベルのCXCR5およびICOSLを発現し、Kir受容体(免疫グロブリン様キラー細胞抑制受容体、マウスではLy49と称される)も発現することを示した。マウスLy49⁺およびLy49⁻CD8T細胞から調製したcDNAによるDNAマイクロアレイはまた、CD8制御性T細胞の発達および機能にとって重要な遺伝子に対する有力な主要転写因子として、転写因子Heliosを同定した。

【0032】

Heliosは、ジンクフィンガー調節因子のイカロス(Ikaros)ファミリーの一員である。Heliosは、T細胞発達の初期段階で高く発現し、FoxP3⁺CD4⁺制御性T細胞のサブセット(70%)でも発現される。しかしながら、Heliosの発現は、FoxP3の発現に依存しない。成熟B細胞、樹状細胞およびミエロイド細胞は、Heliosを発現しない。CD8T細胞プールにおけるHelios発現および機能は報告されていない。本発明者らは、Heliosが、CD8T細胞プール内のLy49⁺CD8制御性T細胞によって専ら発現され、Ly49⁺T細胞におけるこの転写因子

10

20

30

40

50

の発現が、その抑制的な機能に関係することを示した。Heliosタンパク質およびmRNAの存在は、抗体を用いたHeliosの細胞内染色、および定量的PCRによって検出することができる (Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells; Thornton et al. J Immunol 2010 184:3433-3441)。

【0033】

細胞内でのHelios発現は、例えば、一定量の細胞を、Heliosタンパク質またはmRNAの存在について試験することによって検出することができる。Heliosタンパク質の発現は、例えば、表面マーカーCD3、CD8、CD44、CD122およびLy49 (ヒトにおけるKIR) で、マウスからの脾臓細胞 (またはヒトからのPBM C) を染色することによって検出することができる。次いで、細胞を固定バッファー (リン酸緩衝食塩水中の4%パラホルムアルデヒド) で固定し、透過バッファー (リン酸緩衝食塩水中の0.1%サポニンおよび0.009%アジ化ナトリウム) で洗浄する。その後の透過バッファー中での抗Helios抗体による染色により、このサブセットのCD8⁺T細胞におけるHeliosの発現 (%として) を検出することができ、マウスおよびヒトにおけるHelios⁺CD8細胞により発現される付加的表面マーカーを明らかにすることができる。

【0034】

それらの表面におけるCD122の発現は、発達および機能の両方についてのIL 15への依存性と一致する。CD8細胞によるクラスI MHC受容体Ly49の発現は、IL 15に対する増強された応答性にも関係していた (Coles et al., 2000、Judge et al., 2002、Anfossi et al., 2004)。CD8T細胞の3~5%を占めるCD44⁺CD122⁺Kir⁺Helios⁺CD8⁺T細胞は、このT細胞サブセットにおける、実質的にすべてのQa 1拘束性の抑制活性の原因である。

【0035】

特殊化した制御性CD8⁺T細胞は、本発明に従い、自己免疫疾患を処置するために使用される。ここで用いる場合、特殊化した制御性CD8⁺T細胞は、CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞、CD44⁺CD122⁺Helios⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞、および/またはCD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞を含む。

【0036】

本発明の側面は、かかる処置を必要とする対象からT細胞を単離すること、CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞の集団が、数のうえで少なくとも5%増加するように、コンカナバリンAで活性化され、かつ照射された同系CD4T細胞の存在の下、IL 15およびIL 21で富化された培養培地で細胞を生育させること、それによって、CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞で富化された細胞集団を製造すること、により自己免疫疾患を処置する方法を含む。次いで、前記集団からのCD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞は、自己免疫疾患の症状を改善するのに有効な量で対象に投与される。一部の態様において、CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞はKirも発現し、前記集団からのCD44⁺CD122⁺Helios⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞は、自己免疫疾患の症状を改善するのに十分な量でヒト対象に投与することができる。

【0037】

一部の態様において、対象から単離されたT細胞は、単離された細胞を培養培地中で生育させる前に、CD8⁺細胞について富化される。一部の態様において、CD8⁺T細胞は、それらを培養培地中で生育させる前に単離される。本明細書で用いる場合、「単離される」という用語は、対象からT細胞を含むサンプルを採取すること、および、さらに他の非T細胞からT細胞を分離することを指す。一部の態様において、細胞は、10% FCS、 β -メルカプトエタノール、1Mピルビン酸ナトリウム、10mM HEPESバッファー、2mM L-グルタミン、50単位/mlペニシリンおよび50 μ g/mlスト

10

20

30

40

50

レプトマイシン添加RPMI培地で生育させる。一部の態様において、単離された細胞は、単離された細胞における特殊化した制御性CD8⁺T細胞の集団が数のうえで少なくとも5%、10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも100%、または、少なくとも200%まで増加するまで生育させる。

【0038】

一部の態様において、単離されたT細胞を生育させた後、特殊化した制御性CD8⁺T細胞は、CD44⁺CD122⁺Helios⁺CD8⁺制御性T細胞、CD44⁺CD122⁺Helios⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞およびCD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞以外の1または2以上の細胞種を除去することにより、さら

10

【0039】

一部の態様において、特殊化した制御性CD8⁺T細胞は、自己免疫薬剤と組み合わせて投与される。かかる薬剤の非限定例は、メソトレキセート、シクロホスファミド、イムラン(アザチオプリン)、シクロスポリン、およびプレドニゾンおよびメチルプレドニゾンなどのステロイド化合物を含む。

20

【0040】

特殊化した制御性CD8⁺T細胞は、抑制活性の活性化をIL 15に依存している。したがって、本発明の複数の側面は、自己免疫疾患の症状を改善するのに有効な量でインターロイキン15受容体(IL 15R)アゴニストを用いて、特殊化した制御性CD8⁺T細胞の活性を増強することにより、自己免疫疾患を処置する方法を含む。

【0041】

一部の態様において、自己免疫疾患の処置を必要とする対象は、自己免疫疾患を有すると同定された対象であり、すなわち、当該対象は、医師により(例えば、当該技術分野で周知の方法を用いて)自己免疫疾患を有すると診断されている。一部の態様において、処置を必要とする対象は、自己免疫疾患を有する疑い、または発症する疑いのある対象、例えば、自己免疫疾患を示唆する1または2以上の症状を呈している対象などである。一部の態様において、自己免疫疾患を有する疑いのある対象は、自己抗体の異常な力価を示すことがある。自己抗体の異常な力価を有する対象は、自己免疫疾患の少なくとも1つの他の症状を有することがあり、または自己免疫疾患に関係する他の症状を有しないことがある。「処置を必要とする対象」という用語は、かつて自己免疫疾患を有していたが、症状が改善した者をさらに含む。

30

【0042】

対象は、動物、典型的には、哺乳動物である。一側面において、対象は、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、またはげっ歯動物である。重要な態様において、対象はヒトである。ヒトとマウスは、多くの場合同様に称される、同様のT細胞マーカーを共有することが理解される。例えば、ヒトおよびマウスの両方は、CD44、CD122およびCD8を有する。本発明の主題にとって重要な1つのマーカーの場合、名称は異なる。マウスにおけるマーカーLy49は、ヒトではKir(免疫グロブリン様キラー細胞抑制受容体)と称される。特許請求の範囲および明細書がヒトの処置に言及し、マーカーおよび抗体が論じられる範囲において、マーカーはヒトのものであり、抗体はヒトマーカーに結合するものとする。

40

【0043】

本明細書で用いる場合、化合物は、IL 15のように、それがIL 15Rに結合し、特殊化した制御性CD8⁺T細胞の増殖/活性化を誘導する場合、IL 15Rアゴニストである。一部の態様においては、アゴニストは、本来の(native)IL 15によって誘導されるレベルと同様か、またはそれより高いレベルの生物学的反応を誘導する。一

50

部のアゴニストは、いっそう高いレベルの生物学的反応を誘導する（スーパーアゴニスト）。IL 15 Rアゴニストは、典型的には、本来のIL 15のものと同様の、IL 15受容体アルファおよび/またはIL 15受容体ベータ/ガンマに対する結合のための親和性を有する。

【0044】

かかるアゴニストの例は、配列番号1（IL 15）のアミノ酸配列を有するIL 15ポリペプチド、および配列番号1（IL 15）のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を含むポリペプチド、アゴニスト的抗IL 15 R抗体、またはその抗原結合フラグメント、GSリンカーを介して可溶性IL 15受容体アルファ鎖（スシドメイン）に結合したIL 15のヘテロ複合体（組換えIL 15 / IL 15 RA複合体）（例えば、その全体の内容が参照により本明細書に組み込まれる米国出願No.12/090,930を参照）を含むが、これらに限定されない。いずれの態様においても、IL 15 Rは、ヒトIL 15 Rであってよく、IL 15 R受容体アゴニストはヒトIL 15 Rのアゴニストである。

10

【0045】

ヒトIL 15のアミノ酸配列は、NCBI参照配列：NP_000576.1（配列番号1）により表される。IL 15ポリペプチドは、IL 15のフラグメント、例えば、配列番号1のポリペプチドからリーダー配列のタンパク質分解による切断により得られる、IL 15の成熟型として以前キャラクタライズされた配列番号1のアミノ酸49～162なども含み、IL 15の生物学的活性を保持する他のフラグメントは、IL 15という用語に包含される。1または2以上の置換アミノ酸を有するIL 15の誘導體または変異体を含む、IL 15の生物学的活性を示すIL 15アナログも、IL 15 Rアゴニストという用語の意味に含まれる。例示的なアナログは、参照により本明細書に組み込まれる米国出願No.11/639,877、米国特許No.5,552,303およびBernard et al, J. Biol. Chem. 279:24313-24322, 2004に記載されている。IL 15の用語は、ヒト以外の種、例えば、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、ブタ、ウマ、ウシ、イヌ等のIL 15も包含する。

20

【0046】

自身の抗原（または自己抗原）は、それに対して対象が望まない免疫反応を起こす、対象の自己産生構成物である。「自己抗体」は、1または2以上の対象自身の構成物または自身の抗原に結合する、対象によって産生される抗体である。「自己免疫疾患」の用語は、患者の免疫反応が患者自身の構成物に向けられ、望まない、そしてしばしばひどい消耗性の状態（condition）をもたらす、疾患状況および状態を指す。本明細書で用いる場合、「自己免疫疾患」は自己免疫状態、症候群等をさらに含むものとする。

30

【0047】

自己免疫疾患の例は、全身性エリテマトーデス、慢性移植片対宿主病、関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、多発性硬化症、乾癬、炎症性腸疾患、シェーグレン症候群、グレーブス病、クローン病、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、過粘稠度症候群、原因不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症、POEMS症候群、ミエローマ、マクログロブリン血症および寒冷凝集素病を含むが、これらに限定されない。一部の態様において、自己免疫疾患は、自身の抗原に対する抗体を伴い、対象は自身の抗原に対する抗体を有する。

40

【0048】

特殊化した制御性CD8⁺T細胞、またはIL 15 Rアゴニストは、有効な量で投与される。有効な量は、医学的に所望の結果をもたらすのに十分な用量であり、当業者によって、ルーチンの方法を用いて決定され得る。一部の態様において、有効な量は、処置されている状態においてあらゆる改善をもたらす量である。一部の態様において、有効な量は、自己免疫疾患のタイプおよび程度、または処置されている状態、および/または1または2以上の追加の治療剤の使用に依存し得る。しかしながら、当業者は、例えば、インビトロおよび/またはインビボ試験、および/または化合物投与量の他の知識に基づいて

50

、使用する治療剤の適切な用量および範囲を決定することができる。

【0049】

対象に投与される場合、治療剤の有効な量は、当然のことながら、処置されている特定の疾患、疾患の重篤度、年齢、健康状態、サイズおよび体重を含む個々の患者のパラメーター、併用処置、処置の頻度および投与の方式に依存する。それらの要因は、当業者によく知られており、ルーチン程度の実験で対応することができる。一部の態様においては、最大用量、すなわち、正当な医学的判断に従った最大安全用量が用いられる。

【0050】

自己免疫疾患の処置において、有効な量は、疾患の進行を遅延させる、疾患の進行を停止させる、または、疾患の進行を逆転させる量である。有効な量は、自己免疫疾患に係する1または2以上の症状を遅延させる、低減する、阻止する、改善する、または逆転させるのに必要な量を含む。一部の態様において、かかる用語は、1または2以上の関節の腫脹の低減または、自己免疫障害に係する痛み、疲労および/または発熱の低減を指す。一部の態様において、かかる用語は、自己免疫疾患に係する循環自己抗体レベルの低減を指す。一部の態様において、かかる用語は、ヒトのPASIスコアの低減を指す。一部の態様において、かかる用語は、ヒトの総合評価スコアの改善を指す。

10

【0051】

化合物の有効な量は、典型的には、1日または数日の間の1回または2回以上の投与で、約0.001mg/kgから約1000mg/kgの範囲である（当然のことながら、上記で論じた投与の方式および要因に依存する）。

20

【0052】

治療剤の実際の投与量レベルは、特定の患者、組成物および投与方式に対し、所望の治療反応を達成するのに有効な量を得るために変えることができる。選択される投与量レベルは、特定の化合物の活性、投与の経路、処置される組織および処置される患者の以前の病歴に依存する。しかしながら、所望の治療成果を達成するのに必要とされるよりも低いレベルで、化合物の用量を開始し、所望の効果が達成されるまで、徐々に投与量を増加させることは、当該技術分野の技能の範囲内である。

【0053】

本発明の一部の側面によると、組成物が提供される。組成物は、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞を含み、ここで、組成物中のCD8⁺細胞の少なくとも5%は、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞である。一部の態様において、組成物中のCD8⁺細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも100%は、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞である。本発明の一部の側面によると、CD8⁺細胞の組成物（ここで、組成物中のCD8⁺細胞の少なくとも5%はCD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞である）と、薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物が提供される。一部の態様において、医薬組成物は、免疫抑制剤を含む。免疫抑制剤の例は、非ステロイド抗炎症剤、シクロスポリンA、FK506、抗CD4抗体およびラパマイシンを含むが、これらに限定されない。

30

40

【0054】

本発明の一部の側面は、抗原に対する免疫反応を刺激するための方法を含む。前記方法には、抗原を有し、かつ抗原に対する免疫刺激を必要とする対象に、CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞の増殖および/または活性を阻害する剤を、対象における抗原に対する免疫反応を刺激するのに有効な量で投与することを含む。

【0055】

一部の態様において、対象は病原体による感染を有し、病原体は抗原を含む。本明細書で用いる場合、「感染」とは、疾患を引き起こす能力を有する生物による対象の身体への侵入を指す。かかる生物は、限定されないが、ウイルス、バクテリア、菌類および寄生物を含む。

50

【 0 0 5 6 】

ウイルスの例は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV 1およびHIV 2）、ヒトTリンパ好性ウイルスI型（HTLV I）、ヒトTリンパ好性ウイルスII型（HTLV II）、単純ヘルペスウイルスI型（HSV 1）、単純ヘルペスウイルス2型（HSV 2）、ヒトパピローマウイルス（様々な型）、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、CおよびD型肝炎ウイルス、エプスタインバーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルスおよび伝染性軟属腫ウイルスを含むが、これらに限定されない。

【 0 0 5 7 】

バクテリアの例は、*Pasteurella species*、*Staphylococci species*、*Streptococcus species*、*Escherichia coli*、*Pseudomonas species*、および*Salmonella species*を含むが、これらに限定されない。感染性バクテリアの具体的な例は、*Helicobacter pylori*、*Borrelia burgdorferi*、*Legionella pneumophila*、*Mycobacteria sps*（例えば*M. tuberculosis*、*M. avium*、*M. intracellular*、*M. kansasii*、*M. goodii*）、*Staphylococcus aureus*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria meningitidis*、*Listeria monocytogenes*、*Streptococcus pyogenes*（Group A *Streptococcus*）、*Streptococcus agalactiae*（Group B *Streptococcus*）、*Streptococcus (viridans group)*、*Streptococcus faecalis*、*Streptococcus bovis*、*Streptococcus (anaerobic sps.)*、*Streptococcus pneumoniae*、病原性 *Campylobacter sp.*、*Enterococcus sp.*、*Haemophilus influenzae*、*Bacillus anthracis*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Corynebacterium sp.*、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*、*Enterobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pasteurella multocida*、*Bacteroides sp.*、*Fusobacterium nucleatum*、*Streptobacillus moniliformis*、*Treponema palladium*、*Treponema pertense*、*Leptospira*、*Rickettsia*、および*Actinomyces israelii*を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 5 8 】

菌類の例は、*Cryptococcus neoformans*、*Histoplasma capsulatum*、*Coccidioides immitis*、*Blastomyces dermatitidis*、*Chlamydia trachomatis*、*Candida albicans*を含むが、これらに限定されない。他の感染性生物（すなわち、原生生物）は、*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium malariae*、*Plasmodium ovale*、および*Plasmodium vivax*などの*Plasmodium spp.*および*Toxoplasma gondii*を含む。血液感染性および/または組織寄生生物は、*Plasmodium spp.*、*Babesia microti*、*Babesia divergens*、*Leishmania tropica*、*Leishmania spp.*、*Leishmania braziliensis*、*Leishmania donovani*、*Trypanosoma gambiense*、および*Trypanosoma rhodesiense*（アフリカ睡眠病）、*Trypanosoma cruzi*（シャーガス病）および*Toxoplasma gondii*を含む。

【 0 0 5 9 】

寄生生物の例は、*Plasmodium spp.*、*Babesia microti*、*Babesia divergens*、*Leishmania tropica*、*Leishmania spp.*、*Leishmania braziliensis*、*Leishmania donovani*、*Trypanosoma gambiense*および60 *Trypanosoma rhodesiense*（アフリカ睡眠病）、*Trypanosoma cruzi*（シャーガス病）、および*Toxoplasma gondii*を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 6 0 】

一部の態様において、対象はがんを有し、がんは抗原を含み、抗原は腫瘍抗原である。がんはいずれのがんであってもよい。がんは、胆管がん、骨がん、脳およびCNSがん、乳がん、子宮頸がん、絨毛癌、大腸がん、結合組織がん、子宮内膜がん、食道がん、眼がん、胃がん、ホジキンリンパ腫、上皮内腫瘍、喉頭がん、リンパ腫、肝臓がん、肺がん、メラノーマ、神経芽細胞腫、口腔がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、直腸がん、肉腫、皮膚がん、精巣がん、甲状腺がん、および腎臓がんを含むが、これらに限定されない。

【 0 0 6 1 】

腫瘍抗原は、いずれの腫瘍抗原であってもよい。例えば、腫瘍抗原は、ヒト上皮細胞ムチン（Muc 1、乳がん細胞および膵臓がん細胞上に存在するMuc 1糖タンパク質の20アミノ酸コアリピート）、Hrasがん遺伝子産物、p53、癌胎児抗原（C

E A)、*raf* がん遺伝子産物、GD2、GD3、GM2、TF、sTn、MAGE 1、MAGE 3、チロシナーゼ、gp75、Melan A/Mart1、gp100、HER2/neu、EBV LMP1&2、HPV F4、6、7、前立腺特異抗原 (PSA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、アルファフェトプロテイン (AFP)、CO17 1A、GA733、gp72、P53、*ras* がん遺伝子産物、HPV E7 およびメラノーマグングリオシドであってもよいが、これらに限定されない。

【0062】

一部の態様において、抗原は、ワクチンにて対象に投与される。この投与は、感染または腫瘍の存在による対象における抗原の存在を補充することができる。ワクチンは、対象への抗原の初めての導入を含んでもよい。本明細書で用いる場合、「ワクチン」は、無害な形で抗原を含む生物または物質を意味する。ワクチンは、組換えワクチンであっても、または非組換えワクチンであってもよい。ワクチンは、例えば、解毒されているが、依然その主要な免疫原性決定因子を保持する毒素として定義されるトキシイドの形態、または腸チフス、コレラおよびポリオなどの死菌の形態、または生存しているが非病原性の病原体の形態の弱毒化生物の形態をとってもよく、または、それはかかる生物によりコードされる抗原でもよく、または、それは死腫瘍細胞、または腫瘍細胞上に存在する抗原であってもよい。

10

【0063】

抗原は、細胞、細胞抽出物、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、多糖類、多糖結合体、多糖類および他の分子のペプチドおよび非ペプチド模倣物、低分子、脂質、糖脂質、炭水化物、ウイルスおよびウイルス抽出物および寄生生物などの多細胞生物およびアレルギー (例えば、米国特許No.7576066参照) を含むが、これらに限定されない。

20

【0064】

特殊化した制御性 CD8⁺T 細胞の増殖および/または活性を阻害する剤は、抗 IL15 抗体、または特殊化した制御性 CD8⁺T 細胞に結合する抗体を含むが、これらに限定されない。剤は、抗 CD8 抗体、または *Kir* に対する抗体であってもよい。一部の態様において、CD44⁺CD122⁺*Kir*⁺CD8⁺ 制御性 T 細胞に結合する抗体は、CD44⁺CD122⁺*Kir*⁺CD8⁺ 制御性 T 細胞上に存在する第 1 の表面マーカーに結合する第 1 の抗原結合ドメインと、CD44⁺CD122⁺*Kir*⁺CD8⁺ 制御性 T 細胞上に存在する第 2 の表面マーカーに結合する第 2 の抗原結合ドメインとを含む、二重特異性抗体である。CD44⁺CD122⁺*Kir*⁺CD8⁺ 制御性 T 細胞上の第 1 および第 2 の表面マーカーは、CD44、CD122、*Kir* および CD8 を含むが、これらに限定されない。

30

【0065】

一部の態様において、剤は、CD44⁺CD122⁺*Kir*⁺CD8⁺ 制御性 T 細胞上に存在する第 1 の表面抗原に結合する第 1 の抗体の最適下量と、CD44⁺CD122⁺*Kir*⁺CD8⁺ 制御性 T 細胞上に存在する第 2 の表面抗原に結合する第 2 の抗体の最適下量とを含む組成物 (ここで、第 1 の表面抗原は第 2 の表面抗原とは異なる) である。第 1 の抗体は、CD44、CD122、*Kir* および CD8 からなる群から選択される抗原に結合し、第 2 の抗体は、CD44、CD122、*Kir* および CD8 からなる群から選択される抗原に結合する。

40

【0066】

一部の態様において、特殊化した制御性 CD8⁺T 細胞の増殖および/または活性を阻害する剤は、細胞における *Helios* の発現レベルおよび/または活性を低減する剤である。*Helios* のレベルおよび/または活性を阻害する剤は、*Helios* に結合し、その活性 (例えば、DNA 結合活性、核内移行活性、ホモまたはヘテロ二量体化活性、または転写活性化活性) を阻害する *Helios* 結合タンパク質、*Helios* タンパク質に特異的に結合する抗体 (例えば、*Helios* の、DNA または別の転写因子に結合する能力、核に移行する能力、または DNA に結合する能力を妨げる抗体)、例えば、*Helios* 結合パートナー (例えば、DNA または別の転写因子 (例えば、*Ikaros*

50

またはAiolos因子)に結合するが、Heliosの活性(例えば核内移行活性または転写活性化活性)を妨げる、突然変異した不活性Heliosまたはそのフラグメント、細胞のHelios核酸配列(例えばmRNA)に結合し、タンパク質の発現を阻害し得るHelios核酸分子(例えばアンチセンス分子、siRNA)、Helios遺伝子発現を減少させる剤(例えば、Heliosのプロモーターに結合し、Helios遺伝子発現を減少させる低分子)の1または2以上であってよい。

【0067】

一部の態様において、剤は、毒素に結合した、特殊化した制御性CD8⁺T細胞上に存在するマーカーの1つを認識する剤である。CD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8⁺制御性T細胞上に存在するマーカーの1つを認識する剤は、マーカーの1つに特異的なりガンド、またはマーカーの1つに対する抗体であってよい。毒素の例は、生物毒素、化学毒素、合成毒素および放射性核種を含むが、これらに限定されない。放射性核種は、ベータ放出金属放射性核種、アルファ放射体およびガンマ放射体からなる群から選択され得る。放射性核種の例は、¹²³I、¹²⁵I、¹³⁰I、¹³¹I、¹³³I、¹³⁵I、¹²⁸Ba、¹³N、¹⁵O、および¹⁸Fを含むが、これらに限定されない。

10

【0068】

本明細書で使用される場合、抗体の最適用量は、単独で使用した場合には、特殊化した制御性CD8⁺T細胞の活性を阻害して状態を処置するのに有効なおよび/または最適用量ではないが、第2の抗体を組み合わせ使用した場合に、状態を処置するために特殊化した制御性CD8⁺T細胞の活性を阻害して状態を処置するのに有効なおよび/または最適となる量である。最適用量の治療剤の使用は、それにより、抗体のあらゆる可能な副作用の低下が可能となるため、有用である。

20

【0069】

特殊化した制御性CD8⁺T細胞の増殖および/または活性を阻害する剤は、対象における抗原に対する免疫反応を刺激するのに有効な量で投与される。本明細書で用いる「有効な量」の用語は、免疫学的反応と、対応する治療効果とをもたらすのに十分な剤の量を指す。必要とされる正確な量は、対象の種、年齢、一般的な状態、処置されている状態の重篤度および具体的な剤、投与の方式等に依存して、対象ごとに異なる。任意の個々の場合における適切な「有効な」量は、ルーチンの実験を用いて、当業者により決定され得る。

30

【0070】

医薬製剤および化合物は、任意の適した経路により対象に投与される。例えば、組成物は経口的に(舌下を含む)、直腸に、非経口的に、嚢内に、腔内に、腹腔内に、局所および経皮的に(粉末、軟膏剤または滴下剤により)、頬側または経鼻的に投与することができる。本発明の医薬製剤は、薬学的に許容し得る担体を含んでも、その中に希釈されてもよい。本明細書に用いる場合、「薬学的に許容し得る担体」の用語は、ヒト、またはイヌ、ネコもしくはウマなどの他の哺乳動物への投与に適した1または2以上の適合性の賦形剤、希釈剤などの物質を意味する。

【0071】

「担体」という用語は、有効成分が適用を促進するために組み合わせられる、天然もしくは合成の、有機成分または無機成分を意味する。担体は、所望の薬学的な有効性または安定性を実質的に損なう相互作用がないような様式で、本発明の製剤と混合することができる、かつ相互に混合することができる。経口剤形、皮下剤形、静脈内剤形、筋肉内剤形などの剤形に適した担体は、RemingtonのPharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Paにおいて見出すことができる。

40

【0072】

本発明は次の例によりさらに説明されるが、それは決してさらに限定するものとして解釈されるべきではない。この出願の全体にわたって引用される参考文献(参照文献、登録特許、公開された特許出願および同時係属特許出願を含む)のすべての全体の内容は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

50

【0073】

例

材料および方法

マウス

C57BL/6J (B6)、Rag2^{-/-}、IL-15^{-/-} および B6.Qa1 (D227K) マウス (11 世代戻し交配したもの) は、病原体フリーの条件で飼育した。すべての実験は、連邦法およびダナ・ファーマー癌研究所の動物管理使用委員会により承認された施設内ガイドラインに従って行った。

【0074】

試薬およびフローサイトメトリー

単細胞懸濁液を調製し、免疫蛍光分析のために暗所で 4℃ にて維持し、氷冷 FACS バッファー (PBS 中の 2% のウシ胎仔血清、0.1% の NaN₃) で洗浄し、それぞれの抗体とともに 30 分間インキュベートし、分析前に FACS バッファーで洗浄した。抗 CD4、抗 CD8、抗 B220、抗 CD44、抗 CD62L、抗 Fas、抗 ICOS、抗 IgM、抗 CD200 (BD Bioscience) または抗 CD8、抗 Ly49C/I/F/H、抗 Ly49A、Ly49G2、Ly49C/I、Ly49D、Ly49F、Ly49H (eBioscience) を用いた後に、FACSCanto (BD Biosciences) および FlowJo software (TriStar) を用いて細胞の分析を行った。

【0075】

細胞精製および養子移植

ナイーブ B 細胞は、Qa1^{-/-} WT および変異型マウス (BD Bioscience) の脾臓から単離した。ナイーブ CD4⁺CD25⁻ 細胞は、Qa1^{-/-} WT および変異マウスの脾臓から、CD4 細胞富化キット (BD Bioscience) およびビオチン化抗 CD25Ab を用いて精製した。B 細胞および CD4 細胞の純度は > 95% であった。免疫 CD8 細胞を生成するために、WT B6 マウスを、CFA 中の 100 μg の KLH で腹腔免疫し、7~10 日後に脾臓 CD8 細胞を得 (BD Bioscience)、CD44⁺CD122⁺Ly49⁺CD8 T 細胞についてソートした。これらの細胞を、Rag2^{-/-} レシピエントに静脈内移植した。細胞移植後すぐに、Rag2^{-/-} マウスを CFA 中の 100 μg の NP₁₉ KLH で腹腔内免疫し、IFA 中の 50 μg の NP₁₉ KLH で再度腹腔内免疫した。

【0076】

ELISA

NP 特異的抗体を検出するために、ELISA プレートを、0.5 μg/ml の NP₄ BSA または 1 μg/ml の NP₂₃ BSA (Biosearch Technologies) でコートし、CFA 中の NP₁₉ KLH による免疫および IFA 中の NP₁₉ KLH による再免疫の 14 日後に採取した血清を、スタンダードとして用いた。この免疫血清を 1:400 希釈したものを、100 単位/ml として定義した。全 IgG、IgG1 および IgG2a は、ビオチン化抗マウス IgG、IgG1 または、IgG2a とともにプレートをインキュベートした後、ストプトアジピン ペルオキシダーゼにより検出した。自己抗体の検出については、ブタサイログロブリン (Sigma) および、ブタインスリン (Sigma) を、関連 Ab を検出するのに用いた。

【0077】

統計

統計分析は、2 条件の比較についてはウィルコクソンマンホイットニー順位和検定を、2 条件を超える比較についてはクラスカルワリス検定を用いて行った。P 値 < 0.05 を統計学的に有意であるとみなした (* = < 0.05、** = < 0.01、*** = < 0.001)。

【0078】

結果

CD8⁺Treg は抑制活性の獲得に関して IL-15 に依存している

CD44⁺CD8⁺細胞は、CD122⁺IL-15依存性画分およびCD122⁻IL-15非依存性画分で構成される(図1A)。WTおよびIL-15^{-/-}マウスからのCD8⁺CD44⁺CD122⁺細胞の分析は、WTマウスが、IL-15^{-/-}マウスに比べて、5倍多いCD8⁺CD44⁺CD122⁺細胞を示すことを明らかにした。CFA中のKLHによるWTマウスの免疫は、CD44⁺CD122⁺CD8⁺T細胞の50%の増加を誘導したが、IL-15^{-/-}マウスでは、検出可能な増加を誘導しなかった(図1)。IL-15^{-/-}マウスのCD44⁺CD122⁺CD8⁺T細胞の残り集団のさらなる分析は、それらの細胞が、顕著に低いレベルのCD122を発現することを示した(図1A、左パネル)。

【0079】

これらのデータは、IL-15^{-/-}ドナーからのCD44⁺CD8⁺T細胞の不良な抑制活性が、CD122⁺CD44⁺CD8⁺T細胞を生成できないことを反映している可能性を示すものである。CD44⁺CD122⁺CD8⁺細胞のQa-1依存性の抑制活性を試験するために、我々は、WT B6マウスからCD44⁺CD122⁺CD8⁺細胞(>98%の純度)または、CD44⁺CD122⁻CD8⁺細胞(>98%の純度)をソートし、Qa-1(WT)またはQa-1(D277K)ドナーからの(CD25⁻)CD4細胞およびB細胞とともに、それらをRag2^{-/-}宿主に移植した。NP₁₉ KLHでチャレンジ後、CD44⁺CD122⁻細胞ではなく、CD44⁺CD122⁺CD8⁺細胞のレスピエントは、NP特異的なAb反応のQa-1拘束性の抑制を示した(図1B)。対照的に、CD44⁺CD122⁻CD8⁺細胞は抑制しなかった。

【0080】

高親和性Ab反応の発生は、T_{FH}細胞による胚中心(GC)B細胞の活性化に依存する、正確に調整されたプロセスである。Qa-1のD277K変異体は、CD8⁺TregとQa-1⁺標的T_H細胞との間の阻害性の相互作用を妨げる。この不良な相互作用は、多数のCD8⁺Tregの存在下ですら、サイログロブリンおよびインスリンに対する強固な自己抗体反応を可能にする(図1C)。

【0081】

CD8⁺TregによるLy49の発現

CD44⁺CD122⁺CD8⁺T細胞は、Ly49の発現に応じて2つのサブセットに分けることができる。Ly49⁺CD8⁺細胞は、インピトロにおいてIL-15による活性化に対して特に敏感であり、インピボでの有効な発達および年齢依存性の増加についてはCD4⁺T細胞に依存する(Coles et al., 2000、Anfossi et al., 2004)。

【0082】

KLH/CFAによるWT B6マウスの免疫は、CD44⁺CD122⁺CD8⁺T細胞の数を倍加させ、またそれらの細胞の25%は、Ly49も発現する。これらのCD44⁺CD122⁺Ly49⁺細胞はまた、CD8⁺ではなく、CD8⁺も発現し、高レベルのCD62Lも発現する。追加の分析は、Ly49⁺CD8⁺サブセットが、次の阻害性受容体: Ly49A(24.8%)、Ly49C/I(13.1%)、Ly49F(90%)およびLy49G2(33%)を発現することを明らかにし、活性化させるLy49受容体(Ly49D、H)はこれらの細胞によって検出できるレベルで発現していなかった(図2a)。

【0083】

ソートされたCD44⁺CD122⁺Ly49⁻ではなく、CD44⁺CD122⁺Ly49⁺のCD8⁺T細胞は、Qa-1変異体(D277K)CD4⁺T細胞ではなく、Qa-1 WT CD4⁺T細胞を効果的に抑制した。すなわち、抑制活性は、標的CD4細胞上のQa-1の認識に依存した(図2b)。これらの所見は、Ly49発現によりCD8⁺Tregを通常のCD8⁺記憶T細胞から区別できることを示すものであり、CD8⁺Tregの発達がクラスI MHCによるLy49の結合にある程度依存し得る可能性を開くものである。

【0084】

10

20

30

40

50

B6 Yaaにおける不良なCD8 Treg機能は、狼瘡様疾患の発症に寄与し得る

Qa1リガンドのCD8/TCR複合体との相互作用を妨げる点突然変異(Lu et al., 2008)の発現は、TFHの無調節な増加と関係する、B6.Qa1(D227K)マウスにおける狼瘡様自己免疫障害の発症をもたらす(Kim et al., 2010)。不良なCD8⁺Treg活性はまた、BXSBYaaマウスとB6.2m^{-/-}マウスとの交雑種が狼瘡様疾患の急速な発病および強度(intensity)を示すという知見(Bubier et al., 2007)に基けば、BXSBYaaマウスにおける疾患の病因に寄与している可能性がある。

【0085】

SB/Le系統に由来するY染色体座に主に起因するとされる、オスのBXSBYaa自己免疫障害は、実際にY染色体上に転座した余分なTLR7のコピーを示す。このY染色体に連鎖したTLR7の余分なコピーは、多数の狼瘡になりやすい系統において疾患を悪化させ(Izui et al., 1988、Morel et al., 2000、Pisitkun et al., 2006)、非自己免疫性のC57BL/6バックグラウンド(B6 Yaa)において疾患を促進する。B6 Yaaマウスの予備分析は、2および8月齢マウスの両方が、B6.Qa1(D227K)の表現型によく似た、脾臓におけるTFHおよびGC B細胞のおよそ3倍の増加を有することを示した(図3)。我々は、B6 Yaaマウスにおける自己免疫性の表現型がCD8⁺Tregによる不良な制御に関係するかどうかを検討した。B6 YaaマウスにおけるCD44⁺CD122⁺Ly49⁺CD8⁺T細胞の数は、KLH/CF A免疫の7日後のB6 WTマウスにおいて見出された数の2倍であった(データは示してない)。

【0086】

しかしながら、Rag2^{-/-}宿主への、B6(WT)CD4細胞およびB細胞に加え、B6 YaaマウスからのCD44⁺CD122⁺CD8⁺Tregの移植は、B6 Yaa CD8 Tregが標的CD4 T細胞を抑制できないことを明らかにした。WTマウスからのCD8細胞は、同じ実験において強い抑制を移したことから(図4)、この所見は、B6 Yaaマウスにおける自己免疫に関係するTFH細胞の増加が、不良なCD8 Treg機能を反映している可能性を開くものである。

【0087】

照射されたB16-GM-CSF形質導入細胞の最適下レベルによるワクチン接種は、不良なCD8⁺Treg活性を有するマウスにおいてB16腫瘍接種後の生存を増大させたC57BL/6.Qa1(D227K)ノックインマウスおよび野生型C57BL/6マウスに対し、0日に2×10⁵個のGM-CSF-照射(3500ラド)B16細胞で一方の脇腹に皮下でワクチン接種した。ワクチン接種の1週間後、マウスに、反対の脇腹に5×10⁶個のB16メラノーマ細胞を皮下接種した(Dranoff et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Apr 15;90(8):3539-43.、Sampson et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 17;93(19):10399-404)。不良なCD8⁺Treg活性を有するC57BL/6.Qa1(D227K)ノックインマウスは、野生型C57BL/6マウスより長く生存した(図7)。

【0088】

CD4⁺濾胞性ヘルパーT細胞(TFH)の活性を、TFH細胞の表面に発現するQa1の認識を介して調節するようにプログラムされたCD8⁺T細胞の亜集団は、自己抗体反応を弱める(Kim et al., 2010、この全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる)。これらのCD8⁺制御性(Treg)細胞の表面表現型の以前の分析は、これらが、高いレベルのCD44およびCD122、ならびに比較的低いレベルのCXCR5およびICOSLを発現することを示した。それらの表面におけるCD122の発現は、発達および機能の両方についてのIL15へのそれらの依存性(Kim et al., 2010)と一致する。制御性活性は、Kirレセプターも発現するCD44⁺CD122⁺CD8⁺細胞の亜集団に付与される。CD8細胞によるクラスI MHC受容体Ly49の発現は、IL15に対する増強された応答性に関係していた(Coles et al., 2000、Judge et a

10

20

30

40

50

l., 2002、Anfossi et al., 2004)。これらの知見は、CD8 T細胞の3～5%を占めるCD44⁺CD122⁺Kir⁺CD8 T細胞が、このT細胞サブセットに付与される、実質的にすべてのQa-1拘束性の抑制活性の原因であることを示している。

【0089】

Qa-1リガンドのCD8/TCR複合体との相互作用を妨げる227位におけるアミノ酸置換変異(D→K)を発現するQa-1ノックインマウスの分析は、TFHおよびGC B細胞の増加に関係する不良なCD8⁺Treg活性を明らかにした。これらの細胞異常は、組織特異的自己抗体、非リンパ系器官のリンパ球浸潤および重篤な糸球体腎炎といった、BXSB-YaaおよびC57BL/6-Yaaマウスによって示される症候群に類似する一連の病理学的な変化を特徴とする狼瘡様自己免疫障害の発症と関連していた。

10

【0090】

BXSB-Yaa疾患が2mに関連するクラスIa/Ibタンパク質の欠如によって悪化するという知見(Kim et al., 2010)もまた、不良なCD8⁺Treg活性がBXSB-Yaa疾患に寄与し得るとする仮説に矛盾しない。我々は、B6-Yaaマウスが、生後数カ月以内に増加した数のTFHおよびGC B細胞を含んでおり、そしてこれらのマウスからのCD8⁺Tregが、養子宿主におけるWT CD4 T細胞を抑制できないことを見出す。CD8⁺制御性T細胞の発達の不良/異常は、この狼瘡マウスモデルにおける疾患の病因に寄与している可能性がある。

【0091】

制御性CD8⁺T細胞は、自己寛容の維持およびSLE様自己免疫疾患の阻止にとって不可欠である。本明細書で提示するデータは、発達および機能についてのIL-15サイトカインへのそれらの依存性を基にCD8 Tregの表面表現型を確立する。結果は、CD8 T細胞のQa-1拘束性の抑制活性が、それらの表面にCD44、CD122およびLy49を発現する小さい亜集団に付与されることを明らかにした。加えて、我々は、B6.Yaa自己免疫易発症マウスにおけるSLE様疾患の発症がQa-1拘束性CD8 Tregの不良な制御活性に関係していることを見出した。

20

【0092】

ヒト白血球抗原E(HLA-E)のマウスホモログであるQa-1は、意図的(deliberate)な免疫または感染後、自己または外来タンパク質に由来するペプチドに結合し、これを提示する β_2 ミクログロブリンとヘテロダイマーを形成する(Lo et al., 1999、Lo et al., 2000、Sullivan et al., 2002)。Qa-1をコードするmRNAは多くの細胞種において検出できるが(Transy et al., 1987)、Qa-1- β_2 ミクログロブリンヘテロダイマーの表面発現は、正確な集合および輸送のための要件によって、活性化TおよびBリンパ球および樹状細胞の表面に制限されている可能性がある(Sullivan et al., 2002、Soloski et al., 1995)。

30

【0093】

ペプチドを含むQa-1複合体は2つの広範なクラスの受容体を結合する。Qdm(Qa-1決定修飾因子)と呼ばれる、MHCクラスIaリーダー配列に由来するペプチドを含むQa-1ヘテロダイマーは、ナチュラルキラー(NK)細胞およびCD8 T細胞の亜集団によって発現される非クローン性に分布するCD94-NKG2A受容体に結合する。Qa-1/Qdm-NKG2A相互作用の機能的結果は、一般的にNKまたはCD8の細胞溶解活性の阻害である(Moser et al., 2002)。Qa-1リガンドの第2のクラスは、増え続けるペプチドのリストを含むQa-1- β_2 ミクログロブリンヘテロダイマーを含む(Tompkins et al., 1998、Lo et al., 2000、Jiang et al., 2003、Davies et al., 2003)。このQa-1リガンドのセットとCD8 T細胞上のTCRとの間の相互作用は、CD8⁺Tregの誘導、集団の増加およびエフェクター細胞活性の発現を促進し得る。

40

【0094】

Qa-1変異マウスの最近の分析は、自己免疫疾患の阻止におけるCD8⁺Tregの

50

不可欠な寄与を明らかにした。CD8⁺Tregの優先的な標的は、その表面に高い定常状態レベルのQa1を発現するT_{FH}のサブセットである。CD8⁺Tregと標的Qa1⁺濾胞性ヘルパーT細胞との間の阻害性の相互作用の遺伝的な妨害は、SLE様自己免疫疾患の発症をもたらし、それはタンパク質またはウイルス抗原での刺激によって促進された(Kim et al., 2010)。パーフォリンおよびIL15は、CD8⁺Tregの完全な活性化に必要であることが示されている。IL15依存性トランス細胞傷害メカニズムは、活性化T_{FH}細胞によって発現される標準的なサイトカインであるIL21によって効果的に増強されることが示されている(Zeng et al., 2005)。

【0095】

我々の分析は、CD8⁺Tregは、阻害性のLy49受容体(Ly49A、Ly49G2、Ly49C/I、Ly49F)、特にLy49Fを発現するが(図2A)、活性化させる受容体は発現しないことを明らかにした。先の研究は、阻害性のLy49ファミリーメンバーを発現するCD8⁺T細胞は、年齢とともにCD4依存性の増加を示めすが、STAT1欠損が、このLy49⁺CD8⁺亜集団のサイズを低減することを示した(Coles et al., 2000、Anfossi et al., 2004)。Ly49の結合はCD8⁺T細胞の活性化を阻害できるが(Coles et al., 2000)、阻害性Ly49分子の発現はまた、活性化誘導細胞死(AICD)を低減し、それによりこの記憶集団を早期の除去から保護することができる(Ugolini et al., 2001、Young et al., 2001、Roger et al., 2001、Chwae et al., 2002、Gati et al., 2003)。これらの考察は、CD8⁺Tregの表面上のLy49受容体の阻害性の発現は、初期活性化のレベルを制限し得るが、記憶プールにおけるそれらの寿命を延ばし得ることを示している。

【0096】

興味深いことに、CD8⁺Tregによって発現される主要なLy49ファミリーメンバーであるLy49F受容体に結合するリガンドは同定されていない。通常の本MHCクラスI分子に対するLy49Fの結合活性の欠如は、このLy49ファミリーメンバーが非古典的なMHCクラスI分子と相互作用し得るという憶測を呼んだ(Kronenberg et al., 2010)。

【0097】

ヒトCD8⁺T細胞はまた、マウスLy49に類似した阻害性のKIR受容体を発現する細胞の小サブセットを含む。Ly49およびKIRは、マウスおよびヒトの本MHCクラスIをそれぞれ認識する。Ly49タンパク質は、C型レクチン様ドメインをその細胞外ドメインに有するが、ヒトの本NK阻害性受容体としてのKIRファミリーは、イムノグロブリンドメインを有する。両タンパク質とも、細胞質内免疫受容抑制性チロシンモチーフ(ITIM)という構造的相同性を共有しており、これは、その各々のKIRまたはLy49受容体によるMHCクラスIへの結合の際に、阻害性のシグナルを伝達する(Vivier and Anfossi, 2004)。

【0098】

KIR⁺CD8⁺T細胞は、記憶表現型を発現するが、一般的にCCR7および細胞表面CD28/CD27を発現しない(Mingari et al., 1996、Speiser et al., 1999、Anfossi et al., 2001)。興味深いことに、パーフォリンの細胞内発現は、正常成体からのCD8⁺T細胞プールの4~5%を占めるKIR⁺ヒトCD8⁺T細胞に限定されている(Anfossi et al., 2004)。以前の研究は、KIR⁺CD8⁺T細胞プール(全CD8⁺T細胞の4~5%)の小画分から単離されたヒトCD8⁺T細胞クローンがHLA-E(Qa1bのヒトホモログ)を認識することを示したが、これは、マウスにおけるLy49⁺CD8⁺T細胞がQa1依存性の免疫抑制を発揮するという我々の所見と一致する(Pietra et al., 2001、Moretta et al., 2003、Mestas and Hughes, 2004)。

【0099】

びーズ依存性富化(Kim et al., 2010)およびFACS依存性セルソーティング(図5)により、我々はCD44⁺CD122⁺細胞がCXCR5およびICOSLを発現する

ことに気付いた。この表面表現型は、 $CD8^+ Treg$ の抑制活性に寄与する可能性があるため興味深い。 $CXCR5$ の発現は、 $CD8^+ Treg$ の $B/CD4$ T細胞濾胞へのナビゲーションを可能にすることができる一方、活性化した移入 $CD8 Treg$ による $ICOSL$ の発現は、濾胞の微細環境内での $ICOSL^+ T_{FH}$ 細胞とのその相互作用を増強することができる。

【0100】

しかしながら、入手可能な抗体によるそれらの2つの表面タンパク質の検出は比較的効率であるが、 $CD44$ 、 $CD122$ 、および $Ly49$ に特異的な抗体は、 $CD8 Treg$ の、雑多な (heterogeneous) 細胞集団からの効率的な単離に好ましい。 $CD8^+$ 細胞を、 $CD44$ 、 $CD122$ および $Ly49$ の三つ組の発現を基にソートすることは、抑制の分子メカニズムのさらなる分析および $B6$ マウスにおけるこの制御性システムの遺伝子シグネチャーの定義づけを容易にする。

10

【0101】

雄性マウスにおける SLE の重篤度を高める遺伝的修飾因子 Yaa は、 BXS 雑種系統を生み出した、 $C57BL/6$ メスと SB/Le オスとの交雑種から最初に同定された。 BXS 系統に加え、 Yaa の Y 染色体は、多くの狼瘡易発症性の系統において疾患を悪化させる (Kikuchi et al., 2005, Subramanian et al., 2006)。非自己免疫性の $B6$ バックグラウンドへの Yaa の遺伝子移入 ($B6 Yaa$) は、 Yaa が、ループス腎炎を特徴とする SLE 様疾患を8~12ヶ月齢に引き起こし得ることを明らかにした。末端器官の自己免疫疾患は8~12ヶ月まで $B6 Yaa$ マウスにおいて発症しないが、我々は、生後2ヶ月までに T_{FH} および GC B細胞の増加が明らかであることを見出す (図5)。この早期の段階における T_{FH} および GC B細胞の蓄積は、 $CD8 T$ 細胞の不良な制御性活性に関係していた。活性化 $TLR7^hi DC$ による $CD8^+$ 記憶細胞の慢性的な活性化は、 $CD8^+$ 制御性T細胞よりむしろサイトカインを分泌する $CD8^+$ 記憶細胞の発達を優先的に支持する可能性がある。

20

【0102】

$Qa1$ 拘束性の $CD8$ 制御性T細胞の $IL15$ 依存性は、 $CD122$ および Kir の共発現、および、 $CD44^+ CD122^+ Ly49^+ CD8$ 細胞が $Qa1$ 依存性の抑制活性を媒介することに反映されている。 $CD8 Treg$ と標的 $CD4 T$ 細胞との間の相互作用の妨害は、自己抗体生成および SLE 様疾患をもたらす。これらの所見は、 $CD8 Treg$ 活性の増強が自己免疫疾患の処置への新しいアプローチであることを示す。

30

【0103】

転写因子 $Helios$ の発現は、 $Ly49^+ CD8 Treg$ の表現型および抑制活性を決定づける

$Ly49^+$ および $Ly49^- CD8^+ T$ 細胞から調製した $cDNA$ による DNA マイクロアレイは、 $CD8 Treg$ の発達および機能にとって重要である遺伝子に対する有力な主要転写因子として転写因子 $Helios$ を同定した。 $Helios$ は、ジンクフィンガー調節因子のイカロスファミリの一員である。 $Helios$ は、T細胞発達の初期段階で高く発現し、 $FoxP3^+ CD4^+$ 制御性T細胞のサブセット (70%)でも発現される。しかしながら、 $Helios$ の発現は、 $FoxP3$ の発現に依存しない。成熟B細胞、樹状細胞およびミエロイド細胞は、 $Helios$ を発現しない。 $CD8 T$ 細胞プールにおける $Helios$ の発現および機能は報告されていない。我々の分析は、 $Helios$ が、 $CD8 T$ 細胞プール内の $Ly49^+ CD8$ 制御性T細胞によって専ら発現され、 $Ly49^+ T$ 細胞におけるこの転写因子の発現が、その抑制的な機能に関係することを示す (図8)。

40

【0104】

$Helios$ を発現する $Ly49^+ CD8 T$ 細胞の表現型キャラクター化

$Helios^+ Ly49^+$ マウス $CD8^+ Treg$ の追加のキャラクター化は、ヒトにおける $KIR^+ CD8^+$ 制御性T細胞の将来の同定に対し役立つ。図9で実証するとおり、 $Helios$ を発現する $Ly49^+ CD8 T$ 細胞は、より高いレベルの VLA

50

2 および V L A 4 (細胞 細胞相互作用に關与するインテグリン) を発現する。加えて、I L 15 K O マウスは、H e l i o s + L y 4 9 + C D 8 細胞を欠くことから、H e l i o s + L y 4 9 + C D 8 T 細胞の発達は、I L 15 依存性である。決定的な転写因子である H e l i o s の、マウスにおける C D 8 T r e g 活性に関する分析は、ヒトにおける C D 8 + T r e g 細胞の同定およびその遺伝的性質の理解のためのもう一つの重要な因子を追加する。

【0105】

自己免疫疾患における C D 8 T r e g を介した免疫治療：C I A モデル

器官特異的な自己免疫疾患に關係する病原性 C D 4 + T 細胞は、これらの標的 C D 4 + 細胞によって発現される Q a 1 の、C D 8 + T r e g による認識を介して効果的に抑制することができる。これらの自己免疫疾患モデルは、I 型糖尿病 (T 1 D)、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (E A E) および、通常の T H 1 および / または T H 1 7 型 C D 4 細胞が病因的役割を果たすことが知られているコラーゲン誘導関節炎 (C I A) を含む。我々は、コラーゲン誘導関節炎モデルを用いて、自己免疫疾患の予防および処置における C D 8 T r e g の有効性を試験した。疾患の発症は、記憶表現型 C D 8 + T 細胞によってではなく、Q a 1 拘束性 C D 8 + T r e g の注入によって遅延させることができる。

10

【0106】

インビトロでの I L 15 による C D 8 + T r e g の刺激は、これらの細胞の強い増加ならびに表面表現型および機能活性の維持をもたらす。図 10 では、インビトロで増加させた C D 8 T r e g が C I A の発症を効果的に予防している。

20

【0107】

がんにおける C D 8 T r e g を介する免疫療法

C D 8 + T r e g 活性のブロックは、B 1 6 メラノーマモデルにおける腫瘍免疫の増強をもたらした：G M - C S F 産生 B 1 6 メラノーマによるマウスへのワクチン接種は、W T マウスにおける急速な腫瘍成長と比べ、Q a 1 D 2 2 7 K マウスにおける腫瘍成長の進行を遅らせた。Q a 1 D 2 2 7 K マウスにおける腫瘍成長の阻害は、腫瘍内への C D 8 + エフェクター T 細胞の浸潤の数の増加と相関した。それ故、C D 8 + T r e g 依存性抑制のブロックは、腫瘍環境におけるエフェクター T 細胞の増強された増加および活性をもたらす。C D 8 + T r e g を除去するために、90% を超える L y 4 9 + C D 8 T r e g による L y 4 9 F サブタイプの発現を利用することができる。実際に、予備データは、抗 L y 4 9 F 抗体による L y 4 9 F + 細胞の除去が、B 1 6 メラノーマモデルにおける抗腫瘍免疫を増強することを示している。この所見は、抗 K I R (X) 抗体 (ヒトにおける C D 8 T 細胞の主要な K I R サブタイプを標的にする抗体) の投与が、ヒトにおいてがんに対する免疫反応を増強するための実行可能な介入であることを示すものである。

30

【0108】

本発明は、この出願において、上記の説明に記載された、または図面で例示された構造の詳細および構成要素の配置に限定されない。本発明は、他の態様が可能であり、種々の方法で実施または実行することが可能である。また、本明細書で使用される表現および用語は説明のためであり、限定するものとして見なされるべきではない。本明細書における「包括する」、「含む」、または「有する」、「含有する」、「包含する」、およびそれらの変形表現の使用は、その後にリストされる項目およびそれらの均等物ならびに追加の項目を包含することを意味する。

40

【0109】

参考文献

【表 1】

Anderton,S.M., Radu,C.G., Lowrey,P.A., Ward,E.S., and Wraith,D.C. (2001). Negative selection during the peripheral immune response to antigen. *J Exp. Med.* 193, 1-11.

Anfossi,N., Pascal,V., Vivier,E., and Ugolini,S. (2001). Biology of T memory type 1 cells. *Immunol. Rev.* 181, 269-278.

Anfossi,N., Robbins,S.H., Ugolini,S., Georgel,P., Hoebe,K., Bouneaud,C., Ronet,C., Kaser,A., DiCioccio,C.B., Tomasello,E., Blumberg,R.S., Beutler,B., Reiner,S.L., Alexopoulou,L., Lantz,O., Raulet,D.H., Brossay,L., and Vivier,E. (2004). Expansion and function of CD8⁺ T cells expressing Ly49 inhibitory receptors specific for MHC class I molecules. *J. Immunol.* 173, 3773-3782.

Bouneaud,C., Kourilsky,P., and Bousso,P. (2000). Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13, 829-840.

Bubier,J.A., Bennett,S.M., Sproule,T.J., Lyons,B.L., Olland,S., Young,D.A., and Roopenian,D.C. (2007). Treatment of BXSB-Yaa mice with IL-21R-Fc fusion protein minimally attenuates systemic lupus erythematosus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1110, 590-601.

Chwae,Y.J., Chang,M.J., Park,S.M., Yoon,H., Park,H.J., Kim,S.J., and Kim,J. (2002). Molecular mechanism of the activation-induced cell death inhibition mediated by a p70 inhibitory killer cell Ig-like receptor in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 169, 3726-3735.

Coles,M.C., McMahon,C.W., Takizawa,H., and Raulet,D.H. (2000). Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors. *Eur. J. Immunol.* 30, 236-244.

Davies,A., Kalb,S., Liang,B., Aldrich,C.J., Lemonnier,F.A., Jiang,H., Cotter,R., and Soloski,M.J. (2003). A peptide from heat shock protein 60 is the dominant peptide

【 0 1 1 0 】

10

20

30

【表 2】

bound to Qa-1 in the absence of the MHC class Ia leader sequence peptide Qdm. *J. Immunol.* 170, 5027-5033.

Gati,A., Guerra,N., Gaudin,C., Da Rocha,S., Escudier,B., Lecluse,Y., Bettaieb,A., Chouaib,S., and Caignard,A. (2003). CD158 receptor controls cytotoxic T-lymphocyte susceptibility to tumor-mediated activation-induced cell death by interfering with Fas signaling. *Cancer Res.* 63, 7475-7482. 10

Goldrath,A.W. and Bevan,M.J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-262.

Izui,S., Higaki,M., Morrow,D., and Merino,R. (1988). The Y chromosome from autoimmune BXSB/MpJ mice induces a lupus-like syndrome in (NZW x C57BL/6)F1 male mice, but not in C57BL/6 male mice. *Eur. J. Immunol.* 18, 911-915.

Jiang,H., Curran,S., Ruiz-Vazquez,E., Liang,B., Winchester,R., and Chess,L. (2003). Regulatory CD8⁺ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V beta repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8378-8383. 20

Judge,A.D., Zhang,X., Fujii,H., Surh,C.D., and Sprent,J. (2002). Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8⁽⁺⁾ T cells. *J. Exp. Med.* 196, 935-946.

Kearney,E.R., Pape,K.A., Loh,D.Y., and Jenkins,M.K. (1994). Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1(4), 327-339. 30

Kikuchi,S., Fossati-Jimack,L., Moll,T., Amano,H., Amano,E., Ida,A., Ibnou-Zekri,N., Laporte,C., Santiago-Raber,M.L., Rozzo,S.J., Kotzin,B.L., and Izui,S. (2005). Differential role of three major New Zealand Black-derived loci linked with Yaa-induced murine lupus nephritis. *J. Immunol.* 174, 1111-1117.

Kim,H.J., Verbinnen,B., Tang,X., Lu,L., and Cantor,H. (2010). Inhibition of follicular T helper cells by CD8⁺ Treg is essential for self tolerance. *Nature* 467, 328-332. 40

Littman,D.R. and Rudensky,A.Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140, 845-858.

Lo,W.F., Ong,H., Metcalf,E.S., and Soloski,M.J. (1999). T cell responses to gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8⁺ T cells in immunity to

【表 3】

Salmonella infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *J. Immunol.* 162, 5398-5406.

Lo, W.F., Woods, A.S., DeCloux, A., Cotter, R.J., Metcalf, E.S., and Soloski, M.J. (2000). Molecular mimicry mediated by MHC class Ib molecules after infection with gram-negative pathogens. *Nat. Med.* 6, 215-218.

Lu, L., Kim, H.J., Werneck, M.B., and Cantor, H. (2008). Regulation of CD8⁺ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 19420-19425. 10

Martin, D.A., Zheng, L., Siegel, R.M., Huang, B., Fisher, G.H., Wang, J., Jackson, C.E., Puck, J.M., Dale, J., Straus, S.E., Peter, M.E., Krammer, P.H., Fesik, S., and Lenardo, M.J. (1999). Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 4552-4557. 20

Mestas, J. and Hughes, C.C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172, 2731-2738.

Mingari, M.C., Schiavetti, F., Ponte, M., Vitale, C., Maggi, E., Romagnani, S., Demarest, J., Pantaleo, G., Fauci, A.S., and Moretta, L. (1996). Human CD8⁺ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 12433-12438. 30

Morel, L., Croker, B.P., Blenman, K.R., Mohan, C., Huang, G., Gilkeson, G., and Wakeland, E.K. (2000). Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6670-6675.

Moretta, L., Romagnani, C., Pietra, G., Moretta, A., and Mingari, M.C. (2003). NK-CTLs, a novel HLA-E-restricted T-cell subset. *Trends Immunol.* 24, 136-143. 40

Moser, J.M., Gibbs, J., Jensen, P.E., and Lukacher, A.E. (2002). CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8⁽⁺⁾ T cell responses. *Nat. Immunol.* 3, 189-195.

Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M.E., Huster, K.M., Jansson, M., Granucci, F., Shim, D.J., Wucherpfennig, K.W., and Cantor, H. (2001). Analysis of the Relationship between Viral Infection and Autoimmune Disease. *Immunity* 15, 137-147.

【表 4】

Pietra,G., Romagnani,C., Falco,M., Vitale,M., Castriconi,R., Pende,D., Millo,E., Anfossi,S., Biassoni,R., Moretta,L., and Mingari,M.C. (2001). The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR alpha/beta-mediated recognition. *Eur. J. Immunol.* 31, 3687-3693.

Pisitkun,P., Deane,J.A., Difilippantonio,M.J., Tarasenko,T., Satterthwaite,A.B., and Bolland,S. (2006). Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* 312, 1669-1672. 10

Roger,J., Chalifour,A., Lemieux,S., and Duplay,P. (2001). Cutting edge: Ly49A inhibits TCR/CD3-induced apoptosis and IL-2 secretion. *J. Immunol.* 167, 6-10.

Slifka,M.K., Blattman,J.N., Sourdive,D.J., Liu,F., Huffman,D.L., Wolfe,T., Hughes,A., Oldstone,M.B., Ahmed,R., and von Herrath,M.G. (2003). Preferential escape of subdominant CD8⁺ T cells during negative selection results in an altered antiviral T cell hierarchy. *J. Immunol.* 170, 1231-1239. 20

Soloski,M.J., DeClou,A., Aldrich,C.J., and Forman,J. (1995). Structural and functional characteristics of the class 1B molecule, Qa-1. *Immunol. Rev.* 147, 67-89.

Speiser,D.E., Pittet,M.J., Valmori,D., Dunbar,R., Rimoldi,D., Lienard,D., MacDonald,H.R., Cerottini,J.C., Cerundolo,V., and Romero,P. (1999). In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 190, 775-782.

Subramanian,S., Tus,K., Li,Q.Z., Wang,A., Tian,X.H., Zhou,J., Liang,C., Bartov,G., McDaniel,L.D., Zhou,X.J., Schultz,R.A., and Wakeland,E.K. (2006). A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 9970-9975. 30

Sullivan,B.A., Kraj,P., Weber,D.A., Ignatowicz,L., and Jensen,P.E. (2002). Positive selection of a Qa-1-restricted T cell receptor with specificity for insulin. *Immunity* 17, 95-105.

Tompkins,S.M., Kraft,J.R., Dao,C.T., Soloski,M.J., and Jensen,P.E. (1998). Transporters associated with antigen processing (TAP)-independent presentation of soluble insulin to alpha/beta T cells by the class Ib gene product, Qa-1(b). *J. Exp. Med.* 188, 961-971. 40

Transy,C., Nash,S.R., David-Watine,B., Cochet,M., Hunt,S.W., Hood,L.E., and Kourilsky,P. (1987). A low polymorphic mouse H-2 class I gene from the Tla complex is expressed in a broad variety of cell types. *J. Exp. Med.* 166, 341-361.

【表 5】

Ugolini,S., Arpin,C., Anfossi,N., Walzer,T., Cambiaggi,A., Forster,R., Lipp,M., Toes,R.E., Melief,C.J., Marvel,J., and Vivier,E. (2001). Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 2, 430-435.

Vivier,E. and Anfossi,N. (2004). Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat. Rev. Immunol* 4, 190-198. 10

Young,N.T., Uhrberg,M., Phillips,J.H., Lanier,L.L., and Parham,P. (2001). Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. *J. Immunol.* 166, 3933-3941.

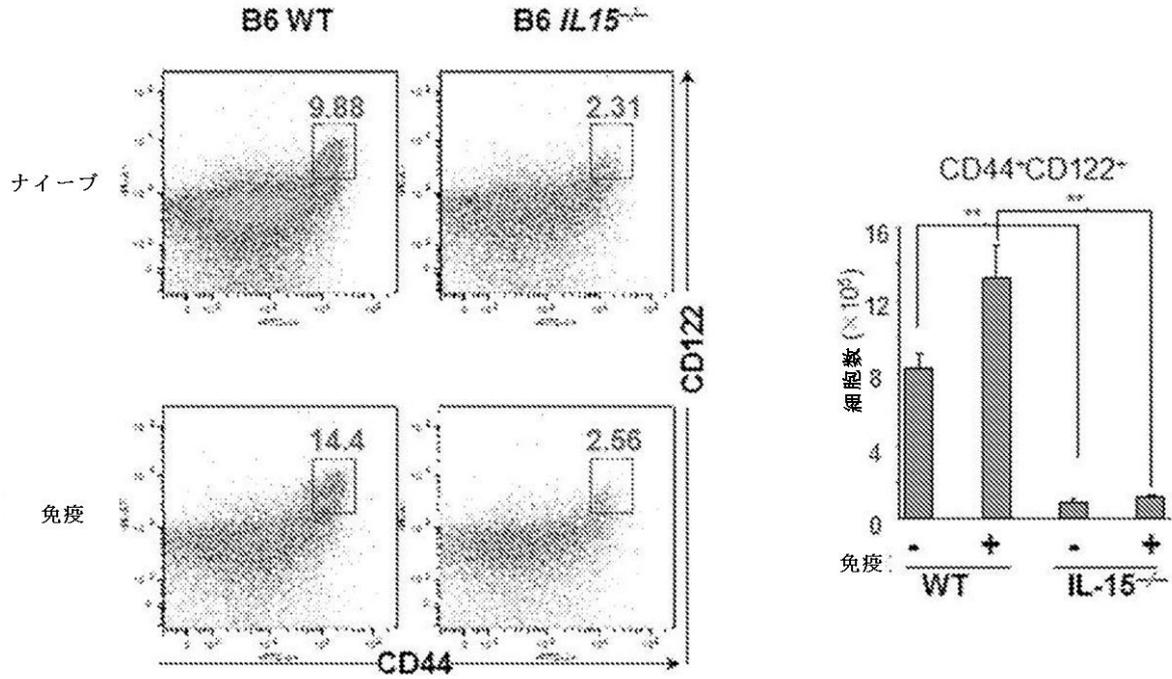
Zeng,R., Spolski,R., Finkelstein,S.E., Oh,S., Kovanen,P.E., Hinrichs,C.S., Pise-Masison,C.A., Radonovich,M.F., Brady,J.N., Restifo,N.P., Berzofsky,J.A., and Leonard,W.J. (2005). Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* 201, 139-148. 20

【図1A】

図1

IL-15反応性CD8 T細胞は抑制活性を示す

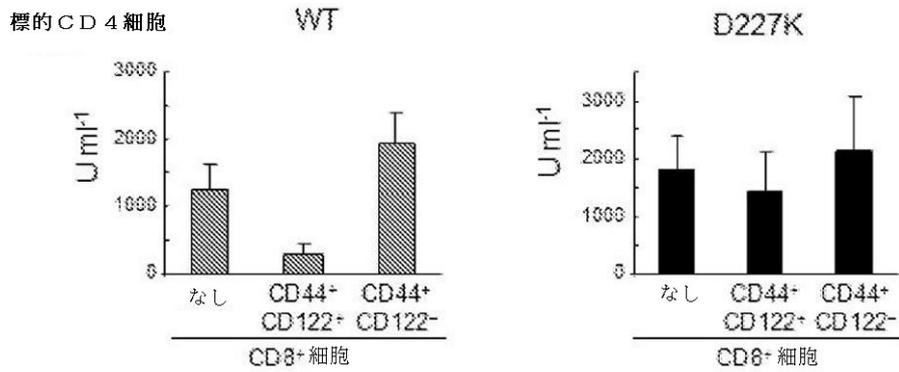
A. CD8 T細胞のFACS分析



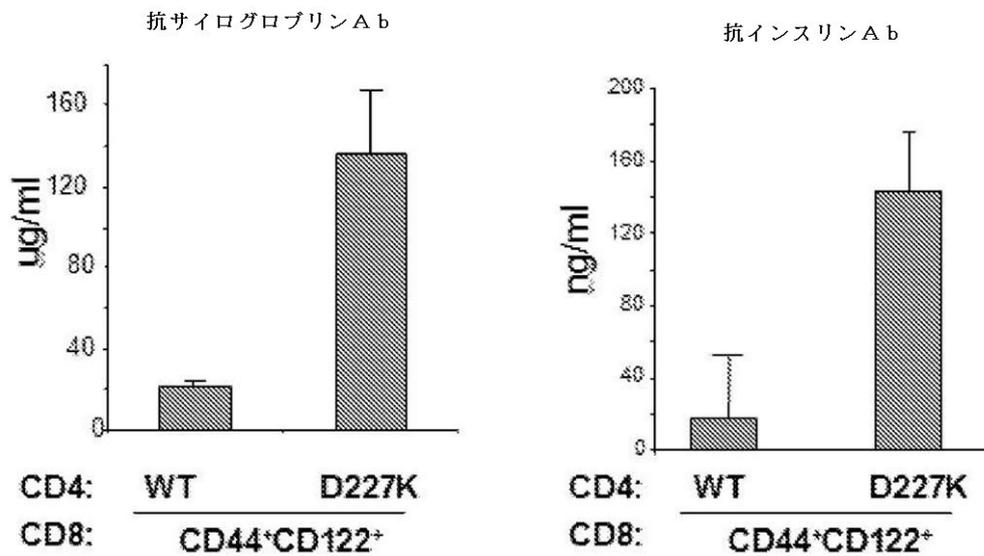
【図 1 B - C】

図 1

B CD4⁺CD122⁺CD8⁺T細胞の抑制活性：高親和性抗NP反応



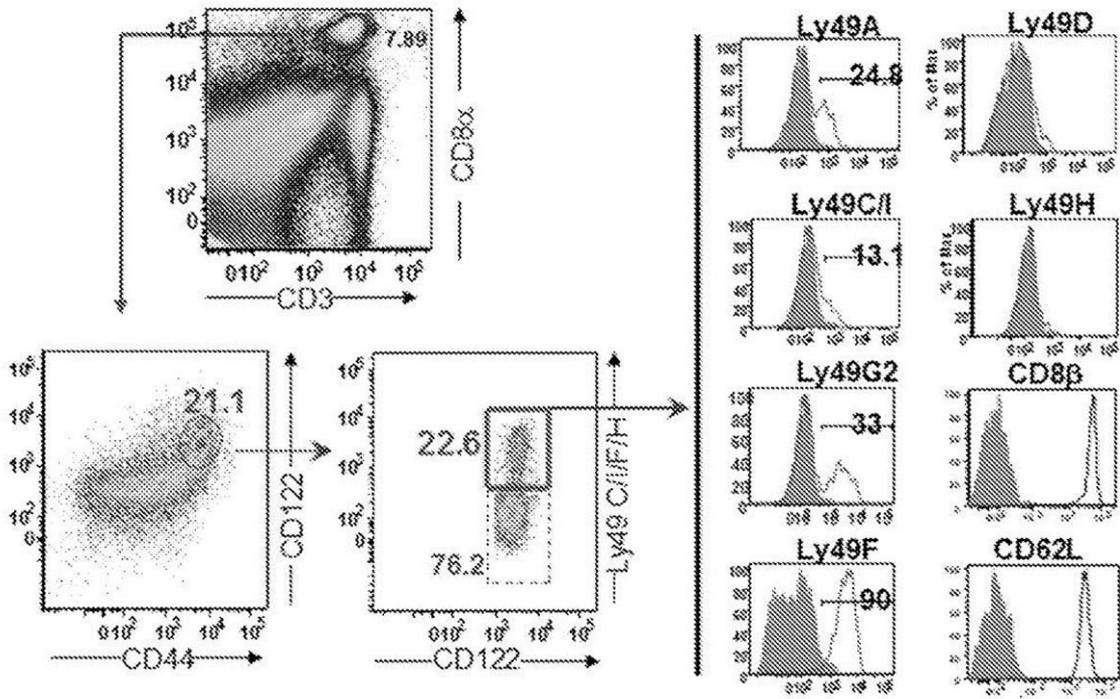
C 自己抗体反応のQa-1依存性の抑制



【図2A - B】

図2

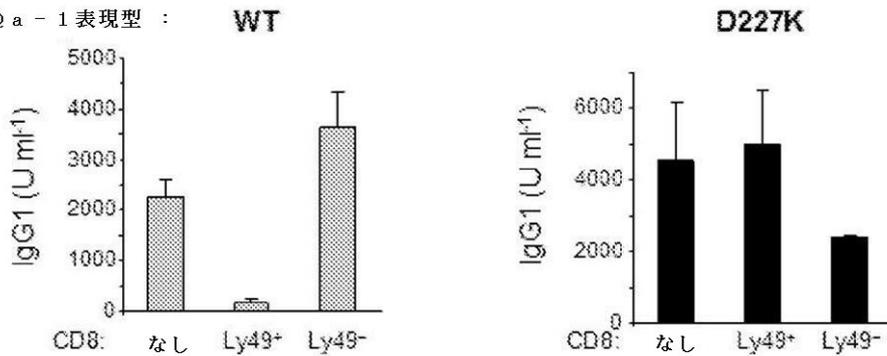
A 免疫後のCD8⁺ TregによるLy49の発現



B CD44⁺CD122⁺Ly49⁺CD8 T細胞は、Qa-1拘束性の抑制活性の原因である

高親和性抗NP A b反応

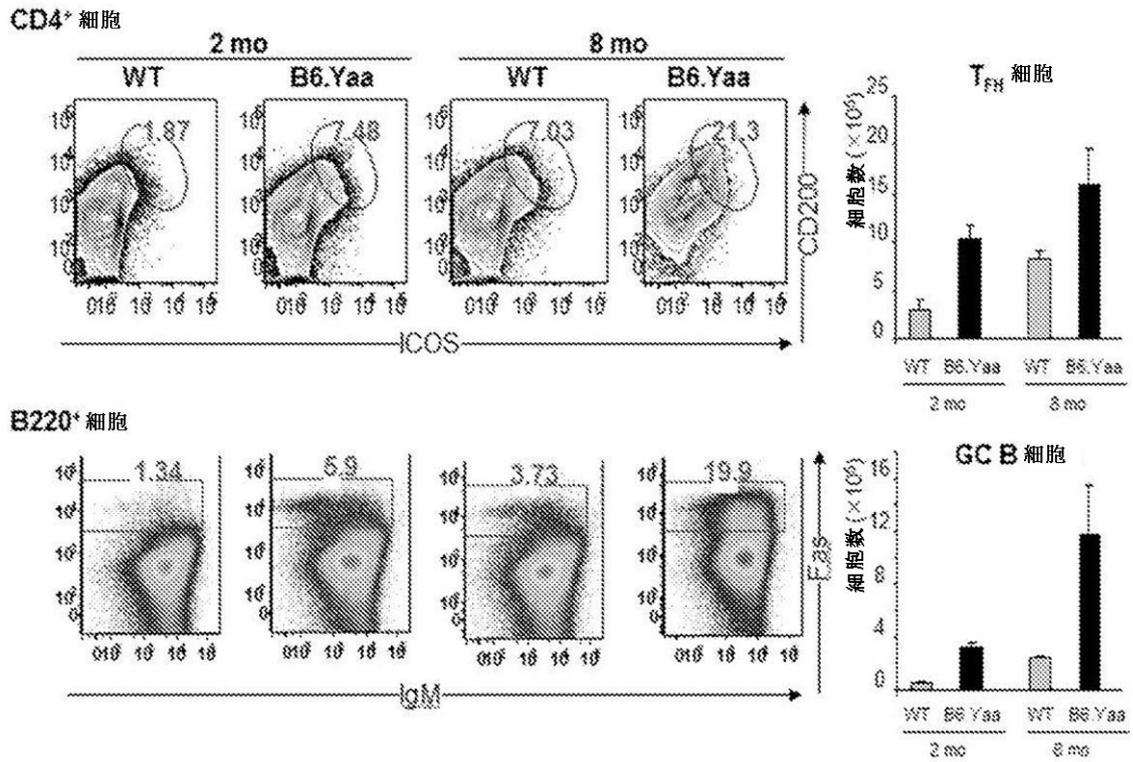
CD4標的のQa-1表現型 :



【 図 3 】

図 3

B6 - Y a a マウスにおける、 T_{FH} および GC B 細胞の数の増加

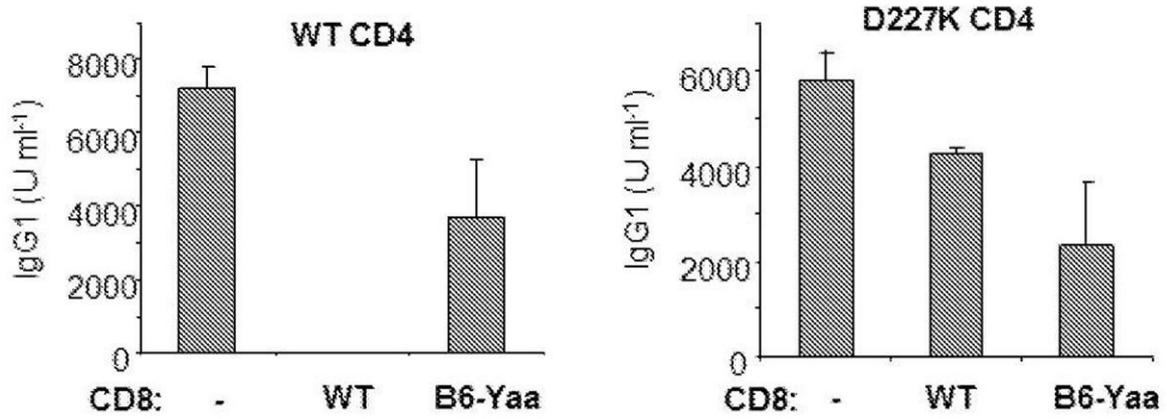


【 図 4 】

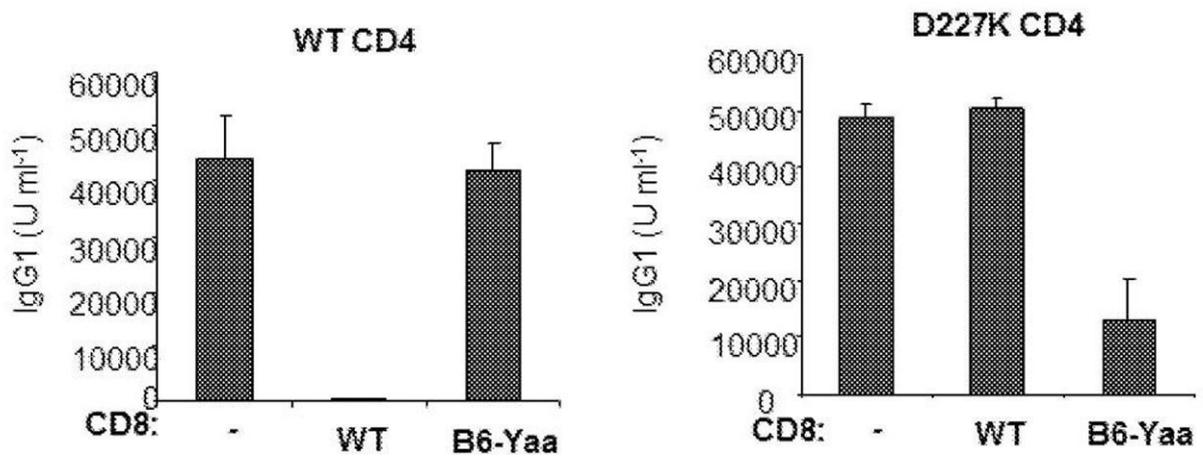
図 4

B 6 - Y a a マウスからの C D 8 + T 細胞の低下した抑制活性

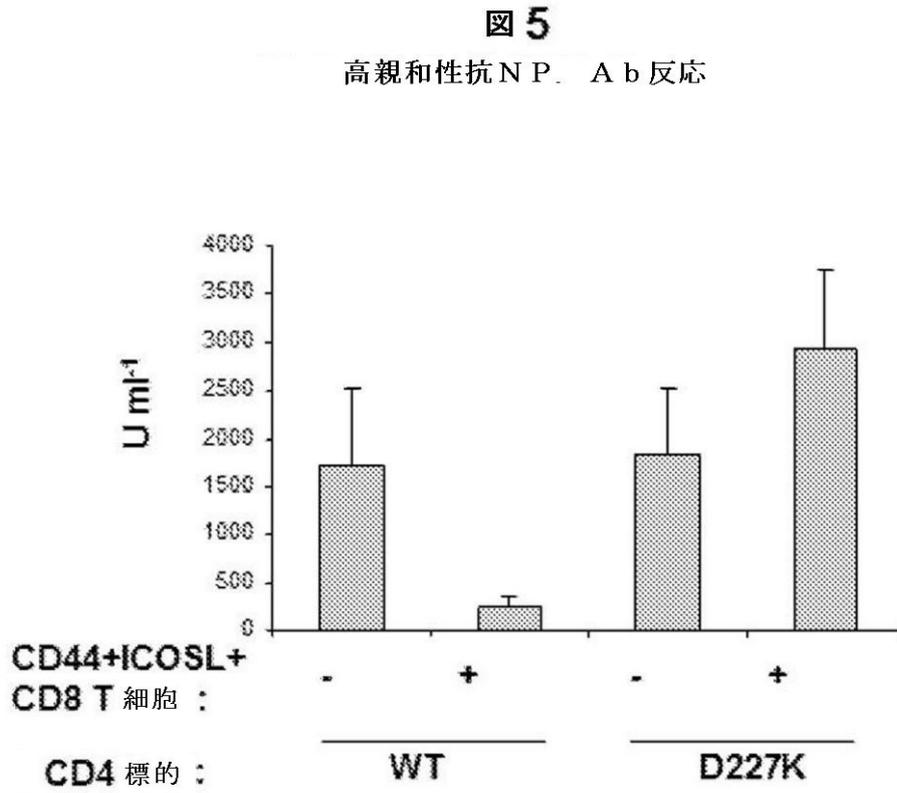
高親和性抗 N P A b 反応



全抗 N P A b 反応



【 図 5 】



【 図 6 】

図 6

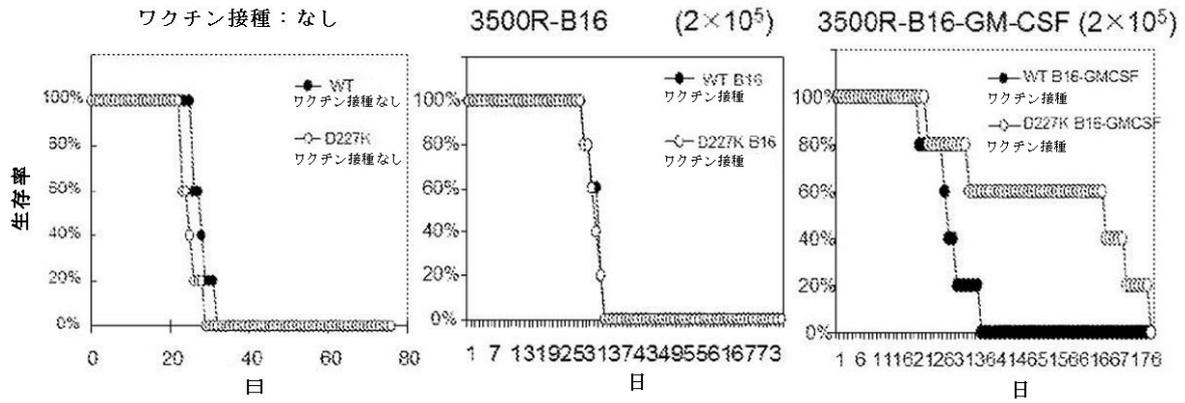
N C B I 参照配列 : NP_000576.1 (ヒト I I - 1 5) : 配列番号 1

mriskphlrs isiqcylcll lnshflteag ihvfilgcfs aglpkteamw vnvisdlkki
edliqsmhid atlytesdvh psckvtamkc filelqvsl esgdasihdt venliilann
slssngnvte sgckeceele eknikeflqs fvhivqmfin ts

【 図 7 】

図 7

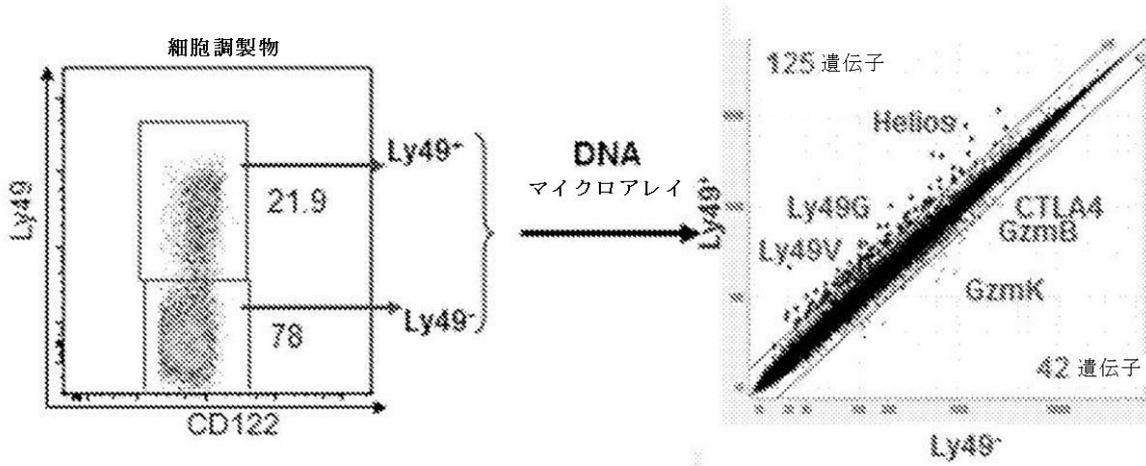
反対の脇腹への 5×10^5 個の B16 細胞による
皮下チャレンジの 1 週間前における
照射 B16-GM-CSF 形質導入細胞 (1、2) による
ワクチン接種後の、C57BL/6、Qa-1 (D227K)
ノックインマウスの生存の C57BL/6 マウスとの比較



【図 8 A - B】

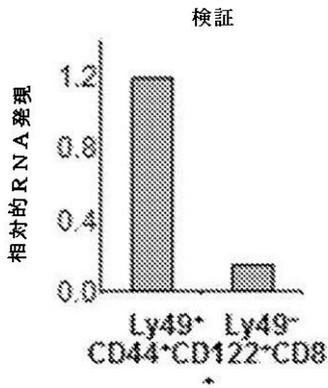
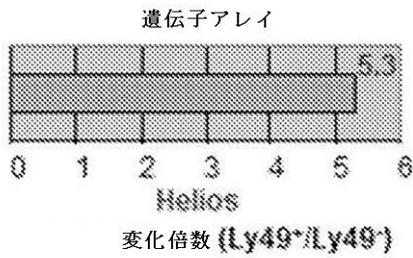
図 8

A CD44⁺CD122⁺Ly49⁺ CD8⁺ Treg の遺伝子特性

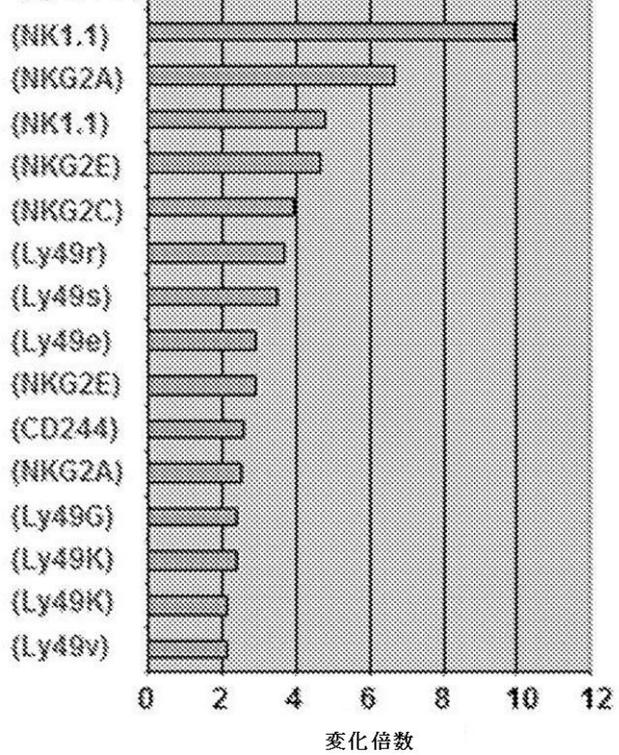


B Ly49⁺ CD8⁺ Treg による Helios の発現

C 自然受容体は Ly49⁺ CD8⁺ T細胞で強くアップレギュレートされる



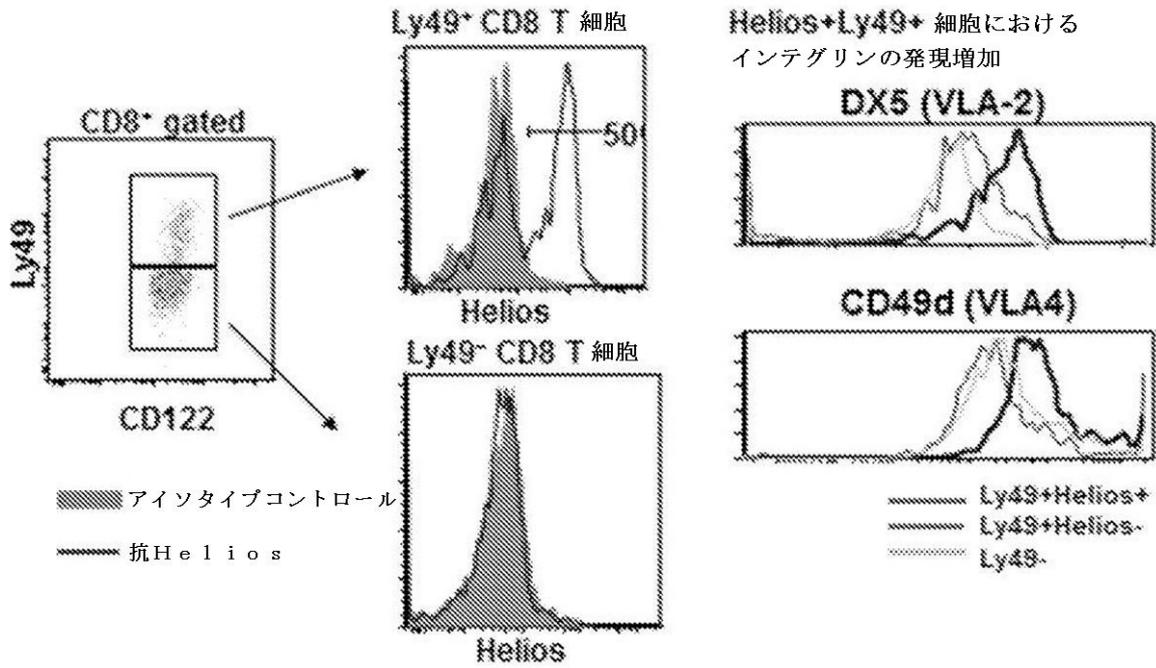
Ly49⁺ CD8⁺ T細胞においてアップレギュレートされた遺伝子 (Ly49P/F)



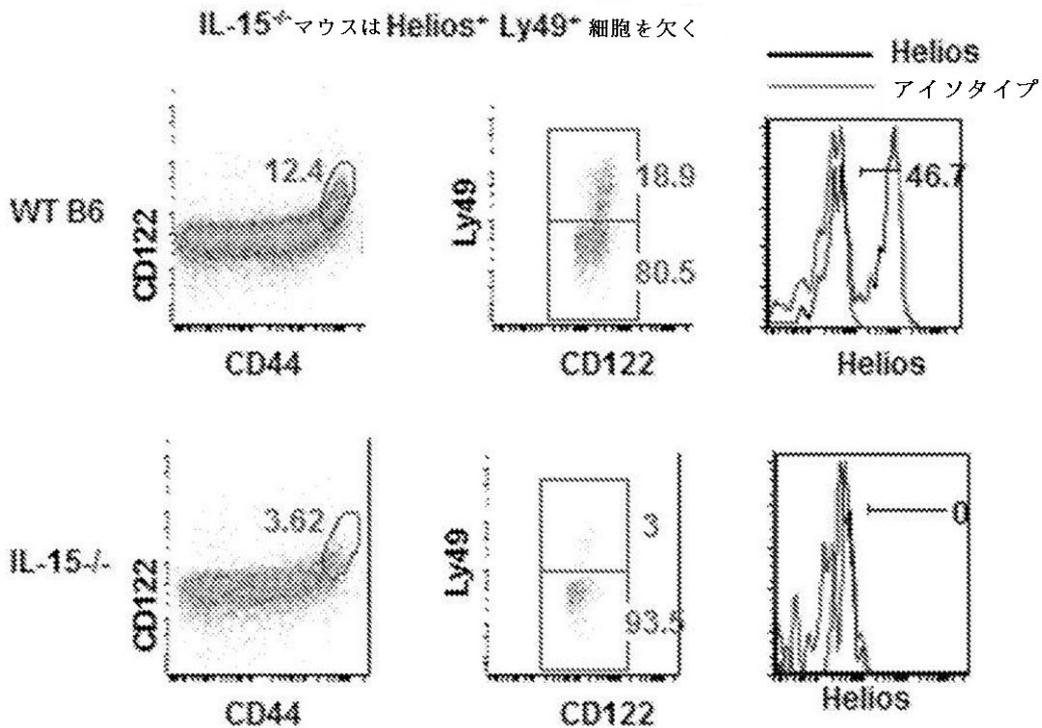
【図9A - B】

図9

A Ly49⁺ CD8⁺ Treg による Helios の発現



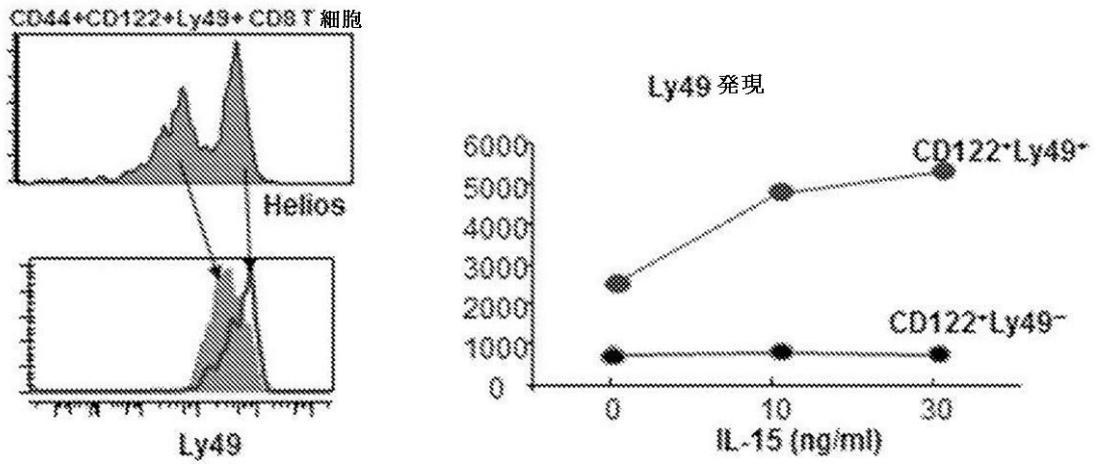
B Helios⁺ Ly49⁺ CD8 T 細胞の発達のための IL-15 の必要性



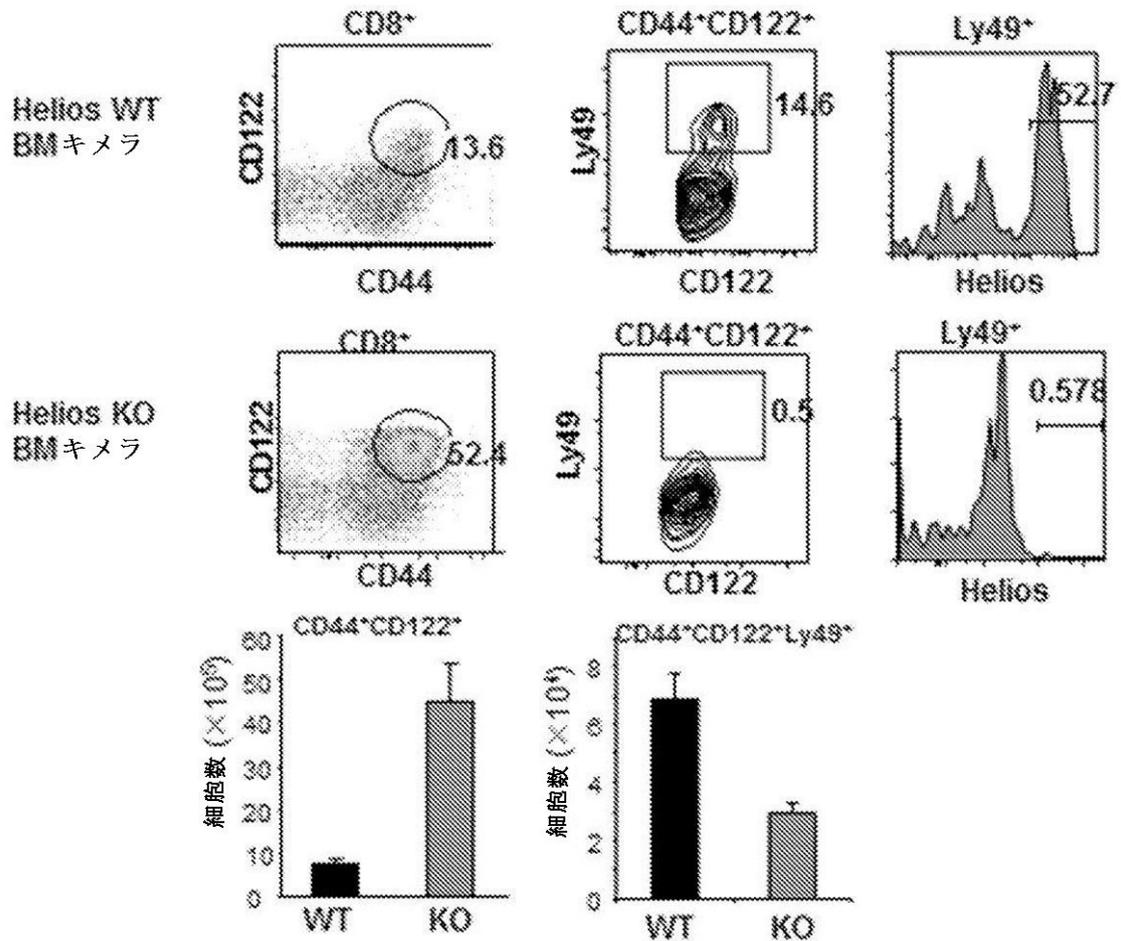
【図9C-D】

図9

C Helios⁺ Ly49⁺ CD8 T細胞による Ly49発現の増加 IL-15反応性とLy49発現レベルとの間の相関



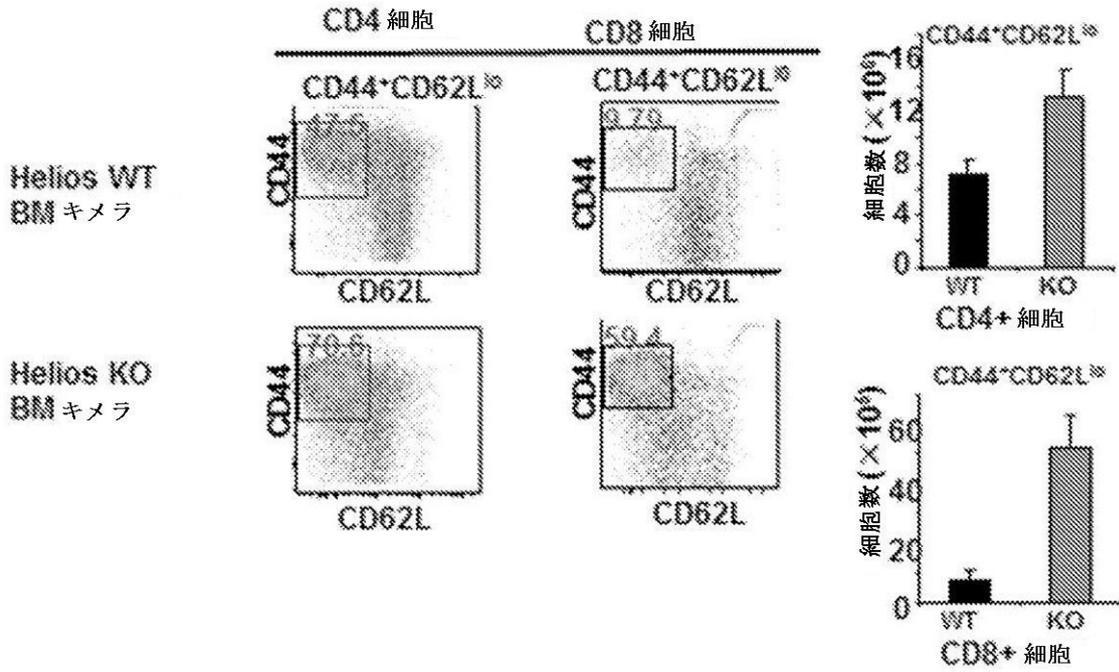
D Helios 欠損マウスはLy49^{hi} CD8⁺ T細胞を欠く



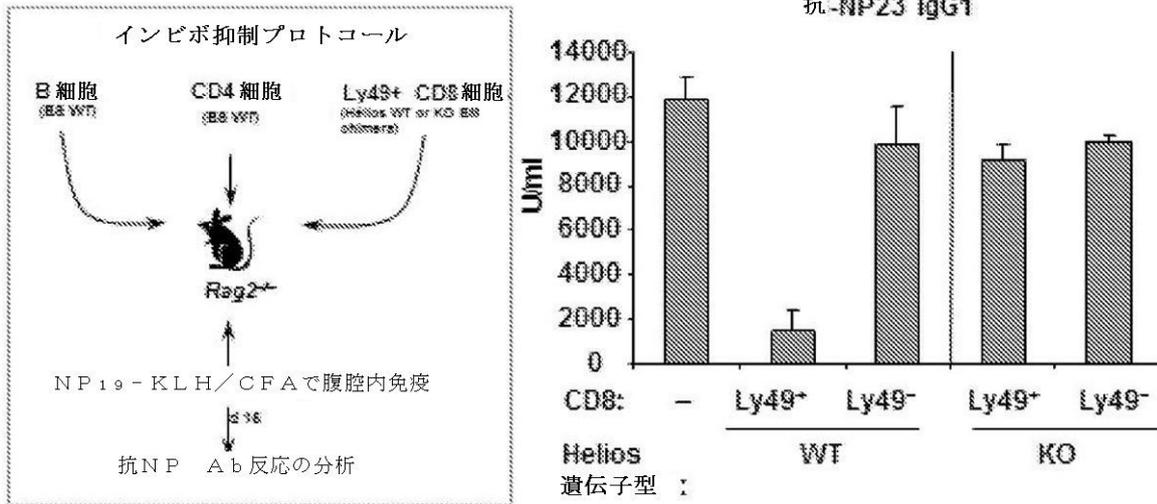
【図9E-F】

図9

E Helios KO BMのレシピエントにおける活性化CD4およびCD8 T細胞の増加



F インビボでの抑制: Helios欠損CD8⁺T細胞の低下した抑制活性

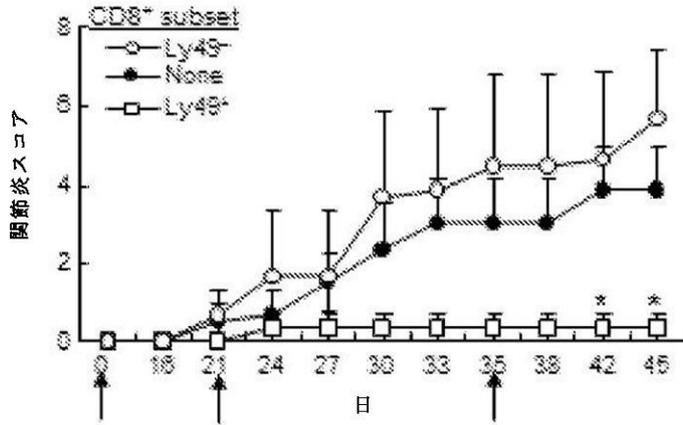


【図10A-C】

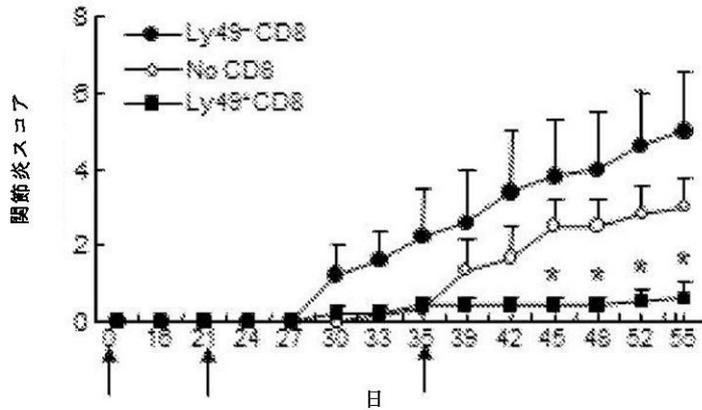
図 10

CD8 TregによるCIAの予防

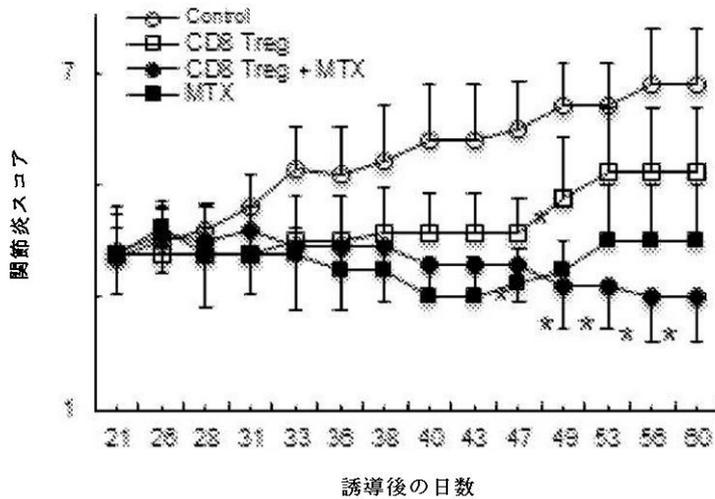
A エキソピボCD8TregはCIAを抑制する



B インビトロで増加させたCD8TregはCIAを抑制する



C CD8Tregの治療効果



【配列表】

2014502258000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/56746
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/54; A61K 38/20 (2012.01) USPC - 530/351, 424/85.2, 930/140 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C07K 14/54; A61K 38/20 (2012.01) USPC - 530/351, 424/85.2, 930/140 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - C07K 14/54; A61K 38/20 (2012.01), USPC - 530/351, 424/85.2, 930/140, 530/350, 930/141, 424/85.1: keyword search, as below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO PubWest (databases: PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Thompson Innovation (core patent databases from 01.01.1982-19.04.2012), Google Scholar - Search Terms: IL-15, receptor, IL-15R, KIR, Helios, CD158, CD158E, CD158E1, CD158E2, IKZF2, ZNF1A2, ZNFN1A2, Gem, CD8, CD44, CD122, regulatory, t cells, treg, concanavalin A, irradiated, anti-IL-15, antibod		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2010/0260781 A1 (MURRAY) 14 October 2010 (14.10.2010) para [0010]; [0075]; [0019]; [0103]; [0090]	1-3 4-6
Y	GRABSTEIN et al. Uniprot Accession 40933 1 February 1995 [online]; (downloaded from http://www.uniprot.org/uniprot/P40933.txt?version=95 on 30 January 2012.)	4
Y	US 2002/0022030 A1 (MARRACK et al.) 21 February 2002 (21.02.2002) abstract; para [0046]	5
Y	US 2009/0324538 A1 (WONG et al.) 31 December 2009 (31.12.2009) para [0045]; [0011]; [0109]	6
A	THORNTON et al. "Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells" J. Immunol.; 24 February 2010; Vol. 184; pg. 3433-3441. Entire document, especially pg 3439, col 2, para 1; pg. 3438, col 2, para 3	7-12, 18, 19, 21, 25-37
A	HONG et al. "High-dose cyclophosphamide-mediated anti-tumor effects by the superior expansion of CD44 ^{sup} high cells after their selective depletion"; Immunobiology; March 2010 (electronically published 22 May 2009); Vol. 215; pg. 182-193. Abstract; pg 192, col 1, para 3 (abstract uploaded to establish publication date).	7-22, 25-37
A	D'ANDREA et al. "Regulation of T Cell Lymphokine Production by Killer Cell Inhibitory Receptor Recognition of Self HLA Class I Alleles" J. Exp. Med.; 1 August 1996; Vol. 184; pg. 789-794. abstract	13-17, 20, 22, 25-37
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 April 2012 (19.04.2012)		Date of mailing of the international search report 01 MAY 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/56746

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 23, 24
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-6 directed to a method of treating an autoimmune disease, comprising administering to a subject in need an interleukin-15 receptor agonist in an amount effective to ameliorate a symptom of the autoimmune disease.

Group II: claims 7-22 and 25-37, directed to compositions and methods comprising CD44+, CD122+, CD8+ T.sub.reg cells which further are positive for an additional marker selected from the group consisting of helios or kir.

- Please see extra sheet for continuation -

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/56746

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/56746

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of Group I is a method of treating an autoimmune disease, comprising administering to a subject in need an interleukin-15 receptor agonist. This is not required by the claims of Group II. The special technical feature of Group II is compositions and methods comprising CD44+, CD122+, CD8+ T.sub.reg cells which further are positive for an additional marker selected from the group consisting of helios or kir - not required by the claims of Group I. Neither of these special technical features is common to the other group, nor do they correspond to a special technical feature in the other group.

The only common technical element shared by the above groups is that they are related to contact of cells with an IL-15 receptor agonist (in some of the methods of Group II (see claims 7 and 13), the T.sub.reg cells may be incubated in the presence of IL-15). This common technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2010/0260781 A1 to Murray et al., which teaches wherein "serum amyloid P (SAP) and SAP agonists are useful in the treatment of autoimmune disorders. One aspect of the disclosure provides methods for treating or preventing an autoimmune disorder or condition in a patient in need thereof by administering a therapeutically effective amount of an SAP agonist" (para [0010]); further wherein the composition administered may further comprise an IL-15 receptor agonist ("at least one dose of a composition comprising a SAP agonist and optionally one or more additional active agent (e.g., cytokines, mitogens, etc.)...IL15" (para [0075]. Note - applicants indicate wherein IL-15, itself may be the agonist - "the IL-15R agonist is a IL-15 polypeptide that comprises a sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and binds an IL-15R". (instant specification, pg. 2); wherein, according to the Uniprot database Accession P40933, 100% identical to SEQ ID NO: 1, is human IL-15)).

Therefore, the inventions of Group I and Group II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature. In order for all inventions to be examined, the appropriate examination fees must be paid.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Q
	A 6 1 K 35/14	Z
	A 6 1 P 37/06	
	C 0 7 K 14/54	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H, U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 キム, ヘ - ジュン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 4 6、ブルックライン、センター ストリート 7
0

(72) 発明者 リウ, リンロン
中華人民共和国 3 1 0 0 5 8、ハンツォウ、ユー ハン タン ロード 3 8 8、リサーチ ビ
ルディング ビー 8 0 1、スクール オブ メディシン、インスティテュート オブ イミュノロ
ジー、ツェーリアン ユニバーシティ

F ターム(参考) 4B065 AA94X BB19 BB34 BC50 BD50 CA44
4C084 AA02 AA03 AA17 AA19 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 CA18
DA46 MA52 MA55 MA56 MA59 MA63 MA66 NA14 ZA021 ZA022
ZA551 ZA552 ZA661 ZA662 ZA891 ZA892 ZB021 ZB022 ZB051 ZB052
ZB082 ZB151 ZB152 ZB261 ZB262 ZC351 ZC352 ZC412 ZC751 ZC752
ZC802
4C085 AA03 AA14 BB02 CC03 CC23 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04
GG05 GG06 GG08
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 DA07 DA20 MA02 MA17 MA66
NA14 ZA02 ZA55 ZA66 ZA89 ZB02 ZB05 ZB08 ZB15 ZB26
4H045 BA09 CA42 DA02 EA22