(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월28일
(11) 등록번호 10-1514463
(24) 등록일자 2015년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7000548
(22) 출원일자(국제) 2006년06월08일
심사청구일자 2011년06월03일
(85) 번역문제출일자 2008년01월08일
(65) 공개번호 10-2008-0104254
(43) 공개일자 2008년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/022423
(87) 국제공개번호 WO 2006/133396
국제공개일자 2006년12월14일
(30) 우선권주장
60/688,872 2005년06월08일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2002000730 A1

(73) 특허권자
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴 450
더 브리검 앤드 우먼즈 하스피털, 인크.
미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
프리만 고단
미국 매사추세츠주 02445 브룩클린 월넛 스트리트 305
샤프 알렌
미국 매사추세츠주 02445 브룩클린 월넛 스트리트 305
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희

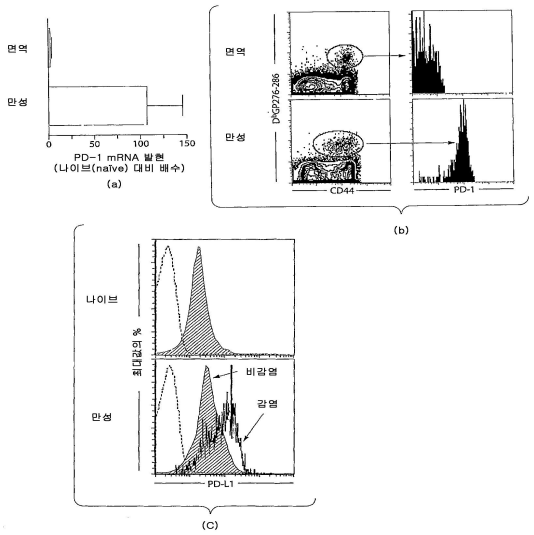
전체 청구항 수 : 총 28 항 심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 **예정 세포사 1(PD-1) 경로를 억제함으로써 지속 감염 및 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 지속 감염, 예컨대 만성 감염, 잠복 감염 및 지발성 감염, 및 암을 치료, 예방 또는 감소시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법 및 조성물은 또한 그러한 감염 및 암과 관련된 하나 이상의 증상의 경감에 유용하다.

대 표 도



(73) 특허권자

에모리 유니버시티

미국 조지아주 30322 아틀란타 포쓰 플로어 엔이 클리프턴 로드 1599

프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지

미합중국, 메사추세츠 02138, 캠브리지, 퀸시스트리트17

(72) 발명자

도프만 데이비드 엠.

미국 매사추세츠주 02445 브룩클린 웰랜드 로드 42

아흐메드 라피

미국 조지아주 30307 아틀란타 듀란드 밀 드라이브 1811

바버 다니엘

미국 매릴랜드주 20852 노쓰 베데스다 마리넬리 로드 5440 아파트먼트 206

훼리 이. 존

미국 펜실베니아주 19083 하버타운 미르틀 애비뉴 110

명 세 서

청구범위

청구항 1

대상에서 지속 바이러스 감염의 증상을 경감하거나 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 대상에서 예정 세포사-1(Programmed Cell Death-1; PD-1) 폴리펩티드의 활성 또는 발현을 감소시키는 화합물을 포함하며, 상기 화합물은 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-PD-1 RNAi, 항-PD-L1 RNAi, 항-PD-L2 RNAi, 항-PD-1 안티센스 RNA, 항-PD-L1 안티센스 RNA, 또는 항-PD-L2 안티센스 RNA인 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 지속 바이러스 감염이 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-림프친화성 바이러스(HTLV), 포진 바이러스(Herpes virus), 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus), 또는 인간 유두종 바이러스(human papilloma virus)에 의한 감염인 약학 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 화합물이 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 또는 항-PD-L2 항체인 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 화합물이 항-PD-1 RNAi, 항-PD-L1 RNAi, 또는 항-PD-L2 RNAi인 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 화합물이 항-PD-1 안티센스 RNA, 항-PD-L1 안티센스 RNA, 또는 항-PD-L2 안티센스 RNA인 약학 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제7항에 있어서, 상기 항체가 단클론성 항체, 인간화 항체, 탈면역화 항체, 또는 Ig 융합 단백질인 약학 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항에 있어서, 백신을 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 백신은 보강제(adjuvant), 또는 프라임 부스터 샷(prime booster shot)을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 제2 화합물을 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제2 화합물이 항바이러스성 화합물, 항염증성 화합물, 항신생물성 화합물, 또는 진통제인 약학 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 제2 화합물은 세포독성 T 림프구 항원 4(CTLA-4), 또는 B 및 T 림프구 감약제(BTLA)의 발현 또는 활성을 감소시키고, 상기 제2 화합물은 항-CTLA-4 항체, 항-BTLA 항체, 항-CD28 항체, 항-ICOS 항체, 항-ICOS-L 항체, 항-B7-1 항체, 항-B7-2 항체, 항-B7-H3 항체, 또는 항-B7-H4 항체인 약학 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 대상이 인간인 약학 조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

대상에서 지속 바이러스 감염의 증상을 경감하거나 예방하기 위한 약학 조성물로서, 항원 특이적 T 세포에서 PD-1 폴리펩티드의 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물과 접촉시킨 항원 특이적 T 세포를 포함하며, 상기 화합물은 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-PD-1 RNAi, 항-PD-L1 RNAi, 항-PD-L2 RNAi, 항-PD-1 안티센스 RNA, 항-PD-L1 안티센스 RNA, 또는 항-PD-L2 안티센스 RNA인 약학 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 항원 특이적 B 세포에서 PD-1 폴리펩티드의 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물과 접촉시킨 항원 특이적 B 세포를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 T 세포는 자가유래 공급원(autologous source)으로부터 유래되는 것인 약학 조성물.

청구항 36

제33항에 있어서, 상기 T 세포는 상기 대상과 동일한 종의 대상으로부터 유래되는 것인 약학 조성물.

청구항 37

제33항에 있어서, 상기 T 세포는 치료받고 있는 상기 대상과 상이한 종의 대상으로부터 유래되는 것인 약학 조성물.

청구항 38

제33항에 있어서, 상기 항원 특이적 T 세포는 바이러스 항원에 대해 특이적인 것인 약학 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 바이러스 항원이 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-림프친화성 바이러스(HTLV), 포진 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 또는 인간 유두종 바이러스의 항원인 약학 조성물.

청구항 40

지속 바이러스 감염을 갖는 대상에서 T 세포의 세포독성 활성을 증가시키기 위한 약학 조성물로서, PD-1 폴리펩티드의 활성 또는 발현을 감소시키는 화합물을 포함하며, 상기 화합물은 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-PD-1 RNAi, 항-PD-L1 RNAi, 항-PD-L2 RNAi, 항-PD-1 안티센스 RNA, 항-PD-L1 안티센스 RNA, 또는 항-PD-L2 안티센스 RNA인 약학 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 화합물이 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 또는 항-PD-L2 항체인 약학 조성물.

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 화합물이 항-PD-1 RNAi, 항-PD-L1 RNAi, 또는 항-PD-L2 RNAi인 약학 조성물.

청구항 43

제40항에 있어서, 상기 세포독성 활성이 사이토킨 생산, T 세포 증식, 또는 감염성 인자 제거(infectious agent clearance)인 약학 조성물.

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

(a) 대상으로부터 유래한 면역 세포의 샘플에서 PD-1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(b) 측정된 PD-1의 발현 또는 활성을, 대조군 샘플에서의 PD-1의 발현 또는 활성과 비교하는 단계로서, PD-1의 발현 또는 활성이, 대조군 샘플에서의 PD-1의 발현 또는 활성과 비교하여 증가한 것은, 상기 대상이 지속 바이러스 감염을 가지고 있거나 가질 위험이 있음을 나타내는 것인 단계

를 포함하는, 지속 바이러스 감염을 가지고 있거나 가질 위험이 있는 대상을 위한 치료를 선택하기 위해 PD-1의 발현 또는 활성을 측정하는 시험관내 방법.

청구항 48

제1항에 있어서, 상기 지속 바이러스 감염이 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염인 약학 조성물.

청구항 49

제33항에 있어서, 상기 지속 바이러스 감염이 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염인 약학 조성물.

청구항 50

제40항에 있어서, 상기 지속 바이러스 감염이 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염인 약학 조성물.

청구항 51

제47항에 있어서, 상기 지속 바이러스 감염이 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염인 시험관내 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **미연방 지원 연구에 관한 설명**

[0002] 본 발명은 미국국립보건원(NIH) 인가 AI39671 및 CA84500에 따라 미국 정부의 지원을 받아 행해졌다. 미정부는 본 발명에 대해 일정 권리를 가진다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 일반적으로, 본 발명은 지속 감염 및 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 예방 백신의 개발로 바이러스 감염의 치사율이 상당히 감소되었으나, 지속 감염을 유발하는 바이러스(예를 들어, C형 간염 바이러스)에 대항하여 그러한 방식을 사용할 경우, 그 성공은 제한적이었다. 급성 감염 및 자기-제한 감염을 유발하는 바이러스와는 대조적으로, 지속 감염-유발 미생물에 대해 제기되는 면역 반응은 종종 일시적이고, 감염을 제거하기(clear)에 불충분하다. 결과적으로, 감염성 미생물은 반드시 일정한 숙주 손상을 유발하는 것은 아니나, 연장된 시간 동안 감염된 대상 내에 남는다.

[0006] 지속 감염-유발 미생물의 박멸에 있어 주요 장애는 숙주 유기체의 면역계를 침범할 수 있는 그러한 미생물의 능력이다. 예를 들어, 특정 바이러스 및 기생충은 감염된 세포의 효율적 T 세포 인식에 필요한 숙주 분자의 발현을 하향 제어한다. 지속 감염은 또한 바이러스 감염의 제어 및 박멸에 있어 중요한 항원 특이적 CD8+ T 세포의 기능적 손상을 유발한다. 치료 백신과 사이토킨 보강제의 조합이 고무적이었으나, 초래되는 면역 반응은 병원체를 성공적으로 박멸시키지 못했다.

[0007] 이에 따라, 지속 감염을 치료, 예방 또는 경감하기 위한 보다 양호한 방법이 필요하다.

발명의 상세한 설명

[0008] **발명의 개요**

[0009] 본 발명은 지속 감염 또는 암의 하나 이상의 증상을 치료, 예방 또는 감소시키거나, 대안적으로는 경감시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은, 항원 특이적 CD8+ T 세포가 예정 세포사(Programmed Death)-1(PD-1) 폴리펩티드의 유도 후에 감염성 인자에 대해 기능적으로 내인성(tolerant)('소진(exhausted)')이 된다는 발견에 기초한다. 따라서, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2의 발현 또는 활성을 감소시킴으로써, 기능적으로 내인적인 CD8+ T 세포의 증식, 사이토킨의 생산, 및 감염성 인자(예를 들어, 바이러스, 세균, 진균, 기생충, 마이코플라즘 또는 암)의 제거율을 증가시키고, 이에 감염성 인자에 대해 특이적인 면역 반응이 증진된다.

[0010] 따라서, 본 발명은 지속 감염(예를 들어, 바이러스 감염, 세균 감염, 진균 감염, 마이코플라즘 감염 및 기생충 감염) 또는 암의 증상의 경감 또는 예방을 필요로 하는 대상(예를 들어, 인간)에게, CD28-유사 과(family)(예를 들어, PD-1, CTLA-4, BTLA, 및 이들의 기능적 단편 또는 변이체) 또는 CD28-유사 과 리간드(예를 들어, PD-L1 또는 PD-L2)의 구성원의 활성 또는 발현을 감소시키는 화합물을 투여함으로써, 그러한 증상을 경감 또는 예방하는 방법을 제공한다. 대안적으로, 대상에게, 항원-특이적 T 세포 또는 B 세포 내의 PD-1 폴리펩티드의 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물과 접촉한, 그 항원-특이적 T 세포 또는 B 세포를 투여한다. 예를 들어, 항원 특이적 T 세포 또는 B 세포는 바이러스 항원에 대해 특이적이다. T 세포 또는 B 세포는 자가 유래의 출처로부터 유래되거나, 피처리 대상과 동일하거나 상이한 종의 또 다른 대상으로부터 유래된다.

[0011] 또한, 본 발명은 T 세포(예를 들어, 무반응(anergic) T 세포 또는 항원에 대한 증가된 내인성을 갖는 T 세포)를, PD-1 폴리펩티드의 활성 또는 발현을 감소시키는 화합물과 접촉시킴으로써, T 세포의 세포독성 활성을 증가시키는 방법을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 상기 모든 측면들에서, 지속 바이러스 감염은 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-림프친화성 바이러스(HTLV), 포진(Herpes) 바이러스, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 또는 인간 유두종 바이러스에 의한 것과 같은 감염으로부터 비롯된다. 지속 바이러스 감염은 또한 잠복성 바이러스에 의해 유발되는 감염을 포함할 수 있다. 암에는 혈관면역아세포성 림프종 및 결절성 림프구 호지킨 림프종과 같은 림프증식성 장애들이 포함된다. 바람직하게, 본 발명의 화합물은 처리하는 대상에 있어 세포독성 T-세포 활성의 증가(예를 들어, IFNγ, TNFα 또는 IL-2와 같은 세포독성 사이토킨 생산의 증가, T 세포 증식의 증가, 또는 바이러스 제거의 증가)에 의해 항원 특이적 면역 반응을 증가시킨다. 예를 들어, 화합물은 PD 리간드 1(PD-L1) 또는 PD 리간드 2(PD-L2)의 발현 또는 활성을 감소시키거나, PD-1과 PD-L1 간의 상호작용, 또는 PD-1과 PD-L2 간의 상호작용을 감소시킨다. 예시적 화합물에는 항체(예를 들어, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및 항-PD-L2 항체), RNAi 분자(예를 들어, 항-PD-1 RNAi 분자, 항-PD-L1 RNAi 및 항-PD-L2 RNAi), 안티센스 분자(예를 들어, 항-PD-1 안티센스 RNA, 항-PD-L1 안티센스 RNA 및 항-PD-L2 안티센스 RNA), 우성적 음성 단백질(예를 들어, 우성적 음성 PD-1 단백질, 우성적 음성 PD-L1 단백질 및 우성적 음성 PD-L2 단백질), 및 소분자 억제제가 포함된다. 항체에는 단클론성 항체, 인간화 항체, 탈면역화 항체, 및 Ig 융합 단백질이 포함된다. 한 예시적 항-PD-L1 항체에는

클론 EH12이 포함된다.

[0013] PD-1 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물에 부가하여, 피처리 대상에 또한 보강제(adjuvant) 또는 프라임 부스터 샷(prime booster shot)을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 백신을 투여할 수도 있다. 임의적으로, 대상에게 제2 화합물, 예컨대 항바이러스성 화합물(예를 들어, 비다라빈, 아시클로비르, 간시클로비르, 발간시클로비르, 뉴클레오시드-유사체 역전사효소 억제제(NRTI), 예컨대 AZT(지도부딘(Zidovudine)), ddI(디다노신(Didanosine)), ddC(잘시타빈(Zalcitabine)), d4T(스타부딘(Stavudine)), 또는 3TC(라미부딘(Lamivudine)), 비뉴클레오시드 역전사효소 억제제(NNRTI), 예컨대 네비라핀 또는 델라비르딘, 프로테아제 억제제, 예컨대 사퀴나비르, 리토나비르, 인디나비르, 또는 넬피나비르, 리바비린, 및 인터페론), 항세균성 화합물, 항진균성 화합물, 항기생충성 화합물, 항염증성 화합물, 항-신생물성 화합물 또는 진통제를 투여할 수 있다. 제2 화합물은 또한 세포독성 T 림프구 항원 4(CTLA-4) 또는 B 및 T 림프구 감약제(BTLA)의 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물일 수 있다. 대상에게 투여될 수 있는 다른 예시적 화합물은 항-CTLA-4 항체, 항-BTLA 항체, 항-CD28 항체, 항-ICOS 항체, 항-ICOS-L 항체, 항-B7-1 항체, 항-B7-2 항체, 항-B7-H3 항체 및 항-B7-H4 항체이다.

[0014] 본 발명은 PD-1 폴리펩티드의 활성 또는 발현을 조절하는 후보 화합물을 확인하는 방법으로서, (a) PD-1 유전자(예를 들어, PD-1 융합 유전자)를 발현하는 세포를 후보 화합물과 접촉시키는 단계; (b) 세포 내 PD-1의 발현 또는 활성을 (예를 들어, PD-1 mRNA 또는 단백질의 발현을 측정함으로써) 측정하는 단계; 및 (c) 세포 내 PD-1의 발현 또는 활성을, 화합물과 접촉하지 않은 대조 세포 내 그러한 발현 또는 활성과 비교하는 단계를 포함하는 방법을 추가로 제공한다. PD-1의 발현 또는 활성의 증가 또는 감소는, 후보 화합물이 PD-1 폴리펩티드의 활성 또는 발현을 조절하는데 유용하다는 것을 가리킨다.

[0015] 대안적으로, 스크리닝 방법은 (a) PD-1 유전자를 과발현하는 T 세포를 후보 화합물과 접촉시키는 단계; (b) T 세포의 세포독성 활성을 결정하는 단계; 및 (c) T 세포의 세포독성 활성을 화합물과 접촉하지 않은 대조 세포에서의 그러한 활성과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 그러한 활성의 증가 또는 감소는, 후보 화합물이 PD-1 폴리펩티드의 활성 또는 발현을 조절하는데 유용하다는 것을 확인시킨다. 세포독성 활성에는 사이토킨 생산, T 세포 증식 및 바이러스 제거가 포함된다.

[0016] 본 발명은 (a) PD-1 폴리펩티드를 후보 화합물과 접촉시키는 단계; (b) 후보 화합물이 PD-1 폴리펩티드와 상호작용하는지의 여부를 결정하는 단계; 및 (c) 후보 화합물이 PD-1 발현 또는 활성을 조절하는데 유용하다는 것을 확인하는 단계를 포함하는 스크리닝 방법을 추가로 제공한다. 바람직하게, 확인된 후보 화합물은 PD-1 폴리펩티드와 상호작용하여, 그것의 활성을 감소시킨다.

[0017] 본원에 기재된 스크리닝 방법에 의해 확인된 후보 화합물은 PD-1과 PD-L1 간의 상호작용 또는 PD-1과 PD-L2 간의 상호작용을 감소시킬 수 있다. 본원에 기재된 스크리닝 방법 중 임의의 방법에 이용되는 세포에는 포유류 세포, 예컨대 설치류 세포 또는 인간 세포가 포함된다. 세포는 면역 세포, 예컨대 T 세포이다. 바람직하게, 그러한 스크리닝 방법에 사용되는 PD-1 폴리펩티드는 인간 PD-1 폴리펩티드이다.

[0018] 또한, 본원에서는 지속 감염 또는 암을 가지고 있거나 그러할 위험에 처해 있는 대상을 진단하는 방법으로서, (a) 대상으로부터 면역 세포(예를 들어, T 세포 또는 B 세포)를 함유하는 샘플을 제공하는 단계, 및 (b) 샘플 내 PD-1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는 방법도 제공된다. PD-1의 발현 또는 활성의, 대조 샘플 내 그러한 발현 또는 활성과 대비된 증가는, 대상이 지속 감염 또는 암을 가지고 있거나 그러할 위험에 처해 있음을 확인시킨다. 바람직하게, 단계 (b)는 항원-특이적 면역 세포, 예컨대 바이러스 항원, 세균 항원, 기생충 항원 또는 진균 항원을 확인시킨다.

[0019] 지속 감염 또는 암을 가지고 있거나 그러할 위험에 처해 있는 대상의 치료를 선택하는 방법도 또한 기재되어 있다. 이 방법은 (a) 대상으로부터 면역 세포(예를 들어, T 세포 또는 B 세포)를 함유하는 샘플을 제공하는 단계; (b) 면역 세포 내 PD-1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계(이에 따라, PD-1의 발현 또는 활성의, 대조 샘플 내 그러한 발현 또는 활성과 대비된 증가는, 대상이 지속 감염 또는 암을 가지고 있거나 그러할 위험에 처해 있는 것으로 확인시킴); 및 (c) 지속 감염 또는 암을 가지고 있거나 그러할 위험에 처해 있는 것으로 진단된 대상에 대한 치료를 선택하는 단계(이로써, 그 치료에는 PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물이 포함됨)를 포함한다. 바람직하게, 단계 (b)는 항원-특이적 면역 세포, 예컨대 바이러스 항원, 세균 항원, 기생충 항원 또는 진균 항원을 확인하는 것을 포함한다.

[0020] 대상으로부터 유래된 샘플에는 혈액 샘플, 조직 생검(tissue biopasy) 및 골수 샘플이 포함된다. 또한, 대조 세포는 지속 감염을 가지고 있지 않거나, 또는 그러할 위험에 처해 있지 않은 대상으로부터 유래될 수 있다.

[0021] 본 발명은 (a) PD-1의 수준 또는 활성을 감소시키는 화합물; 및 (b) 제2 화합물, 예컨대 항바이러스성 화합물, 항세균성 화합물, 항진균성 화합물, 항기생충성 화합물, 항염증성 화합물, 진통제, 항-CTLA-4 항체, 항-BTLA 항체, 항-CD28 항체, 항-ICOS 항체, 항-ICOS-L 항체, 항-B7-1 항체, 항-B7-2 항체, 항-B7-H3 항체 또는 항-B7-H4 항체를 함유하는 조성물을 추가로 제공한다.

[0022] 본 발명은 또한 (a) PD-1의 수준 또는 활성을 감소시키는 화합물; 및 (b) 대상에게 그 화합물을 전달하기 위한 사용지침서를 함유하는 키트를 제공한다. 대안적으로, 키트는 (a) PD-1의 수준 또는 활성을 감소시키는 제1 화합물; (b) 제2 화합물, 예컨대 항바이러스성 화합물, 항세균성 화합물, 항진균성 화합물, 항기생충성 화합물, 항염증성 화합물, 진통제, 항-CTLA-4 항체, 항-BTLA 항체, 항-CD28 항체, 항-ICOS 항체, 항-ICOS-L 항체, 항-B7-1 항체, 항-B7-2 항체, 항-B7-H3 항체 또는 항-B7-H4 항체; 및 (c) 제1 화합물 및 제2 화합물을 대상에게 전달하기 위한 사용지침서를 포함한다.

[0023] 본 발명은 지속 감염의 하나 이상의 증상을 치료, 예방 및 감소시키거나, 대안적으로는 경감시키기 위한 표준 방법에 비해 상당한 이점을 제공한다. PD-1의 수준 또는 활성을 감소시키는 치료제를 투여함으로써, CD8+ T 세포 세포독성이 증가하고, 이에 따라 지속 감염을 확립하는 능력을 갖는 감염성 인자에 대한 면역 반응을 증가시킨다. 또한, 본 발명에 의해 제공되는 후보 화합물의 스크리닝 방법은, 증상을 단지 완화하는 것이 아닌, 상해(injury) 공정을 변형하는 신규 치료제를 확인한다.

[0024] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는, 본 발명이 속하는 당업계의 통상의 숙련가에게 일반적으로 이해되어지는 바와 동일한 의미를 가진다. 본원에 기재된 방법 및 물질과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 수행 또는 시험에 사용될 수 있으나, 적당한 방법 및 물질이 이하 기재된다. 본원에 언급된 모든 공보, 특허출원 및 기타 참고문헌은 전체적으로 본원에 참고 인용된다. 상충되는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우위하게 될 것이다. 또한, 물질, 방법 및 예는 단지 설명을 위한 것으로서, 한정적이지 않은 것으로 한다.

[0025] 본 발명의 다른 특성 및 이점은 하기 발명의 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 명백해질 것이다.

[0026] **도면의 간단한 설명**

[0027] 도 1a는 유전자 어레이 분석에 의해 측정되는, 나이브(naive) 형질전환(transgenic) 마우스, 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV) 암스트롱 면역(대략 감염후 30 일) 감염 마우스, 또는 CD4-결핍 LCMV-Cl-13 감염 마우스(대략 감염후 30일)로부터의 $D^bGP33-41$ 및/또는 $D^bGP276-286$ 특이적 T 세포 내 PD-1 mRNA의 수준을 나타내는 막대 그래프이다.

[0028] 도 1b는 감염후 대략 60일의 LCMV 암스트롱 면역 및 CD4-결핍 LCMV-Cl-13 감염 마우스 내 CD8+ 오량체+ T 세포에서의 PD-1 표면 발현을 나타내는 유세포분석 실험의 일련의 이미지들이다. 무반응 CD8+ T 세포는 LCMV-Cl-13 바이러스("만성" 표지)에 의한 만성 감염 후 대략 60일에서의 세포 표면에서의 높은 수준의 PD-1 폴리펩티드를 발현하나, 바이러스-특이적 CD8+ T 세포는 급성 LCMV 암스트롱 감염("면역" 표지)의 제거 후에 PD-1 폴리펩티드를 발현하지 않는다.

[0029] 도 1c는 만성 감염 마우스 및 비감염 마우스로부터의 비장 세포에서의 PD-L1의 존재를 입증하는 유세포분석 실험의 일련의 이미지들이다. 그것은 PD-L1 발현이 바이러스에 의해 감염된 비장 세포에서 가장 높음을 입증한다.

[0030] 도 2a는 Cl-13 감염 마우스를 감염후 23 내지 37일에 처리한 경우, 처리되지 않은 대조군과 대비하여 DbNP396-404 특이적 및 DbGP33-41 특이적 CD8 T 세포의 수의 대략 3배 증가가 있었음을 나타내는 일련의 산점도(scatter plot)이다. 기능에 있어 임의의 변화를 결정하기 위해, 8가지 상이한 LCMV 에피토프에 따른 IFN-γ 및 TNF-α 생산을 측정하였다.

[0031] 도 2b는 모든 공지의 CD8 T 세포 특이성을 측정한 경우, LCMV 특이적 CD8 T 세포의 총 개수의 2.3배 증가가 있음을 보여주는 산점도이다.

[0032] 도 2c는 8가지 상이한 LCMV 에피토프에 따른 IFN-γ 및 TNF-α 생산을 보여주는 일련의 유세포분석 그래프들이다.

[0033] 도 2d는 처리된 마우스 내 더 큰 바이러스 특이성을 가지는 CD8 T 세포는 TNF-α 생산하는 능력을 가짐을 보여주는 산점도이다.

[0034] 도 2e는 PD-L1 봉쇄(blockade)가 또한 비장, 간, 폐 및 혈청 내 바이러스 조절의 증가를 초래하였음을 보여주는

일련의 막대 차트들이다.

[0035] 도 3a는 대조군("untx" 표지)과 대비한, 감염후 46 내지 60일의 항-PD-L1로 처리된 CD4-결핍 Cl-13 감염 마우스("αPD-L1" 표지) 내의 DbGP33-41 및 DbGP276-286 특이적 CD8+ T 세포("GP33" 및 "GP276" 표지)의 증가를 입증하는 그래프로서, 이는 처리되지 않은 대조군보다, 항-PD-L1로 처리된 마우스가 대략 7배 더 많은 DbGP276-286 특이적 비장 CD8+ T 세포 및 대략 4배 더 많은 DbGP33-41 특이적인 비장 CD8+ T 세포를 함유함을 입증한다.

[0036] 도 3b는 대조군("untx" 표지)와 대비한, 감염후 46 내지 60일의 항-PD-L1로 처리된 CD4-결핍 Cl-13 감염 마우스("αPD-L1 Tx" 표지)의 비장 내 DbGP33-41 및 DbGP276-286 특이적 CD8+ T 세포의 증가된 빈도를 입증하는 일련의 이미지들이다.

[0037] 도 3c는 BrdU 도입 및 Ki67 발현에 의해 측정되는, 항-PD-L1-처리 마우스 내 DbGP276-286 특이적 CD8+ T 세포의 증가된 증식을 입증하는 일련의 이미지들이다.

[0038] 도 3d는 비장 내 DbGP276-286 특이적 CD8+ T 세포와 대비하여, PBMC 내 DbGP276-286 특이적 CD8+ T 세포를 비교함으로써 나타내어지는 바, 높은 수준의 CD8+ T 세포 확장을 갖는 마우스가 말초혈 단핵 세포(PBMC)에서 상당한 반응을 나타냄을 보여주는 차트이다.

[0039] 도 4a는 대조군과 대비한, 항-PD-L1-처리 마우스 내 IFN-γ 생산의 DbGP276-286 및 DbGP33-41 특이적 CD8+ T 세포의 증가를 입증하는 일련의 차트들이다. DbNP396-404, KbNP205-212, DbNP166-175 및 DbGP92-101 특이적 CD8+ T 세포의 보다 높은 빈도가 또한 항-PD-L1-처리 마우스에서 검출되었다.

[0040] 도 4b는 대조군 마우스에서는 DbGP276-286 특이적 CD8+ T 세포 중 20%가 IFN-γ를 생산함과 대비하여, 항-PD-L1-처리 마우스에서는 DbGP276-286 특이적 CD8+ T 세포 중 50%가 IFN-γ를 생산함을 입증하는 차트이다.

[0041] 도 4c는 처리되지 않은 만성 감염된 마우스보다, 항-PD-L1-처리 만성 감염된 마우스가 보다 높은 수준의 TNF-α를 생산하나, 여전히 LCMV 암스트롱 바이러스로 감염된 면역 마우스보다 더 낮은 수준의 TNF-α를 생산함을 입증하는 일련의 이미지들이다.

[0042] 도 4d는 ^{51}Cr 방출 검정을 이용하여 측정할 때, 처리되지 않은 감염된 마우스와 대비하여, 항-PD-L1을 이용한 LCMV-Cl-13 감염 마우스의 처리가 바이러스-특이적 T 세포의 체외 분해 활성을 갱신시킴을 입증하는 차트이다.

[0043] 도 4e는 α-PD-L1을 이용하여 LCMV-Cl-13 감염 마우스를 처리한 후, 각종 기관들 내 바이러스의 역가의 감소를 입증하는 일련의 차트들이다. 바이러스 역가는 처리되지 않은 마우스와 대비하여, 항-PD-L1 처리 2주 후, 비장에서 대략 3배 감소하였고, 간에서 4배 감소하였으며, 폐에서 2배 감소하였고, 혈청에서는 2배 감소하였다.

[0044] 도 5a는 만성 클레이드 C HIV 감염에서 표적이 되는 우성적 에피토프에 대해 특이적인 10 HIV 오량체를 이용한 PD-1 표면 발현을 나타내는 유세포분석 실험의 일련의 이미지들이다. 백분율은 $PD\text{-}1^+$인 오량체$^+$ 세포의 백분율을 가리킨다.

[0045] 도 5b는 항레트로바이러스 요법에 나이브(미경험)인 개체에서 PD-1의 백분율 및 MFI가 총 CD8 T 세포 집단에 비해 HIV-특이적 CD8 T 세포에서 유의적으로 상향 제어되며($p<0.0001$), HIV-감염 군 대(versus) HIV-혈청음성 대조군에서는 PD-1이 총 CD8 T 세포 집단에서 증가됨(각기 $p=0.0033$ 및 $p<0.0001$)을 입증하는 일련의 차트들이다. 65개 HIV-감염 개체 및 11개 HIV 혈청음성 대조군으로부터의 120 HIV 오량체 염색이 분석에 포함되었다.

[0046] 도 5b는 에피토프 특이성에 의해 오량체$^+$ 세포에서의 PD-1 발현의 중위 백분율 및 MFI를 보여주는 일련의 차트들이다.

[0047] 도 5d는 다수 검출가능한 반응을 갖는 개체 내에 상이한 에피토프-특이적 집단에서의 $PD\text{-}1^+$ 세포의 백분율에서의 분산을 나타내는 차트이다. 수평 막대는 각 개체 내 $PD\text{-}1^+$ HIV 오량체$^+$ 세포의 중위 백분율을 가리킨다.

[0048] 도 6a는 오량체 염색에 의해 측정되는 HIV-특이적 CD8 T 세포의 수와 혈장 바이러스 부하(load) 간의 상관 관계가 없는 반면, 오량체$^+$ 세포에서의 PD-1의 백분율 및 MFI와 혈장 바이러스 부하 간에 양의 상관 관계가 있음(각기 $p=0.0013$ 및 $p<0.0001$)을 보여주는 일련의 차트들이다.

[0049] 도 6b는 HIV 오량체$^+$ 세포의 수와 CD4 계수 간에 상관 관계가 없는 반면, HIV 오량체$^+$ 세포에서의 PD-1의 백분율 및 MFI과 CD4 계수 간에는 역의 상관 관계가 있음(각기 $p=0.0046$ 및 $p=0.0150$)을 보여주는 일련의 차트들이다.

[0050] 도 6c는 총 CD8 T 세포 집단에서의 PD-1의 백분율 및 MFI가 혈장 바이러스 부하와 양의 상관 관계를 가짐(각기 p=0.0021 및 p<0.0001)을 입증하는 일련의 차트들이다.

[0051] 도 6d는 총 CD8 T 세포 집단에서의 PD-1 발현의 백분율 및 MFI가 CD4 계수와 역의 상관 관계를 가짐(각기 p=0.0049 및 p=0.0006)을 보여주는 일련의 차트들이다.

[0052] 도 7a는 B*4201 TL9-특이적 CD8 T 세포의 98%가 PD-1^{+}인 대상 SK222으로부터의 B*4201 TL9-특이적 CD8 T 세포의 대표적 표현형 염색을 보여주는 유세포분석 실험의 일련의 이미지들이다.

[0053] 도 7b는 HIV-특이적 CD8 T 세포의 >95%가 PD-1^{+}인 사람으로부터의 표현형 데이터의 개요를 나타내는 차트이다. 7 내지 19개 샘플을 각각의 표시된 표현형 마커에 대해 분석하였다. 수평 막대는 표시된 표현형 마커에 대해 양성인 오량체$^{+}$ PD-1^{+} 세포의 중위 백분율을 가리킨다.

[0054] 도 8a는 B*4201 양성 대상으로부터의 대표적 증식 검정 데이터를 보여주는 유세포분석 실험의 일련의 이미지들이다. 펩티드를 이용하여 6일간 자극한 후, B*4201 TL9-특이적 CD8 T 세포의 백분율이 항-PD-L1 차단(blocking) 항체의 존재 하에 5.7%에서 12.4%로 증가하였다.

[0055] 도 8b는 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에 HIV-특이적 CD8 T 세포의 증식이 유의적으로 증가함을 가리키는 요약적 증식 검정 데이터를 나타내는 선 그래프이다(n=28, p=0.0006, 대응 t-시험(paired t-test)).

[0056] 도 8c는 개체 환자에 기초한 HIV-특이적 CD8 T 세포의 증식에 대한 PD-1/PD-L1 봉쇄의 차별적 효과를 보여주는 막대 그래프이다. 흰색 막대는 펩티드 단독의 존재 하에서의 오량체$^{+}$ 세포의 증가 배수를 가리키고, 흑색 막대는 펩티드 + 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에서의 오량체$^{+}$ 세포의 증가 배수를 가리킨다. CFSE 검정이 하나 초과의 에피토프에 대해 수행된 개체를 별 기호, 사각형 기호 또는 삼각형 기호로 나타낸다.

[0057] **발명의 상세한 설명**

[0058] 최근 수십년 간의 항체 및 백신의 사용은 미생물 감염으로 인해 치사율을 유의적으로 감소시켰다. 그러나 항미생물 치료 양식(modality)의 성공은 숙주 유기체의 면역계를 기피하고 이에 따라 지속 감염을 확립하는 특정 감염성 인자의 능력으로 인해 제한되어왔다. 예를 들어, 간염 및 HIV와 같은 바이러스에 대해 취해지는 면역 반응은 감염성 인자를 제거하는데 충분하지 않아, 감염성 인자는 감염된 대상에 남게 된다. 그러한 감염에서, 항원 특이적 CD8+ T 세포는 '무반응(anergy)' 또는 '소진(exhaustion)'으로 알려진 상태로, 감염성 인자에 대해 기능적으로 내인성을 가지게 된다. 무반응 T 세포는 그것의 세포독성 활성을 소실하며, 즉 사이토킨을 생산하고, 증식하며, 감염성 인자를 제거하는 능력을 소실한다.

[0059] 본 발명은 T 세포 무반응이 PD-1 발현의 유도를 수반하고, PD-1 발현이 특정 유형의 림프증식성 장애와 상관 관계가 있다는 놀라운 사실에 기초한다. 따라서, 본 발명은 T-세포를 PD-1, PD-1 리간드(PD-L1) 또는 PD-1 리간드 2(PD-L2)의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제와 접촉시킴으로써, T-세포 세포독성을 증가시키는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제를 대상에게 투여함으로써, 지속 감염 또는 림프증식성 장애(예를 들어, 혈관면역아세포성 림프종 및 결절성 림프구의 우세형 호지킨 림프종과 같은 암)를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 발현 또는 활성의 감소는 세포독성 T 세포 활성을 증가시키고, 이에 감염성 인자에 대한 특이적 면역 반응을 증가시키게 된다. 본원에 제공된 결과는, 지속 감염된 마우스에 투여된 항-예정 세포사 리간드-1(PD-L1) 차단 항체의 투여가 무반응 T 세포의 세포독성 활성을 증가시켰음을 보여준다. 구체적으로, PD-1 신호전달의 붕괴는 무반응 CD8+ T 세포의 확장을 유도하였고, 사이토킨 생산을 증진시켰으며, 바이러스 제거를 증가시켰다. 또한, CD4 결핍 마우스의 감염 중에 발생된 CD8+ T 세포가 증식하였고, 항-PD-L1 처리 시에 그 상당 기능을 다시 얻었다.

[0060] T 세포가 외래 단백질에 반응하기 위해, 2개의 신호는 항원-제시 세포(APC)에 의해 휴지 T 림프구에 제공되어야 한다. 면역 반응에 특이성을 부여하는 첫 번째 신호 신호는, 주요 조직적합성 착체(MHC)의 영역 내에 제시되는 외래 항원성 펩티드의 인식 후에, T 세포 수용체(TCR)를 통해 유도된다. 보조자극(costimulation)으로도 칭해지는 두 번째 신호는 T 세포가 증식하고 기능적으로 되도록 한다. 보조자극은 항원-특이적이지도 않고 MHC-제한적이지도 않으며, APC에 의해 발현되는 하나 이상의 구별되는 세포 표면 폴리펩티드에 의해 제공된다. T 세포가, 부가적 보조자극 신호를 수용하지 않으면서 단지 T 세포 수용체를 통해 자극되면, 그것은 비반응성, 무반응성이 되거나 죽고, 이에 면역 반응이 하향 조절되게 한다.

[0061] APC에 발현되는 CD80(B7-1) 및 CD86(B7-2) 단백질은 결정적 보조자극 폴리펩티드이다. B7-2는 일차 면역 반응 중에 우세한 역할을 하고, 한편 B7-1은 면역 반응 과정 중에 이후에 상향 제어되어, 일차 T 세포 반응 또는 보조자극 두 번째 T 세포 반응을 연장한다. B7 폴리펩티드는 면역 세포에 보조자극 또는 억제 신호를 제공하여, 면역 세포 반응을 촉진 또는 억제할 수 있다. 예를 들어, PD-L1(B7-4)는 보조자극 수용체에 결합될 때, 면역 세포의 보조자극을 유도하거나, 가용성 형태로 제공될 때에는 면역 세포 보조자극을 억제한다. B7-4 분자는 억제 수용체에 결합될 때, 면역 세포에 억제 신호를 전달할 수 있다. 예시적 B7 과 구성원에는 B7-1, B7-2, B7-3(항체 BB-I에 의해 인식됨), B7h(PD-L1) 및 B7-4, 및 그것의 가용성 단편 또는 유도체가 포함된다. B7 과 구성원은 면역 세포 상의 하나 이상의 수용체, 예컨대 CTLA4, CD28, ICOS, PD-1 및/또는 기타 수용체에 결합하고, 수용체에 따라서 억제 신호 또는 보조자극 신호를 면역 세포에 전달하는 능력을 가진다.

[0062] CD28은 휴지 T 세포에 구성적으로 발현되는 수용체이다. T 세포 수용체를 통한 신호 전달 후, CD28의 결찰 및 보조자극 신호의 신호 전달은, T 세포로 하여금 증식하고 IL-2를 분비하도록 유도한다. CD28에 대해 동종성인 수용체인 CTLA4(CD 152)는 휴지 T 세포에 부재하나, 그것의 발현이 T 세포 활성화 후에 유도된다. CTLA4는 T 세포 반응의 음성 제어에 기여한다. CD28 및 CTLA4 관련 폴리펩티드인 ICOS는 IL-10 생산과 관련된다. PD-L1 및 PD-L2가 결합하는 수용체인 PD-1은 또한 T-세포의 표면 상에 급속히 유도된다. PD-1은 또한 (항-IgM의 대응하여) B-세포의 표면에, 또한 흉선세포 및 골수성 세포의 하위군(subset)에서 발현된다.

[0063] (예를 들어, 가교결합 또는 응집에 의한) PD-1의 결속(engagement)으로 면역 세포 내 억제 신호의 전달이 초래되고, 이에 면역 세포 무반응의 증가를 수반하는 면역 반응의 감소를 초래한다. PD-1 과 구성원은 항원 제시 세포 상의 PD-L1 및 PD-L2와 같은 하나 이상의 수용체에 결합한다.

[0064] 각기 인간 PD-1 리간드 폴리펩티드인 PD-L1 및 PD-L2는 폴리펩티드의 B7 과의 구성원이다. 각 PD-1 리간드는 신호 서열, IgV 도메인, IgC 도메인, 막횡단 도메인 및 짧은 세포질내 꼬리를 포함한다. 이 리간드들은 태반, 비장, 림프절, 흉선 및 심장에서 발현된다. PD-L2는 또한 췌장, 폐 및 간에서 발현되고, 한편 PD-L1은 태아 간, 활성화된 T-세포 및 내피 세포에서 발현된다. 양 PD-1 리간드 모두는 활성화된 단핵구 및 수지상 세포에서 상향 제어된다.

[0065] **정의**

[0066] 본원에 사용되는 "지속 감염"이란, 감염성 인자(예를 들어, 바이러스, 세균, 기생충, 마이코플라즘 또는 진균)가 면역 반응의 유도 후에도, 감염된 숙주로부터 제거되거나 소거되지 않는 감염을 의미한다. 지속 감염은 만성 감염, 잠복성 감염 또는 지발성 감염일 수 있다. 급성 감염은 비교적 기간이 짧고(수일 내지 수주 지속됨), 면역계에 의해 신체로부터 분해되어 나가면서, 지속 감염은 수개월, 수년 또는 심지어 평생 지속될 수 있다. 이 감염은 또한 세포사 또는 심지어는 숙주 세포에 대한 과다 손상을 입히지 않으면서, 침묵적 및 생산적 감염의 단계를 포함하여, 장기간 빈번하게 재발할 수도 있다. 병인적 감염성 인자가 또한 면역 반응이 분해된 후에도, 표준 기법을 이용하여 숙주에서(예를 들어, 감염된 개체의 특정 세포 내에서) 검출될 수 있다. 포유동물은 당업계에 공지된, 예를 들어 본원에 각기 참고 인용되는 예를 들어, 미국 특허 제6,368,832호, 제6,579,854호 및 제6,808,710호, 및 미국 특허 출원 공보 제20040137577호, 제20030232323호, 제20030166531호, 제20030064380호, 제20030044768호, 제20030039653호, 제20020164600호, 제20020160000호, 제20020110836호, 제20020107363호, 및 제20020106730호에 기재된 임의의 표준 방법에 따라, 지속 감염을 가지는 것으로 진단된다. 예를 들어, 대상은 PCR 분석을 이용하여, 상기 개체로부터의 생물학적 샘플에서 클라미디아 종의 검출 후에 지속 클라미디아 감염을 가지는 것으로 진단될 수 있다. 포유동물은 본 발명에 따라 치료하고자 하는 지속 감염을 가진 것으로 진단되었을 필요는 없다. 지속 감염을 확립할 수 있는 미생물 제제에는 바이러스(예를 들어, 유두종 바이러스, 간염 바이러스, 인간 면역 결핍 바이러스 및 포진 바이러스), 세균(예를 들어, 에쉐리키아 콜라이 및 클라미디아(Chlamydia) spp.), 기생충(예를 들어, 플라스모디움(Plasmodium), 레이쉬마니아(Leishmania) spp., 쉬스토소마(Schistosoma) spp., 트리파노소마(Trypanosoma) spp., 톡소플라즈마(Toxoplasma) spp.) 및 진균류가 포함된다.

[0067] "지속 감염의 증상을 경감시키는 것"이란, 지속 감염을 발생하기 전 또는 발생한 후에 그 지속 감염과 관련된 상태 또는 증상 중 임의의 것을 감쇠시키는 것을 의미한다. 대안적으로, 지속 감염의 증상을 경감시키는 것은 대상 내의 감염성 미생물(예를 들어, 바이러스, 세균, 진균, 마이코플라즘 또는 기생충) 부하를, 처리되지 않은 대조군 내 그러한 부하와 대비하여 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 동등한 처리되지 않은 대조군과 대조시에, 그러한 감소 또는 예방 정도는 임의의 표준 기법에 의해 측정 시에 적어도 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 95% 또는 100%이다. 바람직하게, 지속 감염은 당업계에 공지된 임의의 표준 방법에 의해 검출 시에

완전히 제거되고, 이 경우에 지속 감염은 치료된 것으로 간주된다. 지속 감염에 대해 치료하고자 하는 환자는, 의약적 수행자가 그러한 상태를 가지는 것으로 진단한 자이다. 진단은 임의의 적당한 수단에 의한 것일 수 있다. 진단 및 모니터링은 예를 들어, 생물학적 샘플(예를 들어, 조직 생검, 혈액 시험 또는 요 시험)에서의 미생물 부하의 수준을 검출하는 것, 생물학적 샘플 내 미생물 감염의 대리 마커의 수준을 검출하는 것, 지속 감염과 관련된 증상을 검출하는 것, 또는 지속 감염의 전형적인 면역 반응과 관련된 면역 세포를 검출하는 것(예를 들어, 무반응성인 항원 특이적 T 세포를 검출하는 것)을 포함할 수 있다. 지속 감염의 발병이 예방되는 환자는 그러한 진단을 받았을 수도 있고 받지 않았을 수도 있다. 당업자는, 이 환자가 상기 기술된 바와 동일한 표준 시험을 받았을 수 있거나, 조사 없이 하나 이상의 위험 인자(예를 들어, 가족력 또는 감염성 인자에 대한 노출)의 존재로 인해 높은 위험 상태에 처해 있는 것으로 확인되었을 수 있음을 이해할 것이다.

[0068] 본원에 사용되는 "PD-1"이란, PD-L1 또는 PD-L2 단백질과 착체를 형성하고, 이에 따라 면역 반응, 예컨대 T 세포의 보조자극에 관련되는 폴리펩티드를 의미한다. 본 발명의 PD-1 단백질은 천연 발생 PD-1과 실질적으로 동일하다(예를 들어, 문헌 [Ishida 등, EMBO J. 11:3887-3895, 1992, Shinohara 등, Genomics 23:704-706, 1994]; 및 미국 특허 제5,698,520호(본원에 참고로 인용됨)을 참고한다. PD-1 신호 전달은 T 세포 증식, 사이토킨 생산 또는 바이러스 제거를 감소시킴으로써 예를 들어 CD8+ T 세포 세포독성을 감소시킬 수 있다. 본 발명에 따라, PD-1 폴리펩티드는 임의의 표준 방법에 의해 측정 시에 대조 수준 아래로 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 초과만큼 CD8+ T 세포 세포독성 활성을 감소시킨다.

[0069] "PD-1 유전자"란, PD-1 단백질을 코딩하는 핵산을 의미한다.

[0070] "PD-1 융합 유전자"란, PD-1 프로모터, 및/또는 제2 이종성 핵산 서열에 작용적으로 연결된 PD-1 코딩 영역의 전부 또는 부분을 의미한다. 바람직한 실시양태들에서, 제2 이종성 핵산 서열은 리포터 유전자, 즉 발현이 검정될 수 있는 유전자이고; 리포터 유전자에는 글루쿠로니다제(GUS), 루시퍼라제, 클로르암페니콜 트랜스아세틸라제(CAT), 녹색 형광성 단백질(GFP), 알칼리성 포스파타제 및 β-갈락토시다제를 코딩하는 유전자들이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] "PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 것"이란, PD-1의 수준 또는 생물학적 활성을 처리되지 않은 대조군의 PD-1의 수준 또는 생물학적 활성에 비해 감소시키는 것을 의미한다. 본 발명에 따라, 그러한 수준 또는 활성은 처리되지 않은 대조군과 대비하여, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 또는 심지어 100% 초과만큼 감소된다. 예를 들어, PD-1의 생물학적 활성은 PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합이 감소될 경우에 감소되고, 이로써 PD-1 신호 전달이 감소되고, 그 결과 CD8+ T 세포 세포독성이 증가하게 된다. 본원에 사용되는, PD-1 폴리펩티드와 관련한 용어 "활성"에는 천연 발생 PD-1 단백질에 고유한 임의의 활성, 예컨대 활성화된 면역 세포 내 억제 신호를, 예를 들어 항원 제시 세포 상에 천연 리간드를 연합시킴으로써, 조절하는 능력이 포함된다. 면역 세포 내의 억제 신호의 그러한 조절은 면역 세포의 증식 및/또는 면역 세포에 의한 사이토킨 분비의 조절을 초래한다. PD-1은 B7 분자의 결합을 위해 보조자극 수용체와 경쟁함으로써 보조자극 신호를 조절할 수 있다. 이에 따라, 용어 "PD-1 활성"에는 천연 리간드(들)에 결합하는 PD-1 폴리펩티드의 능력, 면역 세포 보조자극 또는 억제 신호를 조절하는 능력, 및 면역 반응을 조절하는 능력이 포함된다. 따라서, PD-1 활성을 감소시키는 것에는 PD-1의 PD-L1 또는 PD-L2에 대한 상호 작용을 감소시키는 것이 포함된다. 이는 예를 들어 PD-L1 또는 PD-L2를 차단함으로써 달성될 수 있다.

[0072] "면역 세포"란, 면역 반응에 일익을 담당하는, 조혈성 기원의 세포를 의미한다. 면역 세포에는 림프구(예를 들어, B 세포 및 T 세포), 천연 킬러 세포 및 골수성 세포(예를 들어, 단핵구, 대식구, 호산구, 비만 세포, 호염기구 및 과립구)가 포함된다.

[0073] "T 세포"란, CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포를 의미한다. 용어 T 세포에는 TH1 세포 및 TH2 세포가 포함된다.

[0074] 용어 "T 세포 세포독성"에는 CD8+ T 세포 활성화에 의해 매개되는 임의의 면역 반응이 포함된다. 예시적 면역 반응에는 사이토킨 생산, CD8+ T 세포 증식, 그랜자임 또는 퍼포린 생산, 및 감염성 인자의 제거가 포함된다.

[0075] "비반응성(unresponsiveness)"에는 자극, 예를 들어 활성화 수용체 또는 사이토킨을 통한 자극에 대한 면역 세포의 불응성이 포함된다. 비반응성은 예를 들어 면역억제제에 대한 노출 또는 고용량의 항원에 대한 노출로 인해 일어날 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "무반응" 또는 "내인성(tolerance)"에는 수용체-매개 자극의 활성화에 대한 불응성이 포함된다. 그러한 불응성은 일반적으로 항원-특이적이고, 내인화 항원에 대한 노출이 중단된 후에도 지속된다. 예를 들어, (비반응성과 반대되는) T 세포 내 무반응은 사이토킨 생산, 예를 들어 IL-2의 결여를 의미한다. T 세포 무반응은, T 세포가 항원에 노출되어, 두 번째 신호(보조자극 신호)의 부재 하에 첫 번

째 신호(T 세포 수용체 또는 CD-3 매개 신호)를 수용할 때 일어난다. 이 조건 하에서, 세포의 동일 항원에 대한 재노출은 (재노출이 보조자극 분자의 존재 하에 일어나는 경우에도) 사이토킨이 생산되지 못하고, 이에 따라 증식하지 못한다. 그러나, 무반응 T 세포는 비관련 항원에 대한 반응을 취할 수 있고, 사이토킨(예를 들어, IL-2)과 배양 시에 증식할 수 있다. 예를 들어, T 세포 무반응은 또한 ELISA나 지시자 세포주를 이용한 증식 검정에 의해 측정되는, T 림프구에 의한 IL-2 생산의 결여에 의해 관찰될 수 있다. 대안적으로, 리포터 유전자 구축물이 사용될 수 있다. 예를 들어, 무반응 T 세포는 5' IL-2 유전자 인핸서의 조절 하의 이종성 프로모터에 의해, 또는 인핸서 내에서 발견될 수 있는 API 서열의 다량체에 의해 유도되는 IL-2 유전자 전사를 개시하지 못한다(Kang 등, Science 257:1134, 1992). 무반응 항원 특이적 T 세포는 상응하는 대조 항원 특이적 T 세포와 대비하여, 세포독성 활성의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 심지어 100%의 감소를 가질 수 있다.

[0076] "정제된 항체"란, 천연적으로 결합된 천연 발생 유기 분자 및 단백질이 없는, 60 중량% 이상인 항체를 의미한다. 바람직하게, 제제는 75 중량% 이상, 더욱 바람직하게는 90 중량% 이상, 가장 바람직하게는 99% 중량% 이상의 항체, 예를 들어 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 특이적 항체이다. 정제된 항체는 예를 들어 재조합으로 생성된 단백질 또는 보존된 모티프 펩티드를 이용하는 친화성 크로마토그래피 및 표준 기법에 의해 수득될 수 있다.

[0077] "특이적으로 결합하다"는 것은, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 폴리펩티드와 같은 항원을 인식하고 결합하나, 천연적으로 단백질을 포함하는 샘플, 예컨대 생물학적 샘플에서의 다른 비항원 분자는 실질적으로 인식하고 결합하지 않는 항체를 의미한다. 한 바람직한 항체는 각기 본원에 참고로 인용되는, 미국 특허 제6,808,710호 및 미국 특허 출원 공보 제20040137577호, 제20030232323호, 제20030166531호, 제20030064380호, 제20030044768호, 제20030039653호, 제20020164600호, 제20020160000호, 제20020110836호, 제20020107363호, 및 제20020106730호에 개시된 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 폴리펩티드에 결합한다.

[0078] "중성화 항체"란, PD-1 폴리펩티드의 생물학적 활성 중 임의의 활성, 특히 T 세포의 세포독성과 같은 면역 반응을 감소시키는 PD-1 폴리펩티드의 능력을 간섭하는 항체를 의미한다. 중성화 항체는, 면역 반응을 감소시키는 PD-1 폴리펩티드의 능력을 바람직하게 50%, 더욱 바람직하게는 70%, 가장 바람직하게는 90% 이상만큼 감소시킬 수 있다. 본원에 기재된 검정들을 포함한, 면역 반응을 측정하기 위한 임의의 표준 검정을 사용하여, 잠재적 중성화 항체를 평가할 수 있다.

[0079] 단백질 또는 폴리펩티드와 관련하여 "실질적으로 동일한"이란, 기준 아미노산 서열에 대해 75% 이상, 단 바람직하게는 85%, 더욱 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95%, 또는 심지어는 99% 동일성을 나타냄을 나타내는 단백질 또는 폴리펩티드를 의미한다. 단백질 또는 폴리펩티드에 있어, 비교 서열의 길이는 일반적으로 20개 이상의 아미노산, 바람직하게는 30개 이상의 아미노산, 더욱 바람직하게는 40개 이상의 아미노산, 가장 바람직하게는 50개 아미노산, 또는 전장 단백질 또는 폴리펩티드일 것이다. 그러한 "실질적으로 동일한" 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 "실질적으로 동일한" 핵산의 한 예를 구성하는 바, 핵산이 그 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 임의의 서열을, 유전 코드의 퇴행성으로 인해 포함함이 인식된다. 또한, "실질적으로 동일한" 핵산 서열은 또한 고엄격성 조건 하에 기준 핵산 분자에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0080] "고엄격성 조건"이란, 높은 온도 및 낮은 이온 강도를 그 특징으로 하고, 65℃에서의 0.5 M $NaHPO_4$(pH 7.2), 7% SDS, 1 mM EDTA 및 1% BSA(분획 V)을 함유하는 완충액, 또는 42℃에서의 48% 포름아미드, 4.8XSSC, 0.2 M 트리스-Cl(pH 7.6), 1X 덴하트(Denhardt) 용액, 10% 덱스트란 술페이트 및 0.1% SDS를 함유하는 완충액에서, 길이가 40개 이상의 뉴클레오티드인 DNA 프로브를 사용함으로써 수득되는 것에 필적하는 혼성화를 허용하는 임의의 조건 군을 의미한다. 고엄격성 혼성화, 예컨대 PCR, 노던(Northern), 서던(Southern) 또는 인시츄 혼성화, DNA 시퀀싱 등을 위한 기타 조건이 분자 생물학의 기술 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 인용되는 문헌 [F. Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1998]을 참고한다.

[0081] "실질적으로 순수한"이란, 천연적으로 동반하는 성분으로부터 분리된 핵산, 폴리펩티드 또는 기타 분자를 의미한다. 전형적으로, 폴리펩티드는 그것이 천연적으로 결합되어 있는 단백질 및 천연 발생 유기 분자가 없이, 적어도 60 중량%, 70 중량%, 80 중량%, 90 중량%, 95 중량% 또는 심지어는 99 중량%로 있을 때 실질적으로 순수한 것이다. 예를 들어, 실질적으로 순수한 폴리펩티드는, 정상적으로 그 단백질을 발현하지 않는 세포 내의 재조합 핵산의 발현에 의해 또는 화학적 합성에 의해, 천연원으로부터의 추출에 의해 수득될 수 있다.

[0082] 용어 "단리된 DNA"란, 소정의 DNA가 유래되어 나오도록 한 출처인 유기체의 천연 발생 게놈에서 DNA를 플랭킹하는 유전자가 없는 DNA를 의미한다. 이에 따라, 용어 "단리된 DNA"는 예를 들어, cDNA, 클로닝된 게놈 DNA 및 합

성 DNA를 포괄한다.

[0083] "유효량"이란, 고혈압을 감소 또는 예방하거나, 포유동물 내의 만성 감염을 치료 또는 예방하는데 필요한 단독 또는 조합된 화합물의 양을 의미한다. 활성 화합물(들)의 유효량은 투여 경로, 대상의 연령, 체중 및 일반적 건강에 따라 변화한다. 궁극적으로, 주치의인 의사 또는 수의사는 적절한 양 및 투약 처방을 결정할 것이다.

[0084] "후보 화합물"이란, 자연 발생 또는 인공 유래된 것인지의 여부를 막론한 화학적 물질을 의미한다. 후보 화합물에는 예를 들어 펩티드, 폴리펩티드, 합성 유기 분자, 천연 발생 유기 분자, 핵산 분자, 펩티드 핵산 분자, 및 이들의 성분 및 유도체가 포함된다. 예를 들어, 본 발명에 따른 유용한 후보 화합물은 PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합을 감소시킨다.

[0085] 용어 "약학 조성물"이란, 하나 이상의 치료학적으로 또는 생물학적으로 활성인 제제를 함유하고 환자에게 투여하기에 적당한 임의의 조성물을 의미한다. 이 제형물들 중 임의의 것이 당업계에서 공지되고 수용되는 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 제20판(ed. A R Gennaro), Mack Publishing Co., Easton, Pa., 2000]을 참고한다.

[0086] **치료 방법**

[0087] T-세포 세포독성은 T-세포를 PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물과 접촉시킴으로써 증가된다. T-세포는 나이브 T-세포, 기억 T-세포 또는 활성화된 T-세포이다. 대안적으로, T-세포는 항원 특이적 T-세포이다. 항원 특이적 T 세포는 감염성 인자에 대해 무반응이거나 내인성을 가진다. T-세포 세포독성은 세포 증식 및 사이토킨 방출의 증가를 그 특징으로 한다.

[0088] 방법은 다양한 감염 및 암의 증상을 경감시키는데 유용하다. 대상에게 PD-1 억제제를 투여함으로써 감염 또는 암이 치료 또는 예방되거나 증상이 경감된다. 대상은 포유동물, 예컨대 인간, 영장류, 마우스 래트, 개, 고양이, 소, 말 및 돼지이다. 대상은 감염을 앓고 있거나 감염이 발병할 위험에 처해 있다. 감염을 앓고 있거나 감염이 발병할 위험에 처해 있는 대상은 특정 감염에 대해 적당한 표준 방법에 의해 확인된다.

[0089] 감염, 예를 들어 세균, 바이러스, 진균, 마이코플라즈마 또는 기생충에 의한 감염이 지속 감염이다. 지속 감염은 급성 감염과 대조적으로, 숙주 면역 반응의 유도에 의해 효과적으로 제거되지 않는다. 감염성 인자 및 면역 반응은 평형 상태에 도달하게 되어, 이에 감염된 대상은 반드시 증상을 나타내지 않더라도 장기간 동안 감염성 상태로 유지된다. 지속 감염에는 예를 들어, 잠복성, 만성 및 지발성 감염이 포함된다.

[0090] 만성 감염에서, 감염성 인자는 항상 신체 내에서 검출될 수 있다. 그러나, 질병의 표시 및 증상은 연장된 시간 동안 존재 또는 부재할 수 있다. 만성 감염의 예에는 B형 간염(HBV에 의해 유발됨) 및 C형 간염(HCV에 의해 유발됨) 아데노바이러스, 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 단순 포진 바이러스 1, 단순 포진 바이러스 2, 인간 포진바이러스 6, 바리셀라-조스터(varicella-zoster) 바이러스, B형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, 유두종 바이러스, 파르보바이러스 B19, 폴리오마바이러스 BK, 폴리오마바이러스 JC, 홍역 바이러스, 루벨라 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T 세포 백혈병 바이러스 I, 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 II가 포함된다. 기생충 지속 감염은 라이쉬마니아(Leishmania), 톡소플라즈마(Toxoplasma), 트리파노소마(Trypanosoma), 플라소모디움(Plasmodium), 쉬스토소마(Schistosoma) 및 엔세팔리토준(Encephalitozoon)에 의한 감염의 결과로서 발생될 수 있다.

[0091] 잠복성 감염에서, 감염성 인자(예를 들어, 바이러스)는 외관상 불활성이고 유휴상태(dormant)이어서, 대상이 항상 표시 또는 증상을 나타내는 것은 아니다. 잠복성 바이러스 감염에서, 바이러스는 증상이 다시 나타나기 전에 장기간 동안 숙주와 평형 상태로 유지되나; 실제 바이러스는 질병의 재활성화가 일어날 때까지 검출될 수 없다. 잠복성 감염의 예에는 HSV-1(열성 포진), HSV-2(음부 포진) 및 VZV (수두-대상 포진)에 의해 유발되는 감염들이 포함된다.

[0092] 지발성 감염에서, 감염성 인자는 매우 긴 시간 동안 그 수가 점차 증가하고, 그 동안 중요한 표시 또는 증상이 관찰이 관찰되지 않는다. 지발성 감염의 예에는 AIDS(HIV-1 및 HIV-2에 의해 유발됨), 동물에게서 종양을 유발하는 렌티바이러스, 및 프리즌이 포함된다.

[0093] 또한, 지속 감염은 종종 급성 감염의 후기 합병증으로서 일어난다. 예를 들어, 아급성 경화성 범뇌염(SSPE)은 급성 홍역 감염 후에 일어날 수 있거나, 혹은 퇴행성 뇌염이 루벨라 감염의 결과로서 일어날 수 있다.

[0094] 암에는 예를 들어 혈관면역아세포성 림프종 또는 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종이 포함된다.

[0095] 혈관면역아세포성 림프종(AIL)은 확대된 림프절 및 고감마글로불린혈증(혈액 내 증가된 항체)로 표시되는 T-세포 비호지킨 림프종의 공격형(급속 진보형)이다. 기타 증상에는 피부 발진, 고열, 체중 감퇴, 양성 쿰 시험(Coomb's test) 또는 야간 발한이 포함될 수 있다. 이 악성은 통상 성인에게서 일어난다. 환자는 통상 연령이 40 내지 90세(중위 평균 약 65세)이고, 남성이 더욱 빈번하다. AIL이 진전함에 따라, 간비종대, 용혈성 빈혈 및 다클론성 고감마글로불린혈증이 발병할 수 있다. 환자의 대략 40 내지 50%에서 피부가 관련된다.

[0096] 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종은 돌연변이화된 비기능적 면역글로불린 유전자를 갖는 배 중심 B 세포로부터 유래되는 것으로 보이는 B 세포 신생물이다. 혈관면역아세포성 림프종과 유사하게, 신생물성 세포는 여포성 수지상 세포의 그물망구조와 관련된다. PD-1 발현이 CD57+ T 세포에 대해 보여지는 패턴과 유사한 패턴으로, 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종 내 신생물성 CD20+ 세포와 밀접히 관련된 T 세포에서 보여진다. CD57은 CXCR5와 함께, 배 중심-관련 T 세포의 또 다른 마커로서 확인되었고, 이 발견은 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종 내 신생물성 세포가 배 중심-관련 T 세포와 밀접한 연관이 있다는 결론을 지지한다.

[0097] PD-1의 억제제는 세포 내 PD-1, PD-L1 또는 PD-2의 발현 또는 활성을 감소시키는 능력을 갖는 임의의 제제이다. PD-1 발현 또는 활성은 대조 세포의 그러한 발현 또는 활성과 대비하여, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%만큼 감소된다. 대조 세포는 PD-1 억제제로 처리되지 않은 세포이다. PD-1 발현 또는 활성은 본원에 기재된 방법을 비롯한, 당업계의 임의의 표준 방법에 의해 결정된다. 임의적으로, PD-1 억제제는 PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합을 억제하거나 감소시킨다. PD-1 억제제에는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 소분자 길항자 또는 siRNA가 포함된다.

[0098] PD-1 억제제 폴리펩티드에는 예를 들어, PD-1 발현 또는 신호 전달을 감소시키는 항체 또는 그것의 단편이 포함된다. 예시적 항체에는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-BTLA 항체, 항-CD28 항체, 항-ICOS 항체, 항-ICOS-L 항체, 항-B7-1 항체, 항-B7-2 항체, 항-B7-H3 항체 또는 항-B7-H4 항체가 포함된다.

[0099] 대안적으로, PD-1 억제제는, PD-1의 생물학적 활성(즉, PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합)을 간섭하는 우성적 음성 단백질을 코딩하는 핵산 또는 우성적 음성 단백질이다. 우성적 음성 단백질은, 우성적 음성 단백질이 상응하는 야생형 단백질의 적어도 10, 20, 35, 50, 100개 또는 150개 초과의 아미노산에 대해 적어도 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 심지어는 99% 서열 동일성을 가지는 임의의 아미노산 분자이다. 예를 들어, 우성적 음성 PD-1은 더 이상 PD-L1에 결합할 수 없도록 하는 돌연변이를 가진다.

[0100] 우성적 음성 단백질은 발현 벡터로서 투여될 수 있다. 발현 벡터는 비바이러스 벡터 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로바이러스, 재조합 아데노-관련 바이러스 또는 재조합 아데노바이러스 벡터)일 수 있다. 대안적으로, 우성적 음성 단백질은, 예를 들어 마이크로주사 기법을 이용하여, 감염된 부위에 또는 전신에, 재조합 단백질로서 직접 투여될 수 있다.

[0101] 소분자에는 펩티드, 펩티도모사체(예를 들어, 펩토이드), 아미노산, 아미노산 유사체, 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드 유사체, 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유사체, 분자량이 약 5,000 그램/몰 미만인 유기 또는 무기 화합물(이종유기성 및 유기금속성 화합물 포함), 분자량이 약 2,000 그램/몰 미만인 유기 또는 무기 화합물, 분자량이 약 1,000 그램/몰 미만인 유기 또는 무기 화합물, 분자량이 약 500 그램/몰 미만인 유기 또는 무기 화합물, 및 이러한 화합물들의 염, 에스테르 및 기타 약학적으로 허용가능한 형태가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0102] PD-1 억제제는 안티센스 분자, RNA 간섭(siRNA) 분자, 또는 PD-1 발현 또는 활성을 표적으로 하는 소분자 길항자이다. 용어 "siRNA"란, 표적 mRNA의 번역을 방지하는 이중 나선의 RNA 분자를 의미한다. DNA가 siRNA 이 전사되도록 하는 주형인 기법을 비롯한, siRNA를 세포에 도입하는 표준 기법이 사용된다. siRNA에는 센스 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 핵산 서열, 안티센스 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 핵산 서열 또는 양자 모두가 포함된다. 임의적으로, siRNA는, 단일 전사체가 표적 유전자로부터의 센스 및 상보 안티센스 서열 모두를 가지도록, 예를 들어 헤어핀을 가지도록 구축된다. siRNA의 표적 세포 내 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 전사체로의 결합은 세포에 의한 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 생산의 감소를 초래한다. 올리고뉴클레오티드의 길이는 10개 이상의 뉴클레오티드이고, 천연 발생 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 전사체 정도의 길이일 수 있다. 바람직하게, 올리고뉴클레오티드의 길이는 19 내지 25개 뉴클레오티드이다. 가장 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드의 길이는 75개, 50개, 25개 미만의 뉴클레오티드이다.

[0103] 기타 적당한 PD-1 억제제가 예를 들어 각기 본원에 참고로 인용되는, 미국 특허 제6,808,710호, 미국 특허 출원

공보 제20040137577호, 제20030232323호, 제20030166531호, 제20030064380호, 제20030044768호, 제20030039653호, 제20020164600호, 제20020160000호, 제20020110836호, 제20020107363호 및 제20020106730호에 기재되어 있다.

[0104] PD-1 억제제의 바람직한 용량은 생물학적으로 활성인 용량이다. 생물학적으로 활성인 용량은, CD8+ T 세포 세포독성 활성의 증가를 유도하여, 감염성 인자에 대해 특이적인 면역 반응을 증가시키는 용량이다. 바람직하게, PD-1 억제제는 처리되지 않은 대조군 수준 아래로 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 초과만큼 항원 특이적 면역 세포(예를 들어, T 세포, 예컨대 CD8+ T 세포) 내 PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 능력을 가진다. 면역 세포 내 PD-1의 수준 또는 활성은, 예를 들어 웨스턴 블롯(Western blot) 분석, 면역조직화학, ELISA 및 노던 블롯(Northern Blot) 분석을 비롯한, 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 측정된다. 대안적으로, PD-1의 생물학적 활성은 PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합을 평가함으로써 측정된다. PD-1의 생물학적 활성은, 예를 들어 사이토킨 생산, 감염성 인자의 제거, 및 항원 특이적 CD8+ T 세포의 증식을 비롯한, CD8+ T 세포 세포독성을 증가시키는 능력에 따라 결정된다. 바람직하게, PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제는 감염성 인자에 대해 특이적인 면역 반응을 처리되지 않은 대조군 수준 위로 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 초과만큼 증가시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명의 제제는 이 활성들 중 하나 이상을 가지는 임의의 제제이다. 본 발명의 제제가 바람직하게는 CD8+ T 세포에서 발현되나, 지속 감염에 대한 면역 반응에 영향을 줄 수 있는 임의의 세포도 또한 본 발명의 방법에 순응적이며, 이에는 예를 들어 B 세포가 포함됨이 이해될 것이다.

[0105] 임의적으로, 대상에게 하나 이상의 부가적 치료제를 투여한다. 부가적 치료제에는 예를 들어 항바이러스성 화합물(예를 들어, 비다라빈, 아시클로비르, 간시클로비르, 발간시클로비르, 뉴클레오시드-유사체 역전사효소 억제제(NRTI)(예를 들어, AZT(지도부딘), ddI(디다노신), ddC(잘시타빈), d4T(스타부딘) 또는 3TC(라미부딘)), 비뉴클레오시드 역전사효소 억제제(NNRTI)(예를 들어, (네비라핀 또는 델라비르딘), 프로테아제 억제제(사퀴나비르, 리토나비르, 인디나비르 또는 넬피나비르), 리바비린 또는 인터페론), 항세균성 화합물, 항진균성 화합물, 항기생충성 화합물, 항염증성 화합물, 항신생물성 제제 또는 진통제가 포함된다.

[0106] 부가적 치료제는 PD-1 억제제를 투여하기 전, 투여하는 동안 또는 투여한 후에 투여된다. 예를 들어, PD-1 억제제 및 부가적 제제는 적어도 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18시간 또는 24시간 초과 간격을 두어 분리된 제형물로 투여된다. 임의적으로, 부가적 제제는 PD-1 억제제와 함께 제형된다. 부가적 제제가 상이한 조성물 내에 존재하는 경우, 상이한 투여 경로가 사용될 수 있다. 제제는 그러한 제제가 감염의 치료, 감소 또는 예방을 위해 효과적이도록 알려진 용량으로 투여된다.

[0107] PD-1 억제제 및 부가적 제제의 농도는 투여 수단, 표적 부위, 포유동물의 생리학적 상태 및 기타 투여되는 의약을 비롯한, 상이한 인자들에 의존한다. 따라서, 처리 투약량은 안정성 및 효능으르 최적화하기 위해 적정화될 수 있고, 이는 당업자의 역량 내에 포함된다. 특별한 상황에 따른 적절한 투약량 및 투여 방식의 결정은 당업자의 역량 내에 포함된다.

[0108] 임의적으로, 대상에게 지속 감염을 유발하는 감염성 인자에 대항한 보호 면역 반응을 도출하는 백신을 추가 투여한다. 예를 들어, 대상은 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 결핵, 인플루엔자 또는 C형 간염에 대항한 면역 반응을 나타내는 백신을 투여받는다. 예시적 백신은 예를 들어 문헌 [Berzofsky 등(J. Clin. Invest. 114:456-462, 2004)]에 기재되어 있다. 원할 경우, 백신은 프라임 부스터 샷 또는 보강제와 함께 투여된다.

[0109] PD-1 억제제는 T 세포, 예를 들어 CD8+T 세포의 세포독성을 증가시키기에 충분한 양으로 투여된다. T-세포의 세포독성의 증가는 면역 반응의 증가 및 지속 감염의 감소를 초래한다. 증가된 면역 반응은, 예를 들어 면역 세포, 예를 들어 T-세포 또는 B 세포 증식의 증가, 사이토킨 생산의 증가, 및 감염성 인자의 제거의 증가에 의해 측정된다. 그러한 감소는 지속 감염과 관련된 증상들 중 하나 이상의 경감을 포함한다. PD-1 억제제의 투여는 처리되지 않은 대상과 대비하여, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%만큼 지속 감염을 감소시키거나 지속 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 경감시킨다.

[0110] 처치는, 임상적 이익, 예컨대 대상 내 감염성 인자 부하의 감소를 초래하는 것이라면 효능적이다. 처치가 예방적으로 적용될 때, "효능적"이란 처치가 감염이 형성되는 것을 지연시키거나 예방함을 의미한다. 효능은 특별한 감염을 진단 또는 치료하기 위한 임의의 공지 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0111] **치료적 투여**

[0112] 본 발명은 PD-1 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물("PD-1 억제제" 또는 "치료 화합물"로도 본원에 칭해짐)을

포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0113] 치료 화합물의 유효량은 바람직하게 약 0.1 mg/kg 내지 약 150 mg/kg이다. 유효 용량은, 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 투여 경로, 부형제 용도, 및 특별한 감염 또는 암의 증상을 치료, 예방 또는 경감시키기 위한 기타 항감염제 또는 치료제의 사용을 비롯한 기타 치료적 처치와 수반되는 동시 투여에 따라 다양하다. 치료적 처방은 감염 또는 암을 앓고 있는 (또는 그러한 질병이 발병할 위험에 처해 있는) 포유동물, 예를 들어 인간 환자를 표준 방법을 이용하여 확인함으로써 수행된다.

[0114] 약학 화합물은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 그러한 개체에게 투여된다. 바람직하게, 화합물은 경구, 직장, 비측, 국소 또는 비경구, 예를 들어 피하, 복강내, 근육내 및 정맥내 투여된다. 화합물은 예방적으로, 또는 감염이 검출된 후에 투여된다. 화합물은 임의적으로 감염을 치료하기 위한 치료 약물의 내복약의 성분으로 제형된다. 비경구 투여에 적당한 제형물의 예에는 등장성 식염수 용액, 5% 포도당 용액 또는 또 다른 표준 약학적으로 허용가능한 부형제 내 활성제의 수용액이 포함된다. 표준 가용화제, 예컨대 PVP 또는 시클로덱스트린이 또한 치료 화합물의 전달을 위한 약학적 부형제로도 이용된다.

[0115] 본원에 기재된 치료 화합물은 통상적 방법을 이용하여 다른 투여 경로를 위한 조성물로 제형된다. 예를 들어, PD-1 억제제는 경구 투여를 위한 캡슐 또는 정제 내에 제형된다. 캡슐은 임의의 표준 약학적으로 허용가능한 물질, 예컨대 젤라틴 또는 셀룰로스를 함유할 수 있다. 정제는 치료 화합물과 고체 담체 및 윤활제의 혼합물을 압착함으로써 통상적 절차에 따라 제형될 수 있다. 고체 담체의 예에는 전분 및 슈거 벤토나이트가 포함된다. 화합물은 경질 쉘 정제, 또는 결합제, 예컨대 락토스 또는 만니톨을 함유하는 캡슐, 통상적 필러, 및 정제화 제제의 형태로 투여된다. 기타 제형물에는 연고, 좌약제, 페이스트, 스프레이, 패치, 크림, 젤, 재흡수성 스폰지 또는 폼(foam)이 포함된다. 그러한 제형물은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 생성된다.

[0116] 치료 화합물이 단백질을 코딩하는 핵산인 경우, 그 치료적 핵산은 (예를 들어, 레트로바이러스 벡터의 사용, 직접적 주사, 마이크로입자 포격(microparticle bombardment)의 사용, 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 트렌스펙션 제제를 이용한 코팅, 또는 핵에 들어가는 것으로 알려져 있는 호미오박스-유사 펩티드로의 연결에 의한 투여 등에 의해) 세포 내에 있도록, 그 핵산을 적절한 핵산 발현 벡터의 부분으로서 구축하여, 코딩된 단백질의 발현을 촉진하기 위해 생체내 투여된다(예를 들어, 문헌 [Joliot, 등, 1991. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1864-1868)]을 참고한다). 대안적으로, 핵산 치료제는 발현을 위해 세포내 도입되거나 숙주 세포 DNA 내에 (동종성 재조합에 의해) 도입되거나, 부체 상태로 남는다.

[0117] DNA의 국소 투여를 위해, 표준 유전자 치료법 벡터가 사용된다. 그러한 벡터에는 복제-결함 간염 바이러스(예를 들어, HBV 및 HCV), 레트로바이러스(예를 들어, WO 89/07136; 문헌 [Rosenberg 등, 1990, N. Eng. J. Med. 323(9):570-578] 참고), 아데노바이러스(예를 들어, 문헌 [Morsey 등, 1993, J. Cell. Biochem., Supp. 17E] 참고), 아데노-관련 바이러스([Kotin 등, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2211-2215]), 복제 결함 단순 포진 바이러스([HSV; Lu 등, 1992, Abstract, page 66, Abstracts of the Meeting on Gene Therapy, Sept. 22-26, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York])로부터 유래된 바이러스 벡터들, 및 이 벡터들의 임의의 변형된 양태들을 비롯한 바이러스 벡터들이 포함된다. 본 발명은 진핵생물 세포로 핵산을 생체내 전달하는 것을 달성하는 임의의 다른 전달 시스템을 이용할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 리포좀, 예를 들어 양이온성 리포좀(리포펙틴(Lipofectin)), 수용체-매개 전달 시스템, 비바이러스 핵산-기재 벡터, 진핵생물 고스트 또는 미소구체(예를 들어, 마이크로입자; 예를 들어, 미국 특허 제4,789,734호; 미국 특허 제4,925,673호; 미국 특허 제3,625,214호; 문헌 [Gregoriadis, 1979, Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341(Academic Press)] 참고)로 팩키징될 수 있다. 네이키드 DNA가 또한 투여될 수 있다.

[0118] 유전자 치료법을 위한 DNA는 환자에게 비경구적으로, 예를 들어 정맥내, 피하, 근육내 및 복강내 투여될 수 있다. DNA 또는 유도제는 약학적으로 허용가능한 담체, 즉 포유동물에 투여하기에 적당한 생물학적으로 적합성인 비히클, 예를 들어 생리 식염수 내에 포함되어 투여된다. 치료적 유효량은, 의약적으로 바람직한 결과, 예를 들어 피험 동물 내 PD-1 유전자 산물의 감소를 발생시킬 수 있는 양이다. 그러한 양은 당업계의 통상의 숙련가에 의해 결정될 수 있다. 의약 기술 분야에 공지되어 있는 바와 같이, 임의의 소정의 환자를 위한 투약량은, 환자의 크기, 신체 표면적, 연령, 투여되는 특별한 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 및 동시 투여되는 다른 약물을 비롯한 많은 인자들에 의존한다. 투약량은 다양할 수 있으나, DNA의 정맥내 투여를 위해 바람직한 투약량은 대략 10^{6} 내지 10^{22}개 DNA 분자 복사체이다. 전형적으로, 플라스미드는 약 1 나노그램 내지 약 5000 마이크로그램의 DNA의 양으로 포유동물에 투여된다. 바람직하게, 조성물은 약 5 나노그램 내지 1000 마이크로그램의 DNA, 10 나노그램 내지 800 마이크로그램의 DNA, 0.1 마이크로그램 내지 500 마이크로그램의 DNA, 1 마이크로그램 내

지 350 마이크로그램의 DNA, 25 마이크로그램 내지 250 마이크로그램의 DNA, 또는 100 마이크로그램 내지 200 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 대안적으로, PD-1 억제제를 코딩하는 재조합 아데노바이러스 벡터는 포유동물에게 적어도 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10} 또는 10^{11} 플라크 형성 단위(pfu)의 농도로 투여될 수 있다.

[0119] PD-1 유전자 산물은 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 생리 식염수 내 포함되어 환자에 정맥내 투여된다. 펩티드의 세포내 전달을 위한 표준 방법이 사용될 수 있는 바, 예를 들어 리포좀 내 팩키징이 이용될 수 있다. 그러한 방법은 당업계의 통상의 숙련가에게 공지되어 있다. 일일 체중 kg 당, 대략 1 내지 100 몰의 본 발명의 폴리펩티드의 정맥내 투약량이 투여될 것으로 예상된다. 본 발명의 조성물은 비경구 투여, 예컨대 정맥내, 피하, 근육내 및 복강내 투여에 유용하다.

[0120] PD-1 억제제는 영향을 받는 조직과 화합물을 접촉시킬 때 유효하다. 따라서, 화합물은 국소 투여될 수 있다. 대안적으로, PD-1 억제제는 전신 투여될 수 있다. 부가적으로, 화합물은 대상의 인접한 주위 조직으로 화합물을 서행 방출하는 고체 또는 재흡수성 매트릭스를 (기관(예를 들어, 장 또는 간)에 직접, 혹은 피하에) 이식함으로써 투여될 수 있다. 예를 들어, 위장관 감염의 치료를 위해, 화합물을 전신(예를 들어, 정맥내, 직장내 또는 경구), 또는 국소(예를 들어, 위 조직에 직접) 투여할 수 있다. 대안적으로, PD-1 억제제-함침 웨이퍼 또는 재흡수성 스폰지를 위 조직에 직접 접촉하도록 둔다. PD-1 억제제는 웨이퍼로부터의 약물의 확산 및 중합체 매트릭스의 부식으로 인해 생체내 서행 방출된다. 또 다른 예로서, 간의 감염(즉, 간염)은 PD-1 억제제를 함유하는 용액을 간 혈관에 주입함으로써 치료된다.

[0121] 신경학적 감염의 치료를 위해, PD-1 억제제를 정맥내 또는 척수강내(즉, 뇌척수액으로의 직접 주입에 의해) 투여할 수 있다. 국소 투여를 위해, 화합물-함침 웨이퍼 또는 재흡수성 스폰지를 CNS 조직과 직접 접촉하도록 둔다. 화합물, 또는 화합물들의 혼합물은 웨이퍼로부터의 약물의 확산 및 중합체 매트릭스의 부식으로 인해 생체내 지연 방출된다. 대안적으로, 화합물은 표준 방법을 이용하여 뇌 또는 뇌척수액으로 주입된다. 예를 들어, 주사 포트로 사용하기 위한 카테터가 있는 천공기 구멍(burr hole) 환을 두개(skull)에 뚫린 천공기 구멍에 두개를 결속하도록 위치시킨다. 카테터에 연결된 유체 저장소(reservoir)는 천공기 구멍 환의 상단 위에 위치한 격막을 통해 삽입된 니들 또는 탐침(stylet)에 의해 접근된다. 카테터 어셈블리(예를 들어 미국 특허 제5,954,687호에 기재됨)는 일정 시간 동안 약물이 투여되도록, 뇌, 뇌 부근 또는 뇌 내에 있는 선택된 위치로 또는 그 위치로부터 유체를 전달하기에 적당한 유체 흐름 경로를 제공한다.

[0122] 심장 감염에서, 화합물을 예를 들어, 심장 조직(즉, 심근, 심낭 또는 심내막)에, 흉벽을 통한 직접적 관상내 주입에 의해, 또는 투시 지침에 따라 표준 경피 카테터 이용 방법을 이용하여 전달할 수 있다. 이에 따라, 억제제는 조직에 직접 삽입되거나, 체내 관광에 삽입되는 카테터 또는 스텐트로부터 주입될 수 있다. 임의의 다양한 관상 카테터 또는 관류 카테터를 사용하여 화합물을 투여할 수 있다. 대안적으로, 화합물은 관상 관 내에 놓인 스테트 상에 코팅 또는 침액된다.

[0123] 폐 감염은 예를 들어 화합물을 흡인에 의해 투여함으로써 치료될 수 있다. 화합물은 예를 들어 기체, 예컨대 이산화탄소, 또는 네뷸라이저 등의 적당한 추진제를 함유하는 가압 컨테이너 또는 디스펜서로부터 에어로졸 분무 형태로 전달된다.

[0124] 당업자는 본 발명에 따라 치료되는 환자가 지속 감염 대상으로 진단하기 위한 동일 시험을 받았을 수 있거나, 혹은 조사 없이 하나 이상의 위험 요소(예를 들어, 감염성 인자에 대한 노출, 감염된 대상에 대한 노출, 유전적 소인 또는 2차 감염의 병리학적 증상 소인을 가짐)의 존재로 인해 높은 위험에 처해 있는 것으로 확인되었을 수 있음을 이해할 것이다. 지속 감염 증상 또는 손상의 감소는 또한 증상의 경감, 질병의 정도의 감쇠, 질병의 안정화된(즉, 악화되지 않은) 상태, 질병 진전의 지연 또는 서행, 및 질병 상태의 경감 또는 완화를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 치료는 건강 보호 제공자에 의해 밀착 감독으로 집에서 행해질 수 있거나, 건강 보호 시설에서 행해질 수 있다.

[0125] **면역 반응의 측정 방법**

[0126] 본 발명에 따른 치료 후의 면역 반응을 측정하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. T 세포의 활성은, 예를 들어 사이토킨 생산을 검출하는 검정에 의해, T 세포 증식을 측정하는 검정, 미생물 제제의 제거를 측정하는 검정, 및 CD8+ T 세포 세포독성을 측정하는 검정에 의해 평가될 수 있다. 이 검정들은 예를 들어, 본원에 각기 참고 인용되는 미국 특허 제6,808,710호 및 미국 특허 출원 공보 제20040137577호, 제20030232323호, 제20030166531호, 제20030064380호, 제20030044768호, 제20030039653호, 제20020164600호, 제20020160000호, 제20020110836호, 제20020107363호, 및 제20020106730호에 기재되어 있다.

[0127] 임의적으로, CD8+ T 세포 세포독성을 증가시키는 PD-1 억제제의 능력은 CD8+ T 세포의 증식을 측정하는 검정[예를 들어, 티미딘 도입, BrdU 검정, 및 세포 사이클 마커(예를 들어, Ki67 및 CFSE)를 이용한 염색(예를 들어, 문헌 [Dong 등(Nature 5:1365-1369, 1999)]에 기재됨)]에 의해 평가된다. 한 예에 있어서, T-세포 증식은 PD-1을 발현하는 정제된 T-세포를 PD-1 억제제, 상기 기재된 바와 같은 일차 활성화 신호, 및 ^{3}H-티미딘을 함께 배양함으로써 모니터링된다. T-세포 증식의 수준은 티미딘 도입을 측정함으로써 결정된다.

[0128] CD8+ T 세포 세포독성은 또한 세포용해 검정(예를 들어, 51Cr 방출 검정, 또는 퍼포린 또는 그랜자임의 방출을 검출하는 검정), 카스파제 활성화를 검출하는 검정, 또는 감염된 대상으로부터의 미생물 제제의 제거를 측정하는 검정에 의해서도 평가된다. 예를 들어, 감염된 대상으로부터의 생물학적 샘플(예를 들어, 혈청, 비장, 간, 폐 또는 바이러스가 국재하는 조직) 내의 바이러스 부하는 치료 전 및 후에 측정될 수 있다.

[0129] 사이토킨, 예컨대 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2의 생산도 또한 측정될 수 있다. 예를 들어, 정제된 T-세포는 PD-1 억제제 단백질 및 일차 활성화 신호의 존재 하에 배양된다. 상등액 내 각종 사이토킨의 수준은, 샌드위치 효소-연결 면역흡수 검정, 또는 예를 들어 문헌 [Dong 등(Nature 5:1365-1369, 1999)]에 기재되어 있는, 기타 통상적 검정에 의해 결정될 수 있다.

[0130] 원할 경우, PD-1 억제제의 효능은 T 세포의 보조자극을 유도하는 그 능력에 의해 평가된다. 예를 들어, 시험관내 T-세포 보조자극을 위한 방법은 PD-1을 발현하는 정제된 T-세포에, 항-CD3 단클론성 항체 또는 포르볼 에스테르에 의해, 혹은 II류 MHC와 관련된 항원에 의해 첫 번째 또는 일차 활성화 신호를 제공하는 것을 포함한다. PD-1 발현 또는 활성을 감소시키고, 이에 따라 면역 기능을 조절하는데 필요한 2차 또는 보조자극 신호를 이 T-세포에 제공하는 후보 화합물의 능력은, 당업계에 공지된 수가지 통상적 검정들 중 임의의 하나에 의해 검정될 수 있다.

[0131] B 세포 반응은 항원 특이적 ELISA(예를 들어, LCMV, HIV, 결핵 또는 말라리아), 혈장 세포 ELISPOT, 기억 B-세포 검정, B 세포의 표현형 결정, 및 면역조직화학에 의한 배 중심 분석에 의해 평가된다.

[0132] **스크리닝 검정**

[0133] 본 발명은 PD-1의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물을 확인하기 위한 스크리닝 방법을 제공한다. 유용한 화합물은 PD-1의 생물학적 활성을 억제하거나 세포내 수준을 감소시키는 임의의 제제를 포함한다. 예를 들어, 후보 화합물은 PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 선도 화합물(lead compound)로서 그러한 제제를 사용하여, 본 스크리닝 방법은 또한, 지속 감염의 치료, 감소 또는 예방, 또는 대안적으로 그러한 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 경감시키는 기능을 하는 추가의 신규 특이적 억제제를 확인하도록 한다. 스크리닝 방법은 초고속 기법을 포함할 수 있다.

[0134] "후보 화합물"이란, 천연 발생 또는 인공 유래된 것인지의 여부를 막론한 화학 물질을 의미한다. 후보 화합물에는 예를 들어, 펩티드, 폴리펩티드, 합성 유기 분자, 천연 발생 유기 분자, 핵산 분자, 펩티드 핵산 분자 및 그것의 성분 및 유도체가 포함된다. 예를 들어, 본 발명에 따른 유용한 후보 화합물은 PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합을 감소시킨다.

[0135] 수많은 방법들이 그러한 스크리닝 검정을 수행하기 위해 이용가능하다. 한 접근법에 따라, 후보 화합물은 PD-1 발현 세포의 배지에 다양한 농도로 첨가된다. "PD-1 유전자"란, PD-1 단백질을 코딩하는 핵산을 의미한다. "PD-1 융합 유전자"란, PD-1 프로모터, 및/또는 제2 이종성 핵산 서열에 작용적으로 연결된 PD-1 코딩 영역의 전부 또는 일부를 의미한다. 바람직한 실시양태들에서, 제2 이종성 핵산 서열은 리포터 유전자, 즉 그 발현이 검정될 수 있는 유전자이며; 리포터 유전자에는 글루쿠로니다제(GUS), 루시퍼라제, 클로르암페니콜 트랜스아세틸라제(CAT), 녹색 형광성 단백질(GFP), 알칼리성 포스파타제, 및 베타-갈락토시다제를 코딩하는 것들이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0136] 이어서, PD-1의 유전자 발현을 예를 들어 혼성화 프로브로서 PD-1의 핵산 분자로부터 제조된 임의의 적절한 단편을 이용하여 표준 노던 블롯 분석(Ausubel 등, 이하 동문)에 의해, 혹은 적절한 프라이머를 이용한 실시간 PCR에 의해, 측정할 수 있다. 후보 화합물의 존재 하에서의 유전자 발현의 수준을 후보 분자가 결여된 대조군 배지에서 측정된 수준과 비교한다. 원할 경우, 후보 화합물의 효과를 대안적으로 동일한 일반 접근법 및 표준 면역학적 기법, 예컨대 웨스턴 블로팅, 또는 예를 들어 PD-1에 대해 특이적인 항체를 이용하는 면역석출을 이용하여, PD-1 폴리펩티드의 수준에서 측정될 수 있다. 예를 들어, 면역검정을 사용하여, PD-1의 수준을 검출 또는 모니터링할 수 있다. PD-1에 결합할 수 있는 다클론성 또는 단클론성 항체를 임의의 표준 면역검정 형식(예를 들어, ELISA 또는 RIA 검정)에 사용하여, PD-1의 수준을 측정할 수 있다. PD-1을 또한 질량 분광법, 고성능 액

체 크로마토그래피, 분광광도 또는 형광측정 기법, 또는 이들의 조합법을 이용하여 측정할 수 있다.

[0137] 대안적으로, 본 발명의 스크리닝 방법을 사용하여, PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합을 처리되지 않은 대조군과 대비하여, 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%만큼 감소시킴으로써 PD-1의 생물학적 활성을 감소시키는 후보 화합물을 확인할 수 있다. 예를 들어, 후보 화합물을, 이하 추가 기재되는 바와 같이, PD-1을 함유하는 무세포 용액에서, 또는 PD-1에 대해 cDNA로 트랜스펙션된 후, PD-1을 천연적으로 발현하는 세포 내 PD-1 활성을 감소시키는 그 능력에 대해 시험할 수 있다. PD-1의 결합 또는 활성화에 대한 후보 화합물의 영향을, 방사능 및 비방사능 결합 검정, 경쟁 검정 및 수용체 신호 전달 검정에 의해 실험할 수 있다.

[0138] 한 구체적 예로서, PD-1을 코딩하는 핵산을 발현하는 포유동물 세포(예를 들어, 설치류 세포)를 후보 화합물(예를 들어, 펩티드, 폴리펩티드, 합성 유기 분자, 천연 발생 유기 분자, 핵산 분자 또는 이들의 성분)의 존재 하에 배양한다. 세포는 내인적으로 PD-1을 발현할 수 있고, 혹은 대안적으로 당업계에 공지된 임의의 표준 기법에 의해 유전공학 처리(예를 들어, 트랜스펙션 및 바이러스 감염)되어, PD-1을 과발현할 수 있다. PD-1의 발현 수준을 웨스턴 블롯 분석에 의해 이 세포에서 측정한 후, 이어서 후보 화합물과 접촉하지 않은 대조 세포 내 동일 단백질의 발현 수준과 비교한다. 자체의 합성 또는 생물학적 활성을 감소시킨 결과로서의 PD-1 활성 수준의 감소를 촉진하는 화합물이 본 발명에서 유용한 것으로 간주된다.

[0139] 한 특별한 예에서, 면역 반응의 증가를 초래하는, PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합을 간섭하는(이로써, PD-1의 생물학적 활성을 감소시키는) 화합물이 본 발명에 따라 유용하다. PD-1의 생물학적 활성을 감소시키는 능력이 있는 경우, 그러한 분자를 예를 들어 지속 감염을 치료, 감소 또는 예방하거나, 대안적으로 그러한 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 경감시키는 치료제로서 사용할 수 있다. 한 구체적 예로서, 후보 화합물을 2개의 단백질과 접촉시킬 수 있으며, 이 때 첫 번째 단백질은 PD-1과 실질적으로 동일한 폴리펩티드이고, 두 번째 단백질은 PD-L1 또는 PD-L2(즉, 결합을 허용하고 감소된 면역 반응을 초래하는 조건 하에서 PD-1 폴리펩티드에 결합하는 단백질)이다. 이 특별한 스크리닝 방법에 따라, 후보 화합물을 첨가한 후, 2개의 단백질 간의 상호작용을 측정한다. 후보 화합물을 첨가한 후의 (화합물의 부재 하에서의 그러한 화합물과 대비되는) PD-1의 두 번째 폴리펩티드에 대한 결합의 감소는 후보 화합물이 2개의 단백질 간의 상호작용을 억제하는 능력을 가지는 것으로 확인시킨다. 궁극적으로, 본 발명의 스크리닝 검정을, 예를 들어 무세포 시스템 내에서, 또는 효모 2-혼성체 시스템을 이용하여, 수행할 수 있다. 원할 경우, 단백질 또는 후보 화합물 중 하나는 상기 기재된 바와 같은 지지체에 고정화되거나, 검출가능한 기를 가질 수 있다.

[0140] 대안적으로 또는 부가적으로, 후보 화합물은 PD-1에 특이적으로 결합하고 이에 따라 PD-1을 억제하는 것에 대해 스크리닝될 수 있다. 그러한 후보 화합물의 효능은 그것의 PD-1과의 상호작용 능력에 의존한다. 그러한 상호작용은 임의의 수의 표준 결합 기법 및 기능적 검정(예를 들어, 문헌 [Ausubel 등, 이하 동문]에 기재된 검정)을 이용하여 용이하게 검정될 수 있다. 예를 들어, 후보 화합물을 PD-1과의 상호작용 및 결합에 대해 시험관내 시험할 수 있고, 면역 반응을 조절하는 그것의 능력을 임의의 표준 검정(예를 들어, 본원에 기재된 검정)을 이용하여 검정할 수 있다.

[0141] 예를 들어, PD-1에 결합하는 후보 화합물을, 크로마토그래피 이용 기법을 이용하여 확인할 수 있다. 예를 들어, 재조합 PD-1을, PD-1을 발현하도록 공학처리된 세포(예를 들어, 상기 기재된 것)로부터 표준 기법을 이용하여 정제될 수 있고, 칼럼 상에 고정화될 수 있다. 대안적으로, 천연 발생 PD-1을 칼럼 상에 고정화할 수 있다. 이어서, 후보 화합물의 용액을 칼럼에 통과시키고, PD-1에 대해 특이적인 화합물을 PD-1에 결합하여 칼럼 상에 고정화되는 그 능력에 기초하여 확인한다. 화합물을 단리하기 위해, 칼럼을 세정하여, 비특이적으로 결합된 분자를 제거하고, 이어서 관심 화합물을 칼럼에서 방출시켜, 수집한다. 이 방법 (또는 임의의 다른 적절한 방법)에 의해 단리된 화합물을, 원할 경우, (예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해) 추가 정제할 수 있다.

[0142] 신규 억제제에 대한 스크리닝 및 선도 화합물의 최적화를, 예를 들어 표준 기법을 이용하여 세포독성 T 세포 활성 또는 면역 반응을 조절하는 그 능력을 평가함으로써 평가할 수 있다. 또한, 이 후보 화합물을 항-미생물 제제(예를 들어, 상기 기재된 것)로서 기능하는 그 능력에 대해 시험할 수 있다. 이 접근법에 의해 단리된 화합물은 또한 예를 들어 지속 감염을 치료, 감소 또는 예방하거나, 대안적으로는 그러한 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 경감시키는 치료제로서 사용될 수 있다. 10 mM 이하의 친화도 상수로 PD-1에 결합하는 것으로 확인되는 화합물이 본 발명에 특히 유용한 것으로 간주된다.

[0143] 잠재적 치료제에는 유기 분자, 펩티드, 펩티드 모사체, 폴리펩티드, 및 PD-1을 코딩하는 핵산 서열 또는 폴리펩티드에 결합함으로써 그 활성을 억제 또는 소멸시키는 항체가 포함된다. 잠재적 항-미생물 제제에는 또한 그러

한 폴리펩티드의 결합 부위에 결합하여 차지함으로써 세포내 결합 분자에의 결합을 방지하고, 이에 따라 정상적 생물학적 활성이 방지되도록 하는 소분자가 포함된다. 다른 잠재적 항-미생물 제제에는 안티센스 분자가 포함된다.

[0144] **진단 및 예후 방법**

[0145] 암, 예를 들어 혈관면역아세포성 T 세포 림프종 또는 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종은 시험 샘플(즉, 환자 유래 샘플) 내 PD-1 폴리펩티드의 양을 조사함으로써 검출된다. 대조 샘플과 대비한 PD-1 폴리펩티드의 수준 변화는 대상이 암을 가짐을 가리킨다. 그 변화는 대조 샘플과 대비한 PD-1 폴리펩티드의 증가 또는 감소일 수 있다. 대조 샘플을 시험 샘플과 유사한 방식으로 제조(즉, 분획화)한다.

[0146] 샘플은 예를 들어, 혈액, 혈청, 복수, 소변 및 기타 체액이다. 바람직하게, 샘플은 T-세포 또는 B-세포이다.

[0147] PD-1의 양은 시험 샘플에서 결정되어, 정상 대조 수준의 발현과 비교된다. 정상적 대조 수준이란, 암을 앓지 않는 대상에 전형적으로 발견되는 PD-1 폴리펩티드의 발현 수준을 의미한다. 환자 유래 샘플 내 PD-1의 수준이 증가함은, 대상이 암을 앓고 있거나 암을 발병할 위험에 처해 있음을 가리킨다. 대조적으로, 방법을 예방적으로 적용할 경우에. 환자 유래 샘플 내 PD-1 폴리펩티드의 수준이 유사하거나 감소함은, 대상이 암을 앓고 있거나 암을 발병할 위험에 처해 있지 않음을 가리킨다. 환자 유래 샘플 내 PD-1 폴리펩티드의 수준이 증가함은, 대상이 암을 앓고 있거나 암을 발병할 위험에 처해 있음을 가리킨다.

[0148] PD-1 폴리펩티드의 양의 변경은 통계학적으로 유의적이다. 통계학적으로 유의적이라 함은, 변경이 단지 우연히 일어날 것으로 예상되는 것보다 더 크다는 것을 의미한다. 통계학적 유의도는 당업계에 공지된 방법에 의해 결정된다. 예를 들어, 통계학적 유의도는 p-값에 의해 결정된다. p-값은 실험 중에 군 간의 차이가 우연이 일어나게 되는 확률의 척도이다. ($P(z \geq z_{관찰})$). 예를 들어 0.01의 p-값은, 결과가 우연히 일어나게 될 가능성이 100 중 1임을 의미한다. p-값이 낮을수록, 군 간의 차이가 처리에 의해 유발되는 가능성이 더욱 크다. p-값이 0.05 이상일 때 변경이 통계학적으로 유의적이다. 바람직하게, p-값은 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001 또는 그 미만이다.

[0149] 시험, 검정 또는 방법의 "진단 정확도"는, 시험, 검정 또는 방법의, 암을 가졌거나 암의 위험에 처해 있는 환자를 구별하는 능력에 관한 것으로, 이는 환자가 PD-1 폴리펩티드의 "임상적으로 유의적인 존재"를 가지는 것에 기초한다. "임상적으로 유의적인 존재"란, 환자(전형적으로는 환자로부터의 샘플) 내의 PD-1 폴리펩티드의 존재가 그 PD-1 폴리펩티드에 대한 소정의 절사점(cut-off point) 또는 역치)보다 높거나 낮음을 의미하고, 이에 따라 환자가 충분히 많은 단백질이 존재함이 마커가 되는 암을 가지는 것을 가리킨다.

[0150] 용어 "높은 진단 정확도" 및 "매우 높은 진단 정확도"는, 암의 존재 또는 부재를 올바르게(정확히) 가리키는 소정의 절사점을 갖는 PD-1 폴리펩티드에 대한 시험 또는 검정을 가리킨다. 완벽한 시험은 완전한 정확도를 가질 것이다. 이에 따라, 당뇨병을 가지는 개체에 대해, 시험은 단지 양성 시험 결과를 가리킬 것이며, 어떠한 개체에 대해서도 "음성"이라고 보고하지 않을 것이다(즉, "그릇된 음성"은 없음). 즉, 시험의 "감도"(참된 양성 비율)는 100%일 것이다. 한편, 당뇨병을 가지지 않은 개체에 대해서는, 시험은 단지 음성 시험 결과를 가리킬 것이며, 어떠한 개체에 대해서도 "양성"이라고 보고하지 않을 것이다(즉, "그릇된 양성"은 없음). 즉, 시험의 "특이성"(참된 음성 비율)은 100%일 것이다. 예를 들어, 시험, 예를 들어 임상적 진단 시험의 특이성, 감도 및 양성 및 음성 예측 값에 대해 논의하고 있는 문헌 [O'Marcaigh AS, Jacobson RM, "Estimating The Predictive Value Of A Diagnostic Test, How To Prevent Misleading Or Confusing Results," Clin. Ped. 1993, 32(8): 485-491]를 참고한다.

[0151] 시험 (또는 검정)의 분리점(cut point) 또는 역치의 변화는 통상 감도 및 특이성을 감소시키나, 정성적으로 역의 관계가 있다. 예를 들어, 분리점이 감소할 때, 피험 집단 내 더 많은 개체가 전형적으로 분리점 또는 역치보다 높은 시험 결과를 가질 것이다. 분리점보다 높은 시험 결과를 갖는 개체는 시험을 수행하는 목적이 되는 질병, 상태 또는 증후군을 가지고 있는 것으로 보고되기 때문에, 분리점을 낮추게 되면 더 많은 개체가 양성 결과를 가지는 것(즉, 암을 가지는 것)으로 보고되게 된다. 이에 따라, 암을 가지는 자의 분율이 높을수록, 그것을 가지는 것으로 시험에 의해 나타내어지게 될 것이다. 따라서, 시험의 감도(참된 양성 비율)가 증가될 것이다. 그러나, 동시에 그 질병, 증상 또는 증후군을 가지지 않는 더 많은 사람들(즉, 참된 "음성" 사람들)이 분리점보다 높은 PD-1 폴리펩티드 값을 가지는 것으로 시험에 의해 나타내어지고, 이에 따라 시험에 의해 음성으로 바르게 나타내어지는 것이 아니라 양성으로 보고됨(즉, 질병, 증상 또는 증후군을 가짐)으로 시험에 의해 나타내어질 것이므로, 더 많은 그릇된 양의 결과들이 있을 것이다. 따라서, 시험의 특이성(참된 음성 비율)이 감소될 것

이다. 유사하게, 분리점을 상승시킴은 감도를 감소시키고 특이성을 증가시키는 경향이 있을 것이다. 그러므로, 환자의 상태를 평가하기 위한 제안된 의약 시험, 검정 또는 방법의 정확도 및 유용성을 평가함에 있어, 항상 감도 및 특이성 모두를 고려해야 하고, 감도 및 특이성이 분리점 범위에 걸쳐 유의적으로 변화할 수 있으므로, 감도 및 특이성이 보고되는 분리점이 무엇인지 염두해야 한다.

[0152] 그러나, 단지 단일 값으로 분리점의 전 범위에 걸쳐 시험, 검정 또는 방법의 감도 및 특이성을 나타내는 지시자이다. 그 지시자는 의문의 시험, 검정 또는 방법을 위한 리시버 오퍼레이팅 캐릭터리스틱스(Receiver Operating Characteristics)("ROC") 곡선에서 비롯된다. 예를 들어, 문헌 [Shultz, "Clinical Interpretation Of Laboratory Procedures," chapter 14 in Teitz, Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis and Ashwood (eds.), 4th edition 1996, W.B. Saunders Company, p. 192-199]; 및 문헌 [Zweig 등, "ROC Curve Analysis: An Example Showing The Relationships Among Serum Lipid And Apolipoprotein Concentrations In Identifying Patients With Coronory Artery Disease," Clin. Chem., 1992, 38(8): 1425-1428]를 참고한다.

[0153] ROC 곡선은 x-축(0 내지 1 스케일(즉, 100%))에 나타낸 [1 - 특이성]와 동등한 값에 대한, y-축(0 내지 1 스케일(즉, 100%))에 나타낸 감도의 x-y 플롯이다. 즉, 그것은 시험, 검정 또는 방법에 대한 그릇된 양성 비율에 대한 참된 양성 비율의 플롯이다. 의문의 시험, 검정 또는 방법에 대한 ROC 곡선을 작도하기 위해, 환자를, 환자가 질병, 상태 또는 증후군에 대해 참된 양성 또는 음성인지의 여부를 결정하기 위해 의문의 시험, 검정 또는 방법과 무관한 완벽하게 정확한 또는 "골드 표준" 방법을 이용하여 평가한다(예를 들어, 관상 조영술은 관상 죽상경화증의 존재에 대한 골드 표준 시험임). 환자를 또한 의문의 시험, 검정 또는 방법을 이용하여 시험하고, 변화하는 분리점들에 대해, 환자가 시험, 검정 또는 방법에 따라 양성 또는 음성으로 보고된다. 감도(참된 양성 비율) 및 [1 - 특이성]과 동등한 값(그 값은 그릇된 양성 비율과 동등함)을 각 분리점에 대해 결정하고, x-y 값의 각 쌍을 x-y 다이어그램 상에 단일 점으로 플로팅한다. 이 점들을 연결한 "곡선"이 ROC 곡선이다.

[0154] 곡선 아래의 면적("AUC")은 단지 단일 값으로 분리점의 전 범위에 걸쳐 시험, 검정 또는 방법의 감도 및 특이성이 나타나도록 하는 지시자이다. 최대 AUC는 1(완벽한 시험)이고, 최소 면적은 1/2이다. AUC가 1에 가까울수록, 시험의 정확도가 보다 양호하다.

[0155] "높은 진단 정확도"란, AUC(시험 또는 검정에 대한 ROC 곡선의 아래 면적)이 0.70 이상, 적당하게는 0.75 이상, 더욱 적당하게는 0.80 이상, 바람직하게는 0.85 이상, 더욱 바람직하게는 0.90 이상, 가장 바람직하게는 0.95 이상인, (PD-I 폴리펩티드의 임상적으로 유의한 존재를 결정함으로써 당뇨병의 존재를 가리키기 위한 본 발명의 시험과 같은) 시험 또는 검정을 의미한다.

[0156] "매우 높은 진단 정확도"란, AUC(시험 또는 검정에 대한 ROC 곡선의 아래 면적)이 0.875 이상, 적당하게는 0.90 이상, 더욱 적당하게는 0.925 이상, 바람직하게는 0.95 이상, 더욱 바람직하게는 0.975 이상, 가장 바람직하게는 0.98 이상인 시험 또는 검정을 의미한다.

[0157] 임의적으로, 특별한 암에 대한 다른 공지된 바이오마커의 발현이, 또한 대상이 암을 가지고 있는지의 여부를 가리키는 것으로 결정될 수 있다. 예를 들어, CD10, bcl-6, CD20, CD57 또는 CXCR5가 검출된다.

[0158] PD-1 폴리펩티드 및 부가적 바이오마커는 임의의 적당한 방식으로 검출되나, 전형적으로는 환자로부터의 샘플을 PD-1 또는 바이오마커와 결합하는 항체와 접촉시킨 후, 반응 산물의 존재 또는 부재를 검출함으로써 검출된다. 항체는 상기 상세히 논의된 바와 같이, 단클론성, 다클론성, 키메라 항체 또는 이들의 단편일 수 있고, 반응 산물의 검출 단계는 임의의 적당한 면역검정에 의해 수행될 수 있다. 대상으로부터의 샘플은 전형적으로 상기와 같은 생물학적 유체이고, 상기 기재된 방법을 수행하는데 사용되는 생물학적 유체와 동일한 샘플일 수 있다.

[0159] PD-1 폴리펩티드의 발현은 또한 암의 치료 과정을 모니터링하도록 한다. 이 방법에서는 생물학적 샘플이 암에 대해, 치료, 예를 들어 수술, 화학요법 또는 호르몬치료를 받는 대상으로부터 제공된다. 원할 경우, 생물학적 샘플이 치료 전, 중 또는 후의 각종 시점들에 대상으로부터 수득된다. 이어서, PD-1의 발현을 결정하고, 기준, 예를 들어 암 상태가 알려져 있는 대조군과 비교한다. 기준 샘플을 치료에 노출하였다. 대안적으로는, 기준 샘플을 치료에 노출하지 않았다. 임의적으로, 그러한 모니터링은 두 번째 외관 수술 감독 절차 및 후속 수술 감독 절차들에 앞서 수행된다. 예를 들어, 샘플을, 암에 대한 초기 수술 치료를 받고 그 암에 대한 항신생물제로 후속 처리한 대상으로부터 수집하여, 치료 진행을 모니터링할 수 있다.

[0160] 기준 샘플이 암을 가지지 않은 대상으로부터 수득된 경우, 시험 샘플 및 기준 샘플에서의 PD-1 폴리펩티드의 양의 유사 또는 감소는, 그 치료가 효능적인 것임을 가리킨다. 그러나, 시험 샘플 및 기준 샘플에서의 PD-1 폴리펩티드의 양의 증가는 덜 바람직한 임상적 성과 또는 예후를 가리킨다.

[0161] "효능적"이란, 치료가 PD-1 폴리펩티드의 양의 감소, 또는 대상 내 종양의 크기, 우세도 또는 전이 가능성의 감소를 초래함을 가리킨다. 암의 평가는 표준 임상적 프로토콜을 이용하여 행해진다. 효능은 특별한 종양을 진단 또는 치료하기 위한 임의의 공지된 방법과 연관하여 결정된다. PD-1 폴리펩티드의 발현은 또한 전신적, 예를 들어 화학요법, 호르몬 또는 방사능 치료에 대해 반응성일 환자를 확인하도록 한다. 이 방법에서, 생물학적 샘플은 암에 대해, 수술 치료를 받기 전 대상으로부터 제공된다. 이어서, PD-1 폴리펩티드의 발현이 결정되고, 암의 수술 제거 후 대상으로부터 수득된 생물학적 샘플과 비교한다. PD-1 폴리펩티드의 양이 암의 수술적 제거 후에 감소하는 경우, 환자는 전신적 치료에 대해 반응성이기 쉽다. 대조적으로, 폴리펩티드의 양이 암의 수술적 제거 후에도 일정하게 유지되거나 증가하는 경우, 전신적 치료에 대해 반응성이 아니기 쉽다.

[0162] PD-1 폴리펩티드 또는 기타 암 바이오마커의 발현은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 단백질 또는 핵산 수준에서 결정된다. 예를 들어, 구체적으로 이 서열들 중 하나 이상을 인식하는 프로브를 이용하는 노던 혼성화 분석을 사용하여, 유전자 발현을 결정할 수 있다. 대안적으로, 발현은 역전사 이용 PCR 검정을 이용하여, 예를 들어 유전자의 차별적 발현 서열에 대해 특이적인 프라이머를 이용하여 측정된다. 발현은 또한 단백질 수준에서, 즉 본원에 제공된 유전자 산물에 의해 코딩되는 펩티드의 수준 또는 그 펩티드의 활성을 측정함으로써 결정된다. 그러한 방법은 당업계에 공지되어 있고, 이에는 예를 들어 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 대한 항체에 기초한 면역검정이 포함된다. 임의의 생물학적 물질을 사용하여 단백질 또는 그 단백질의 활성의 검출/정량화를 행할 수 있다. 대안적으로, 분석하고자 하는 각 단백질의 활성에 따라 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 활성을 결정하기 위해 적당한 방법을 선택할 수 있다.

[0163] 대상은 바람직하게 포유동물이다. 포유동물은 예를 들어, 인간, 비인간 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말 또는 소이다. 대상은 전형적으로 여성 인간 또는 남성 인간이다. 대상은 이전에 암을 가지는 것으로 진단되었고, 가능하게는 이미 암에 대해 치료를 받았을 수 있다. 대안적으로, 대상은 이전에 암을 가지는 것으로 진단되지 않았을 수 있다. 본 발명은 암에 대한 위험에 처한 모든 환자들에 대해 유용하다. 각 유형의 암이 그 자체의 위험 요소의 군을 가지나, 암을 발병할 위험은 연령, 성, 인종 및 개인 및 가족 병력에 따라 증가한다. 다른 위험 인자는 대체로 생활방식 선택과 관련되나, 특정 감염, 직업적 노출 및 일부 환경 인자가 또한 암 발병과 관련될 수도 있다.

[0164] 암의 진단은 전형적으로 조사 시에 질량의 확인을 통해 행해지나, 그것은 또한 방사선학적 진단 또는 초음파와 같은 다른 수단을 통해서도 행해질 수 있다. 치료는 전형적으로 세포재생 수술, 및 그에 이은 과 같은 항신생물제, 예컨대 도세탁셀, 비노렐빈, 젬시타빈, 카페시타빈, 또는 시클로포스파미드, 메토트렉세이트 및 플루오로우라실의 조합물; 시클로포스파미드, 독소루비신 및 플루오로우라실의 조합물; 독소루비신 및 시클로포스파미드의 조합물; 독소루비신 및 시클로포스파미드와 파클릭탁셀의 조합물; 독소루비신, 및 그에 이어 CMF; 또는 시크로포스파미드, 에피루비신 및 플루오로우라실의 조합을 이용한 처리를 통해 이루어진다. 또한, 많은 환자들이 방사선 요법을 필요로 할 것이다.

[0165] 본 발명에 따라 수행되는 면역검정은 동질성 검정 또는 이질성 검정일 수 있다. 동질성 검정에서, 면역학적 반응은 통상 특이적 항체(예를 들어, PD-1 폴리펩티드), 표지된 분석물 및 관심 샘플과 관련된다. 표지로부터 생기는 신호는 표지된 분석물에 항체가 결합할 때, 직접적으로 또는 간접적으로 변형된다. 면역학적 반응 및 그의 정도의 검출 모두는 동질성 용액에서 수행된다. 이용될 수 있는 면역화학적 표지에는 유리 라디칼, 방사성동위원소, 형광성 염료, 효소, 박테리오파지 또는 보조 효소가 포함된다.

[0166] 이질성 검정 접근법에서, 시약은 통상 샘플, 항체, 및 검출가능한 신호를 생산하는 수단이다. 상기 기재된 바와 같은 샘플을 사용할 수 있다. 항체를 일반적으로 지지체, 예컨대 비이드, 플레이트 또는 슬라이드 상에 고정화하여, 액체상에서 항원을 함유하는 것으로 의심되는 시편과 접촉시킨다. 이어서, 지지체를 액체상으로부터 분리하고, 지지체상 또는 액체상을 그러한 신호를 생산하는 수단을 이용하는 검출가능한 신호에 대해 조사한다. 신호는 샘플 내 분석물의 존재와 관련된다. 검출가능한 신호를 생산하는 수단은 방사능 표지, 형광성 표지 또는 효소 표지의 사용을 포함한다. 예를 들어, 검출하고자 하는 항원이 두 번째 결합 부위를 포함하는 경우, 그 부위에 결합하는 항체는 검출가능한 기에 접합되어 분리 단계 전에 액체상 반응 용액에 첨가될 수 있다. 고체 지지체에서의 검출가능한 기의 존재는, 시험 샘플 내 항원의 존재를 가리킨다. 적당한 면역검정의 예는 방사능면역검정, 면역형광 방법 또는 효소-연결 면역검정이다.

[0167] 당업자는 본원에 기재된 방법을 수행하는데 유용할 수 있는, 수많은 특정 면역검정 형식 또는 이의 변형법들에 익숙할 것이다. 일반적으로, 문헌 [E. Maggio, Enzyme-Immunoassay(1980)(CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.)]를 참고하고; 또한 미국 특허 제4,727,022호(Skold 등; 발명의 명칭: "Methods for Modulating Ligand-

Receptor Interactions and their Application"), 미국 특허 제4,659,678호(Forrest 등; 발명의 명칭: "Immunoassay of Antigens"), 미국 특허 제4,376,110호(David 등; 발명의 명칭: "Immunometric Assays Using Monoclonal Antibodies"), 미국 특허 제4,275,149호(Litman 등; 발명의 명칭: "Macromolecular Environment Control in Specific Receptor Assays"), 미국 특허 제4,233,402호(Maggio 등; 발명의 명칭: "Reagents and Method Employing Channeling)", 및 미국 특허 제4,230,767호(Boguslaski 등; 발명의 명칭: "Heterogenous Specific Binding Assay Employing a Coenzyme as Label")를 참고한다. 항체를 공지된 기법, 예컨대 석출에 따라, 진단 검정에 적당한 고체 지지체(예를 들어, 라텍스 또는 폴리스티렌과 같은 물질로부터 형성된 비이드, 플레이트, 슬라이드 또는 웰)에 접합한다. 본원에 기재된 항체를 마찬가지로 공지된 기법에 따라 검출가능한 기, 예컨대 방사성표지(예를 들어, 35 S, 125 I, 131 I), 효소 표지(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제), 및 형광성 표지(예를 들어, 플루오레신)에 접합할 수 있다.

[0168] 본원에 기재된 방법을 수행하기 위한 진단 키트는 수많은 방식들로 생산된다. 한 실시양태에서, 진단 키트는 (a) 고체 지지체에 접합된 항체(예를 들어, PD-1 폴리펩티드) 및 (b) 검출가능한 기에 접합된 본 발명의 제2 항체를 포함한다. 시약은 또한 보강제, 예컨대 완충제 및 단백질 안정화제, 예를 들어 포도당 등을 포함할 수 있다. 진단 키트는 필요한 경우, 검출가능한 기가 한 구성원(예를 들어, 효소 기질)인 신호-산출 시스템의 다른 구성원들, 시험에 있어 배경 간섭을 감소시키는 제제, 조절 시약, 시험을 수행하기 위한 장치 등을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 시험 키트는 (a) 항체, 및 (b) 검출가능한 기에 접합된 항체에 대한 특이적 결합 파트너를 포함한다. 마찬가지로 상기와 같은 보강제가 포함될 수 있다. 시험 키트는 임의의 적당한 방식으로, 전형적으로는 시험을 수행하기 위한 인쇄된 사용설명서 시트와 함께 단일 용기 내에 모든 요소들과 함께 팩키징될 수 있다.

[0169] 본 발명은 부분적으로는 하기 실시예에 기재된 실험에 기초한다. 이 실시예는 본 발명을 설명하기 위해 제공된 것으로, 본 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

실 시 예

[0170] **실시예 1: 항-PD-L1 항체를 이용한, 만성 감염된 마우스에서의 PD-1 경로의 억제**

[0171] 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV)의 각종 균주들로 감염된 마우스를 사용하여, $CD8^+$ T 세포 기능에 대한 만성 바이러스 감염의 영향을 연구하였다. LCMV 암스트롱 균주는 8일 이내에 제거되는 급성 감염을 유발하고, 매우 기능적인 휴지 기억 $CD8^+$ T 세포의 긴 수명의 집단을 남긴다. 대조적으로, LCMV Cl-13 균주는 3개월까지 지속되는 바이러스혈증을 그 특징으로 하는 숙주 내 지속 감염을 확립한다. 바이러스는 일부 조직에 무기한으로 남고, 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포가 기능적으로 손상되게 된다. D^bNP396-404 $CD8^+$ T 세포는 물리적으로 제거되는 반면, D^bGP33-41 및 D^bGP276-286 $CD8^+$ T 세포는 지속되나, 항-바이러스 사이토킨, 예컨대 IFN-γ 및 TNF-α를 증식하거나 분비하는 능력을 소실한다.

[0172] C57BL/6 마우스를 미 국립 암 연구소(미국 매릴랜드주 프레더릭 소재)로부터 구매하였다. 마우스에 $2x10^6$ pfu의 LCMV-Cl-13을 정맥내 감염시켰다. 감염 당일 및 감염 다음 날에 PBS 내 500 ㎍의 GK1.5를 주사함으로써 CD4 결핍을 수행하였다. 2×10^5 pfu의 LCMV 암스트롱을 마우스에 복강내 감염시킴으로써, LCMV 면역 마우스를 발생시킨다.

[0173] 유전자 어레이 분석을 FACS로 정제된 나이브 D^bGP33-41 특이적 P14 형질전환 $CD8^+$ T 세포, LCMV 암스트롱 면역 마우스로부터 유래된 D^bGP33-41 특이적 기억 $CD8^+$ T 세포, 및 $CD4^+$ 결핍 LCMV Cl-13 감염 마우스로부터 유래된 D^bGP33-41 특이적 또는 D^bGP276-286 특이적 $CD8^+$ T 세포에 대해 수행하였다. RNA 단리 및 유전자 어레이 분석을 문헌 [Kaech 등, (Cell 111:837-51, 2002)]에 기재된 바대로 수행하였다. PD-1 mRNA는 기억 $CD8^+$ T 세포에 비해, 소진된 $CD8^+$ T 세포에서 고도로 발현되었다(도 1a). 또한, PD-1은 LCMV Cl-13 감염 마우스 내 $CD8^+$ T 세포의 표면에 발현되었으나, LCMV 암스트롱의 제거 후에 $CD8^+$ T 세포의 표면에 존재하지 않았다(도 1b). 만성 감염된 마우스는 또한 PD-1, PD-L1의 리간드 중 하나를, 대부분의 림프구, 및 APC에서 비감염 마우스에 비해 보다 높은 수준으로 발현하였다. 이에 따라, 바이러스 항원 지속성 및 $CD8^+$ T 세포 소진은 PD-1 발현에서의 유도와

동시에 일어난다.

[0174] PD-1/PD-L1 경로의 차단이 T 세포 기능을 복원하고 만성 LCMV 감염 동안에 바이러스 조절을 증진할 수 있다는 가설을 시험하기 위해, PD-1/PD-L1 보조 억제 경로를 αPD-L1 차단 항체를 이용하여 만성 LCMV 감염 동안에 붕괴하였다. PD-L1에 대한 차단 단클론성 항체를, LCMV Cl-13(200 ㎍의 래트 항-마우스 PD-L1 IgG2b 단클론성 항체(클론 10F.5C5 또는 10F.9G2))로 감염된 마우스에 대해 3일마다 감염후 23 내지 37일에 복강내 투여하였다. 37일째에, 처리되지 않은 대조군에 비해, 처리된 마우스에서 대략 2.5 배 더 많은 D^bNP396-404 특이적 $CD8^+$ T 세포 및 3배 더 많은 D^bGP33-41 특이적 $CD8^+$ T 세포들이 있었다(도 2a). 비장 내 CD4+ T 세포의 수가 처리된 마우스 및 처리되지 않은 마우스 모두에 있어 대략 동일하였기 때문에(~6×10^4 CD4+ T 세포의 IA^bGP61-80/비장), 증식 유도는 $CD8^+$ T 세포에 대해 특이적이었다.

[0175] CD8+ T 세포 증식의 증가에 부가하여, PD-1 신호 전달의 억제는 또한 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포 내 항-바이러스 사이토킨의 증가된 생산을 초래하였다. 8가지 상이한 CTL 에피토프에 대한, CD8+ T 세포에 의한 IFN-γ, TNF-α의 생산을 결정하였다. 조합 반응은 처리되지 않은 마우스에 비해, 처리된 마우스에서 2.3배 더 높았다(도 2b 및 2c). TNF-α 생산 세포의 빈도의 2배 증가가 또한 처리 후에 관찰되었다(도 2d). 바이러스 제거는 또한 바이러스가 처리된 마우스의 혈청, 비장 및 간에서 제거됨에 따라 가속화되었다. 감소된 바이러스 역가가 또한 처리된 마우스에서 감염후 37일까지(처리 개시 후 14일에) 폐 및 신장(~10배)에서 관찰되었다. 그러나, 처리되지 않은 마우스는 이 모든 조직들에서 상당한 수준의 바이러스를 나타냈다(도 2e). 혈청 및 조직 균질액(homogenate) 내의 바이러스 역가를, 문헌 [Ahmed 등(J. Virol. 51:34-41, 1984)]에 기재된 바와 같이, 원숭이 신장 유래 섬유아세포(Vero cells)를 이용하여 결정하였다. PD-1 억제제가 CD8+ T 세포 증식 및 바이러스 제거를 증가시킴을 보여주는 결과는, PD-1 신호 전달의 억제가 CD8+ T 세포 기능을 복원시킴을 가리킨다. 또한, PD-1 신호 전달의 억제는 또한 비장 내 LCMV 특이적 항체 분비 세포의 수가 또한 처리 후에 증가됨(> 10배)에 따라, B 세포 반응을 증진시켰다.

[0176] $CD4^+$ T 세포는 CD8+ T 세포 반응의 발생 및 유지에 있어 핵심적 역할을 한다. 이와 관련하여, CD4+ T 세포의 부재 하에서 플라이밍된 CD8+ T 세포(소위 "무력(helpless)" CD8+ T 세포)는 정상적 면역 반응을 취할 수 없다. 또한, 만성 LCMV 감염은 CD4+ T 세포의 부재 하에 더욱 심하다. 따라서, LCMV-Cl-13 감염 동안에 발생된 무력 T 세포는 CD4+ T 세포의 존재 하에 발생된 T 세포보다 더욱 더 심한 기능적 손상을 나타낸다. D^bNP396-404 특이적 $CD8^+$ T 세포는 비검출가능한 수준으로 제거되고, D^bGP33-41 및 D^bGP276-286 $CD8^+$ T 세포는 IFN-γ 및 TNF-α를 분리하는 능력을 완전히 소실한다.

[0177] $CD4^+$ T 세포는 LCMV-Cl-13 감염 시에 결핍되고, 마우스를 감염후 46 내지 60일에 항-PD-L1 항체 처리법으로 처리하였다. LCMV-특이적 $CD4^+$ T 세포는 처리 전 또는 후에 세포내 IFN-α 염색에 의해 검출가능하지 않았다. 처리 후에, 처리된 마우스는 처리되지 않은 대조군 마우스보다 비장 내 대략 7배 더 많은 D^bGP276-286 $CD8^+$ T 세포 및 4배 더 많은 D^bGP33-41 $CD8^+$ T 세포를 가졌다(도 3a). 비장 내의 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 수도 또한 증가하였다(도 3b). 처리된 마우스에서의 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 이러한 증가는 BrdU 도입에 의해 검출되는 바, 증식에 증가에 기인하였다. 처리되지 않은 마우스에서는 43%의 D^bGP276-286 $CD8^+$ T 세포가 중간 수준의 BrdU을 도입하였고, 2%가 높은 수준의 BrdU을 도입하였으며, 반면 처리된 마우스에서는 D^bGP276-286 $CD8^+$ T 세포의 50%가 중간 수준의 BrdU를 도입하였고, 37%가 높은 수준의 BrdU를 도입하였다. 처리하는 동안에 마시는 물에 1 mg/ml BrdU을 도입함으로써 BrdU 분석을 수행하였고, 제조업체(BD 바이오사이언시스(BD Biosciences), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)의 프로토콜에 따라 염색을 수행하였다. 또한, 처리된 마우스는 세포 사이클-관련 단백질 Ki67을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 보다 높은 백분율로 함유하였다(처리되지 않은 마우스 경우에는 19%인 것에 비해 60%임, 도 3c). PBMC 내 $CD8^+$ T 세포의 처리에 대한 반응은 높은 수준의 $CD8^+$ T 세포 확장을 갖는 마우스에 제한되었다.

[0178] PD-1 억제는 또한 무력의 소진된 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포에서 항-바이러스 사이토킨 생산을 증가시켰다. 처리 후, IFN-γ를 생산하는 D^bGP33-41 및 D^bGP276-286 $CD8^+$ T 세포의 수가 현저히 증가하였으나(도 4a), 보다

많은 수의 $D^bNP396-404$, $K^bNP205-212$, $D^bNP166-175$ 및 $D^bGP92-101$ 특이적 $CD8^+$ T 세포가 또한 처리된 마우스에서 검출되었다(도 4a). 처리된 마우스로부터의 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포의 50%가 IFN-γ를 생산할 수 있는 반면, 대조군의 처리되지 않은 마우스는 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포의 20%가 IFN-γ를 생산할 수 있다(도 4b). 그러나, 처리된 마우스로부터의 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포에 의해 생산되는 IFN-γ 및 TNF-α의 수준은 완전 기능적 $D^bGP276-286$ 특이적 기억 세포보다 낮았다(도 4c).

[0179] PD-1 억제는 또한 무력의 소진된 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 세포용해 활성을 증가시켰다. 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 체외 세포용해 활성을 처리 후에, ^{51}Cr 방출 검정을 이용하여 검출하였다(Wherry 등, 2003. J. Virol. 77:4911-27). 바이러스 역가는, 처리되지 않은 마우스에 비해, 처리 2주 후에 대략 비장에서는 3배, 간에서는 4배, 폐에서는 2배, 또한 혈청에서는 2배만큼 감소하였다(도 4e).

[0180] 그러므로, 이 결과는 PD-1 경로의 차단이 만성 바이러스 감염에 대한 CTL 말초 내인성을 파괴한다는 것과, $CD4^+$ T 세포가 결핍된 소진된 $CD8^+$ T 세포가 비가역적으로 비활성화되지 않는다는 것을 입증한다.

[0181] **실시예 2: 항-바이러스 백신 및 PD-1 억제제의 투여**

[0182] 지속 감염 동안의 T 세포를 증강시키는 한 접근법이 치료적 백신 접종이다. 이 접근법에 대한 근본 이유는, 내인성 항원이 만성 바이러스 감염 동안에 최적 또는 면역원성 방식으로 제시되지 않을 수 있다는 것과, 백신 형태의 항원을 제공하는 것이 바이러스-특이적 T 및 B 세포에 더욱 효과적인 자극을 제공할 수 있다는 것이다. 만성 LCMV 모델을 이용하여, 마우스에 치료적 백신(VVGP33)으로서 LCMV GP33 에피토프를 발현하는 재조합 우두 바이러스를 투여하였고, 이는 일부 만성 감염된 마우스에서 CD8+ T 세포 반응의 최적 증진을 초래하였다. 치료적 백신을 처방받은 9마리 만성 감염된 마우스 중 4마리가 양성 반응을 나타낸 반면, 대조군 마우스에서는 아무 것도 GP33에 대항한 면역 반응의 유의적 증가를 가지지 않았다. 이 치료적 백신 접종을 PD-L1 억제제와 조합한 경우, LCMV 특이적 T 세포 반응이 어느 하나의 단독 처리에 비해 더 큰 수준으로 증강되었고, 조합 처리의 효과는 부가 그 이상이었다.

[0183] **실시예 3: PD-1 RNAi를 이용한, 만성 감염된 마우스 내의 PD-1 경로의 억제**

[0184] RNA 간섭(RNAi)은 포유류 세포에서 유전자 발현을 침묵화할 수 있다. 긴 이중 나선의 RNA(dsRNA)가 세포에 도입되고, 그 후 특이적 mRNA 분자 또는 mRNA의 작은 군을 표적으로 하는 보다 작은 침묵화 RNA(siRNA)로 가공된다. 이 기술은 항체가 기능적이지 않은 상황에 특히 유용하다. 예를 들어, RNAi는 독특한 스플라이스 변이체가 가용성 형태의 PD-1 및 CTLA-4를 생산하는 상황에 이용될 수 있다.

[0185] PD-1 침묵화 RNA는 상업적으로 입수가능한 siRNA 발현 벡터, 예컨대 p*사일런서*(p*Silencer*)™ 발현 벡터 또는 아데노바이러스 벡터(앰비온(Ambion), 미국 텍사스주 오스틴 소재)에 삽입된다. 이어서, 이 벡터를 체내 또는 체외에서 표적의 소진된 T 세포와 접촉된다(실시예 4 참고).

[0186] **실시예 4: 소진된 T 세포의 체외 재생**

[0187] 바이러스-특이적 소진된 $CD8^+$ T 세포를, 자기 비이드 또는 밀도 원심분리를 이용하여 LCMV-Cl-13 만성 감염된 마우스로부터 단리한다. 트랜스펙션된 $CD8^+$ T 세포를, PD-L1, PD-L2 또는 PD-1을 표적으로 하는 단클론성 항체와 접촉시킨다. 실시예 1에 기재된 바와 같이, PD-1 경로의 억제는 $CD8^+$ T 세포의 재생을 초래한다. 따라서, 예를 들어 CD8+ T 세포 증식 및 사이토킨 생산의 증가가 있다. 이 재생된 $CD8^+$ T 세포를 감염된 마우스에 재도입하고, 바이러스 부하를 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정한다.

[0188] **실시예 5: 신규 $CD8^+$ T 세포 재생자(rejuvenator) 화합물의 시험관내 스크리닝**

[0189] PD-1 경로를 조절하는 화합물은, 만성 바이러스 감염으로부터 비롯되는 $CD8^+$ T 세포 소진을 역전시키는 그 능력에 기초한 체내 및 체외 스크리닝 검정으로 확인될 수 있다.

[0190] 소진된 $CD8^+$ T 세포는 LCMV-Cl-13으로 만성 감염된 마우스로부터 유래되고, 그 후 시험 화합물과 접촉된다. 접촉된 T 세포로부터 방출된 항-바이러스 사이토킨(예를 들어, IFN-γ 또는 TNF-α)의 양을 예를 들어, ELISA 또

는 기타 정량 방법에 의해 측정하고, 시험 화합물과 접촉하지 않은 소진된 T 세포로부터 방출된 항-바이러스 사이토킨이 있는 경우, 그것의 양과 비교한다. 처리되지 않은 세포에 의해 방출된 항-바이러스 사이토킨의 양과 대비한, 처리된 세포에 의한 그러한 양의 증가는, 화합물이 T 세포 활성을 조절하는데 유용한 PD-1 억제제인 것으로 확인시킨다.

[0191] **실시예 6: 신규 $CD8^+$ T 세포 재생자 화합물의 생체내 스크리닝**

[0192] 소진된 $CD8^+$ T 세포는 LCMV-Cl-13으로 만성 감염된 마우스로부터 유래된다. 시험 화합물을 감염된 마우스에 정맥내 투여한다. 처리된 마우스 및 처리되지 않은 마우스의 혈청으로 방출된 항-바이러스 사이토킨(예를 들어, IFN-γ 또는 TNF-α)의 양을 예를 들어, ELISA 또는 기타 정량 방법에 의해 측정하여 비교한다. 처리되지 않은 마우스 내 혈청에서 발견되는 항-바이러스 사이토킨의 양과 대비한, 처리된 마우스 내 혈청에서 발견되는 항-바이러스 사이토킨의 양의 증가는, 시험 화합물이 PD-1 억제제인 것으로 확인시킨다. 대안적으로, 바이러스 역가(예를 들어, 혈청 바이러스 역가)를 시험 화합물의 처리 전 및 후에 결정할 수 있다.

[0193] **실시예 7: 지속 HCV 감염의 면역 처리법에 대한 모델로서의 침팬지.**

[0194] 침팬지는 인간에 있어 HCV 지속의 모델을 제공한다. 긴 수명의 바이러스 지속성을 초래하는 T 세포 면역원성의 결함은 모두 HCV-특이적 CD4+ T 헬퍼 세포의 결함 및 손상 또는 변경된 CD8+ T 이펙터 세포 활성을 포함한다. 지속 감염된 침팬지를 CTLA-4, PD-1 또는 양자의 조합에 대한 항체로 처리한다. 재조합 구조적 및 비구조적 HCV 단백질을 이용한 백신 접종과 조합된 억제 경로의 봉쇄의 효능, 및 그러한 전략이 바이러스-특이적 기억 T 세포의 빈도 및 장수를 증진시킬 수 있는지의 여부를 결정한다. T 세포 면역원성의 결함은 지속 감염된 인간 및 침팬지에서 독점적으로 HCV-특이적이다. 감염된 침팬지의 혈액 및 간을 CTLA-4, PD-1, BTLA 및 이들의 리간드의 발현, 및 Treg 세포의 존재에 대해 조사한다. 이어서, 항바이러스 활성은, 이 분자를 통해 신호 전달을 차단하는 인간화 단클론성 항체를 침팬지에게 전달함으로써 복원될 수 있다.

[0195] 지속 감염된 침팬지를 인간화 αCTLA-4 항체(MDX-010, 메다렉스(Medarex)) 또는 αPD-1 항체로 처리한다. MDX-010의 초기 용량은 0.3 mg/kg이고, 2주 후 1.0 mg/kg이며, 이어서 3주 간격으로 3, 10, 30 mg/kg이다. 항체를 이용하여 보조 억제 분자를 처리한 후, 체액성 및 세포성 면역 반응뿐만 아니라 HCV RNA 부하가 결정될 것이다. 샘플을 1, 2, 3, 5 및 8주에 수집한 후, 월 간격으로 수집한다. 샘플은 1) 트랜스아미나제, 자기항체, HCV에 대한 중성화 항체, 및 사이토킨 반응의 분석을 위한 혈청, 2) 바이러스 부하 및 게놈 진화를 위한 혈장, 3) 면역원성, 보조자극/억제 수용체 발현 및 기능의 시험관내 측정을 위한 PBMC, 4) 간내 림프구 및 RNA의 단리를 위한 프레쉬(비고정) 간, 및 5) 조직학 및 면역조직화학 분석을 위한 고정화된 (포르말린/파라핀 포매) 간을 포함한다. 구역 림프절을 또한 2 또는 3 시점에 수집하여, 면역조직화학 및 분자 기법에 의해 보조 억제 분자 및 스플라이스 변이체의 발현을 평가한다. 이 치료법의 효능 및 안정성을 평가하기 위한 검정이 또한 본원에 기재된 바대로 수행될 것이다.

[0196] HCV 항원을 이용한 백신 접종이 PD-1에 대한 항체의 치료적 효과를 증강시키는지의 여부를 결정하기 위해, 침팬지를 하기와 같이 처리한다: 1) 0, 4 및 24주에서 재조합 엔벨로프 당단백질 E1 및 E2(MF59 보강제 내) 및 기타 단백질(코어 + ISCOMS와 함께 제형된 NS 3, 4 및 5)을 이용한 근육내 면역화; 2) 1)에 사용되나 αCTLA-4 항체(백신이 주어지는 경우, 각각 30 mg/Kg 체중, 0, 4 및 24주에 투여)와 함께 동시 투여되는 백신을 이용한 근육내 면역화; 3) αPD-1(또는 BTLA) 항체로 CTLA-4 항체를 치환한 것을 제외하고는 2)와 동일함; 4) CTLA-4 및 PD-1 (또는 BTLA) 항체의 조합을 백신에 부가하여 사용하는 것을 제외하고는 군 2 및 3과 동일함. HCV-특이적 T 및 B 세포 반응을 1년간의 기간 동안 면역화한 후에 월 간격으로 모니터링한다.

[0197] 이 분석에서의 HCV-오량체+ 및 총 T 세포에 대해 조사된 마커에는 차별화 마커(예를 들어 CD45RA/RO, CD62L, CCR7 및 CD27), 활성화 마커(예를 들어 CD25, CD69, CD38 및 HLA-DR), 생존/증식 마커(예를 들어 bcl-2 및 Ki67), 세포독성 잠재적 마커(예를 들어 그랜자임 및 퍼포린), 및 사이토킨 수용체 마커(CD122 및 CD127)가 포함된다. 케모카인 IP-10의 예비처리 수준과 PEG IFN-γ/리바비린에 대한 반응 간에 흥미로운 상관관계가 있다. IP-10 수준을 측정하여, 음성 제어 경로 또는 HCV-특이적 T 세포 반응과 IP-10 수준 간의 잠재적 상관관계를 조사한다. PBMC에서의 억제 수용체 및 리간드의 발현을 유세포분석에 의해 수행한다.

[0198] **실시예 8: 반응성 림프계 조직에서의 PD-1 면역염색**

[0199] *재료*

[0200] 케이스 물질을 브리엄 앤드 워먼즈 호스피털(Brigham & Women's Hospital)(미국 메사츄세츠주 보스톤 소재)로부

터 기관 정책에 따라 입수하였다. 모든 진단은 세계 보건 기구 림프종 분류계(Jaffe ES 등, 2001)에 기재된 조직학적 및 면역표현형 특성에 기초하였고, 모든 경우들에서 진단 물질을 혈액병리학자에 의해 검토하였다.

[0201] *면역염색*

[0202] PD-1에 대한 면역검색을, 전술된 항-인간 PD-1 단클론성 항체(2H7; 5)를 이용하여, 10 mM 시트르산염 완충액(pH 6.0)에서 마이크로파 항원 회복을 행한 후의 포르말린-고정 파라핀 포매 조직 섹션에, 문헌 [Jones D 등, 1999; Dorfman DM 등, 2003]에 전술된 바와 같이, 표준 간접 아비딘-비오틴 호스래디쉬 퍼옥시다제 방법 및 디아미노벤지딘 발색법을 이용하여, PD-1에 대한 면역염색을 수행하였다. 신생물성 세포의 25% 이상이 양성 염색을 나타낸 경우, 그 케이스를 PD-1에 대해 면역 반응성이 있는 것으로 간주하였다. PD-1 염색을, 연구한 모든 케이스들에 대해 동일한 단백질 농도로 희석된 마우스 IgG 이소타입 대조 항체의 것과 비교하여, 염색 특이성을 확인하였다.

[0203] PD-1에 대한 단클론성 항체 2H7을 사용하여, 반응성 림프계 조직, 흉선 및 B 세포 및 T 세포 림프증식성 장애의 일정 범위의 케이스들에서의 포르말린-고정, 파라핀-포매 시편을 염색하였다. 여포성 증식을 포함한, 반응성 변화를 나타내는 편도의 시편에서, 배 중심 내 우세하게 작은 림프구의 하위군이 PD-1에 대한 세포질 염색을 나타냈고, 여포간 T 세포 구역 내에 빈번하지 않은 PD-1-양성 세포가 나타났다. 배 중심에서의 PD-1 염색 패턴은 pan-T 세포 마커인 CD3에 대한 항체에서 보여지는 패턴과 실질적으로 동일하였고, 반면 pan-B 세포 마커인 CD20에 대한 항체는 매우 대부분의 배 중심 B 세포를 염색시켰다. 반응성 림프절 및 비장의 조직학적 구획에서도 유사한 결과가 나타났다. 성장 마우스의 흉선에서는 PD-1 염색이 관찰되지 않았다.

[0204] **실시예 9: B 세포 및 T 세포 림프증식성 장애의 파라핀 포매 조직 구획에서의 PD-1 면역염색**

[0205] PD-1 발현에 대한 일정 범위의 B 세포 및 T 세포 림프증식성 장애들을 연구하였고; 그 결과가 표 1에 요약되어 있다. 여포성 림프종 6 케이스 및 버킷(Burkitt) 림프종 7 케이스를 비롯한 여포성 기원의 수많은 B 세포 비호지킨 림프종을 포함한 일정 범위의 림프증식성 장애뿐만 아니라, B 전구 림프모구성 백혈병/림프모구성 림프종의 대표적 경우를 비롯한, B 세포 림프증식성 장애의 42 케이스를 PD-1 발현에 대해 시험하였다. B 세포 림프증식성 장애는 모두 PD-1에 대한 염색을 나타내지 않았다. 일부 케이스들에서, 비신생물성 반응성 림프계 조직이 존재하였고, 편도 및 상기 언급된 기타 반응성 림프계 조직에서 보여지는 바와 같이 PD-1 염색 패턴을 나타냈다.

[0206] 유사하게, 정통적 호지킨 림프종 11 케이스 및 림프구 우세형 호지킨 림프종 14 케이스를 포함한 호지킨 림프종 25 케이스에서, 신생물성 세포는 PD-1에 대한 염색을 나타내지 않았다. 흥미롭게도, 림프구 우세형 호지킨 림프종의 14 케이스 모두에서, 신생물성 CD20-양성 L&H 세포 주위의 T 세포는, 림프구 우세형 호지킨 림프종 내 CD57+ T 세포에 대해 나타난 염색 패턴과 유사하게, PD-1에 대한 면역반응성이었다, 이 PD-1-양성 세포는 존재하는 총 CD3+ T 세포 집단의 하위군이었다.

[0207] 일정 범위의 T 세포 림프증식성 장애를 PD-1의 발현에 대해 연구하였고; 그 결과가 표 1에 요약되어 있다. T 전구세포 림프모구성 백혈병/림프모구성 림프종의 미숙 T 세포의 신생물의 케이스는, T 세포 전림프구성 백혈병, 말초 T 세포 림프종, 비특정화 퇴행성 대세포 림프종 및 성인 T 세포 백혈병/림프종의 케이스들을 포함한, 말초 후흉선 T 세포의 신생물에서와 같이, PD-1에 대해 음성이었다. 대조적으로, 혈관면역아세포성 림프종의 19 케이스 모두가 pan-T 세포 마커, 예컨대 CD3에 대해 또한 면역반응성인 PD-1-양성 세포의 포커스를 포함하였다. PD-1-양성 세포는 혈관면역아세포성 림프종의 한 특징적 특성인 확장된 CD21+ 여포성 수지상 세포(FDC) 네트워크의 포커스에서 일관되게 발견되었다.

표 1

[0208] 림프증식성 장애에서의 PD-1 면역염색

	PD-1 면역염색
B 세포 LPD	0/42*
B-LL/LL	0/3
CLL	0/4
MCL	0/4
FL	0/6
MZL	0/3
HCL	0/3

DLBCL	0/6
BL	0/7
LPL	0/3
MM	0/3
호지킨 림프종	0/25
정통 호지킨 림프종	0/11
결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종	0/14**
T 세포 LPD	18/55
T-LL/LL	0/5
T-PLL	0/3
AIL	19/19
PTCL, 비특정화됨	0/14
ATCL	0/12
ATLL	0/3

[0209] 약어: B-LL/LL - B 전구세포 림프모구성 림프종/림프모구성 백혈병; CLL - 만성 림프구성 백혈병; MCL - 외투세포 림프종; FL - 여포성 림프종; MZL - 변연부 림프종; HCL - 유모(hairy) 세포 백혈병; DLBCL - 미만성 대세포의 B 세포 림프종; BL - 버킷 림프종; LPL - 림포형질세포성 림프종; MM - 다발성 골수종; T-LL/L - T 전구림프모구성 백혈병/림프모구성 림프종; T-PLL - T 세포 전림프구 백혈병; AIL - 혈관면역아세포성 림프종; PTCL - 비특정화된 말초 T 세포 림프종; ALCL - 퇴행성 대세포 림프종; ATLL - 성인 T 세포 백혈병/림프종.

[0210] * 면역 반응성 케이스의 수/케이스의 총수

[0211] ** PD-1-양성 세포는 14 케이스 모두에서 신생물성 L&H 세포 주위에 로제트를 형성함.

[0212] **실시예 10: HIV-특이적 인간 CD8 T 세포에서의 PD-1 발현 연구를 위한 일반 방법**

[0213] 하기 방법들을 이용하여, 실시예 11 내지 14에 상세히 설명되는 실험을 수행하였다.

[0214] *연구 대상*

[0215] 만성 클레이드 C HIV-1 감염을 갖는 연구 참여자를 맥코드 병원(McCord Hospital)(남아프리카 더번 소재), 및 세인트 매리 병원(St. Mary's Hospital)(남아프리카 마리안힐 소재)에 있는 외래 환자 클리닉에서 모집하였다. 말초혈을 이 코호트에서의 65명 대상으로부터 입수하였고, 이들 모두 분석 시에 항레트로바이러스 요법에 나이브인 자들이었다. 10개의 구축된 I류 오량체(이하 참조)에 부합하는 자체의 발현된 HLA 대립유전자에 기초하여 포함되는 대상들을 선별하였다. 코호트의 중위 바이러스 부하는 42,800 HIV-1 RNA 복사체(copies)/ml 혈장 (범위: 163 내지 750,000)였고, 중위 절대 CD4 계수는 362(범위: 129 내지 1179)이었다. 감염 기간에 관한 정보는 입수가능하지 않았다. 모든 대상들은 지방 임상시험심사위원회에 의해 승인된 연구 동의서를 제출하였다.

[0216] *PD-1 및 PD-L1 항체의 구축*

[0217] 인간 PD-L1에 대한 단클론성 항체(29E.2A3, 마우스 IgG2b) 및 PD-1에 대한 단클론성 항체(EH12, 마우스 IgG1)를 전술된 바와 같이 제조하였고, 이는 PD-1:PD-L1 상호작용을 차단하는 것으로 나타났다.

[0218] *MHC I류 오량체*

[0219] 전술된 바와 같이 합성된 10개의 HIV MHC I류 오량체(Altman JD 등, 1996)를 본 연구를 위해 사용하였다: A*0205 GL9(p24, GAFDLSFFL; 서열 번호 1), A*3002 KIY9(히테그라세(Integrase), KIQNFRVYY; 서열 번호 2), B*0801 DI8(p24, DIYKRWII; 서열 번호 3), B*0801 FL8(Nef, FLKEKGGL; 서열 번호 4), B*4201 RM9(Nef, RPQVPLRPM; 서열 번호 5), B*4201 TL9(p24, TPQDLNTML; 서열 번호 6), B*4201 TL10(Nef, TPGPGVRYPL; 서열 번호 7), B*4201 YL9(RT, YPGIKVKQL; 서열 번호 8), B*8101 TL9(p24, TPQDLNTML; 서열 번호 9), 및 Cw0304 YL9(p24, YVDRFFKTL; 서열 번호 10). A*0205, A*3002 및 Cw*0304를 발현하는 플라스미드가 다행히도 문헌[Drs. Eugene Ravkov and John Altman, NIH Tetramer Core Facility(미국 조지아주 아틀란타 소재)]에 의해 제공되었다.

[0220] *HLA I류 오량체 염색 및 표현형 분석*

[0221] 새로 단리된 말초혈 단핵 세포(PBMC, 5십만개)를 오량체로 20분 동안 37℃에서 염색하였다. 이어서, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 1회 세정하였고, 펠렛화하였으며, 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC)-접합 항-CD8(벡톤 딕킨슨(Becton Dickinson)), 파이코에리트린-접합 항-PD-1(클론 EH12), 및 바이어프로브(ViaProbe)(벡톤 딕킨슨)로 직접 염색하였다. 세포를 실온에서 20분 동안 항온 처리하고, PBS로 1회 세정하고, 1% 파라포름알데히드가 있는 200 ㎕ PBS에 재현탁시키고, 형광-활성화된 세포 분류기(FACSCalibur, 벡톤 딕킨슨)에서 습득하였다. 최소 100,000 발생건이 FACSCalibur에서 습득되었다.

[0222] *CFSE 증식 검정*

[0223] 백만개의 새로 단리된 PBMC를 PBS로 2회 세정하고, 펠렛화하며, 1 ml의 0.5 μM 카르복시-플루오레신 디아세테이트, 숙신이미딜 에스테르(CFSE, 몰레큘러 프로브즈(Molecular Probes))에 7분 동안 37℃에서 재현탁시켰다. 세포를 PBS로 2회 세정하고, 1 ml의 R10 배지(글루티아티온, 페니실린, 스트렙토마이신 및 10% 우태아 혈청[FCS]로 보충된 RPMI 1640)에 재현탁시키며, 24-웰 플레이트의 한 웰에 도말하였다. 초기 연구에 의해, 최종 농도 0.2 ㎍/ml 펩티드가 최적의 증식 반응을 산출하고, 이에 따라 이것이 각 검정에 잘 사용되는 최종 펩티드 농도가 됨이 밝혀졌다. 음성 대조 웰은 매질 단독 내 PBMC, 또는 정제된 항-PD-L1(10 ㎍/ml)를 갖는 매질 내 PBMC로 구성되었고, 양성 대조 웰은 10 ㎍/ml의 파이토헤마글루티닌(PHA)으로 자극되었다. 37℃ 인큐베이터에서 6일 항온 처리한 후, 세포를 2 ml의 PBS로 세정하고, PE-접합 MHC I류 오량체, 바이어프로브(벡톤 딕킨슨) 및 항-CD8-APC 항체로 염색하였다. 세포를 FACSCalibur에서 습득하여, 셀퀘스트(CellQuest)® 소프트웨어(벡터 딕킨슨)에 의해 분석하였다. 세포를 바이어프로브$^-$ CD8$^+$ 림프구에 게이팅하였다. 오량체$^+$ 세포의 증가 배수를, 펩티드의 존재 하에서의 CD8$^+$ 오량체$^+$ 세포의 백분율을 펩티드 자극의 부재 하에서의 CD8$^+$ 오량체$^+$ 세포의 백분율로 나눔으로써 계산하였다.

[0224] *통계학적 분석*

[0225] 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 버전 4.0a를 이용하여, 스피어만(Spearman) 상관관계, 만-위트니(Mann-Whitney) 시험, 및 대응 t-시험 분석을 수행하였다. 모든 시험들은 2-테일이었고, $p<0.05$의 p 값이 유의적인 것으로 간주되었다.

[0226] **실시예 11: HIV-특이적 CD8 T 세포에서의 PD-1 발현**

[0227] 우성적 HIV-1 클레이드 C 바이러스 CD8 T 세포 에피토프에 대해 특이적인 10개 MHC I류 오량체의 패널을, Gag, Nef, 인테그라제 및 RT에서의 빈번하게 표적화되는 에피토프 및 우세형 HLA 대립유전자에 기초하여(Kiepiela P 등, 2004), 이 세포에서의 표면 PD-1 발현을 직접 가시화하였다. 고해상도 HLA 감식을 전 코호트에서 수행하였고, 65명의 항레트로바이러스 요법에 대해 나이브(미경험)인 자들의 하위군을 관련 HLA 대립유전자의 발현에 기초하여, 연구를 위해 선별하였다. 총 120개의 개별 에피토프를 조사하였고, HIV 오량체$^+$ 세포에서의 PD-1의 대표적 체외 염색이 도 5a에 나와 있다. PD-1 발현은 이 오량체$^+$ 세포에서 쉽게 드러났고, 동일 개체로부터의 총 CD8 T 세포 집단에서보다 유의적으로 더 높았으며($p<0.0001$); 이에 따라 오량체$^+$ CD8 T 세포 및 총 CD8 T 세포 집단 모두에서의 PD-1 발현은 HIV-혈청음성 대조군에서보다 유의적으로 더 높았다(도 5b). 시험한 10개 오량체 중 8개에 있어, 항원-특이적 CD8 세포에서의 발현 수준이 100%인 사람이 한 명 이상 확인되었다(도 5c). 3 내지 25명 개체로부터의 PBMC를 각 HIV 오량체 반응에 대해 염색하였고, 중위 PD-1 발현 수준은 오량체$^{4"}$ 세포 68% 내지 94% 범위 내였다(도 5c). 이 결과는, 오량체$^+$ 세포 및 총 CD8 T 세포 집단 모두에서의 PD-1의 평균 형광 강도(MFI)의 분석에 의해 더욱 확인되었다(도 5b 및 5c).

[0228] 그 다음에, 다수 검출가능한 반응들을 갖는 자들의 PD-1 발현 수준의 측면에 있어 에피토프-특이적 차이에 대한 증거들이 있는지의 여부를 결정하였다. 조사한 65명의 사람들 중, 16명 개체는 각기 3 내지 5 오량체 양성 반응을 가졌다. PD-1 발현이 거의 동일하였고, 16명 대상 중 3명에 대해 분석된 각 반응에 있어 100%에 도달하였으나; 다른 13명 개체는 에피토프에 따라 상이한 패턴의 PD-1 발현을 나타냈다(도 5d). 이 데이터는, PD-1 발현이 단일 사람으로부터의 동시적 에피토프-특이적 CD8 T 세포에서 차별적으로 발현될 수 있고, 이는 아마도 항바이러스 효능의 에피토프-특이적 차이를 가리키는 최근 데이터와 일관될 것이다(Tsomides TJ 등, 1994; Yang O 등, 1996; Loffredo JT 등, 2005).

[0229] **실시예 12: PD-1 발현과 HIV 질병 진전 간의 관계**

[0230] HIV-특이적 CD8 T 세포에서의 PD-1 발현과 혈장 바이러스 부하 및 CD4 계수 간의 관계를 결정하였고, 이 양자 모두는 HIV 질병 진전의 예측자이다. 이전 연구들과 일관되게, 오량체 양성 세포의 수와 바이러스 부하 또는 CD4 계수 간의 관계는 어떠한 유의적 상관관계도 나타내지 못했다(도 6a 및 6b). 대조적으로, 바이러스 부하와, HIV 오량체 양성 세포에서의 PD-1 발현의 백분율 및 MFI 양자 간에는 유의적 양의 상관관계가 있었다(각각 $p=0.0013$ 및 $p<0.0001$; 도 6a). 또한, CD4 계수와, HIV 오량체 양성 세포에서의 PD-1의 백분율 및 MFI 간에 역의 상관관계가 있었다(각각 $p=0.0046$ 및 $p=0.0150$; 도 6b). 시험한 오량체가 가능히 이 대상들 중 HIV-특이적 CD8 T 세포 집단의 단지 한 분율만을 나타내기 때문에, 모든 CD8 세포에서의 PD-1 발현과 이 매개변수들 간의 관계도 또한 조사하였다. 바이러스 부하와, 총 CD8 T 세포 집단에서의 PD-1 발현의 백분율 및 MFI 양자 간의 유의적 양의 상관관계가 있었고(각각 $p=0.0021$ 및 $p<0.0001$; 도 6C), CD4 계수와, 총 CD8 T 세포 집단에서의 PD-1 발현의 백분율 및 MFI 양자 간의 역의 상관관계가 관찰되었다(각각 $p=0.0049$ 및 $p=0.0006$; 도 6D). 이 동일한 군에서, CMV-특이적 CD8 T 세포에서의 PD-1 발현을 5 대상에서 시험하였고, HIV-특이적 CD8 T 세포에 비해 유의적으로 더 적은 PD-1가 이 세포에서 발현되었으며(중위 23% CMV 오량체$^{+}$ PD-1^{+}, $p=0.0036$, 데이터가 나와 있지 않음), 이 동일 개체에게 있어 벌크 CD8 T 세포와 상이하지 않은 바, 이는 높은 PD-1 발현이 모든 바이러스-특이적 CD8 T 세포의 균일한 특성이 아님을 가리킨다. 이 데이터는 만성 HIV 감염에 있어 항원의 양이 증가함에 따라, CD8 T 세포에서의 PD-1의 발현이 증가하게 됨을 제시하고, 만성 LCMV 감염에 있어 설치류 데이터와 일관되며, 여기에서 PD-1 발현은 CD8 T 세포의 기능적 소진과 관련된다(Barber DL 등, 2005). 또한, 그것은 다수 에피토프의 분석을 포함한 대규모 연구에 있어, HIV-특이적 CD8 T 세포와, 바이러스 부하 또는 CD4 계수 간의 첫 번째 명료한 관련성을 제공한다.

[0231] **실시예 13: PD-1 발현과 CD8 T 세포 기억 상태(status) 및 기능 간의 관계**

[0232] 그 다음에, CD27, CD28, CD45RA, CD57, CD62L, CD127, CCR7, 퍼포린, 그랜자임 B 및 Ki67을 포함한, CD8 T 세포 기억 상태 및 기능과 관련된 수많은 부가적 표현형 마커들 관련 영역에서 PD-1 발현을 분석하였다(도 7). 한 개체로부터의 B*4201 TL9 오량체$^{+}$ 세포에서의 이 마커들의 대표적 염색이 도 7a에 나와 있고, 13 대상에 대한 집산 데이터가 도 7b에 나와 있다. 이 연구들은, 4가지 초과 색의 다중매개변수 유세포분석이 [KwaZulu Natal]에서는 이용가능하지 않기 때문에, 95% 초과 PD-1 양성인 오량체 반응에 제한되었다. HIV 오량체$^{+}$ PD-1^{+} 세포는 높은 수준의 CD27 및 그랜자임 B, 매우 낮은 수준의 CD28, CCR7 및 세포내 Ki67, 낮은 수준의 CD45RA 및 퍼포린, 및 중간 수준의 CD57 및 CD62L을 발현하였다(도 7b). 이 데이터는 HIV-특이적 PD-1^{+} T 세포가 이펙터/이펙터 기억 표현형을 나타내고, HIV-특이적 CD8 T 세포의 왜곡 성숙(skewed maturation)의 과거 보고(Champagne P 등, 2001; Appay V 등, 2002; Hess C 등, 2004)와 일관되었다. 또한, 바이러스 시퀀싱을 수행하여, 이 세포가 면역 도피(immune escape)를 추진하는지의 여부를 결정하였다(Brown JA 등, 2003). 평가한 이 오량체-양성 반응들 중 45개 반응에서, 단지 5개 반응에서의 바이러스 에피토프만이 남아프리카 클레이드 C 일치 서열과 상이하였고(데이터가 나와 있지 않음), 이는 이 세포들이 생체내 적은 선택압을 나타냄을 가리킨다.

[0233] LCMV 모델을 이용한 마우스에서의 과거 실험들은, 항-PD-L1 차단 항체 주입에 의한 PD-1/PD-L1 상호작용의 생체내 봉쇄가, 사이토킨 생산, 사멸 성능, 증식 성능, 및 가장 현저하게는 바이러스 부하의 감소에 의해 측정할 때, LCMV-특이적 CD8 T 세포의 기능을 증지시켰음을 보여주었다(Barber DL 등, 2005).

[0234] **실시예 14: HIV-특이적 CD8 T 세포의 증식에 대한 PD-1/PD-L1 경로의 봉쇄의 영향**

[0235] HIV-특이적 CD8 T 세포가 또한 손상된 증식 성능을 나타내기 때문에(Migueles SA 등, 2002; Lichterfeld M 등, 2004), PD-1/PD-L1의 봉쇄가 이 기능을 시험관내 증진시킬 수 있는지의 여부가 결정되었다. B*4201-양성 개체로부터의 대표적 데이터가 도 8a에 나와 있다. 새로 단리된 CFSE-표지 PBMC를 매질 단독, 또는 항-PD-L1 항체가 있는 매질과 항온 처리함으로써, 6일간 배양한 후, CFSE^{hi}로 남은 B*4201-TL9-특이적 CD8 T 세포의 집단(CD8 T 세포의 1.2%)가 유지되었다. CFSE-표지 PBMC를 6일간 TL9 펩티드 단독으로 자극함으로써, CFSE^{lo} B*4201 TL9 오량체$^{+}$ 세포가 4.8배 확장되었고, 반면 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에 CFSE-표지 PBMC를 TL9 펩티드로 자극함으로써, TL9-특이적 세포의 증식을 더욱 증진시켰으며, 이에 따라 오량체$^{+}$ 세포가 10.3배 증가하게 되었다. 정제된 항-인간 PD-L1 차단 항체의 존재 및 부재 하에 28개 샘플에 대해 CFSE 증식 검정을 수행하였다. 펩티드 단독으로 자극한 후의 증식량과 대비한, HIV-특이적 CD8^{+} T 세포의 증식의 유의적 증가가 펩티드 + 항-PD-L1 차단

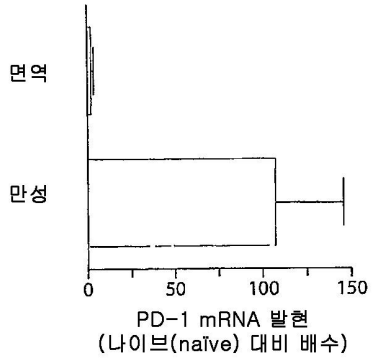
항체의 존재 하에 관찰되었다(도 8b; p=0.0006, 대응 t-시험). 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에서의 오량체$^{+}$ 세포의 증가 배수는 개체 및 소정의 개체 내의 에피토프에 따라 변화하였고(도 8c), 이 역시도 이 반응들의 기능적 소진 정도의 에피토프-특이적 차이를 제시한다.

[0236] **기타 실시양태**

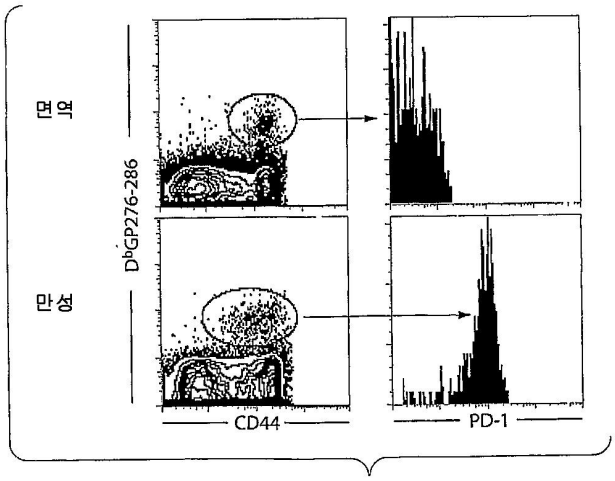
[0237] 본 발명은 본 발명의 상세한 설명과 관련하여 기재되었으나, 상기 설명은 본 발명을 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범주를 제한하지 않으며, 본 발명의 범주는 첨부된 특허청구범위의 범주에 의해서만 한정된다. 기타 측면, 이점 및 변형도 하기 특허청구범위의 범주 내에 속한다.

도면

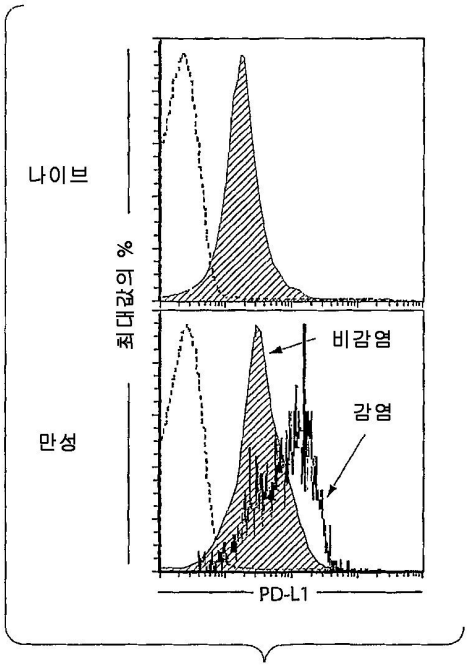
도면1a



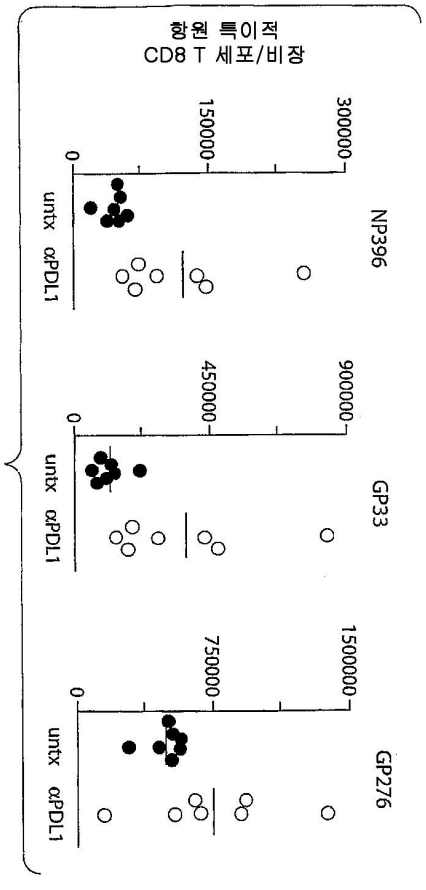
도면1b



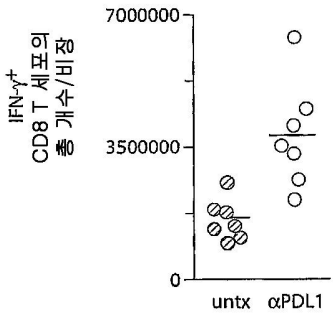
도면1c



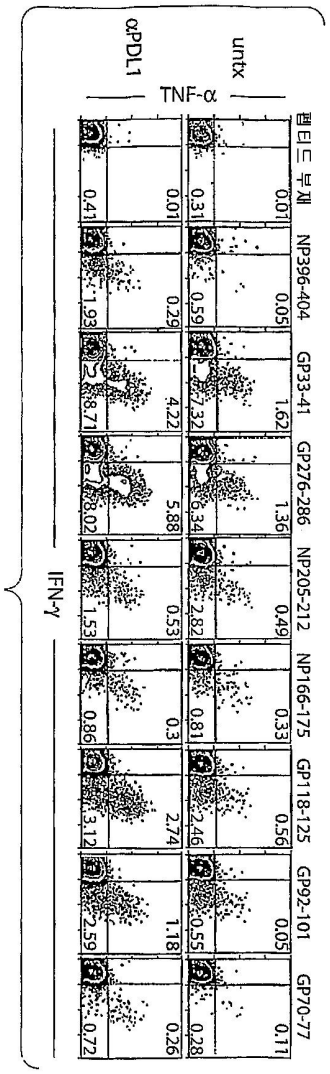
도면2a


항원 특이적
CD8 T 세포/비장
NP396
GP33
GP276
0
150000
300000
450000
900000
750000
1500000
untx
αPDL1

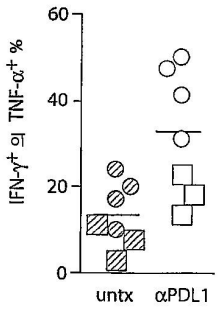
도면2b


IFN-γ+
CD8 T 세포의
총 개수/비장
7000000
3500000
0
untx
αPDL1

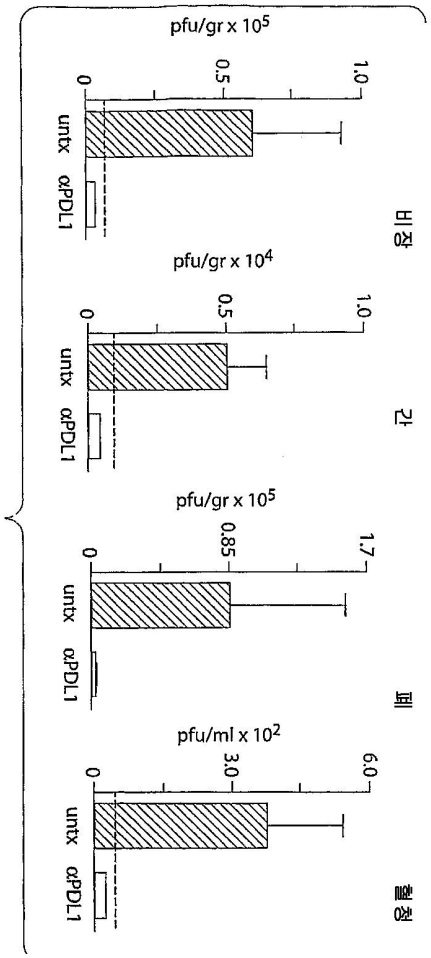
도면2c


펩티드 부재
NP396-404
GP33-41
GP276-286
NP205-212
NP166-175
GP118-125
GP92-101
GP70-77
untx
αPDL1
TNF-α
IFN-γ
0.01
0.31
0.05
0.59
1.62
7.32
1.36
6.34
0.49
2.82
0.33
0.81
0.56
2.46
0.05
0.55
0.11
0.28
0.41
0.01
1.93
0.29
8.71
4.22
8.02
5.88
1.53
0.53
0.86
0.3
3.12
2.74
2.59
1.18
0.72
0.26

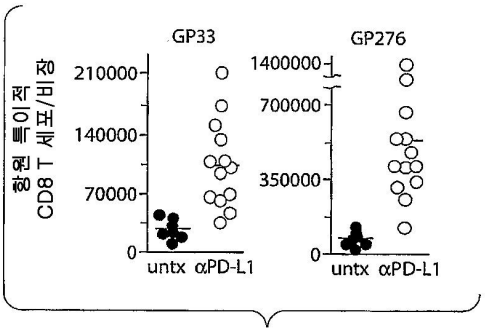
도면2d


IFN-γ+ 의 TNF-α+ %
60
40
20
0
untx
αPDL1

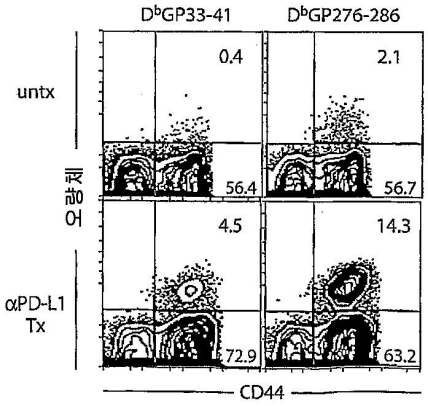
도면2e


pfu/gr x 10^5
0
0.5
1.0
untx
αPDL1
비장
pfu/gr x 10^4
0
0.5
1.0
untx
αPDL1
간
pfu/gr x 10^5
0
0.85
1.7
untx
αPDL1
폐
pfu/ml x 10^2
0
3.0
6.0
untx
αPDL1
혈청

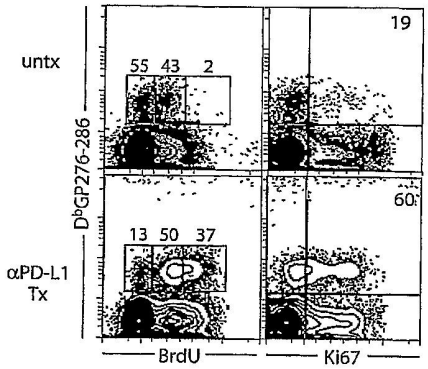
도면3a


항원 특이적
CD8 T 세포/비장
GP33
GP276
210000
140000
70000
0
1400000
700000
350000
0
untx αPD-L1
untx αPD-L1

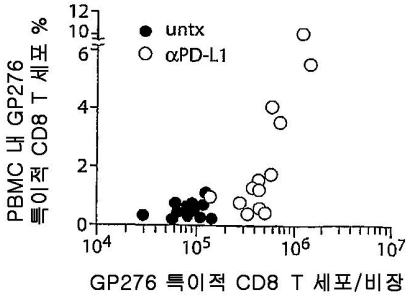
도면3b



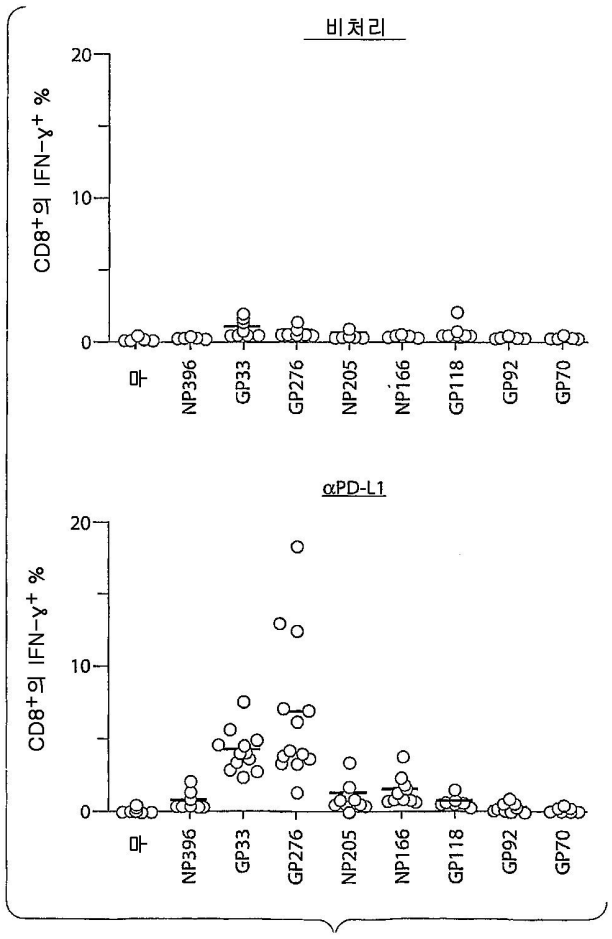
도면3c



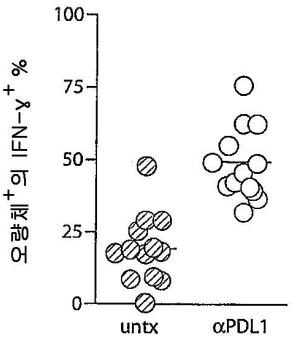
도면3d



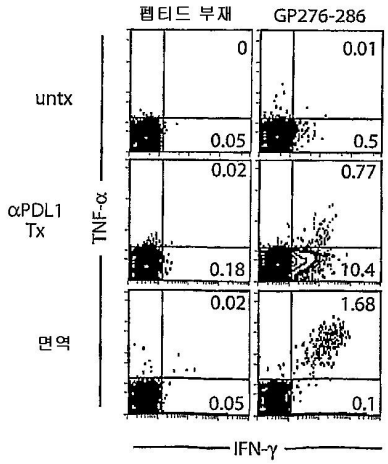
도면4a


비처리
CD8+의 IFN-γ+ %
20
10
0
무
NP396
GP33
GP276
NP205
NP166
GP118
GP92
GP70
αPD-L1
CD8+의 IFN-γ+ %
20
10
0
무
NP396
GP33
GP276
NP205
NP166
GP118
GP92
GP70

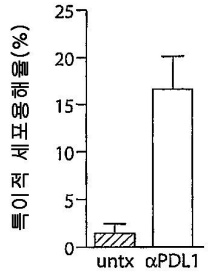
도면4b


오량체+의 IFN-γ+ %
100
75
50
25
0
untx
αPDL1

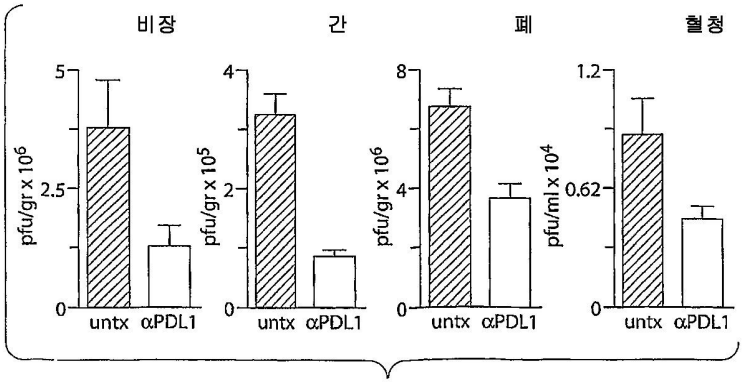
도면4c



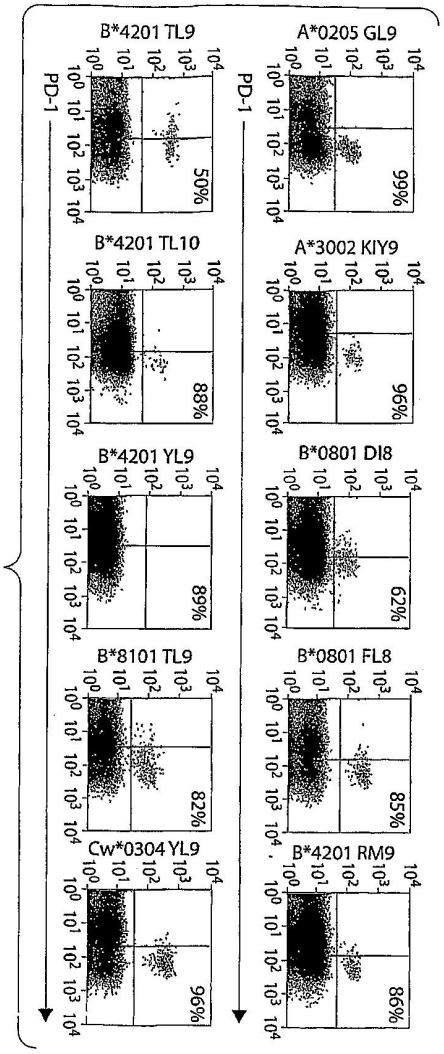
도면4d



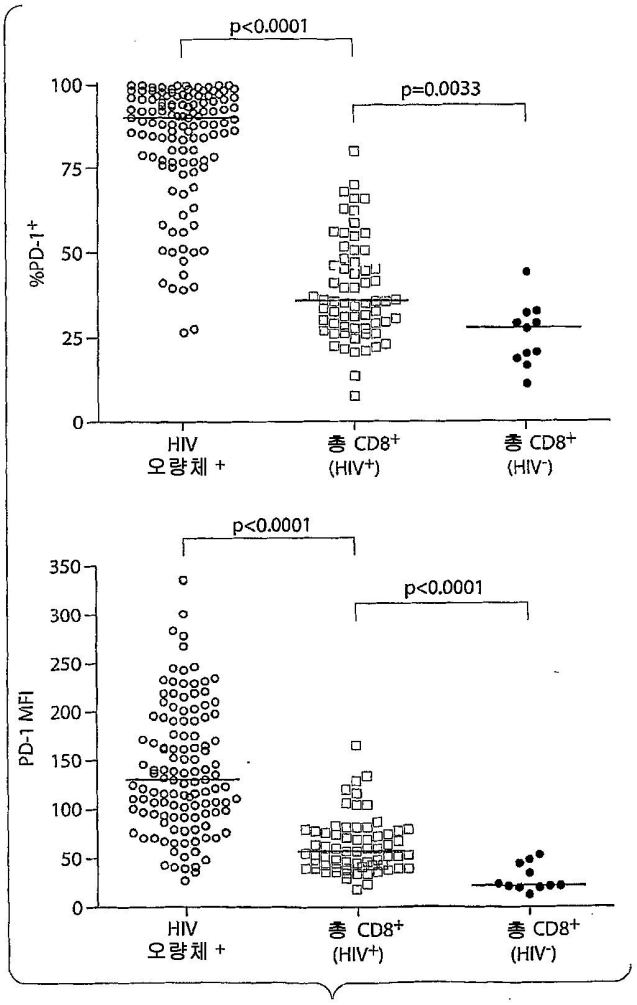
도면4e



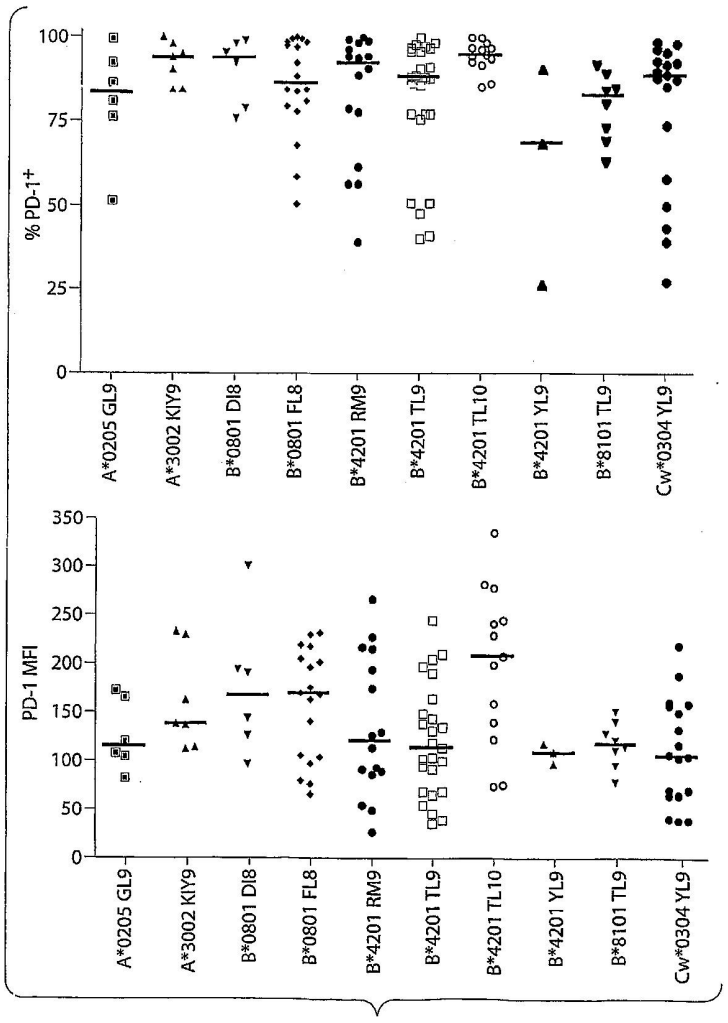
도면5a


B*4201 TL9
50%
A*0205 GL9
99%
B*4201 TL10
88%
A*3002 KIY9
96%
B*4201 YL9
89%
B*0801 DI8
62%
B*8101 TL9
82%
B*0801 FL8
85%
Cw*0304 YL9
96%
B*4201 RM9
86%
PD-1
PD-1

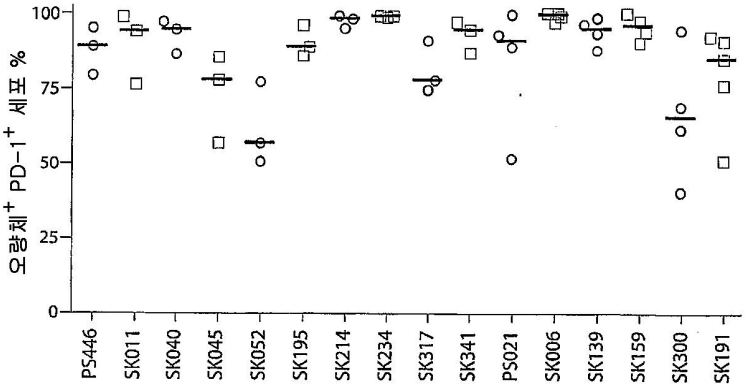
도면5b


p<0.0001
p=0.0033
%PD-1+
100
75
50
25
0
HIV
오량체 +
총 CD8+
(HIV+)
총 CD8+
(HIV-)
p<0.0001
p<0.0001
PD-1 MFI
350
300
250
200
150
100
50
0
HIV
오량체 +
총 CD8+
(HIV+)
총 CD8+
(HIV-)

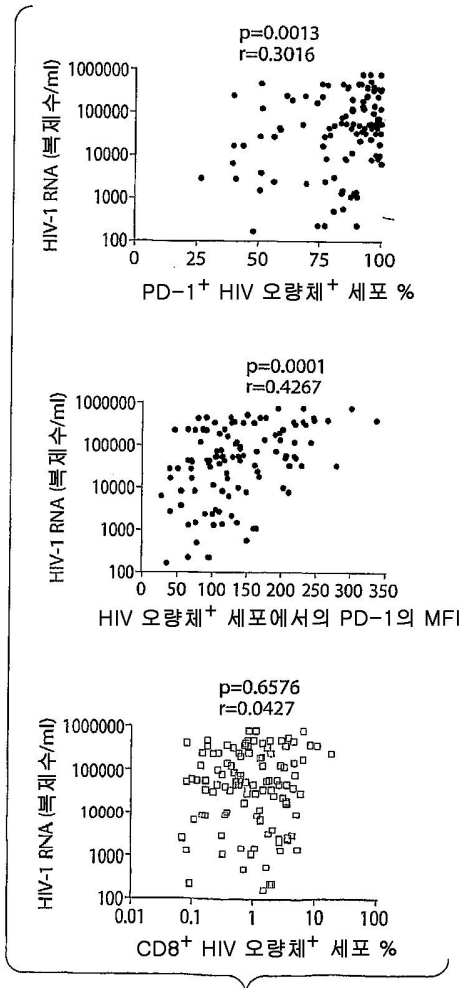
도면5c


% PD-1+
100
75
50
25
0
A*0205 GL9
A*3002 KIY9
B*0801 DI8
B*0801 FL8
B*4201 RM9
B*4201 TL9
B*4201 TL10
B*4201 YL9
B*8101 TL9
Cw*0304 YL9
PD-1 MFI
350
300
250
200
150
100
50
0
A*0205 GL9
A*3002 KIY9
B*0801 DI8
B*0801 FL8
B*4201 RM9
B*4201 TL9
B*4201 TL10
B*4201 YL9
B*8101 TL9
Cw*0304 YL9

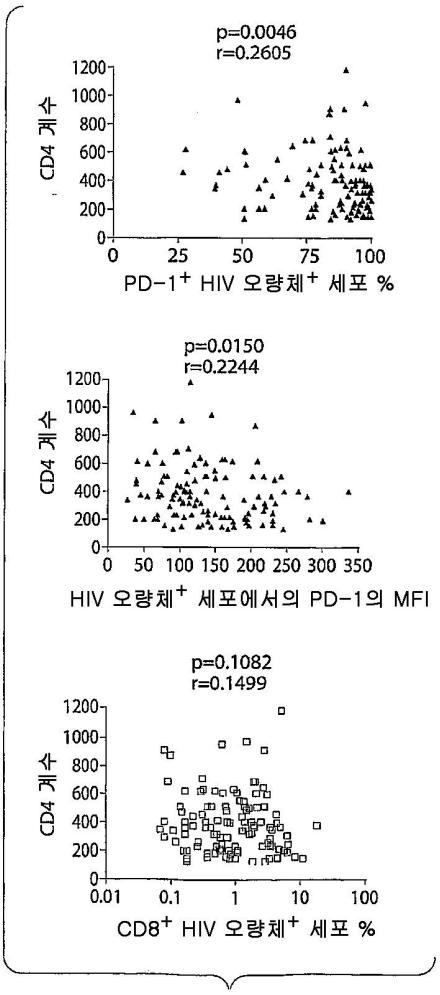
도면5d


오량체+ PD-1+ 세포 %
100
75
50
25
0
PS446
SK011
SK040
SK045
SK052
SK195
SK214
SK234
SK317
SK341
PS021
SK006
SK139
SK159
SK300
SK191

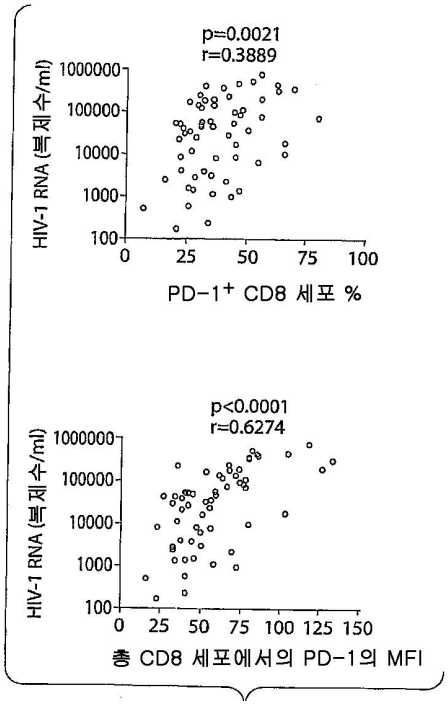
도면6a


p=0.0013
r=0.3016
HIV-1 RNA (복제수/ml)
1000000
100000
10000
1000
100
0
25
50
75
100
PD-1+ HIV 오량체+ 세포 %
p=0.0001
r=0.4267
HIV-1 RNA (복제수/ml)
1000000
100000
10000
1000
100
0
50
100
150
200
250
300
350
HIV 오량체+ 세포에서의 PD-1의 MFI
p=0.6576
r=0.0427
HIV-1 RNA (복제수/ml)
1000000
100000
10000
1000
100
0.01
0.1
1
10
100
CD8+ HIV 오량체+ 세포 %

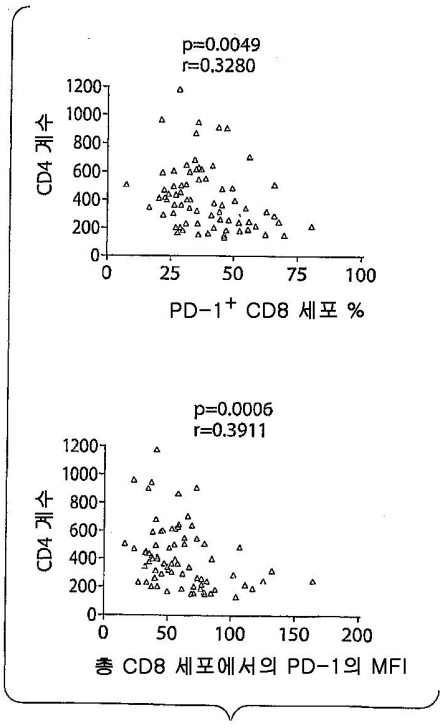
도면6b


p=0.0046
r=0.2605
CD4 계수
1200
1000
800
600
400
200
0
0 25 50 75 100
PD-1+ HIV 오량체+ 세포 %
p=0.0150
r=0.2244
CD4 계수
0 50 100 150 200 250 300 350
HIV 오량체+ 세포에서의 PD-1의 MFI
p=0.1082
r=0.1499
CD4 계수
0.01 0.1 1 10 100
CD8+ HIV 오량체+ 세포 %

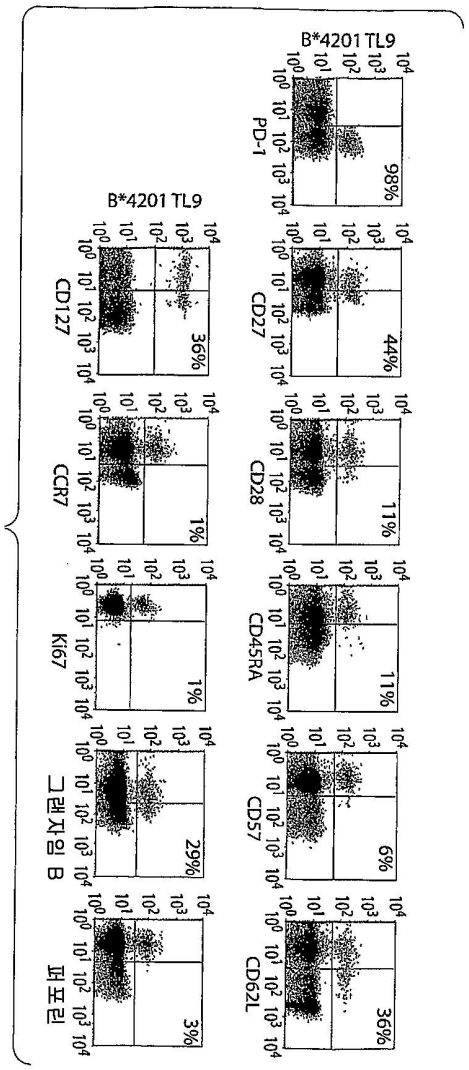
도면6c


p=0.0021
r=0.3889
HIV-1 RNA (복제수/ml)
1000000
100000
10000
1000
100
0
25
50
75
100
PD-1+ CD8 세포 %
p<0.0001
r=0.6274
HIV-1 RNA (복제수/ml)
1000000
100000
10000
1000
100
0
25
50
75
100
125
150
총 CD8 세포에서의 PD-1의 MFI

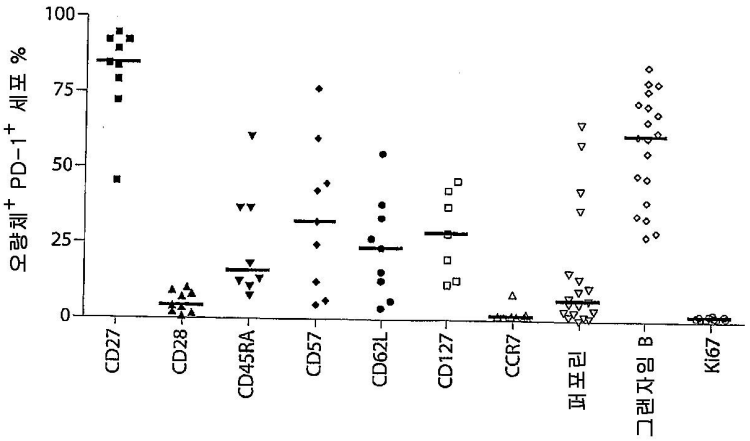
도면6d


p=0.0049
r=0.3280
CD4 계수
1200
1000
800
600
400
200
0
0
25
50
75
100
PD-1+ CD8 세포 %
p=0.0006
r=0.3911
CD4 계수
1200
1000
800
600
400
200
0
0
50
100
150
200
총 CD8 세포에서의 PD-1의 MFI

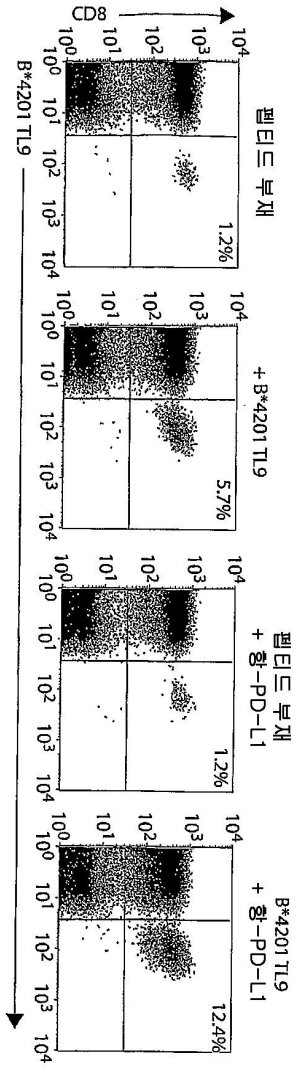
도면7a


B*4201 TL9
PD-1
98%
CD27
44%
CD28
11%
CD45RA
11%
CD57
6%
CD62L
36%
B*4201 TL9
CD127
36%
CCR7
1%
Ki67
1%
그랜자임 B
29%
퍼포린
3%

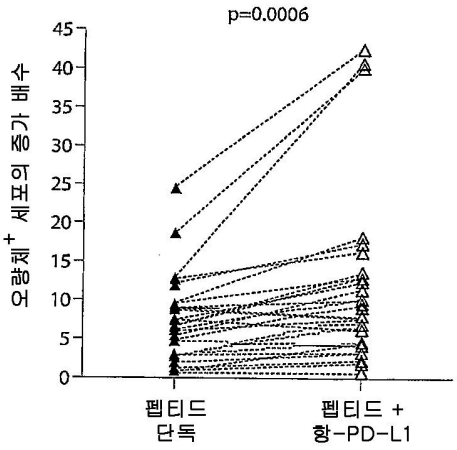
도면7b


100
75
50
25
0
오량체+ PD-1+ 세포 %
CD27
CD28
CD45RA
CD57
CD62L
CD127
CCR7
퍼포린
그랜자임 B
Ki67

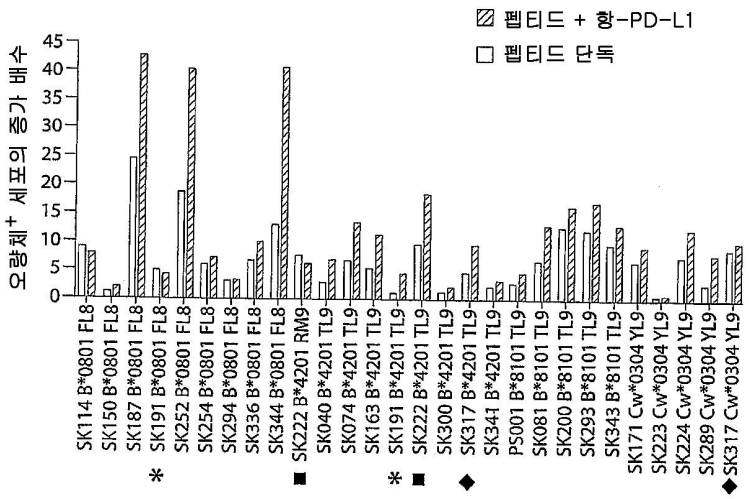
도면8a


CD8
B*4201 TL9
펩티드 부재
1.2%
+ B*4201 TL9
5.7%
펩티드 부재
+ 항-PD-L1
1.2%
B*4201 TL9
+ 항-PD-L1
12.4%

도면8b



도면8c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Dana-Farber Cancer Institute
The Brigham and Women's Hospital, INC.
Emory University
Freemon, Gordon
Sharpe, Arlene
Dorfman, David M.
Ahmed, Rafi
Barber, Daniel
Wherry, E. John

<120> Methods and Compositions for the Treatment of Persistent Infections

<130> 20363-030-061

<140> PCT/US2006/022423
<141> 2006-06-08

<150> 60/688,872
<151> 2005-06-08

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 1

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Phe Phe Leu
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 2

Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 3

Asp Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 4

Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 5

Arg Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met
1 5

<210> 6
<211> 9

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 6

Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 7

Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 8

Tyr Pro Gly Ile Lys Val Lys Gln Leu
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 9

Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> HIV MHC Class I tetramer

<400> 10

Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr Leu
1 5