(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5520961号
(P5520961)

(45)発行日　平成26年6月11日(2014.6.11)　(24)登録日　平成26年4月11日(2014.4.11)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| G01N 33/50 | (2006.01) | G01N | 33/50 | ZNAK |
| A61K 45/00 | (2006.01) | A61K | 45/00 | |
| A61K 39/395 | (2006.01) | A61K | 39/395 | D |
| A61K 39/29 | (2006.01) | A61K | 39/395 | N |
| A61K 39/21 | (2006.01) | A61K | 39/395 | V |

請求項の数 59　(全 126 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-538705 (P2011-538705)
(86)(22)出願日　平成21年11月27日 (2009.11.27)
(65)公表番号　特表2012-510619 (P2012-510619A)
(43)公表日　平成24年5月10日 (2012.5.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/066023
(87)国際公開番号　WO2010/063011
(87)国際公開日　平成22年6月3日 (2010.6.3)
審査請求日　平成24年3月23日 (2012.3.23)
(31)優先権主張番号　61/118,570
(32)優先日　平成20年11月28日 (2008.11.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　506282425
エモリー　ユニバーシティ
アメリカ合衆国，ジョージア　３０３２２，　アトランタ，ノース　イースト，クリフトン　ロード　１５９９，フォース　フロア
(73)特許権者　399052796
デイナ　ファーバー　キャンサー　インスティチュート，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　０２２１５，　ボストン，ブルックライン　アベニュー　４５０
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】感染症および腫瘍を処置するための方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
PD-1アンタゴニストの第一の用量を投与された被験対象からの第一の試料におけるメモリーB細胞の増殖を決定する段階
を含む、被験対象における持続性の感染症もしくは腫瘍を処置するために有用なPD-1アンタゴニストの用量が十分であるか否かを検査するためのインビトロ方法であって、
対照と比較して第一の試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストの第一の用量が被験対象における持続性の感染症もしくは腫瘍を処置するために有用であることを示しており、対照と比較してメモリーB細胞の増殖に有意な変化がなければ、PD-1アンタゴニストの第一の用量が被験対象における持続性の感染症もしくは腫瘍を処置するために十分ではないことを示している、前記方法。
【請求項２】
PD-1アンタゴニストの第二の用量を投与された被験対象からの第二の試料におけるメモリーB細胞の増殖を決定する段階
をさらに含む、請求項1記載の方法であって、
対照と比較して第二の試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストの第二の用量が被験対象における持続性の感染症もしくは腫瘍を処置するために有用であることを示しており、対照と比較してメモリーB細胞の増殖に有意な変化がなければ、PD-1アンタゴニストの第二の用量が被験対象における持続性の感染症もしくは腫瘍を処置するために十分ではないことを示している、前記方法。

【請求項３】
対照と比較して第一の試料におけるメモリーB細胞の増殖に有意な変化がなく、第二の用量が第一の用量より高い、請求項2記載の方法。
【請求項４】
対照と比較して第一の試料からのメモリーB細胞の増殖が増加して、第二の用量が第一の用量より低い、請求項2記載の方法。
【請求項５】
PD-1アンタゴニストを投与された被験対象からの試料におけるメモリーB細胞の増殖を測定する段階
を含む、PD-1アンタゴニストを投与された被験対象における持続性の感染症もしくは腫瘍の処置のPD-1アンタゴニストの有効性を検査するためのインビトロ方法であって、
対照と比較して試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストが被験対象における持続性の感染症もしくは腫瘍を処置するために有効であることを示している、前記方法。
【請求項６】
被験対象からの試料中のナイーブB細胞を測定する段階をさらに含む、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。
【請求項７】
増殖しているメモリーB細胞を測定する段階がKi67の発現を測定する段階を含む、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。
【請求項８】
メモリーB細胞の増殖を測定する段階が、Ki67に特異的に結合する抗体を用いることを含む、請求項7記載の方法。
【請求項９】
メモリーB細胞の増殖を測定する段階が、ブロモデオキシウリジンの取り込みを測定する段階を含む、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。
【請求項１０】
メモリーB細胞の増殖を測定する段階が、蛍光活性化セルソーティング（FACS）を用いることを含む、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。
【請求項１１】
被験対象がウイルス感染症を有する、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。
【請求項１２】
被験対象が持続的ウイルス感染症を有する、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。
【請求項１３】
被験対象がウイルス抗原を投与される、請求項11～12のいずれか1項記載の方法。
【請求項１４】
ウイルス感染症が、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、ヘルペスウイルス、エプスタイン-バーウイルス、またはヒト乳頭腫ウイルスによる感染症である、請求項11～13のいずれか1項記載の方法。
【請求項１５】
被験対象が腫瘍を有する、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。
【請求項１６】
被験対象が腫瘍抗原を投与される、請求項15記載の方法。
【請求項１７】
腫瘍関連抗原が、PRAME、WT1、サーバイビン、サイクリンD、サイクリンE、プロテナーゼ3およびそのペプチドPR1、好中球エラスターゼ、カテプシンG、MAGE、MART、チロシナーゼ、GP100、NY-Eso-1、ハーセプチン、癌胎児抗原（CEA）、または前立腺特異的抗原（PSA）である、請求項16記載の方法。
【請求項１８】
被験対象が真菌感染症または細菌感染症を有する、請求項1～10のいずれか1項記載の方

法。
【請求項１９】
PD-1アンタゴニストが、PD-1に特異的に結合する抗体、PD-L1に特異的に結合する抗体、PD-L2に特異的に結合する抗体、低分子阻害性抗PD-1 RNAi、低分子阻害性抗PD-L1 RNA、低分子阻害性抗PD-L2 RNAi、抗PD-1アンチセンスRNA、抗PD-L1アンチセンスRNA、抗PD-L2アンチセンスRNA、ドミナントネガティブPD-1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L2タンパク質、PD-1の低分子阻害剤、またはその組み合わせである、請求項1～18のいずれか1項記載の方法。
【請求項２０】
PD-1に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、請求項19記載の方法。
【請求項２１】
PD-L1に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、請求項19記載の方法。
【請求項２２】
PD-L2に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、請求項19記載の方法。
【請求項２３】
対照がPD-1アンタゴニストの第一の濃度を投与する前に得られた被験対象からの試料であるか、または標準値である、請求項1～22のいずれか1項記載の方法。
【請求項２４】
被験対象が、メモリーB細胞の増殖を増加させることが決定されている用量をさらに投与されている、請求項1～23のいずれか1項記載の方法。
【請求項２５】
PD-1アンタゴニストの治療的有効量を投与された被験対象からの試料におけるメモリーB細胞の増殖を測定し、それによって哺乳動物レシピエントにおける関心対象抗原に対する免疫応答を産生することを含む、哺乳動物レシピエントにおける関心対象抗原に対する免疫応答を誘導する方法に使用するための薬剤の製造における、治療的有効量のPD-1アンタゴニストの使用。
【請求項２６】
被験対象がウイルス感染症を有する、請求項25記載の使用。
【請求項２７】
被験対象が慢性ウイルス感染症を有する、請求項26記載の使用。
【請求項２８】
関心対象抗原がウイルス抗原である、請求項26～27のいずれか1項記載の使用。
【請求項２９】
ウイルス感染症が、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、ヘルペスウイルス、エプスタイン-バーウイルス、またはヒト乳頭腫ウイルスによる感染症である、請求項26～28のいずれか1項記載の使用。
【請求項３０】
ウイルス感染症が肝炎ウイルス感染症であり、ウイルス抗原が肝炎gp33である、請求項28記載の使用。
【請求項３１】
ウイルス感染症がヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症である、請求項26～28のいずれか1項記載の使用。
【請求項３２】
ウイルス感染症がヒト免疫不全ウイルス感染症であり、関心対象抗原がgp120である、

請求項28記載の使用。
【請求項３３】
被験対象が腫瘍を有する、請求項25記載の使用。
【請求項３４】
関心対象抗原が腫瘍抗原である、請求項33記載の使用。
【請求項３５】
関心対象抗原が、PRAME、WT1、サーバイビン、サイクリンD、サイクリンE、プロテナーゼ3およびそのペプチドPR1、好中球エラスターゼ、カテプシンG、MAGE、MART、チロシナーゼ、GP100、NY-Eso-1、ハーセプチン、癌胎児抗原（CEA）、または前立腺特異的抗原（PSA）である、請求項34記載の使用。
【請求項３６】
病原体が真菌であり、関心対象抗原が真菌抗原である、請求項25記載の使用。
【請求項３７】
病原体が細菌であり、関心対象抗原が細菌抗原である、請求項25記載の使用。
【請求項３８】
PD-1アンタゴニストが、PD-1に特異的に結合する抗体、PD-L1に特異的に結合する抗体、PD-L2に特異的に結合する抗体、低分子阻害性抗PD-1 RNAi、低分子阻害性抗PD-L1 RNA、低分子阻害性抗PD-L2 RNAi、抗PD-1アンチセンスRNA、抗PD-L1アンチセンスRNA、抗PD-L2アンチセンスRNA、ドミナントネガティブPD-1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L2タンパク質、PD-1の低分子阻害剤、またはその組み合わせである、請求項25～37のいずれか1項記載の使用。
【請求項３９】
PD-1に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、請求項38記載の使用。
【請求項４０】
PD-L1に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、請求項38記載の使用。
【請求項４１】
PD-L2に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、請求項38記載の使用。
【請求項４２】
方法が、被験対象からの試料中のナイーブB細胞を測定することをさらに含む、請求項25～41のいずれか1項記載の使用。
【請求項４３】
増殖するメモリーB細胞の測定が、Ki67の発現の測定を含む、請求項25～42のいずれか1項記載の使用。
【請求項４４】
増殖メモリーB細胞の測定が、Ki67に特異的に結合する抗体を用いることを含む、請求項43記載の使用。
【請求項４５】
メモリーB細胞の増殖の測定が、ブロモデオキシウリジンの取り込みの測定を含む、請求項25～44のいずれか1項記載の使用。
【請求項４６】
メモリーB細胞の増殖の測定が、蛍光活性化セルソーティング（FACS）を用いることを含む、請求項25～45のいずれか1項記載の使用。
【請求項４７】
被験対象が、追加の化合物の治療的有効量をさらに投与されている、請求項1～24のい

ずれか1項記載の方法。
【請求項４８】
追加の化合物が抗ウイルス化合物、抗菌化合物、抗真菌化合物、抗寄生虫化合物、抗炎症化合物、または鎮痛薬である、請求項47記載の方法。
【請求項４９】
被験対象が免疫抑制されている、請求項1～24および47～48のいずれか1項記載の方法。
【請求項５０】
被験対象が無症候性である、請求項1～24および47～49のいずれか1項記載の方法。
【請求項５１】
被験対象がヒトである、請求項1～24および47～50のいずれか1項記載の方法。
【請求項５２】
被験対象が、追加の化合物の治療的有効量をさらに投与されている、請求項25～46のいずれか1項記載の使用。
【請求項５３】
追加の化合物が抗ウイルス化合物、抗菌化合物、抗真菌化合物、抗寄生虫化合物、抗炎症化合物、または鎮痛薬である、請求項52記載の使用。
【請求項５４】
被験対象が免疫抑制されている、請求項25～46および52～53のいずれか1項記載の使用。
【請求項５５】
被験対象が無症候性である、請求項25～46および52～54のいずれか1項記載の使用。
【請求項５６】
被験対象がヒトである、請求項25～46および52～55のいずれか1項記載の使用。
【請求項５７】
メモリーB細胞を含む細胞集団に物質を接触させる段階と、
メモリーB細胞の増殖および／またはメモリーB細胞の抗体分泌細胞への分化を検出する段階と
を含む、有用なPD-1アンタゴニストを選択する方法であって、
メモリーB細胞の増殖が増加すればおよび／またはメモリーB細胞の抗体分泌細胞への分化が増加すれば、物質がPD-1アンタゴニストであることを示している、前記方法。
【請求項５８】
メモリーB細胞が持続的感染症の患者由来である、請求項57記載の方法。
【請求項５９】
持続的感染症がヒト免疫不全ウイルス感染症である、請求項58記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権の主張
本出願は、その全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、2008年11月28日に提出された米国特許仮出願第61/118,570号の恩典を主張する。
【０００２】
政府の支援に関する声明
本出願は、NIH助成金ROl AI057029, ROl AI071852 および ROl AI074417の下で米国政府の支援を受けてなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。
【０００３】
分野
本出願は、アンタゴニストを用いること、具体的に持続性の感染症および腫瘍を処置するためにPD-1アンタゴニストを用いること、およびPD-1アンタゴニストの有効量を投与するための方法に関する。
【背景技術】

【０００４】
背景
宿主免疫応答の免疫抑制は、持続的な感染症や腫瘍の免疫抑制に影響を与える。持続的な感染症は、ウイルスが消滅せず、感染個体の特異的細胞にウイルスが残っている感染症である。持続的感染症はしばしば、宿主細胞を急速に殺すことなく、または宿主細胞の過度の損傷も生じることなく、無症候性感染症および増殖的感染症の双方の段階を伴う。持続的なウイルス-宿主相互作用には三つのタイプが存在する：潜伏性、慢性、および遅発性感染症。潜伏性感染症は、疾患再発の事例のあいだに証明可能な感染性のウイルスが存在しないことを特徴とする。慢性感染症は、一次感染症後に感染性ウイルスが連続的に存在することを特徴として、これには慢性または再発性疾患が含まれうる。遅発型感染症は、長期の潜伏期間の後に進行性疾患が続くことを特徴とする。潜伏性および慢性感染症とは異なり、遅発型感染症は、ウイルス複製の急性期と共に始まらないことがある。持続的感染症のあいだ、ウイルスゲノムは、細胞DNAに安定に組み入れられうるか、またはエピソームとして維持されうる。持続的感染症は、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、麻疹ウイルス、パポバウイルス、異種指向性マウス白血病ウイルス関連ウイルス （xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) ）プリオン、肝炎ウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、および乳頭腫ウイルスなどのウイルスによって起こる。
【０００５】
それによって持続的感染症が維持される機構は、ウイルスおよび細胞の遺伝子発現の調節、ならびに宿主免疫応答の改変を伴いうる。潜伏性感染症の再活性化は、細胞生理学の変化、もう一つのウイルスによる重複感染、および身体的ストレスまたは外傷が含まれる様々な刺激によって誘発される可能性がある。宿主の免疫抑制はしばしば、多数の持続的ウイルス感染症の再活性化に関連している。
【０００６】
多くの研究により、癌と診断された患者における免疫応答の欠陥が示されている。特定の癌に関連する多数の腫瘍抗原が同定されている。多数の固形腫瘍に関して、多くの腫瘍抗原が定義されている：免疫によって定義されるMAGE 1、2&3；MART-1/Melan-A、gp100、癌胎児抗原（CEA）、HER-2、ムチン（すなわち、MUC-1）、前立腺特異抗原（PSA）、および前立腺酸ホスファターゼ（PAP）。さらに、B型肝炎（HBV）、エプスタイン-バー（EBV）、およびヒト乳頭腫（HPV）などのウイルスタンパク質はそれぞれ、肝細胞癌、リンパ腫、および子宮頚癌の発症において重要であることが示されている。しかし、癌を有すると診断された患者の免疫抑制により、これらの患者の生得の免疫系はしばしば腫瘍抗原に対して反応することができない。
【０００７】
受動および能動免疫療法はいずれも、腫瘍の処置において有用であると提唱されている。受動免疫は、抗体または細胞障害性T細胞などの免疫応答の成分を、関心対象に供給する。能動免疫療法は、サイトカイン、抗体、または内因性の免疫応答を活性化するための化学化合物などの治療物質を利用して、腫瘍を異物として認識するように免疫系をプライミングする。受動および能動免疫の誘導はいずれも、特定のタイプの癌の処置において成功を収めている。
【０００８】
一般的に、疾患、たとえば自己免疫疾患、炎症障害、アレルギー、移植の拒絶、癌、免疫欠損、ウイルス感染、および他の免疫系関連障害を処置するための安全かつ有効な治療法を提供し、かつそれらを治療するための安全量を確立する必要がある。治療剤（例えば、PD-1アンタゴニスト）のある特定量が被検体の治療に有効であるかを決定する方法の必要性がなお存在する。
【発明の概要】
【０００９】
PD-1アンタゴニストは、PD-1の発現および／または活性を低減させる。持続的感染症な

どの感染症を有する対象を、PD-1アンタゴニストを用いて処置することができる。腫瘍を有する対象もまた、PD-1アンタゴニストを用いて処置することができる。さらに、PD-1アンタゴニストの治療的有効量と共に、関心対象抗原を認識する活性化T細胞の治療的有効量を移植することによって対象を処置することができる。

【００１０】

免疫応答は、哺乳動物レシピエントにおいて測定されうる。いくつかの態様において、本明細書において開示される処置法には、B細胞を測定する段階が含まれる。いくつかの態様において、方法には、被験対象からの試料におけるメモリーB細胞の増殖を測定する段階が含まれる。

【００１１】

いくつかの態様において、PD-1アンタゴニストを投与された被験対象におけるPD-1アンタゴニストの効能を決定するための方法が開示される。これらの方法には、対照と比較して試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストが被験対象の処置にとって有効であることを示している、PD-1アンタゴニストを投与された被験対象からの試料におけるメモリーB細胞の増殖を測定する段階が含まれる。

【００１２】

被験対象を処置するために有用であるPD-1アンタゴニストの用量を決定するための方法も同様に、本明細書において開示される。これらの方法には、PD-1アンタゴニストの第一の用量を被験対象に投与する段階、および被験対象からの第一の試料におけるメモリーB細胞の増殖を決定する段階が含まれる。対照と比較して第一の試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストの第一の用量が被験対象を処置するために有用であることを示している。対照と比較してメモリーB細胞の増殖に有意な変化がなければ、PD-1アンタゴニストの第一の用量が被験対象を処置するために十分でないことを示している。

【００１３】

前述および他の特色および長所は、添付の図面を参照して進行するいくつかの態様に関する以下の詳細な説明からより明らかとなるであろう。

[本発明1001]

PD-1アンタゴニストの第一の用量を被験対象に投与する段階と、

被験対象からの第一の試料におけるメモリーB細胞の増殖を決定する段階と

を含む、被験対象を処置するために有用なPD-1アンタゴニストの用量を決定するための方法であって、

対照と比較して第一の試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストの第一の用量が被験対象を処置するために有用であることを示しており、対照と比較してメモリーB細胞の増殖に有意な変化がなければ、PD-1アンタゴニストの第一の用量が被験対象を処置するために十分ではないことを示している、前記方法。

[本発明1002]

PD-1アンタゴニストの第二の用量を被験対象に投与する段階と、

被験対象からの第二の試料におけるメモリーB細胞の増殖を決定する段階と

をさらに含む、本発明1001の方法であって、

対照と比較して第二の試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストの第二の用量が被験対象を処置するために有用であることを示しており、対照と比較してメモリーB細胞の増殖に有意な変化がなければ、PD-1アンタゴニストの第二の用量が被験対象を処置するために十分ではないことを示している、前記方法。

[本発明1003]

対照と比較して第一の試料におけるメモリーB細胞の増殖に有意な変化がなく、第二の用量が第一の用量より高い、本発明1002の方法。

[本発明1004]

対照と比較して第一の試料からのメモリーB細胞の増殖が増加して、第二の用量が第一の用量より低い、本発明1002の方法。

[本発明1005]
PD-1アンタゴニストを投与された被験対象からの試料におけるメモリーB細胞の増殖を測定する段階
を含む、PD-1アンタゴニストを投与された被験対象におけるPD-1アンタゴニストの効能を決定するための方法であって、
対照と比較して試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストが被験対象を処置するために有効であることを示している、前記方法。
[本発明1006]
被験対象からの試料中のナイーブB細胞を測定する段階をさらに含む、本発明1001～1005のいずれかの方法。
[本発明1007]
増殖しているメモリーB細胞を測定する段階がKi67の発現を測定する段階を含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。
[本発明1008]
メモリーB細胞の増殖を測定する段階が、Ki67に特異的に結合する抗体を用いることを含む、本発明1007の方法。
[本発明1009]
メモリーB細胞の増殖を測定する段階が、ブロモデオキシウリジンの取り込みを測定する段階を含む、本発明1001～1008のいずれかの方法。
[本発明1010]
メモリーB細胞の増殖を測定する段階が、蛍光活性化セルソーティング（FACS）を用いることを含む、本発明1001～1009のいずれかの方法。
[本発明1011]
被験対象がウイルス感染症を有する、本発明1001～1010のいずれかの方法。
[本発明1012]
被験対象が持続的ウイルス感染症を有する、本発明1001～1011のいずれかの方法。
[本発明1013]
被験対象がウイルス抗原を投与される、本発明1011～1012のいずれかの方法。
[本発明1014]
ウイルス感染症が、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、ヘルペスウイルス、エプスタイン-バーウイルス、またはヒト乳頭腫ウイルスによる感染症である、本発明1011～1013のいずれかの方法。
[本発明1015]
被験対象が腫瘍を有する、本発明1001～1010のいずれかの方法。
[本発明1016]
被験対象が腫瘍抗原を投与される、本発明1015の方法。
[本発明1017]
腫瘍関連抗原が、PRAME、WT1、サーバイビン、サイクリンD、サイクリンE、プロテナーゼ3およびそのペプチドPR1、好中球エラスターゼ、カテプシンG、MAGE、MART、チロシナーゼ、GP100、NY-Eso-1、ハーセプチン、癌胎児抗原（CEA）、または前立腺特異的抗原（PSA）である、本発明1016の方法。
[本発明1018]
被験対象が真菌感染症または細菌感染症を有する、本発明1001～1010のいずれかの方法。
[本発明1019]
PD-1アンタゴニストが、PD-1に特異的に結合する抗体、PD-L1に特異的に結合する抗体、PD-L2に特異的に結合する抗体、低分子阻害性抗PD-1 RNAi、低分子阻害性抗PD-L1 RNA、低分子阻害性抗PD-L2 RNAi、抗PD-1アンチセンスRNA、抗PD-L1アンチセンスRNA、抗PD-L2アンチセンスRNA、ドミナントネガティブPD-1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L2タンパク質、PD-1の低分子阻害剤、またはその

組み合わせである、本発明1001～1018のいずれかの方法。
[本発明1020]
PD-1に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、本発明1019の方法。
[本発明1021]
PD-L1に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、本発明1019の方法。
[本発明1022]
PD-L2に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、本発明1019の方法。
[本発明1023]
対照がPD-1アンタゴニストの第一の濃度を投与する前に得られた被験対象からの試料であるか、または標準値である、本発明1001～1022のいずれかの方法。
[本発明1024]
被験対象におけるメモリーB細胞の増殖を増加させることが決定されている用量を投与する段階をさらに含む、本発明1001～1023のいずれかの方法。
[本発明1025]
PD-1アンタゴニストの治療的有効量を被験対象に投与する段階と、
被験対象からの試料におけるメモリーB細胞の増殖を測定し、それによって哺乳動物レシピエントにおける関心対象抗原に対する免疫応答を産生する段階と
を含む、哺乳動物レシピエントにおける関心対象抗原に対する免疫応答を誘導する方法。
[本発明1026]
被験対象がウイルス感染症を有する、本発明1025の方法。
[本発明1027]
被験対象が慢性ウイルス感染症を有する、本発明1026の方法。
[本発明1028]
関心対象抗原がウイルス抗原である、本発明1026～1027のいずれかの方法。
[本発明1029]
ウイルス感染症が、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、ヘルペスウイルス、エプスタイン-バーウイルス、またはヒト乳頭腫ウイルスによる感染症である、本発明1026～1028のいずれかの方法。
[本発明1030]
ウイルス感染症が肝炎ウイルス感染症であり、ウイルス抗原が肝炎gp33である、本発明1028の方法。
[本発明1031]
ウイルス感染症がヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症である、本発明1026～1028のいずれかの方法。
[本発明1032]
ウイルス感染症がヒト免疫不全ウイルス感染症であり、関心対象抗原がgp120である、本発明1028の方法。
[本発明1033]
被験対象が腫瘍を有する、本発明1025の方法。
[本発明1034]
関心対象抗原が腫瘍抗原である、本発明1033の方法。
[本発明1035]
関心対象抗原が、PRAME、WT1、サーバイビン、サイクリンD、サイクリンE、プロテナーゼ3およびそのペプチドPR1、好中球エラスターゼ、カテプシンG、MAGE、MART、チロシナ

ーゼ、GP100、NY-Eso-1、ハーセプチン、癌胎児抗原（CEA）、または前立腺特異的抗原（PSA）である、本発明1034の方法。

[本発明1036]

病原体が真菌であり、関心対象抗原が真菌抗原である、本発明1025の方法。

[本発明1037]

病原体が細菌であり、関心対象抗原が細菌抗原である、本発明1025の方法。

[本発明1038]

PD-1アンタゴニストが、PD-1に特異的に結合する抗体、PD-L1に特異的に結合する抗体、PD-L2に特異的に結合する抗体、低分子阻害性抗PD-1 RNAi、低分子阻害性抗PD-L1 RNA、低分子阻害性抗PD-L2 RNAi、抗PD-1アンチセンスRNA、抗PD-L1アンチセンスRNA、抗PD-L2アンチセンスRNA、ドミナントネガティブPD-1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L2タンパク質、PD-1の低分子阻害剤、またはその組み合わせである、本発明1025～1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

PD-1に特異的に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、本発明1038の方法。

[本発明1040]

PD-L1に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、本発明1038の方法。

[本発明1041]

PD-L2に結合する抗体が、（1）モノクローナル抗体もしくはその機能的断片、（2）ヒト化抗体もしくはその機能的断片、または（3）免疫グロブリン融合タンパク質である、本発明1038の方法。

[本発明1042]

被験対象からの試料中のナイーブB細胞を測定する段階をさらに含む、本発明1025～1041のいずれかの方法。

[本発明1043]

増殖するメモリーB細胞を測定する段階が、Ki67の発現を測定する段階を含む、本発明1025～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

増殖メモリーB細胞を測定する段階が、Ki67に特異的に結合する抗体を用いることを含む、本発明1043の方法。

[本発明1045]

メモリーB細胞の増殖を測定する段階が、ブロモデオキシウリジンの取り込みを測定する段階を含む、本発明1025～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

メモリーB細胞の増殖を測定する段階が、蛍光活性化セルソーティング（FACS）を用いることを含む、本発明1025～1045のいずれかの方法。

[本発明1047]

追加の化合物の治療的有効量を被験対象に投与する段階をさらに含む、本発明1001～1046のいずれかの方法。

[本発明1048]

第二の化合物が抗ウイルス化合物、抗菌化合物、抗真菌化合物、抗寄生虫化合物、抗炎症化合物、または鎮痛薬である、本発明1047の方法。

[本発明1049]

被験対象が免疫抑制されている、本発明1001～1048のいずれかの方法。

[本発明1050]

被験対象が無症候性である、本発明1001～1049のいずれかの方法。

[本発明1051]
被験対象がヒトである、本発明1001～1050のいずれかの方法。
[本発明1052]
メモリーB細胞を含む細胞集団に物質を接触させる段階と、
メモリーB細胞の増殖および／またはメモリーB細胞の抗体分泌細胞への分化を検出する段階と
を含む、有用なPD-1アンタゴニストを選択する方法であって、
メモリーB細胞の増殖が増加すればおよび／またはメモリーB細胞の抗体分泌細胞への分化が増加すれば、物質がPD-1アンタゴニストであることを示している、前記方法。
【図面の簡単な説明】
【００１４】
【図１】図1Aは、遺伝子アレイ分析によって測定した、ナイーブなトランスジェニックマウス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）アームストロング免疫（感染後およそ30日）感染マウス、またはCD4枯渇LCMV-Cl-13感染マウス（感染後およそ30日）からのD$^{b}$GP33-41および／またはD$^{b}$GP276-286特異的T細胞におけるPD-1 mRNAレベルを示す棒グラフである。図1Bは、感染後およそ60日でのLCMVアームストロング免疫およびCD4枯渇LCMV-Cl-13感染マウスにおけるCD8+テトラマー+T細胞上のPD-1表面発現を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。アネルギーCD8+ T細胞は、LCMV-Cl-13ウイルスによる慢性的な（「慢性的」と表示）感染後およそ60日目で細胞表面上に高レベルのPD-1ポリペプチドを発現するが、ウイルス特異的CD8+ T細胞は、急性のLCMVアームストロング感染症の消滅後にPD-1ポリペプチドを発現しない（「免疫」と表示）。図1Cは、慢性的に感染したマウスおよび非感染マウスからの脾細胞におけるPD-L1の存在を証明するフローサイトメトリー実験の一連の画像である。これは、PD-L1発現が、ウイルスに感染した脾細胞において最高であることを証明している。
【図２】図2Aは、Cl-13感染マウスを感染後23日から37日まで処置した場合に、無処置対照と比較して、DbNP396-404特異的およびDbGP33-41特異的CD8+ T細胞の数がおよそ3倍増加したことを示す一連のスキャッタープロットである。機能のいかなる変化も決定するために、異なるLCMVエピトープ8個に応答したIFN-γおよびTNF-α産生を測定した。図2Bは、公知の全てのCD8+ T細胞特異性を測定した場合に、LCMV特異的CD8+ T細胞の総数が2.3倍増加したことを示すスキャッタープロットである。図2Cは、異なるLCMVエピトープ8個に応答したIFN-γおよびTNF-α産生を示す一連のフローサイトメトリーグラフである。図2Dは、処置マウスにおけるより多くのウイルス特異的CD8+ T細胞がTNF-αの産生能を有することを示すスキャッタープロットである。図2Eは、PD-L1遮断によってまた、脾臓、肝臓、肺、および血清におけるウイルス制御の増加が起こったことも示す一連の棒グラフである。
【図３】図3Aは、感染後46～60日目に抗PD-L1（「αPD-L1」と表示）によって処置したCD4-枯渇Cl-13感染マウスにおけるDbGP33-41およびDbGP276-286特異的CD8+ T細胞（「GP33」および「GP276」と表示）の増加を示すグラフであり、抗PD-L1によって処置したマウスが無処置マウスよりおよそ7倍多いDbGP276-286特異的脾臓CD8+ T細胞およびおよそ4倍多いDbGP33-41特異的脾臓CD8+ T細胞を含有したことを証明している。図3Bは、感染後46～60日目に抗PD-L1によって処置した（「αPD-L1 Tx」と表示）CD4-枯渇Cl-13感染マウス対対照マウス（「untx」と表示）の脾臓におけるDbGP33-41およびDbGP276-286特異的CD8+ T細胞の頻度の増加を証明するフローサイトメトリー実験の一連の画像である。図3Cは、BrdU取り込みおよびKi67発現によって測定した場合に、抗PD-L1処置マウスにおけるDbGP276-286特異的CD8+ T細胞の増殖の増加を証明するフローサイトメトリー実験の一連の画像である。図3Dは、脾臓におけるDbGP276-286特異的CD8+ T細胞と比較してPBMCにおけるDbGP276-286特異的CD8+ T細胞を比較することによって示されるように、高レベルのCD8+ T細胞拡大を有するマウスが、末梢血単核球（PBMC）において認識可能な応答を表示することを示すチャートである。
【図４】図4Aは、対照と比較して抗PD-L1処置マウスにおけるIFN-γ産生DbGP276-286およ

びDbGP33-41特異的CD8+ T細胞の増加を示す一連のチャートである。抗PD-L1処置マウスではまた、より高頻度のDbNP396-404、KbNP205-212、DbNP166-175、およびDbGP92-101特異的CD8+ T細胞が検出された。図4Bは、抗PD-L1処置マウスでは、対照マウスにおけるDbGP276-286特異的CD8+ T細胞の20％と比較して、DbGP276-286特異的CD8+ T細胞の50％がIFN-γを産生することを証明するチャートである。図4Cは、抗PD-L1処置した慢性感染マウスが無処置の慢性感染マウスより高レベルのTNF-αを産生するが、LCMVアームストロングウイルスに感染した免疫マウスより低レベルのTNF-αを産生することを証明するフローサイトメトリー実験の一連の画像である。図4Dは、$^{51}$Cr放出アッセイを用いて測定した場合に、抗PD-L1によってLCMV-Cl-13感染マウスを処置すると、無処置感染マウスと比較した場合にウイルス特異的T細胞のエクスビボ溶解活性を取り戻すことを証明するチャートである。図4Eは、LCMV-Cl-13感染マウスをα-PD-L1によって処置した後の様々な臓器におけるウイルス力価の低減を証明する一連のチャートである。ウイルス力価は、無処置マウスと比較して抗PD-L1処置の2週間後に脾臓においておよそ3倍、肝臓において4倍、肺において2倍、および血清において2倍減少した。

【図５】図5Aは、慢性的なクレードC HIV感染症において標的化された優性エピトープに対して特異的なHIVテトラマー10個を用いたPD-1表面発現を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。百分率は、PD-1$^+$であるテトラマー$^+$細胞の百分率を示す。図5Bは、抗レトロウイルス療法ナイーブな個体における総CD8+ T細胞集団と比較して、PD-1の百分率およびMFIが、HIV特異的CD8+ T細胞において有意にアップレギュレートされていること（$p<0.0001$）、およびPD-1がHIV感染対HIV血清陰性対照における総CD8+ T細胞集団において増加する（それぞれ、$p=0.0033$および$p<0.0001$）ことを証明する一連のチャートである。HIV感染個体65人およびHIV血清陰性対照11人からのHIVテトラマー染色120例を分析に含めた。図5Cは、エピトープ特異性によってテトラマー$^+$細胞におけるPD-1発現の百分率およびMFIの中央値を示す一連のチャートである。図5Dは、多数の検出可能な応答を有する個体における異なるエピトープ特異的集団におけるPD-1$^+$細胞の百分率における変動を描写するチャートである。水平方向のバーは、各個体におけるPD-1$^+$HIVテトラマー$^+$細胞の百分率の中央値を示す。

【図６】図6Aは、テトラマー染色によって測定した場合にHIV特異的CD8+ T細胞数と血漿ウイルス負荷のあいだに相関がないが、テトラマー$^+$細胞におけるPD-1の百分率およびMFIと血漿ウイルス負荷のあいだには正の相関が存在する（それぞれ、$p=0.0013$および$p<0.0001$）ことを証明する一連のチャートである。図6Bは、HIVテトラマー$^+$細胞数とCD4数のあいだに相関がないが、HIVテトラマー$^+$細胞におけるPD-1の百分率およびMFIと、CD4数のあいだに逆相関が存在する（それぞれ、$p=0.0046$および$p=0.0150$）ことを示す一連のチャートである。図6Cは、総CD8+ T細胞集団におけるPD-1の百分率およびMFIが血漿ウイルス負荷と正の相関がある（それぞれ、$p=0.0021$および$p<0.0001$）ことを証明する一連のチャートである。図6Dは、総CD8+ T細胞集団におけるPD-1発現の百分率およびMFIが、CD4数と逆相関する（それぞれ、$p=0.0049$および$p=0.0006$）ことを描写する一連のチャートである。

【図７】図7Aは、B*4201 TL9特異的CD8+ T細胞の98％がPD-1$^+$である対象SK222からのB*4201 TL9特異的CD8+ T細胞の代表的な表現型染色を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。図7Bは、HIV特異的CD8$^+$ T細胞の＞95％がPD-1$^+$である人からの表現型データのサマリーを図示するチャートである。表記の表現型マーカーのそれぞれに関して試料7～19例を分析した。水平方向のバーは、表記のマーカーに関して陽性であったテトラマー$^+$ PD-1$^+$細胞の百分率の中央値を示す。

【図８】図8Aは、B*4201陽性対象からの代表的な増殖アッセイデータを示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。ペプチドによる6日間の刺激後、B*4201 TL9特異的CD8+ T細胞の百分率は、抗PD-L1ブロッキング抗体の存在下で5.7％から12.4％に増加した。図8Bは、抗PD-L1ブロッキング抗体の存在下でHIV特異的CD8+ T細胞増殖の有意な増加を示す増殖アッセイデータのサマリーを描写する折れ線グラフである（$n=28$、$p=0.0006$、対応のあるt検定）。図8Cは、個々の患者に基づいてHIV特異的CD8+ T細胞の増殖に及ぼすPD

-1/PD-L1遮断の異なる効果を示す棒グラフである。白色の棒グラフは、ペプチド単独の存在下でのテトラマー$^+$細胞の増加倍数を示し、黒色の棒グラフは、ペプチド＋抗PD-L1ブロッキング抗体の存在下でのテトラマー$^+$細胞の増加倍数を示す。CFSEアッセイを一つより多くのエピトープについて行った個体を星印、四角印、または三角印で示す。

【図９】図9A～9Dは、慢性感染マウスにおいて、抗原特異的CD8-T細胞頻度およびウイルス力価に及ぼす、PD-L1遮断と組み合わせた治療ワクチンの相乗効果を示すダイアグラムおよびグラフの組である。図9Aは、実験プロトコールの図解ダイアグラムである。LCMVクローン-13（CL-13）感染マウスに、感染後4(週)目に野生型ワクシニアウイルス（VV/WT）、またはLCMV GP33-41エピトープ発現ワクシニアウイルス（VV/GP33）をワクチン接種した。同時に、マウスを抗PD-L1によって3日ごとに5回処置したか、または処置を行わなかった。図9Bは、治療後1週目でPBMCにおけるGP33およびGP276特異的CD8-T細胞の頻度を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。数値は、CD8-T細胞あたりのテトラマー陽性細胞の頻度を表す。データは実験3回の典型例（representative）である。図9C～9Dは、治療後の血液におけるGP33およびGP276特異的CD8-T細胞の頻度（図9C）ならびにウイルス力価（図9D）のグラフである。テトラマー陽性CD8-T細胞数およびウイルス力価の変化をそれぞれ、表記の時点でテトラマー染色およびプラークアッセイによって血液中でモニターした。テトラマー陽性CD8-T細胞数およびウイルス力価を、VV/WTまたはVV/GP33による感染（直線）後および抗PD-L1による処置後（影をつけた領域）の個々のマウス（上の四つのパネル）および多数のマウス（下のパネル）に関して示す。破線は、ウイルスの検出限界を表す。結果を実験3回からプールする。

【図１０】図10A～10Dは、PD-L1遮断と組み合わせて治療ワクチンを与えたマウスの異なる組織における抗原特異的CD8-T細胞の増加およびウイルス制御の増強を示すグラフおよびデジタル画像である。図10Aは、治療後4週目での異なる組織におけるGP33特異的CD8-T細胞の頻度を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。数値は、CD8-T細胞あたりのGP33テトラマー陽性細胞の頻度を表す。データは、実験2回の代表である。図10Bは、治療後4週目での異なる組織におけるGP33特異的CD8-T細胞数のグラフである。図10Cは、治療後2週目（黒）および4週目（白）での表記の組織におけるウイルス力価を示す棒グラフの組である。破線は、ウイルスの検出限界を表す。1群あたりマウスn＝6匹。結果を実験2回からプールする。図10Dは、治療後2週目でのaLCMV抗原（赤色）による脾臓の免疫染色のデジタル画像である。倍率：20倍。

【図１１】図11A～11Dは、PD-L1遮断と組み合わせた治療ワクチンによる、消耗したCD8-T細胞における機能回復の増強を示すプロットおよびグラフである。図11Aは、治療後4週目でのワクチン接種マウスの脾細胞によるIFN-γ産生および脱顆粒を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。脾細胞をαCD107a/b抗体の存在下で表記のペプチドによって刺激した後、IFN-γに関して共染色した。示したプロットは、CD8-T細胞に関してゲートを設定され、独立した実験2回の代表である。図11Bは、図11AからのLCMVペプチドのそれぞれに対して特異的なCD8-T細胞あたりのIFNγ$^+$CD107$^+$細胞の百分率を示すグラフであり、多数のマウスに関するサマリーである（各応答に関してn＝6）。結果を実験2回からプールする。図11Cは、ワクチン接種マウスにおいてIFN-γを産生することができるCD8-T細胞からのTNF-α産生を示すプロットの組である。脾細胞をGP33-41またはGP276-286ペプチドによって刺激した後、IFNγ産生CD8- T細胞をゲート設定した後、IFN-γ（x-軸）対TNF-α（y-軸）によってプロットした。プロットの上下の数値はそれぞれ、IFNγ$^+$細胞におけるTNF-α$^+$細胞の頻度およびIFNγ$^+$細胞の平均蛍光強度（MFI）を示す。データは、独立した実験2回の代表である。図11Dは、図11CからのGP33-41またはGP276-286ペプチドに関するIFN-γ$^+$細胞あたりのTNF-α$^+$細胞の百分率を示すグラフであり、多数のマウスに関してサマリーする（各応答に関してn＝6）。

【図１２】図12A～12Bは、慢性感染マウスの抗原特異的CD8-T細胞の表現型を変化させる、PD-L1遮断と組み合わせた治療ワクチンの効果を示すプロットの組である。図12Aは、治療後の表記の時間でのPBMCにおけるGP33テトラマー特異的CD8-T細胞の表現型を示すプロットの組である。ヒストグラムのゲートをGP33$^+$CD8-T細胞に関して設定した。高レベルの

CD27またはCD127を発現する集団の頻度を、プロット上の百分率によって示す。グランザイムBのヒストグラム上の数値は、発現のMFIを表す。データは、独立した実験3回の代表である。図12Bは、治療後4週目で異なる組織におけるGP33テトラマー特異的CD8-T細胞の表現型の変化を示すプロットの組である。ヒストグラムのゲートを$GP33^{+}CD8$-T細胞に関して設定した。高レベルのCD127またはPD-1を発現する集団の頻度をプロット上の百分率によって示す。グランザイムBおよびBcl-2のヒストグラム上の数値は、発現のMFIを表す。データは、独立した実験2回の代表である。

【図１３】図13A～13Eは、「無力な」消耗したCD8 T細胞における機能の回復に及ぼすPD-L1遮断と組み合わせた治療ワクチンの相乗効果を示す図解ダイアグラム、プロット、およびグラフである。図13Aは、プロトコールの図解ダイアグラムである。マウスからCD4 T細胞を枯渇させた後、LCMVクローン-13を感染させた。マウス数匹に、感染後7週目に野生型ワクシニアウイルス（VV/WT）またはLCMV GP33-41エピトープ発現ワクシニアウイルス（VV/GP33）をワクチン接種した。同時に、マウスを、αPD-L1またはそのアイソタイプによって3日ごとに5回処置した。抗体の初回処置後2週目に、マウスを分析のために屠殺した。図13Bは、治療後4週目での表記の組織におけるGP33特異的CD8-T細胞の頻度を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像および棒グラフである。数値は、CD8-T細胞あたりのGP33テトラマー陽性細胞の頻度を表す。治療後2週目での異なる組織におけるCD8 T細胞あたりのGP33特異的細胞の頻度も同様にサマリーする。図13Cは、脾細胞をαCD107a/b抗体の存在下でGP33ペプチドによって刺激して、IFN-γに関して共染色する実験からの結果を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。示されたプロットのゲートをCD8-T細胞について設定する。GP33ペプチドに関して特異的なCD8-T細胞あたりの$IFN\text{-}\gamma^{+}$ $CD107^{+}$細胞の百分率を、多数のマウスに関してサマリーする。図13Dは、Db-拘束GP33-41テトラマーに関して陽性である細胞あたりのGP33ペプチドによる刺激後の$IFN\text{-}\gamma^{+}$細胞の百分率の棒グラフであり、多数のマウスに関してサマリーする。図13Eは、治療後2週目での表記の組織におけるウイルス力価の棒グラフである。プロットは全て実験2回の代表であり、サマリーした結果は全て実験2回からのプールである（1群あたりマウスn＝6）。

【図１４】図14A～14Bは、先天性のキャリアマウスへの養子移入後、PD1/PD-L1シグナル伝達経路の遮断が、抗原特異的T細胞の総数を増加させることを示す、プロットおよびグラフの組である。全脾細胞を、抗PD-L1による治療と共に、または治療を行わずに、先天性のキャリアマウスに養子移入した。図14Aは、$CD8^{+}$T細胞に関してゲートを設定した特異的時点からの代表的なフローサイトメトリープロットの組である。図14Bは、独立した実験2回からの末梢血におけるDb GP33-特異的CD8 T細胞拡大のキネティクスを示すグラフである（1群あたり動物n＝4）。

【図１５】図15A～15Eは、養子T細胞免疫療法後のPD-1/PDL1経路の遮断が、抗原特異的CD8 T細胞におけるサイトカイン産生を増強することを示すプロットおよびグラフである。脾細胞を移入後17日目に単離して、抗原性ペプチドによる刺激時のサイトカイン発現に関して分析した。図15Aは、定義されたCD8エピトープによる刺激5時間後、またはペプチドなしの対照における、細胞内サイトカイン染色によって査定した場合のIFNγの発現に関して示される代表的なフロープロットの組である。図15Bおよび15Dは、TNFαまたは107abとIFNγとの二重発現に関して示される代表的なプロットである（象限のスタットはCD8ゲートの百分率である）。図15Cおよび15Eは、同様にTNFαまたは107ab（1群あたり動物n＝3）を産生するIFNγ産生細胞の百分率のグラフである。

【図１６】図16A～16Bは、LCMVクローン13感染マウスにおける抗体分泌細胞のレベルの増加を示すグラフおよびプロットである。総ASCレベルを、ELISPOTおよびCD138染色によってαPD-L1処置後の慢性的LCMV感染マウスにおいて測定した。図16Aは、脾臓ASCの総数のグラフであり、独立した実験3回からの結果のサマリーである。図16Bは、脾臓における抗体分泌細胞（ASC）の増加を、マーカーCD138によって測定することができることを示すプロットの組である。一つの代表的なプロットを示し、ASCは、CD138+およびB220低／中間体である（リンパ球に関してゲート設定）。

【図１７】抗PD-L1による慢性的LCMV感染マウスの処置によって、骨髄ASCレベルの上昇が

起こらないことを示すグラフである。ASCの総数を、ELISPOTによって、抗（α）PD-L1処置後14日目の慢性的LCMV感染マウスの脾臓および骨髄から計数した。線は、群内の幾何平均を表す。

【図１８】αPD-L1およびαCTLA-4の同時投与によって、脾臓ASCの相乗的増加が起こることを示すグラフである。慢性LCMV感染マウスにαPD-L1、αCTLA-4、またはその双方を14日間投与して、脾臓におけるASCをELISPOTによって計数した。線は処置群における幾何平均を表す。

【図１９】図19A～19Bは、αPD-L1処置マウスにおける増強されたB細胞ならびにCD4 T細胞増殖および胚中心活性を示すプロットである。図19Aは、αPD-L1処置後のKi-67レベルの上昇を示すCD4 T細胞およびB細胞のフローサイトメトリー分析のプロットである。結果は、先に記載された各カラムと同様に、CD4またはB細胞においてゲートされる。図19Bは、PNAおよび高レベルのFASを発現するB細胞の頻度の増加を示すプロットの組であり、これはαPD-L1によって処置したマウスにおける胚中心活性の増強を示している。プロットは、異なる実験2回の結果をサマリーする一つの代表的なグラフである。

【図２０】図20A～20Cは、CD8およびCD4 T細胞サブセットにおけるPD-1発現を示すプロットおよびグラフである。図20Aは、血液中でのCD8+/CD3+リンパ球における、PD-1と様々な表現型マーカーの共発現を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。図20Bは、PD-1を発現する様々なCD8+/CD3+および（D）CD4+/CD3+ T細胞サブセットの百分率のプロットの組である。水平方向のバーは、表記のマーカーに関して陽性（白丸）および陰性（黒三角）であるT細胞におけるPD-1の百分率の平均値を示す。図20Cは、対象1人からのPD-1発現CD4+ T細胞の表現型データを表すプロットの組である。

【図２１】図21A～Bは、PD-1が慢性感染症に対して特異的なCD8 T細胞においてより高度に発現されることを証明するプロットおよびグラフである。図21Aは、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、インフルエンザおよびワクシニアウイルス特異的CD8 T細胞の代表的なPD-1染色を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。テトラマー+細胞におけるPD-1発現の幾何平均蛍光強度（GMFI）を示す。図21Bは、健康なボランティア（n＝35）からのEBV、CMV、インフルエンザ、およびワクシニアウイルス特異的CD8 T細胞におけるPD-1 GMFIのサマリーを示すプロットである。

【図２２】図22A～Cは、抗PD-L1遮断が、慢性感染症に対して特異的なCD8 T細胞のインビトロ増殖を増加させることを証明するプロットおよびグラフである。図22Aは、CFSEによって標識した後、表記の条件下で6日間培養したリンパ球を示すフローサイトメトリー実験の一連の画像である。画像は、EBVおよびCMV陽性対象からの代表的な染色を示す。図22Bは、抗PD-L1ブロッキング抗体による遮断後のEBV、CMV、インフルエンザ、およびワクシニアウイルス抗原特異的応答の棒グラフである。棒グラフは、ペプチド単独と比較してペプチド＋抗PD-L1ブロッキング抗体の存在下でのテトラマー+細胞の増加倍数を示す。図22Cは、抗PD-L1抗体遮断後のテトラマー+細胞における増加倍数とPD-1発現（培養前）との関係を示す折れ線グラフである。

【図２３】図23B～23Cは、C型肝炎ウイルス（HCV）特異的CD8+ T細胞が、ヒト慢性HCV感染症においてPD-1を発現することを示すプロットおよびグラフである。図23Aは、HCV特異的CD8+ T細胞におけるPD-1の発現を示す慢性HCV感染症患者5人からの代表的なプロットである。太字の数値は、HCV特異的CD8+ T細胞（y-軸）におけるPD-1発現の頻度（x-軸）を同定する。プロット内の斜体での数値は、総CD8+ T細胞におけるテトラマー陽性細胞の頻度を同定する。y-軸において、1073および1406は、テトラマーのHCVエピトープ特異性を同定する。患者は、患者番号が後に続く「Pt」によって同定される。細胞をCD8+リンパ球に関してゲート設定した。プロットは対数尺度である。図23Bは、健康なドナー（CD8健康）、HCV感染患者（CD8 HCV）からのCD8+ T細胞、およびCD8+ HCV特異的T細胞（HCV tet+）におけるPD-1発現の比較である。図23Cは、HCV（HCV tet+）に関して特異的なCD8+ T細胞におけるPD-1発現と比較した、HCV感染（HCV+）および健康ドナー（健康）からのインフルエンザウイルスに対して特異的な（Flu tet+）CD8+ T細胞におけるPD-1発現のグラフである。対応のないt検定を用いて、総CD8+ T細胞対HCV特異的CD8+ T細胞における同じ患

者内のPD-1発現の差を比較した。

【図２４】図24A～24Dは、肝臓からのPD-1発現CD8+ T細胞の頻度が末梢血からの細胞の頻度より大きいことを示すプロットおよびグラフである。図24Aは、末梢血対肝臓からの総CD8+ T細胞におけるPD-1の発現を示す、慢性HCV感染症患者5人の代表的なプロットである。プロット内の太字の数値は、リンパ球ゲートにおける総CD8+ T細胞におけるPD-1発現を有する細胞の頻度を同定する。プロットは対数尺度である。図24Bは、HCV慢性感染患者における末梢血対肝臓からのCD8+ T細胞におけるPD-1発現の比較である。対応のあるt検定を用いて同じ患者内でのPD-1発現の差を比較した。図24Cは、末梢血対肝臓からのCD8+エフェクターメモリー（$T_{EM}$）細胞におけるPD-1発現の比較である。メモリーサブセットは、CD62LおよびCD45RAの示差発現によって同定した。上のプロットにおける太字の数値は、それぞれの象限における細胞の頻度を表す。細胞をCD8+リンパ球に関してゲート設定した。$T_{EM}$サブセットをゲート設定して（四角）、PD-1の発現を下のヒストグラムプロットにおいて示す。点線は、ナイーブなCD8+ T細胞（陰性集団として用いられる）におけるPD-1発現を示す。ヒストグラムプロットの数値は、PD-1を発現する細胞の頻度を表す。慢性HCV感染症患者10人に関するCD8+ $T_{EM}$細胞におけるPD-1発現の頻度の比較を、ヒストグラムプロットの下にサマリーする。対応のあるt検定を用いて、同じ患者内の末梢血対肝臓からのCD8+ $T_{EM}$におけるPD-1発現の差を比較した。図24Dは、末梢血対肝臓からの総CD8+ T細胞におけるCD127発現の差を示す慢性HCV感染症患者2人からの代表的なプロットである。太字の数値は、総CD8+ T細胞におけるCD127発現の頻度を同定する。細胞をCD8+リンパ球についてゲート設定した。プロットは対数尺度である、末梢血対肝臓における総CD8+ T細胞におけるCD127発現の比較のサマリーをFACSプロットの下に示す。対応のあるt検定を統計分析のために用いた。

【図２５】肝臓におけるHCV特異的CD8+ T細胞が消耗表現型を示すことを示すグラフおよびプロットの組である。慢性HCV感染症患者2人の末梢血および肝臓からのHCV特異的CD8+ T細胞におけるPD-1およびCD127発現の代表的なプロット。プロットの第一列は、HCVテトラマー陽性集団（四角）を同定する。四角の上の数値は、CD3+リンパ球におけるテトラマー陽性細胞の頻度を表す。HCVテトラマーのエピトープ特異性をy-軸において同定する（1073）。プロットの第二および第三の列は、慢性HCV感染症患者2人の末梢血および肝臓からのHCV特異的CD8+ T細胞におけるPD-1およびCD127発現を示す。太字の数値は、HCV特異的CD8+ T細胞におけるPD-1またはCD127発現の頻度を表す。プロットは対数尺度であり、CD3+CD8+リンパ球に関してゲートを設定する。FACSプロットの下に、総CD8+ T細胞、対末梢からのCD8+ HCV特異的T細胞（HCV tet+ PBMC）、対肝臓からのHCV特異的CD8+ T細胞（HCV tet+肝臓）におけるPD-1発現（左）およびCD127発現（右）の比較のサマリーを示す。対応のあるt検定を用いて同じ患者内での発現を比較した。

【図２６】PD-1/PD-L1経路の遮断が、抗原刺激したHCV特異的T細胞の拡大を増加させることを示すプロットの組である。異なるHLA-A2患者2人からのCFSE標識PBMCを、IL-2および抗PD-L1抗体（上のパネル）または抗PD-1抗体（下のパネル）の存在下で同源のペプチド抗原を用いて6日間刺激した。非刺激対照も同様に示す。増殖しつつあるCFSE低およびCFSE高HCV特異的HLA-A2+ CD8+ T細胞の百分率をそれぞれの象限において示す。

【図２７】図27A～27Dは、SIV239感染後のサル免疫不全ウイルス（SIV）特異的CD8 T細胞におけるPD-1発現の上昇を示すプロットおよびグラフである。図27Aは、正常なマカクからの総CD8 T細胞におけるPD-1発現を示すプロットである。図27Bは、SIV239感染マカクにおける総およびSIV-gag特異的CD8 T細胞におけるPD-1発現を示すプロットである。SIV感染後12週目にPBMCについて分析を行った。図27Cは、正常およびSIV感染マカクからの総およびSIV-特異的CD8 T細胞におけるPD-1陽性細胞のサマリーを提供するグラフである。SIV感染マカクに関するデータは、感染後12週目でのデータを表す。図27D（最後のパネル）は、正常およびSIV感染マカクからの総およびSIV特異的CD8 T細胞におけるPD-1発現の平均蛍光強度（MFI）のサマリーを提供するグラフである。

【図２８】図28A～28Bは、PD-1のインビトロ遮断によって、SIV特異的CD8 T細胞の拡大の増強が起こることをそれぞれ示すプロットおよびグラフである。SHIV89.6Pに感染したMam

u A*01陽性マカクからのPBMCを、抗PD-1ブロッキングAb（10μg/ml）の非存在下および存在下で、P11Cペプチド（0.1μg/ml）によって6日間刺激した。3日間刺激後、IL-2（50単位/ml）を加えた。刺激終了時に細胞をCD3、CD8、およびGag-CM9テトラマーに関して表面上で染色した。非刺激細胞（nostim）を陰性対照とした。細胞を、散乱に基づいて、後にCD3に基づいてリンパ球に関してゲートを設定し、CD8およびテトラマーの発現に関して分析した。図28Aは、代表的なFACSプロットである。グラフ上の数値は、総CD8 T細胞の百分率としてテトラマー陽性細胞の頻度を表す。図28Bは、マカク6匹からのデータのサマリーを提供するグラフである。感染後12週目に得られた細胞を用いて分析を行った。増加倍数を、P11C刺激培養物および非刺激細胞におけるテトラマー陽性細胞の頻度の比率として計算した。

【図２９】LCMV感染後の異なる細胞タイプにおけるPD-L1、PD-L2、およびPD-1発現のキネティクスを示すプロットの組である。マウスにクローン-13（CL-13）$2\times10^6$ pfuを感染させた。異なるタイプの細胞におけるPD-L1、PD-L2、およびPD-1発現を表記の感染後の時点でヒストグラムとして示した。表記の細胞タイプにおけるPD-1発現の平均蛍光強度（MFI）を示す。

【図３０ａ】慢性SIV感染症のあいだにインビボでPD-1を遮断すると、血液および腸管の双方において機能の質が改善されたGag-CM9-特異的CD8 T細胞が増加することを示すPACSプロットである。図30aは、マカクRRk10に関する代表的なFACSプロットである。

【図３０ｂ】図30bおよび30cは、血液（図30b）および腸管（結腸直腸粘膜組織）（図30c）におけるGag-CM9-テトラマー-陽性CD8 T細胞の規模および表現型を示すFACSプロットである。代表的なFACSプロットを左側に示し、全てのMamu A*01陽性動物の要約を右側に示す。FACSプロット上の数字は、総CD8 T細胞の百分率としてのテトラマー陽性細胞の出現率を表す。矢印および垂直な線は、抗PD-1抗体または対照抗体処置を示す。

【図３０ｃ】図30bおよび30cは、血液（図30b）および腸管（結腸直腸粘膜組織）（図30c）におけるGag-CM9-テトラマー-陽性CD8 T細胞の規模および表現型を示すFACSプロットである。代表的なFACSプロットを左側に示し、全てのMamu A*01陽性動物の要約を右側に示す。FACSプロット上の数字は、総CD8 T細胞の百分率としてのテトラマー陽性細胞の出現率を表す。矢印および垂直な線は、抗PD-1抗体または対照抗体処置を示す。

【図３１】慢性SIV感染症のあいだにインビボでPD-1を遮断すると、多機能ウイルス特異的CD8 T細胞が増加することを示す。図31aは、総CD8 T細胞の百分率としてのGag特異的サイトカイン分泌CD8 T細胞の出現率を示す。代表的なFACSプロットを左側に示して、群の要約を右側に示す。矢印および垂直な線は、抗PD-1抗体または対照抗体処置を示す。線は、抗PD-1抗体処置マカクを表し、赤い線は対照抗体処置マカクを表す。図31bは、総サイトカイン陽性細胞の百分率として表されたサイトカイン同時発現サブセットを示す。各群の平均百分率を示す。

【図３２】慢性SIV感染症のあいだにインビボでPD-1を遮断すると、SIV特異的液性免疫が増強されることを示す。図32aは、SIV感染後でインビボPD-1遮断前での血液中のメモリー（$CD20^+CD27^+CD21^-$）およびナイーブ（$CD20^+CD27^-CD21^+$）B細胞上でのPD-1の発現を示す。図32bは、遮断後の血清中の抗SIV Env結合抗体の力価を示す。図32cは、遮断後のメモリーおよびナイーブB細胞上のKi67発現（増殖に関するマーカー）を示す。FACSプロット上の数字は、それぞれの総細胞の百分率としてのKi67陽性細胞を表す。マカクRAf11およびRJd11を、SIV感染後22週目に、抗PD-1抗体および抗レトロウイルス治療によって同時に処置した。

【図３３】インビボでPD-1を遮断すると、血漿中のウイルス血症を低減させて、SIV感染マカクの生存を延長させることを示す。感染の初期慢性期の際に抗PD-1抗体によって処置されたマカク（図33a）、感染の後期慢性期の際に抗PD-1抗体によって処置されたマカク（図33b）、およびSIV感染症の初期／後期慢性期の際に対照抗体によって処置されたマカク（図33c）における血漿中のウイルス量。星印は、動物の死亡を示している。図33dは、0日目から28日目（初期慢性期）または0日目から21日目（後期慢性期）のあいだの血漿中のウイルス量の低減倍率を示す。図33eは、PD-1遮断後のSIV感染マカクの生存を示す。

【発明を実施するための形態】
【００１５】
配列表
添付の配列表に記載した核酸およびアミノ酸配列を、37 C.F.R. 1.822において定義されるように、ヌクレオチド塩基に関して標準的な一文字表記およびアミノ酸に関して三文字コードを用いて示す。各核酸配列の一つの鎖のみを示すが、表示の鎖に対する任意の参照によって、相補鎖が含まれると理解される。添付の配列表において：
【００１６】
SEQ ID NO:1は、ヒトPD-1の例示的なアミノ酸配列である。
【００１７】
SEQ ID NO:2は、マウスPD-1の例示的なアミノ酸配列である。
【００１８】
SEQ ID NO:3は、ヒトPD-L1の例示的なアミノ酸配列である。
【００１９】
SEQ ID NO:4は、ヒトPD-L2の例示的なアミノ酸配列である。
【００２０】
SEQ ID NO:5～12は、ヒトフレームワーク領域の例示的なアミノ酸配列である。
【００２１】
SEQ ID NO:13～35は、抗原性ペプチドの例示的なアミノ酸配列である。
【００２２】
SEQ ID NO:36～43は、主要組織適合性ペプチドのアミノ酸配列である。
【００２３】
SEQ ID NO:44およびSEQ ID NO:45は、T細胞エピトープのアミノ酸配列である。
【００２４】
SEQ ID NO:46は、変種ヒトPD-L2の例示的なアミノ酸配列である。
【００２５】
SEQ ID NO:47～52は、抗原性ペプチドの例示的なアミノ酸配列である。
【００２６】
SEQ ID NO:53～56は、プライマーの核酸配列である。
【００２７】
詳細な説明
本開示は、腫瘍または持続的ウイルス感染症などの免疫応答の誘導のためにPD-1アンタゴニストを用いることに関する。本開示はまた、被検体を治療するために有効なPD-1アンタゴニストの用量を決定するための方法に関する。
【００２８】
用語
特に明記していない限り、技術用語は通常の使用に従って用いられる。分子生物学における一般的な用語の定義は、Benjamin Lewin, Genes V, Oxford University Pressから出版, 1994 (ISBN 0-19- 854287-9)；Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd.から出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9)；およびRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology : a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc.から出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)において見いだされるであろう。
【００２９】
本開示の様々な態様の概説を容易にするために、特定の用語に関する以下の説明を提供する。
【００３０】
変更：そのパラメータに関する対照値と比較したパラメータの統計学的に有意な変化。1つの例において、「増加」は、対照と比較した、メモリーB細胞の数または増殖などのパラメータの統計学的に有意な上昇である。適した統計分析は当技術分野において周知であ

り、これにはStudent's T検定およびANOVAアッセイが含まれるが、これらに限定されるわけではない。いくつかの例において、これはp値≦0.05である。他の例において、増加または減少などの有意な変化は、平均値からの2標準偏差のまたはそれより大きい変化である。「有意な変化が存在しない」とは、適当な統計学的検定を用いて、値の変化が統計学的有意性に達しなかったことを意味する。いくつかの例において、これはp値＞0.05である。他の例において、「有意な変化が存在しない」とは、平均値から2標準偏差未満である増加または減少である。いくつかの態様において、メモリーB細胞の増殖の場合などの「増加」または「上昇」は、約20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、または2倍、3倍、4倍、もしくは5倍の増加である。1つの例において、「減少」または「低減」は、対照と比較してメモリーB細胞の数または増殖などのパラメータの統計学的に有意な低下である。適した統計分析は当技術分野において周知であり、これには、Student's T検定およびANOVAアッセイが含まれるが、これらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、メモリーB細胞の増殖の場合などの「減少」は、約20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％または2倍、3倍、4倍、もしくは5倍減少である。

【００３１】

アンチセンス、センス、およびアンチジーン：DNAは二つの逆平行鎖、すなわちプラス鎖と呼ばれる5'→3'鎖、およびマイナス鎖と呼ばれる3'→5'鎖を有する。RNAポリメラーゼは、核酸を5'→3'方向に付加することから、DNAのマイナス鎖は、転写の際のRNAの鋳型として役立つ。このように、RNA転写物は、マイナス鎖と相補的であって、プラス鎖と同一である（UがTの代わりに用いられることを除き）配列を有するであろう。

【００３２】

アンチセンス分子は、RNAまたはDNAのプラス鎖のいずれかに対して特異的にハイブリダイズ可能である、または特異的に相補的である分子である。センス分子は、DNAのマイナス鎖に対して特異的にハイブリダイズするまたは特異的に相補的である分子である。アンチジーン分子は、DNA標的に向けられるアンチセンスまたはセンス分子のいずれかである。アンチセンスRNA（asRNA）は、センス（コード）核酸に対して相補的なRNA分子である。

【００３３】

増幅：核酸を参照して用いる場合、この用語は、試料または標本における核酸分子のコピー数を増加させる技術を指す。増幅の例は、対象から収集された生物試料を、試料中の核酸鋳型に対してプライマーをハイブリダイズさせる条件で、オリゴヌクレオチドプライマー対に接触させるポリメラーゼ連鎖反応である。プライマーを適した条件で伸長させて、鋳型から解離させた後、再アニールして、伸長させ、解離させて核酸のコピー数を増幅する。インビトロ増幅産物は、標準的な技術を用いる、電気泳動、制限エンドヌクレアーゼ切断パターン、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、またはライゲーション、および／または核酸シークエンシングによって特徴付けすることができる。インビトロ増幅技術の一例には、鎖置き換え増幅（米国特許番号 5,744,311を参照されたい）；非転写等温増幅（米国特許番号 6,033,881を参照されたい）；修復連鎖反応増幅（WO 90/01069を参照されたい）；リガーゼ連鎖反応増幅（EP-A-320 308を参照されたい）；ギャップ充填リガーゼ連鎖反応増幅（米国特許番号 5,427,930を参照されたい）；リガーゼ検出とPCRのカップリング（米国特許番号 6,027,889を参照されたい）；およびNASBA（商標）RNA非転写増幅（米国特許番号 6,025,134を参照されたい）が含まれる。

【００３４】

抗体：エピトープ（たとえば、腫瘍もしくはウイルス抗原またはその断片などの抗原）を特異的に認識して結合する少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンド。これには、無傷の免疫グロブリン、ならびにFab'断片、$F(ab)'_2$断片、一本鎖Fvタンパク質（「scFv」）、およびジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）などの当技術分野において周知であるそれらの変種および一部が含まれる。scFvタンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域および免疫グロブリンの重鎖可変領域がリンカーによって結合している融合タンパク質であり、dsFvでは、鎖は、鎖の会合を安定化する

ためにジスルフィド結合を導入するように変異されている。この用語にはまた、キメラ抗体（たとえば、ヒト化ネズミ抗体）、ヘテロ共役抗体（たとえば、二重特異的抗体）などの遺伝子工学操作型が含まれる。同様に、Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)；Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997を参照されたい。

【００３５】

典型的に、免疫グロブリンは、重鎖および軽鎖を有する。それぞれの重鎖および軽鎖は、定常領域および可変領域を含有する（領域は「ドメイン」としても知られる）。重鎖と軽鎖可変領域は合わせて、抗原に特異的に結合する。軽鎖および重鎖可変領域は、そのあいだに「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる三つの超可変領域が介在する「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびCDRの程度は定義されている（参照により本明細書に組み入れられる、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照されたい）。Kabatデータベースは、現在オンラインで維持されている。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種の中で比較的保存されている。構成成分である軽鎖と重鎖の複合フレームワーク領域である、抗体のフレームワーク領域は、CDRを三次元空間において配置および整列させるために役立つ。

【００３６】

CDRは、抗原のエピトープに対する結合に主に関与している。それぞれの鎖のCDRは、N-末端から始めて順に番号をつけられて典型的にCDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれ、同様に典型的に特定のCDRが位置する鎖によっても同定される。このように、$V_H$ CDR3は、それが見いだされる抗体の重鎖の可変ドメインに位置するが、$V_L$ CDR1は、それが見いだされる抗体の軽鎖の可変ドメインからのCDR1である。

【００３７】

「$V_H$」または「VH」という言及は、Fv、scFv、dsFv、またはFabの可変領域が含まれる免疫グロブリン重鎖の可変領域を指す。「$V_L$」または「VL」という言及は、Fv、scFv、dsFv、またはFabの可変領域が含まれる免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指す。

【００３８】

「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の一つのクローンによって、またはその中に一つの抗体の軽鎖および重鎖遺伝子がトランスフェクトされている細胞によって産生された抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって、たとえば骨髄腫細胞と免疫脾細胞との融合からハイブリッド抗体形成細胞を作製することによって産生される。モノクローナル抗体には、ヒト化モノクローナル抗体が含まれる。

【００３９】

「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域と、非ヒト（マウス、ラット、または合成など）免疫グロブリンからの一つまたは複数のCDRとが含まれる免疫グロブリンである。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワーク領域を提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。一つの態様において、CDRは全てヒト化免疫グロブリンにおけるドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域は存在する必要はないが、存在する場合、それらはヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一でなければならず、すなわち約95％またはそれより多く同一であるような、少なくとも約85～90％同一でなければならない。よって、おそらくCDRを除くヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンまたは抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから得たアミノ酸による限られた数の置換を有してもよい。ヒト化または他のモノクローナル抗体は、抗原結合または他の免疫グロブリン機能に対して実質的に影響を及ぼさないさらなる保存的アミノ酸置換を有しうる。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子工学操作によって構築することができる（たとえば、米国特許番号 5,585,089を参照されたい）。

【００４０】
「中和抗体」は、PD-1ポリペプチドなどのポリペプチドの任意の生物活性と干渉する抗体である。たとえば、中和抗体は、T細胞の細胞障害性などの免疫応答をPD-1ポリペプチドが低減させる能力と干渉することができる。いくつかの例において、中和抗体は、PD-1ポリペプチドの免疫応答低減能を約50％、約70％、約90％、またはそれより多く低減させることができる。本明細書において記述されるアッセイが含まれる、免疫応答を測定するための任意の標準的なアッセイを用いて、可能性がある中和抗体を査定してもよい。
【００４１】
抗原：動物に注射されるまたは吸収される組成物が含まれる、動物における抗体産生またはT細胞応答を刺激することができる化合物、組成物、または物質。抗原は、異種免疫原によって誘導される産物が含まれる特異的な液性または細胞性免疫の産物と反応する。「抗原」という用語には、関連する全ての抗原性エピトープが含まれる。「エピトープ」または「抗原性決定因子」は、それに対してBおよび／またはT細胞が応答する抗原における部位を指す。一つの態様において、エピトープがMHC分子に関連して存在する場合、T細胞はエピトープに応答する。エピトープは、近接アミノ酸、またはタンパク質の三次元フォールディングにより近位に配置される非近接アミノ酸の双方によって形成されうる。近接アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的に変性溶媒に曝露されても保持されるが、三次元フォールディングによって形成されたエピトープは、変性溶媒による処置によって典型的に失われる。エピトープには典型的に、独自の空間コンフォメーションにおいて、アミノ酸少なくとも3個、より通常、少なくとも5個、約9個、または約8～10個が含まれる。エピトープの空間的コンフォメーションを決定する方法には、たとえばx線結晶学および二次元核磁気共鳴が含まれる。
【００４２】
抗原は組織特異的抗原または疾患特異的抗原となりうる。組織特異的抗原はまた疾患特異的抗原となりうることから、これらの用語は排他的ではない。組織特異的抗原は、一つの組織などの限られた数の組織において発現される。組織特異的抗原の特異的な非制限的な例は、前立腺特異抗原、子宮特異抗原、および／または精巣特異抗原である。組織特異的抗原は、前立腺および子宮組織の双方などのような一つより多い生殖組織において発現される抗原などの、しかしこれらに限定されない一つより多い組織によって発現されてもよい。疾患特異的抗原は、疾患のプロセスと一致して発現される。疾患特異的抗原の特異的な非制限的な例は、その発現が腫瘍の形成と相関する、または腫瘍の形成を予測する抗原である。疾患特異的抗原は、T細胞またはB細胞によって認識される抗原となりうる。
【００４３】
抗原提示細胞（APC）：MHCクラスIまたはクラスII分子に結合した抗原をT細胞に提示することができる細胞。APCには、単球、マクロファージ、樹状細胞、B細胞、T細胞、およびランゲルハンス細胞が含まれるが、これらに限定されるわけではない。抗原を他のT細胞（CD4+および／またはCD8+ T細胞が含まれる）に提示することができるT細胞は、抗原提示T細胞（T-APC）である。
【００４４】
B細胞：リンパ球、すなわち白血球（白血球）のサブセット。成熟B細胞は、抗体を産生する形質細胞、およびメモリーB細胞へと分化する。「B細胞前駆体」は、成熟B細胞へと発達することができる細胞である。B細胞前駆体には、幹細胞、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、ならびに未成熟B細胞および移行性B細胞が含まれる。一般的に、初期プロB細胞（たとえば、CD43またはB220を発現する）は、免疫グロブリン重鎖再構成を受けて、後期プロBおよびプレB細胞になり、さらに免疫グロブリン軽鎖再構成を受けて未成熟B細胞になる。未成熟B細胞には、T1およびT2 B細胞が含まれる。たとえば、マウスにおいて、未成熟B細胞には、$AA41^{hi}CD23^{lo}$細胞であるT1 B細胞が含まれる。マウス未成熟B細胞のもう1つの例は、$AA41^{hi}CD23^{hi}$細胞であるT2 B細胞である。ヒトにおいて、未成熟B細胞（たとえば、未成熟末梢移行B細胞）には、$CD38^{hi}$、$IgD^{+}$、$CD10^{+}$、$CD24^{hi}$、$CD44^{lo}$、$CD23^{lo}$、および$CD1^{lo}$細胞が含まれる。このように、未成熟B細胞に

は、軽鎖および重鎖免疫グロブリン遺伝子が再構成しているB220（CD45R）発現細胞が含まれる。1つの態様において、未成熟B細胞は、CD45R、クラスII、IgM、CD19、およびCD40を発現する。未成熟B細胞は、代替軽鎖発現を示さないがIgαβおよびRAGを発現する。未成熟B細胞は、免疫グロブリン（たとえば、IgA、IgGまたはIgM）を産生することができる成熟B細胞へと発達する。成熟B細胞は表面IgMおよびIgDを獲得して、抗原に応答することができ、CD21およびCD23などの特徴的なマーカーを発現する（$CD23^{hi}CD21^{hi}$細胞）。B細胞は、リポ多糖類（LPS）またはIL-4などの物質およびIgMに対する抗体によって活性化されうる。B細胞およびB細胞前駆体の共通の生物学的起源には、骨髄、末梢血、脾臓およびリンパ節が含まれる。

【００４５】

抗原に初めて遭遇するB細胞は「ナイーブ」B細胞として知られ、この細胞はその細胞表面にIgMおよびIgDを有する。B細胞前駆体（たとえば、予め委任された小型リンパ球）は抗原によって刺激された後、芽球細胞へと分化して、これは成熟形質細胞またはメモリーB細胞のいずれかに分化することができる未成熟形質細胞へと分化する。成熟形質細胞は、特異的抗原に応答して免疫グロブリンを分泌する。メモリーB細胞は、一般的に二次免疫応答（一次曝露後のその後の抗原曝露）の際に見いだされるが一次抗原応答の際にも同様に検出されうる、アイソタイプスイッチおよび体細胞超変異を受けるB細胞である。メモリーB細胞の発達は、リンパ小胞の胚中心（GC）で起こり、ここで抗原によって駆動されたリンパ球は、おそらくヘルパーT細胞の影響下で体細胞超変異および親和性選択を受ける。メモリーB細胞は一般的にCD27を発現する。典型的に、メモリーB細胞はまた、その細胞表面上に高親和性抗原特異的免疫グロブリン（B細胞受容体）を発現する。このように、メモリーB細胞は、$CD20^{+}CD27^{+}$でありえて、$CD20^{int}/CD21^{+}/CD27^{+}$（静止期メモリー細胞）、$CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{+}$（活性化メモリー）が含まれる。$CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{-}$細胞は、独自の「異型または組織メモリー」B細胞である。

【００４６】

結合親和性：抗原に対する抗体の親和性。1つの態様において、親和性は、Frankel et al., Mol. Immunol., 16:101-106, 1979によって記述されるスキャッチャード法の改変によって計算される。もう1つの態様において、結合親和性は、抗原／抗体解離速度によって決定される。なおもう1つの態様において、高い結合親和性は、競合的ラジオイムノアッセイによって測定される。いくつかの例において、高い結合親和性は少なくとも約$1\times10^{-8}$ Mである。他の態様において、高い結合親和性は、少なくとも約$1.5\times10^{-8}$、少なくとも約$2.0\times10^{-8}$、少なくとも約$2.5\times10^{-8}$、少なくとも約$3.0\times10^{-8}$、少なくとも約$3.5\times10^{-8}$、少なくとも約$4.0\times10^{-8}$、少なくとも約$4.5\times10^{-8}$、または少なくとも約$5.0\times10^{-8}$である。

【００４７】

結合または安定な結合（オリゴヌクレオチド）：オリゴヌクレオチドは、十分量のオリゴヌクレオチドが塩基対を形成する場合、またはその結合の検出を容認するようにその標的核酸にハイブリダイズする場合、標的核酸に結合または安定に結合する。結合は、標的：オリゴヌクレオチド複合体の物理的または機能的特性のいずれかによって検出することができる。標的とオリゴヌクレオチドとの結合は、機能的および物理的結合アッセイの双方が含まれる、当業者に公知の任意の技法によって検出することができる。たとえば、結合は、遺伝子の発現、DNA複製、転写、翻訳などの生合成プロセスに対して、結合が観察可能な効果を有するか否かを決定することによって機能的に検出することができる。

【００４８】

DNAまたはRNAの相補鎖の結合を検出する物理的方法は、当技術分野において周知であり、これには、DNアーゼIまたは化学フットプリンティング、ゲルシフトおよびアフィニティ切断アッセイ、ノザンブロッティング、ドットブロッティング、ならびに吸光度検出技法のような方法が含まれる。たとえば、単純かつ信頼できることから広く用いられている一つの方法は、温度を徐々に増加させた場合の、オリゴヌクレオチド（または類似体）と標的核酸とを含有する溶液の220～300 nmでの吸光度の変化を観察する段階を伴う。オリ

ゴヌクレオチドまたは類似体がその標的に結合した場合、オリゴヌクレオチド（または類似体）と標的とが互いに解離するまたは融解する特徴的な温度で吸光度が突然増加する。

【００４９】

オリゴマーとその標的核酸との結合は、オリゴマーの50％がその標的から融解する温度（$T_m$）をしばしば特徴とする。より高い（$T_m$）は、より低い（$T_m$）を有する複合体と比較してより強い、またはより安定な複合体を意味する。

【００５０】

癌または腫瘍：分化の喪失、生育速度の増加、周辺組織への浸潤を有する特徴的な脱分化を経た、および転移することができる悪性新生物。生殖器の癌は、子宮、精巣、卵巣、前立腺、ファローピウス管、または陰茎などの生殖組織にその主な起源を有する癌である。たとえば、前立腺癌は、前立腺組織において生じるまたは前立腺組織から生じる悪性新生物であり、子宮癌は子宮組織において生じるまたは子宮組織から生じる悪性新生物であり、精巣癌は精巣において生じる悪性新生物である。残留癌は、甲状腺癌を低減または撲滅するために対象に与えられた任意の形の処置後に対象に残留している癌である。転移性癌は、転移性癌が由来する当初の（原発性）癌の起源部位以外の体の一つまたは複数の部位での癌である。

【００５１】

CD28（白血球分化抗原28）：T細胞活性化にとって必要である共刺激シグナルを提供するT細胞上で発現される分子の1つ。CD28はB7.1（CD80）およびB7.2（CD86）の受容体である。Toll様受容体リガンドによって活性化されると、B7.1発現は、抗原提示細胞（APC）においてアップレギュレートされる。抗原提示細胞上のB7.2発現は構成的である。CD28は、ナイーブT細胞において構成的に発現される唯一のB7受容体である。

【００５２】

化学療法；化学療法剤：本明細書において用いられるように、異常な細胞の生育を特徴とする疾患の処置において治療的に有用である任意の化学物質。そのような疾患には、腫瘍、新生物、および癌と共に、乾癬などの過形成生育を特徴とする疾患が含まれる。一つの態様において、化学療法剤は、固形腫瘍などの新生物を処置するために有用な物質である。一つの態様において、化学療法剤は放射活性分子である。当業者は、有用な化学療法剤を容易に同定することができる（たとえば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition；Perry et al., Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd ed., c 2000 Churchill Livingstone, Inc；Baltzer L, Berkery R (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995；Fischer DS, Knobf MF, Durivage HJ (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993を参照されたい）。本明細書において開示される免疫原ポリペプチドは、さらなる化学療法剤に関連して用いることができる。

【００５３】

CD28：細胞表面抗原は、T細胞上で発現されるT90/44抗原またはTp44としても知られる。CD28は、T細胞上で作用する共刺激タンパク質の受容体である。CD28の天然のリガンドは、B7-1またはCD80と呼ばれる44～54 kDaの糖タンパク質である。関連分子B7-2が存在する。B7-1は、活性化B細胞および他の抗原提示細胞上で発現される。これはマクロファージ、ケラチノサイト、T細胞、B細胞、末梢血樹状細胞およびランゲルハンス細胞によって発現される。B7-2は、血液樹状細胞およびランゲルハンス細胞、B細胞、マクロファージ、クップファー細胞、活性化単球、ならびに様々なナチュラルキラー細胞クローンにおいて見いだされる。T細胞上のCD28に対するB7の結合は、T細胞増殖を誘発する共刺激シグナルを送達する。

【００５４】

対照レベル（免疫パラメータ）：免疫パラメータのベースラインレベル。いくつかの態様において、対照レベルは、治療物質の非存在下での、メモリーB細胞または増殖メモリーB細胞などの免疫系の成分のレベルである。対照レベルは、関心対象物質によって処置

されていない被験対象からの試料において、または対照物質によって処置されている被験対象からの試料において測定されうる。対照レベルはまた、経時的に多数の試料の平均値から決定された値などの標準値でありうる。対照レベルはまた、現在評価中である被験対象がその時点ではその用量が被験対象に投与されていない、治療物質の特異的用量によって処置された被験対象からの試料において測定されうる。対照は、評価中の被験対象から、または異なる被験対象からでありうる。

【００５５】

対照レベル（ポリペプチドまたは核酸）：一定の条件下でおよび／または特異的な遺伝的バックグラウンドにおいて天然に通常見いだされるポリペプチドまたは核酸などの分子のレベル。一定の態様において、対照の分子レベルは、直接または間接的に処置に供されていない細胞または標本において測定することができる。いくつかの例において、対照レベルは、PD-1アンタゴニストなどの物質に接触されていない細胞におけるレベルとなりうる。さらなる例において、対照レベルは、PD-1アンタゴニストを投与されていない対象におけるレベルとなりうる。

【００５６】

DNA（デオキシリボ核酸）：DNAは、ほとんどの生きている生物（いくつかのウイルスは、リボ核酸（RNA）を含む遺伝子を有する）の遺伝材料を含む長鎖ポリマーである。DNAポリマーにおける反復単位は、そのそれぞれが、リン酸基が付随したデオキシリボース糖に結合している四つの塩基、すなわちアデニン、グアニン、シトシン、およびチミンの一つを含む異なる四つのヌクレオチドである。ヌクレオチドトリプレット（コドンと呼ばれる）は、ポリペプチドにおけるそれぞれのアミノ酸、または終止シグナルをコードする。コドンという用語はまた、その中でDNA配列が転写されるmRNAにおける三つのヌクレオチドの対応する（および相補的な）配列のために用いられる。

【００５７】

特に明記していなければ、DNA分子に対するいかなる参照もDNA分子の逆の相補体が含まれると意図される。本明細書における本文において一本鎖が必要である場合を除き、DNA分子は、一本鎖のみを描写するように記述されていても、二本鎖DNA分子の双方の鎖を包含する。

【００５８】

検出する段階または検出（細胞または生体分子の）：試験中のメモリーB細胞などの生体分子または特異的細胞タイプの存在を定量的または定性的に決定する段階を指す。たとえば、被験対象からの試料中のメモリーB細胞の存在を定量的もしくは定性的に決定する段階、または増殖メモリーB細胞を検出する段階を指す。一般的に、タンパク質、核酸などの生物分子の検出、または特異的細胞タイプもしくは細胞増殖を検出する段階は、生物学的アッセイを行う必要があり、単純な観察ではない。たとえば、抗体もしくは核酸プローブ（いずれも標識されうる）を利用するアッセイは、それぞれタンパク質もしくは細胞を検出するために用いられうる。PD-1アンタゴニストによる処置の効能を診断する段階または診断は、メモリーB細胞の増殖などの細胞または生体分子における有意な変化を検出する段階を伴う。

【００５９】

コードする：ポリヌクレオチドは、その本来の状態において、または当業者に周知の方法によって操作した場合に、それが転写および／または翻訳されてmRNAおよび／またはポリペプチドまたはその断片を産生することができる場合に、ポリペプチドをコードすると言われる。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補体であり、コード配列をそこから導き出すことができる。

【００６０】

発現：それによって遺伝子のコード情報が、細胞に存在して作動される構造に変換されるプロセス。発現された遺伝子には、mRNAに転写された後にタンパク質に翻訳される遺伝子、およびRNAに転写されるがタンパク質に翻訳されない遺伝子（たとえば、siRNA、転移RNA、およびリボソームRNA）が含まれる。このように、遺伝子または遺伝子のプロモータ

ー領域などの標的配列の発現によって、mRNA、タンパク質、またはその双方の発現が起こりうる。標的配列の発現は阻害または増強されうる（減少または増加しうる）。

【００６１】

発現制御配列：それに対して機能的に連結する異種核酸配列の発現を調節する核酸配列。発現制御配列は、発現制御配列が、核酸配列の転写および適当であれば翻訳を制御および調節する場合、核酸配列に機能的に連結している。このように、発現制御配列には、適切なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、タンパク質コード遺伝子の前の開始コドン（すなわちATG）、スプライシングシグナル、mRNAを適当に翻訳させるためにその遺伝子の正確な読み取り枠を維持するためのエレメント、および終止コドンが含まれうる。「制御配列」という用語は、少なくともその存在が発現に影響を及ぼしうる成分が含まれると意図され、同様にその存在が有利であるさらなる成分、たとえばリーダー配列および融合パートナー配列が含まれうる。発現制御配列にはプロモーターが含まれうる。

【００６２】

プロモーターは、転写を指示するために十分である最小の配列である。同様に、細胞タイプ特異的、組織特異的、または外部シグナルもしくは物質によって誘導可能にするために、プロモーター依存的遺伝子発現を制御可能にするために十分なそれらのプロモーターエレメントが含まれる；そのようなエレメントは、遺伝子の5'または3'領域に位置してもよい。構成的および誘導型プロモーターの双方が含まれる（たとえば、Bitter et al, Methods in Enzymology 153:516-544, 1987を参照されたい）。たとえば、細菌系においてクローニングする場合、バクテリオファージλのpL、plac、ptrp、ptac（ptrp-lacハイブリッドプロモーター）などの誘導型プロモーターを用いることができる。一つの態様において、哺乳動物細胞系においてクローニングする場合、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（メタロチオネインプロモーターなど）または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（レトロウイルス長末端反復；アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーターなど）を用いることができる。組み換えDNAまたは合成技術によって産生されたプロモーターも同様に、核酸配列の転写を提供するために用いることができる。

【００６３】

異種：異なる遺伝的起源または種を起源とする。一般的に、関心対象タンパク質に特異的に結合する抗体は、異種タンパク質に特異的に結合しないであろう。

【００６４】

宿主細胞：ベクターを繁殖させてそのDNAを発現させることができる細胞。細胞は、原核細胞または真核細胞であってもよい。細胞は、ヒト細胞などの哺乳動物細胞となりうる。この用語にはまた、本発明の宿主細胞の任意の子孫が含まれる。全ての子孫は、複製の際に起こる変異が存在する可能性があることにより、親細胞と同一でない可能性があると理解される。しかし、そのような子孫は「宿主細胞」という用語を用いる場合には含まれる。

【００６５】

免疫応答：B細胞、T細胞、または単球などの免疫系の細胞の刺激に対する応答。1つの態様において、応答は特定の抗原に対して特異的である（「抗原特異的応答」）。1つの態様において、免疫応答は、CD4+応答またはCD8+応答などのT細胞応答である。もう1つの態様において、応答は、B細胞応答であり、それによって特異的抗体の産生またはメモリーB細胞の増殖が起こる。B細胞応答は、メモリーB細胞応答または血漿B細胞応答でありうる。血漿B細胞応答の例は、抗体の産生である。メモリーB細胞の応答の例は、メモリーB細胞の増殖である。

【００６６】

免疫細胞に関する「不応性」には、活性化受容体による刺激またはサイトカインなどの刺激に対する免疫細胞の屈折性（refractivity）が含まれる。不応性は、たとえば免疫抑制剤に対する曝露または大量の抗原に対する曝露のために起こりうる。本明細書において用いられるように、「アネルギー」または「寛容」という用語には、活性化受容体媒介刺

激に対する屈折性が含まれる。そのような屈折性は一般的に抗原特異的であり、寛容化抗原に対する曝露が終わった後でも持続する。

【００６７】

たとえばT細胞におけるアネルギー（不応性とは対照的に）は、サイトカイン産生（IL-2など）の欠如を特徴とする。T細胞アネルギーは、T細胞が抗原に曝露されて、第二のシグナル（共刺激シグナル）の非存在下で第一のシグナル（T細胞受容体またはCD-3媒介シグナル）を受領した場合に起こる。これらの条件において、同じ抗原に対する細胞の再曝露（たとえ、曝露が共刺激分子の存在下で起こっても）によってサイトカインの産生不全が起こり、このように増殖不全が起こる。しかし、アネルギーT細胞は、無関係な抗原に対する応答を行うことができ、サイトカイン（IL-2など）と共に培養すると増殖することができる。たとえば、T細胞アネルギーはまた、ELISAによってまたは指標細胞株を用いる増殖アッセイによって測定した場合に、Tリンパ球によるIL-2産生の欠如によって観察されうる。または、レポーター遺伝子構築物を用いることができる。たとえば、アネルギーT細胞は、5' IL-2遺伝子エンハンサーの制御下で異種プロモーターによって、またはエンハンサー内で認められうるAP1配列の多量体によって誘導されるIL-2遺伝子転写を開始することができない（Kang et al. Science 257:1134, 1992）。アネルギー抗原特異的T細胞は、対応する対照抗原特異的T細胞と比較して、細胞障害活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%もの低減を有する可能性がある。

【００６８】

免疫原性ペプチド：ペプチドがMHC分子に結合して、免疫原性ペプチドが由来する抗原に特異的な細胞障害性Tリンパ球（「CTL」）応答またはB細胞応答（たとえば、抗体産生またはメモリーB細胞増殖）を誘導するように、対立遺伝子特異的モチーフまたは他の配列を含むペプチド。

【００６９】

一つの態様において、免疫原性ペプチドは、配列モチーフ、または当技術分野において公知のニューラルネットもしくは多項式決定などの他の方法を用いて同定される。典型的に、一定の親和性で結合する高い確率をそれらに与え、免疫原性となるであろうスコアによってそれらを選択するために、アルゴリズムを用いてペプチドの「結合閾値」を決定する。アルゴリズムは、特定の位置で特定のアミノ酸のMHC結合に及ぼす効果、特定の位置で特定のアミノ酸の抗体結合に及ぼす効果、またはモチーフ含有ペプチドにおける特定の置換の結合に及ぼす効果に基づく。免疫原性ペプチドの状況において、「保存残基」は、ペプチドにおける特定の位置でランダム分布によって予測されるであろうより有意に高い頻度で出現する残基である。一つの態様において、保存残基は、MHC構造が免疫原性ペプチドとの接触点を提供する可能性がある残基である。

【００７０】

免疫原性ペプチドはまた、特異的MHCタンパク質（たとえば、HLA-A02.01）に対するその結合を測定することによって、またはMHCタンパク質の状況において提示された場合にはCD4および／またはCD8のその刺激能によって同定することができる。

【００７１】

免疫原性組成物：免疫原性ポリペプチドを含む、またはポリペプチドを発現する細胞に対する測定可能なCTL反応を誘導する、もしくはポリペプチドに対する測定可能なB細胞応答（ポリペプチドに特異的に結合する抗体の産生、またはメモリーB細胞の増殖など）を誘導する免疫原性ポリペプチドをコードする核酸を含む組成物。インビトロで使用する場合、免疫原性組成物は、単離核酸、核酸または免疫原性ペプチドが含まれるベクターからなりうる。インビボで用いる場合、免疫原性組成物は典型的に、薬学的に許容される担体、および／または他の物質において、核酸、核酸が含まれるベクター、および／または免疫原性ポリペプチドを含むであろう。免疫原性組成物には、任意でアジュバント、PD-1アンタゴニスト、共刺激分子、または共刺激分子をコードする核酸が含まれうる。ポリペプチド、またはポリペプチドをコードする核酸は、当技術分野において認識されたアッセイ

によってそのCTL誘導能に関して容易に試験することができる。

【００７２】

免疫学的反応条件（インビトロ）：特定のエピトープに対して作成された抗体を、実質的に他の全てのエピトープに対する結合より検出可能に大きい程度に、および／または実質的に他の全てのエピトープに対する結合を実質的に除外するように、そのエピトープに結合させる「免疫複合体を形成するために十分な条件」が含まれる。免疫学的反応条件は、抗体結合反応のフォーマットに依存して、典型的にイムノアッセイプロトコール（ELISAまたはラジオイムノアッセイなどの）、FACSにおいて利用される条件、またはインビボで遭遇する条件である。イムノアッセイフォーマットおよび条件の記述に関しては、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)を参照されたい。本明細書において開示される方法において使用される免疫学的反応条件は、典型的に生きている哺乳動物または哺乳動物細胞の内部である条件（たとえば、温度、浸透圧、pH）に対する言及が含まれる「生理的条件」である。いくつかの臓器は極端な条件に供されると認識されるが、生物体内部および細胞内環境は通常、pH7付近（すなわち、pH 6.0～pH 8.0、より典型的にpH 6.5～7.5）であり、主な溶媒として水を含有し、0℃より上で50℃より下の温度で存在する。浸透圧は、細胞の生存および増殖を支持する範囲内である。

【００７３】

疾患の阻害または処置：腫瘍の成長または持続的な感染症などの疾患を阻害することは、疾患の完全な発症を阻害すること、または疾患プロセスの生理的効果を弱めることを指す。いくつかの例において、疾患の阻害または処置は、腫瘍または病原体による感染症の症状を弱めることを指す。たとえば、癌の処置は、癌を有することが既知である人における腫瘍随伴性症候群の発症を予防することができる、または腫瘍の徴候もしくは症状を弱めることができる。もう一つの態様において、感染症の処置は、感染症の症状の発生を阻害または弱めることを指しうる。「処置」は、疾患または疾患に関連する病態の徴候または症状を改善する治療介入を指す。治療的ワクチン接種は、病原体に既に感染した対象に物質を投与することを指す。対象は、処置が症状の発生を防止するように、無症候性となりうる。治療ワクチンはまた、一つもしくは複数の既存の症状の重症度を低減させる、または病原体の負荷を低減させることができる。

【００７４】

感染疾患：感染物質によって引き起こされた任意の疾患。感染性病原体の例には、ウイルス、細菌、マイコプラズマおよび真菌が含まれるが、これらに限定されるわけではない。特定の例において、これは、感染性の病原体の少なくとも一つのタイプによって引き起こされる疾患である。もう一つの例において、これは、感染性病原体の少なくとも二つの異なるタイプによって引き起こされる疾患である。感染性の疾患は、任意の体のシステムに影響を及ぼしえて、急性（短時間作用型）または慢性／持続性（長期間作用型）となりえて、発熱と共にまたは発熱を伴わずに発生しえて、任意の年齢群に起こりえて、互いに重なり合うことができる。

【００７５】

ウイルス疾患は一般的に、レシピエントに既に存在するウイルスの再活性化により免疫抑制後に起こる。持続的なウイルス感染症の特定の例には、サイトメガロウイルス（CMV）肺炎、腸炎、および網膜炎；エプスタイン-バーウイルス（EBV）リンパ増殖疾患；鶏痘／帯状疱疹（水痘-帯状疱疹ウイルス、VZVによって引き起こされる）；HSV-1および-2粘膜炎；HSV-6脳炎；BK-ウイルス出血性膀胱炎；ウイルス性インフルエンザ；呼吸器多核体ウイルス（RSV）による肺炎；AIDS（HIVによって引き起こされる）；ならびにA、B、またはC型肝炎が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【００７６】

感染性ウイルスのさらなる例には、以下が含まれる：レトロウイルス科；ピコルナウイルス科（たとえば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カルシウイルス科（胃腸炎を引き

起こす株のような）；トガウイルス科（たとえば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（たとえば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス（たとえば、コロナウイルス）；ラブドウイルス（たとえば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（たとえば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス（たとえば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルス）；オルトミクソウイルス科（たとえば、インフルエンザウイルス）；ブンヤウイルス科（たとえば、ハンターンウイルス、ブンヤウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス）；アレナウイルス（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（たとえば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス）；ビルナウイルス科；ヘパドナウイルス科（B型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（パルボウイルス）；パポバウイルス科（乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス科（ほとんどのアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（単純ヘルペスウイルス（HSV）1およびHSV-2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス）；ポックスウイルス科（天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；およびイリドウイルス科（アフリカブタ熱ウイルスなど）；および分類されていないウイルス（たとえば、海綿状脳症の原因物質、δ肝炎の物質（B型肝炎ウイルスの欠損サテライトであると考えられる）、非A非B肝炎の物質（クラス1＝内部伝播；クラス2＝非経口伝播）（すなわちC型肝炎）；ノーウォークおよび関連ウイルス、およびアストロウイルス）。

【００７７】

真菌感染症の例には、アスペルギルス症；鵞口瘡（カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）によって引き起こされる）；クリプトコックス症（クリプトコックス（Cryptococcus）によって引き起こされる）；およびヒストプラスマ症が含まれるが、これらに限定されるわけではない。このように、感染性真菌の例には、クリプトコックス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、ヒストプラスマ・カプスラツム（Histoplasma capsulatum）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、ブラストミセス・デルマチチディス（Blastomyces dermatitidis）、トラコーマクラミジア（Chlamydia trachomatis）、カンジダ・アルビカンスが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【００７８】

感染性細菌の例には以下が含まれる：ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Borelia burgdorferi）、レジオネラ・ニューモフィリア（Legionella pneumophilia）、ミコバクテリア種（Mycobacteria sps）（ヒト型結核菌（M. tuberculosis）、トリ型結核菌（M. avium）、マイコバクテリウム・イントラセルラエ（M. intracellulare）、マイコバクテリウム・カンサイイ（M. kansaii）、マイコバクテリウム・ゴードナエ（M. gordonae）など）、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、淋菌（Neisseria gonorrhoeae）、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）、リステリア菌（Listeria monocytogenes）、化膿性連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）（A群連鎖球菌）、ストレプトコッカス・アガラクチエ（Streptococcus agalactiae）（B群連鎖球菌）、ヴィリダンス型連鎖球菌（Streptococcus (viridans group)）、糞便連鎖球菌（Streptococcus faecalis）、ストレプトコッカス・ボビス（Streptococcus bovis）、嫌気性連鎖球菌（Streptococcus (anaerobic sps.)）、肺炎連鎖球菌（Streptococcus pneumoniae）、病原性カンピロバクター種（Campylobacter sp.）、エンテロコッカス種（Enterococcus sp.）、インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）、炭疽菌（Bacillus anthracis）、ジフテリア菌（corynebacterium diphtheriae）、コリネバクテリウム種（Corynebacterium sp.）、ブタ丹毒菌（Erysipelothrix rhusiopathiae）、ウェルシュ菌（Clostridium perfringers）、破傷風菌（Clostridium tetani）、エンテロバクター・アエロゲネス（Enterobacter aerogenes）、肺炎桿菌（Klebsiella pneumoniae）、パスツレラ・マルトシダ（Pasturella multocida）、バクテロイデス種（Bacteroides sp.）、フゾバクテリウム・ヌクレアツム（Fusobacterium nucleatum）、ストレプトバシラス・モニリフォルミス（Streptobacillus moniliformis）、梅毒トレポネーマ（Trepon

ema pallidium）、トレポネーマペルテヌ（Treponema pertenue）、レプトスピラ（Leptospira）、およびイスラエル放線菌（Actinomyces israeli）。他の感染性生物（原生生物など）には：熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium falciparum）、およびトキソプラズマ・ゴンジイ（Toxoplasma gondii）が含まれる。

【００７９】

「持続的感染症」は、免疫応答の誘導後でさえも、感染物質（ウイルス、マイコプラズマ、細菌、寄生虫、または真菌など）が感染宿主から消滅または消失していない感染症である。持続的感染症は慢性感染症、潜伏性感染症、または遅発型感染症となりうる。潜伏性感染症は、疾患の再発事例のあいだに証明可能な感染性ウイルスが存在しないことを特徴とする。慢性感染症は、一次感染後に感染性ウイルスが持続的に存在することを特徴とし、これには慢性または再発性疾患が含まれうる。遅発型感染症は、持続的な潜伏期間の後に進行性の疾患が続くことを特徴とする。潜伏性および慢性感染症とは異なり、遅発型感染症はウイルス複製の急性期と共に始まらない可能性がある。急性感染症は比較的短期間であり（数日から数週間持続）、免疫系によって体から消散するが、持続的感染症はたとえば、数ヶ月、数年、または一生の間でさえ持続しうる。これらの感染症はまたしばしば、長期間にわたって頻繁に再発し、殺細胞を伴わないまたは宿主細胞に対して過度の損傷を伴わない無症候性および症候性の感染症の段階を伴う。持続的感染症はしばしば、宿主細胞の急速な殺細胞、または過度の損傷を引き起こすことなく、無症候性および症候性の感染段階を伴う。持続的なウイルス感染のあいだ、ウイルスゲノムは細胞DNAに安定に組み入れられるか、またはエピソームによって維持されうる。持続的な感染症は、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、麻疹ウイルス、パポバウイルス、プリオン、肝炎ウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、および乳頭腫ウイルスなどのウイルスによって起こる。

【００８０】

原因となる感染物質はまた、免疫応答が消散した後であっても、標準的な技術を用いて宿主細胞において（感染個体の特異的細胞内部など）検出される可能性がある。哺乳動物は、当技術分野において公知の、およびたとえばその全てが参照により本明細書に組み入れられる、U.S. Patent Nos. 6,368,832、6,579,854、および6,808,710、ならびに米国特許出願第20040137577号、第20030232323号、第20030166531号、第20030064380号、第20030044768号、第20030039653号、第20020164600号、第20020160000号、第20020110836号、第20020107363号、および第20020106730号において記述される任意の標準的な方法に従って持続的感染症を有すると診断される。

【００８１】

「持続的感染症の症状の緩和」は、持続的感染症に関連する任意の状態または症状を改善することである。または持続的感染症の症状の緩和は、無処置対照におけるそのような負荷と比較して、対象における感染性微生物（ウイルス、細菌、真菌、または寄生虫）の負荷を低減する段階を伴いうる。同等の無処置対照と比較して、そのような低減または予防の程度は、任意の標準的な技術によって測定した場合に少なくとも5％、10％、20％、40％、50％、60％、80％、90％、95％、または100％である。望ましくは、持続的感染症は、当技術分野において公知の任意の標準的な方法によって検出した場合に完全に消滅し、この場合持続的感染症は処置されていると見なされる。持続的感染症に関して処置されている患者は、医師がそのような状態を有すると診断した患者である。診断は任意の適した手段によって行ってもよい。診断およびモニタリングは、たとえば、生物試料（たとえば、組織生検、血液検査、または尿検査）における微生物負荷のレベルを検出する段階、生物試料における微生物感染症の代用マーカーレベルを検出する段階、持続的感染症に関連する症状を検出する段階、または持続的感染症に典型的な免疫応答に関係する免疫細胞を検出する段階（たとえば、アネルギーであるおよび／または機能的に障害を有する抗原特異的T細胞の検出）を伴ってもよい。持続的感染症の発症が予防される患者は、そのような診断を受けていてもよく、受けていなくてもよい。当業者は、これらの患者が先に記述

した同じ標準的な検査を受けていてもよく、または試験を受けずに一つもしくは複数の危険因子（家族歴もしくは感染物質に対する曝露）の存在により高リスクである患者であると同定される可能性があると理解するであろう。

【００８２】

単離された：「単離された」生物学的成分（核酸、タンパク質、またはオルガネラなど）は、成分が天然に起こる生物の細胞における他の生体成分、すなわち他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、タンパク質およびオルガネラから実質的に分離または精製されている。「単離」されている核酸およびタンパク質には、標準的な精製法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。この用語はまた、宿主細胞における組み換え型発現によって調製された核酸およびタンパク質と共に化学合成核酸を包含する。

【００８３】

「精製抗体」は、それが天然に会合するタンパク質および天然に存在する有機分子を少なくとも60重量％含まない。いくつかの例において、調製物は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2特異的抗体などの抗体の少なくとも約75重量％、少なくとも約80重量％、少なくとも約90重量％、少なくとも約95重量％、または少なくとも約99重量％である。精製抗体は、たとえば組み換えによって産生されたタンパク質または保存されたモチーフペプチドを用いるアフィニティクロマトグラフィー、および標準的な技術によって得ることができる。

【００８４】

標識：その分子の検出を容易にするために、抗体またはタンパク質などのもう1つの分子に直接または間接的にコンジュゲートされた検出可能な化合物または組成物。標識の特異的な非制限的な例には、蛍光タグ、酵素連結、および放射活性同位元素が含まれる。1つの例において、「標識抗体」は、抗体におけるもう1つの分子の取り込みを指す。たとえば、標識は、放射標識アミノ酸を組み入れること、または印をつけたアビジンによって検出されうるビオチニル部分（たとえば、測光法または比色法によって検出されうる蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン）をポリペプチドに付着させることなどの検出可能なマーカーである。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法が当技術分野において公知であり、これらを用いてもよい。ポリペプチドの標識の例には、以下が含まれるが、これらに限定されるわけではない：放射性同位元素または放射性核種（$^{35}$Sまたは$^{131}$Iなどの）、蛍光標識（フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、ランタニドリン光体）、酵素標識（西洋ワサビペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される既定のポリペプチドエピトープ（ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、またはガドリニウムキレートなどの磁性物質。いくつかの態様において、標識は、可能性がある立体障害を低減するために様々な長さのスペーサーアームによって付着されてもよい。

【００８５】

リンパ球：体の免疫防御に関係する白血球の1つのタイプ。主に2つのタイプのリンパ球が存在する：B細胞とT細胞。

【００８６】

腫瘍組織適合抗原複合体（MHC）：ヒト白血球抗原（「HLA」）が含まれる、異なる種において記述される組織適合抗原系を包含することを意味する一般的な呼称。

【００８７】

哺乳動物：この用語には、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の双方が含まれる。同様に「被験対象」という用語には、ヒトおよび獣医学被験対象の双方が含まれる。

【００８８】

平均蛍光強度（フローサイトメトリー）：フローサイトメトリーは、それが散乱レーザー光または蛍光体によって放射された蛍光のいずれであれ、細胞または粒子の光の強度の測定に関する。光は、増幅器によって光を当初の蛍光強度およびPMT上の電圧に比例して電圧に変換する光電子増倍管（PMT）によって検出される。連続分布であるこれらの電圧は、蛍光レベルに応じて各シグナルを特異的チャンネルに入れるアナログデジタル変換器

（ADC）によって不連続な分布に変換される。ADCの分解能がより大きければ、これは連続分布をより厳密に反映する。

【００８９】

フローサイトメトリーデータは、線形または対数尺度のいずれかを用いて表示されうる。対数尺度を用いることは、分布が右にずれているほとんどの生物学的状況において適応される。この場合、効果は、対数正規分布と呼ばれる分布を標準化することであり、データは対数変換されている。線形のシグナルは線形増幅器を通して生じるが、対数変換は対数増幅器または自動照合表（LUT）を用いることのいずれかによって達成されてもよい。分析的サイトメーターにおけるほとんどのADCは、10ビットであり、すなわち、それらはデータを2e10または1024チャンネルに分割するが、データのより大きい分解能を与えるために、12または14ビットADCを用いる傾向が高まりつつある。

【００９０】

1データチャンネルからのデータ（散乱または蛍光）は、x-軸が1024チャンネル（10ビットADCの場合）に分割されるヒストグラムとして表示される。データが線形尺度である場合、チャンネル数およびそのチャンネルの線形値は、容易に得られるであろう。対数尺度の場合、x-軸はなおも1024チャンネルに分割されるが、4-log decade尺度（一般的4 log decadeが用いられる）として表示される。

【００９１】

フローサイトメトリーデータを定量するために、集団の分布の測定が利用される。一般的に、中心傾向の測定は平均値および中央値である。平均値は、「代表値」であり、算術平均または幾何平均のいずれかでありうる。算術平均は、Σ(x)/nとして計算され、幾何平均は$\sqrt[n]{(a1\times a2\times a3.....an)}$として計算される。一般的に、対数増幅データでは、データ分布の加重を考慮に入れることから幾何平均が用いられ、算術平均は、線形データまたは線形尺度で表示されるデータに関して用いられる。中央値は中心値であり、すなわち、値の半分が上で値の半分が下である50パーセンタイルである。「高い」発現および「低い」発現を有する細胞は、全集団の蛍光に応じて相対的に決定されうる：これらのパラメータは、フローサイトメトリーデータのプロット上で容易に可視化される。

【００９２】

新生物：良性および悪性腫瘍のみならず他の増殖障害が含まれる異常な細胞増殖。

【００９３】

中和抗体：感染物質上の特異的抗原に結合することによって感染物質の感染力価を低減させる抗体。いくつかの例において、感染物質はウイルス、細菌、または真菌である。

【００９４】

オリゴヌクレオチド：長さがヌクレオチド約100塩基までの直鎖状のポリヌクレオチド配列。

【００９５】

オープンリーディングフレーム（ORF）：いかなる内部終止コドンも含まない、アミノ酸をコードする一連のヌクレオチドトリプレット（コドン）。これらの配列は通常ペプチドに翻訳可能である。

【００９６】

機能的に連結した：第一の核酸配列が、第二の核酸配列と機能的な関係で置かれている場合に、第一の核酸配列は、第二の核酸配列に機能的に連結している。たとえば、プロモーターは、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合に、コード配列に機能的に連結している。一般的に、機能的に連結したDNA配列は近接しており、二つのタンパク質コード領域を接合させることが必要である場合には、同じ読み取り枠に存在する。

【００９７】

薬学的に許容される担体：有用な薬学的に許容される担体は、従来通りである。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)は、本明細書において開示される融合タンパク質の薬学的送達にと

って適した組成物および処方を記述する。

【００９８】

一般的に、担体の性質は、用いられる特定の投与様式に依存するであろう。たとえば、非経口製剤は通常、水、生理食塩液、緩衝塩溶液、デキストロース水溶液、グリセロールなどの薬学的および生理学的に許容される液体が媒体として含まれる注射液を含む。固体組成物（粉剤、丸剤、錠剤、またはカプセル剤）に関して、従来の非毒性の固体担体には、たとえば、薬学等級のマンニトール、乳糖、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが含まれうる。生物学的に中性の担体のほかに、投与される薬学的組成物は、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤などの非毒性の補助物質、たとえば酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタンの微量を含有しうる。

【００９９】

「治療的有効量」は、処置される対象において所望の生物学的効果を達成するための組成物または細胞の量である。たとえば、これは、免疫応答を誘導するため、腫瘍の成長を阻害するため、メモリーB細胞の増殖を誘導するため、または腫瘍もしくは持続的感染症の外面的な症状を測定可能に変更するために、必要なPD-1アンタゴニストの量となりうる。対象に投与する場合、インビトロ効果を達成することが知られている標的組織（たとえば、リンパ球における）濃度を達成するであろう用量が一般的に用いられるであろう。

【０１００】

特定の例において、治療的有効量は、メモリーB細胞の増殖を誘導するために有効なPD-1アンタゴニストなどの物質の量である。もう1つの特定の例において、治療的有効量は、メモリーB細胞応答および／またはT細胞応答を増加させることによって改善されうる障害などの、被験対象における障害の兆候または症状を変化させるPD-1アンタゴニストの量である。

【０１０１】

PD-1アンタゴニストなどの物質の有効量は、たとえば処置コースのあいだ毎日、1回用量で、または数回用量で投与されうる。しかし、PD-1アンタゴニストの有効量は、処置される被験対象、処置される状態の重症度およびタイプ、ならびに投与様式に依存するであろう。本明細書において開示される方法は、医学および獣医学の状況において等しい適応を有する。ゆえに、「処置される被験対象」という一般的な用語には、免疫応答の増強などの望ましい生物学的効果の増加を必要とする全ての生物（たとえば、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシ）が含まれると意図される。

【０１０２】

ポリヌクレオチド：ポリヌクレオチドまたは核酸配列という用語は、長さが少なくとも10塩基のヌクレオチドの重合化型を指す。組み換え型ポリヌクレオチドには、それが由来する生物の天然に存在するゲノムにおいて直ちに近接する（一つは5'端で一つは3'端）コード配列のいずれにも直ちに近接しないポリヌクレオチドが含まれる。したがって、この用語には、たとえばベクター、自立複製プラスミドもしくはウイルス、または原核細胞もしくは真核細胞のゲノムDNAに組み入れられる、または他の配列とは独立して異なる分子（たとえばcDNA）として存在する組み換え型DNAが含まれる。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはいずれかのヌクレオチドの改変型となりうる。用語には、DNAの一本鎖および二本鎖型が含まれる。

【０１０３】

ポリペプチド：長さまたは翻訳後修飾（たとえば、グリコシル化またはリン酸化）とは無関係な任意のアミノ酸の鎖。ポリペプチドは、長さがアミノ酸3～30個となりうる。一つの態様において、ポリペプチドは、長さがアミノ酸約7～約25個である。なおもう一つの態様において、ポリペプチドは、長さがアミノ酸約8～約10個である。なおもう一つの態様において、ペプチドは、長さがアミノ酸約9個である。ポリペプチドに関して、「含む」は、さらなるアミノ酸配列または他の分子が分子に含まれうることを示し、「本質的にからなる」は、さらなるアミノ酸配列が分子に含まれないが、他の物質（標識または化学化合物など）が含まれうることを示し、「からなる」は、さらなるアミノ酸配列および

さらなる物質が分子に含まれないことを示している。

【０１０４】

増殖：当技術分野において公知の多様な様式で測定されうる、子孫を産生するための細胞の分裂。これには、総細胞数を計数するアッセイ、特異的細胞タイプの細胞数を計数するアッセイ、KI-67アッセイ、チミジン取り込み、およびブロモデオキシウリジンアッセイが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【０１０５】

Programmed Death（PD）-1：PD-L1またはPD-L2タンパク質と複合体を形成して、T細胞の共刺激などの免疫応答に関係するタンパク質。一般的に、PD-1タンパク質は、天然に存在する（野生型）PD-1と実質的に同一である（たとえば、その全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、Ishida et al. EMBO J. 11:3887-3895, 1992, Shinohara et al. Genomics 23:704-706, 1994；および米国特許番号 5,698,520を参照されたい）。いくつかの例において、PD-1シグナル伝達は、たとえばT細胞増殖、サイトカイン産生、またはウイルスクリアランスを低減させることによってCD8+ T細胞の細胞障害性を低減させる。このように、PD-1ポリペプチドは、任意の標準的な方法によって測定した場合に、CD8+ T細胞の細胞障害活性を、対照レベルより少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%より多く下まで低減させることができる。

【０１０６】

本明細書において用いられるように、PD-1ポリペプチドまたはタンパク質に関して「活性」という用語には、抗原提示細胞における天然のリガンドにかみあうことによるなどの、活性化免疫細胞における阻害シグナルの調節能などの天然に存在するPD-1タンパク質に固有の任意の活性が含まれる。免疫細胞における阻害シグナルのそのような調節によって、免疫細胞の増殖の調節および／または生存、および／または免疫細胞によるサイトカイン分泌が起こる。PD-1タンパク質はまた、B7分子の結合に関して共刺激受容体と競合することによって、共刺激シグナルを調節することができる。このように、「PD-1活性」という用語には、PD-1ポリペプチドまたはタンパク質のその天然のリガンドに対する結合能、免疫細胞の共刺激または阻害シグナルの調節能、および免疫応答の調節能が含まれる。

【０１０７】

「PD-1の発現または活性を低減させる」とは、無処置対象または試料などの対照におけるPD-1タンパク質のレベルまたは生物活性に対するPD-1のレベルまたは生物活性の減少を指す。特異的な例において、レベルまたは活性は、無処置対照と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、または100%より多くまで低減される。たとえば、PD-L1、PD-L2、または双方に対するPD-1タンパク質の結合が低減されて、それによってPD-1シグナル伝達が低減され、したがってCD8+ T細胞の細胞障害性が増加する場合、PD-1タンパク質の生物活性は低減される。

【０１０８】

「PD-1遺伝子」は、PD-1タンパク質をコードする核酸である。「PD-1融合遺伝子」は、第二の異種核酸配列に機能的に連結したPD-1コード領域である。PD-1融合遺伝子には、PD-1プロモーターが含まれうる、または異種プロモーターが含まれうる。いくつかの態様において、第二の異種核酸配列は、レポーター遺伝子、すなわちその発現がアッセイされる可能性がある遺伝子である；レポーター遺伝子には、グルクロニダーゼ（GUS）、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールトランスアセチラーゼ（CAT）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、アルカリホスファターゼ、およびβ-ガラクトシダーゼが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【０１０９】

試料（生物試料）：体液、組織、細胞、ならびにDNA、RNA、およびタンパク質などのその小成分を含有する生物試料が含まれる。たとえば、本発明の状況における一般的な試料には、骨髄、脾臓、リンパ節、血液、たとえば末梢血（尿、唾液、組織生検、外科標本、細針吸引、剖検材料等が含まれる、そこからB細胞またはB細胞前駆体を単離することができる任意の他の起源が含まれうる）。

【０１１０】
特異的結合物質：定義された標的のみに実質的に結合する物質。このように、PD-1特異的結合物質は、PD-1ポリペプチドに実質的に結合して、無関係なポリペプチドには結合しない物質である。一つの態様において、特異的結合物質は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2ポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。
【０１１１】
「特異的に結合する」という用語は、PD-1などの抗原に関して、その抗原を担う細胞または組織に対する抗体または他のリガンドの全体的または部分的な優先的会合であって、抗原を欠損する細胞または組織には優先的に会合しないことを指す。当然、分子と非標的細胞または組織のあいだに一定の程度の非特異的相互作用が起こる可能性があると認識される。それにもかかわらず、特異的結合は、抗原の特異的認識を通して媒介されるとして区別される可能性がある。選択的に反応する抗体は抗原に結合するが、それらは低い親和性で反応する可能性がある。特異的結合によって、抗体（または他のリガンド）と抗原を担う細胞とのあいだには、抗体（または他のリガンド）と抗原を欠損する細胞とのあいだよりかなり強い会合が起こる。特異的結合によって、典型的にポリペプチドを欠損する細胞または組織と比較して、PD-1ポリペプチドを担う細胞または組織に対して結合する抗体または他のリガンドの量（単位時間あたり）の、5倍より大きい、10倍より大きい、または100倍より大きい増加などの、2倍より大きい増加が起こる。そのような条件下でのタンパク質に対する特異的結合は、特定のタンパク質に対するその特異性のために選択される抗体を必要とする。多様なイムノアッセイフォーマットが、特定のタンパク質に特異的に免疫反応する抗体または他のリガンドを選択するために適切である。たとえば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質に特異的に免疫反応するモノクローナル抗体を選択するためにルーチンで用いられる。特異的免疫反応性を決定するために用いることができるイムノアッセイフォーマットおよび条件に関する説明については、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)を参照されたい。
【０１１２】
T細胞：免疫応答にとって不可欠な白血球。T細胞には、$CD4^+$ T細胞および$CD8^+$ T細胞が含まれるが、これらに限定されるわけではない。$CD4^+$ Tリンパ球は、その表面上に「分化抗原群4」（CD4）として知られるマーカーを運ぶ免疫細胞である。ヘルパーT細胞としても知られるこれらの細胞はまた、抗体応答と共にキラーT細胞応答が含まれる免疫応答を組織化するために役立つ。$CD8^+$ T細胞は、「分化抗原群8」（CD8）マーカーを運ぶ。一つの態様において、CD8+ T細胞は、細胞障害性Tリンパ球である。もう一つの態様において、CD8+細胞はサプレッサーT細胞である。T細胞は、抗原提示細胞上に提示された関心対象の特異的抗原にそれが応答することができる場合に、「活性化」される。
【０１１３】
形質導入／トランスフェクト：形質導入された細胞は、分子生物学的技術によってその中に核酸分子が導入されている細胞である。本明細書において用いられるように、形質導入という用語は、ウイルスベクターによるトランスフェクション、プラスミドベクターによる形質転換、ならびに電気穿孔、リポフェクション、および粒子銃加速による裸のDNAの導入が含まれる、それによって核酸分子がそのような細胞に導入される全ての技術を包含する。
【０１１４】
ベクター：宿主細胞に導入され、それによって形質転換宿主細胞を産生する核酸分子。ベクターには、複製開始点などの、宿主細胞においてそれを複製させる核酸配列が含まれてもよい。ベクターにはまた、選択マーカーおよび当技術分野において公知の他の遺伝子エレメントをコードする一つまたは複数の核酸が含まれてもよい。ベクターには、グラム陰性およびグラム陽性細菌細胞における発現のためのプラスミドが含まれるプラスミドベクターが含まれる。例示的なベクターには、大腸菌（E. coli)およびサルモネラ（Salmonella）における発現のためのベクターが含まれる。ベクターにはまた、レトロウイルス、

オルトポックス、アビポックス、鶏痘、カプリポックス、スイポックス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アルファウイルス、バキュロウイルス、シンドビスウイルス、ワクシニアウイルス、およびポリオウイルスベクターなどの、しかしこれらに限定されないウイルスベクターが含まれる。

【０１１５】

特に説明していなければ、本明細書において用いられる全ての科学技術用語は、本開示が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。単数形である「一つの（a）」、「一つの（an）」、および「その」には、本文が明白にそうでないことを示している場合を除き、複数形が含まれる。同様に、「または」という用語には、本文が明白にそうでないことを示している場合を除き、「および」が含まれると意図される。さらに、全ての塩基の大きさまたはアミノ酸の大きさ、および核酸またはポリペプチドに関して与えられる全ての分子量または分子の質量の値は、近似値であり、説明のために提供されると理解される。本明細書に記述の方法および材料と類似または同等の方法および材料を、本開示の実践または試験において用いることができるが、適した方法および材料を以下に記述する。「含む」という用語は、「含まれる」の意味である。本明細書において言及した全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献はその全内容物が参照により本明細書に組み入れられる。矛盾する場合は、用語の説明を含め、本発明が優先するであろう。さらに、材料、方法、および例は、例示的であるに過ぎず、制限的であると意図されない。

【０１１６】

関連出願

開示される本発明の主題はまた、2007年12月26日に提出されたPCT公開番号PCT/US2007/088851号、2005年6月8日に提出された米国特許仮出願第60/688,872号、2006年6月8日に提出された米国実用新案登録出願第11/449,919号、および2006年6月8日に提出されたPCT公開番号PCT/US2006/22423号の主題にも関連する。本出願はまた、2006年12月27日に提出された米国特許仮出願第60/877,518号にも関連する。これらの先行出願はその全内容が参照により本明細書に組み入れられる。

【０１１７】

PD-1アンタゴニスト

本明細書において開示される方法は、PD-1経路の阻害剤（PD-1アンタゴニスト）を用いることを伴う。PD-1分子は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーである。ヒトPD-1は、免疫グロブリンスーパーファミリードメイン、膜貫通ドメイン、および免疫受容体チロシンに基づく阻害モチーフ（ITIM）が含まれる細胞内領域を含有する細胞内領域を有する（Ishida et al, EMBO J. 11:3887, 1992；Shinohara et al, Genomics 23:704, 1994；U.S. Pat. No. 5,698,520）。これらの特色はまた、同様にgp49B、PIR-B、およびキラー阻害性受容体（KIR）が含まれる免疫阻害性受容体と呼ばれるより大きいファミリーの分子を定義する（Vivier and Daeron (1997) Immunol. Today 18:286）。理論に拘束されることを望むものではないが、これらの受容体のチロシンリン酸化ITIMモチーフは、S112-ドメイン含有ホスファターゼと相互作用して、それによって阻害性シグナルに至ると考えられている。これらの免疫阻害性受容体のサブセットは、KIRなどの主要組織適合抗原複合体（MHC）分子に結合して、CTLA4はB7-1およびB7-2に結合する。

【０１１８】

ヒトにおいて、PD-1は、活性化誘導アポトーシスを受けるT細胞株において当初同定された50～55 kDaのI型膜貫通受容体である。PD-1は、T細胞、B細胞、およびマクロファージにおいて発現される。PD-1のリガンドはB7ファミリーメンバーPD-リガンド1（PD-L1、B7-H1としても知られる）およびPD-L2（B7 DCとしても知られる）である。

【０１１９】

インビボにおいて、PD-1は、活性化T細胞、B細胞、および単球において発現される。実験データは、中心および末梢の免疫応答のダウンレギュレーションにおいてPD-1とそのリガンドとの相互作用が関係あることを意味している。特に、野生型T細胞における増殖はP

D-L1の存在下で阻害されるが、PD-1欠損T細胞の増殖は阻害されない。さらに、PD-1欠損マウスは自己免疫表現型を示す。

【０１２０】

ヒトPD-1の例示的なアミノ酸配列を以下に示す（同様にIshida et al, EMBO J. 11:3887, 1992；Shinohara et al, Genomics 23:704, 1994；U.S. Pat. No. 5,698,520を参照されたい）：

mqipqapwpv vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpptffpa
llvvtegdna tftcsfsnts esfvlnwyrm spsnqtdkla
afpedrsqpg qdcrfrvtql pngrdfhmsv vrarrndsgt
ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp
rpagqfqtlv vgvvggllgs lvllvwvlav icsraargti
garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfqw rektpeppvp
cvpeqteyat ivfpsgmgts sparrgsadg prsaqplrpe
dghcswpl (SEQ ID NO: 1)

【０１２１】

マウスPD-1の例示的なアミノ酸配列を以下に示す：

mwvrqvpwsf twavlqlswq sgwllevpng pwrsltfypa
wltvsegana tftcslsnws edlmlnwnrl spsnqtekqa
afcnglsqpv qdarfqiiql pnrhdfhmni ldtrrndsgi
ylcgaislhp kakieespga elvvterile tstrypspsp
kpegrfqgmv igimsalvgi pvllllawal avfcstsmse
argagskddt lkeepsaapv psvayeeldf qgrektpelp
tacvhteyat ivfteglgas amgrrgsadg lqgprppprhe
dghcswpl (SEQ ID NO: 2)

【０１２２】

さらなるアミノ酸配列は、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許番号 6,808,710 ならびに米国特許出願第2004/0137577号、第2003/0232323号、第2003/0166531号、第2003/0064380号、第2003/0044768号、第2003/0039653号、第2002/0164600号、第2002/0160000号、第2002/0110836号、第2002/0107363号、および第2002/0106730号において開示されている。PD-1は、その細胞外領域に一つのIg V様ドメインを含有する免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーメンバーである。PD-1細胞質ドメインは、二つのチロシンを含有し、ほとんどの膜近位のチロシン（マウスPD-1におけるVAYEEL（SEQ ID NO:2のアミノ酸223～228位を参照されたい））は、ITIM（免疫受容体チロシンに基づく阻害モチーフ）内に位置する。PD-1上にITIMが存在することは、この分子が、細胞質ホスファターゼの動員によって抗原受容体シグナル伝達を減弱させるように機能することを示している。ヒトおよびネズミPD-1タンパク質は、約60％のアミノ酸同一性を共有し、可能性があるN-グリコシル化部位4個、およびIg-Vドメインを定義する残基が保存される。細胞質領域におけるITIMおよびカルボキシ末端チロシン周囲のITIM様モチーフ（ヒトおよびマウスにおいてそれぞれ、TEYATI（SEQ ID NO:2のアミノ酸166～181位を参照されたい））も同様に、ヒトおよびネズミオーソログのあいだで保存されている。

【０１２３】

PD-1は、PD-L1に対するその結合能に基づいてCD28/CTLA-4分子ファミリーのメンバーである。インビボにおいて、CTLA4と同様に、PD-1は、抗CD3に応答してT細胞の表面上で急速に誘導される（Agata et al. Int. Immunol. 8:765, 1996）。しかし、CTLA4とは対照的に、PD-1はまた、B細胞の表面においても誘導される（抗IgMに応答して）。PD-1はまた、胸腺細胞および骨髄細胞のサブセットにおいても発現される（Agata et al. (1996)、前記；Nishimura et al. (1996) Int. Immunol. 8:773）。

【０１２４】

T細胞アネルギーは、PD-1発現の誘導と一致する。本明細書において、T細胞の細胞障害性は、PD-1の発現または活性を低減させる物質をT細胞に接触させることによって増加さ

せることができることが開示される。より具体的に、PD-1の発現または活性を低減させる物質を、ウイルス抗原または腫瘍抗原などに対する免疫応答を増加させるために用いることができることが本明細書において開示される。

【０１２５】

理論に拘束されることを望むものではないが、PD-1発現または活性の低減によって、細胞障害性T細胞活性の増加が起こり、感染物質に対する特異的免疫応答が増加する。T細胞を異物タンパク質に応答させるためには、抗原提示細胞（APC）によって二つのシグナルが休止期Tリンパ球に提供されなければならない。免疫応答に対する特異性を付与する第一のシグナルは、主要組織適合抗原複合体（MHC）の状況において提示された異物抗原性ペプチドの認識後に、T細胞受容体（TCR）によって伝達される。共刺激と呼ばれる第二のシグナルは、T細胞を増殖させて機能的となるように誘導する。共刺激は抗原特異的ではなく、MHC拘束を受けず、APCによって発現される一つまたは複数の別個の細胞表面ポリペプチドによって提供される。T細胞が、さらなる共刺激シグナルを受けることなくT細胞受容体を通してのみ刺激される場合、それらは非応答性、アネルギーとなるか、または死滅して、免疫応答のダウンレギュレーションが起こる。

【０１２６】

APC上に発現されるCD80（B7-1）およびCD86（B7-2）タンパク質は、不可欠な共刺激ポリペプチドである。B7-2は一次免疫応答のあいだ主な役割を果たすが、B7-1は、一次T細胞応答または共刺激性の二次T細胞応答を延長させるために免疫応答の過程において後にアップレギュレートされる。B7ポリペプチドは、免疫細胞の応答を促進または阻害するために免疫細胞に対して共刺激または阻害性シグナルを提供することができる。たとえば、共刺激受容体に結合すると、PD-L1（B7-4）は、免疫細胞の共刺激を誘導するか、または可溶性型で存在する場合に免疫細胞の共刺激を阻害する。阻害性受容体に結合すると、PD-L1分子は、免疫細胞に阻害性シグナルを伝達することができる。例示的なB7ファミリーメンバーには、B7-1、B7-2、B7-3（抗体BB-1によって認識される）、B7h（PD-L1）、およびB7-4、ならびにその可溶性断片または誘導体が含まれる。B7ファミリーメンバーは、CTLA4、CD28、ICOS、PD-1および／または他の受容体などの免疫細胞上の一つまたは複数の受容体に結合し、受容体に応じて、免疫細胞に対する阻害性シグナルまたは共刺激シグナルの伝達能を有する。

【０１２７】

CD28は、休止期T細胞において構成的に発現される受容体である。T細胞受容体を通してのシグナル伝達後、CD28のライゲーションおよび共刺激シグナルの伝達によって、T細胞は増殖してIL-2を分泌するように誘導される。CD28に対して相同な受容体であるCTLA4（CD152）は、休止期T細胞には存在しないが、T細胞の活性化後にその発現が誘導される。CTLA4は、T細胞応答の負の調節において役割を果たす。CD28およびCTLA4に関連するポリペプチドであるICOSは、IL-10産生に関係する。それに対してPD-L1およびPD-L2が結合する受容体であるPD-1も同様に、T細胞表面上で急速に誘導される。PD-1はまた、B細胞表面（抗IgMに応答して）ならびに胸腺細胞および骨髄細胞のサブセットにおいても発現される。

【０１２８】

PD-1がかみあうと（たとえば、クロスリンクまたは凝集によって）、免疫細胞における阻害性シグナルの伝達が起こり、それによって免疫細胞のアネルギーの増加に不随して免疫応答の低減が起こる。PD-1ファミリーメンバーは、抗原提示細胞上のPD-L1およびPD-L2などの一つまたは複数の受容体に結合する。その双方がヒトPD-1リガンドポリペプチドであるPD-L1およびPD-L2は、B7ポリペプチドファミリーメンバーである（上記を参照されたい）。それぞれのPD-1リガンドはシグナル配列、IgVドメイン、IgCドメイン、膜貫通ドメイン、および短い細胞質テールを含有する。インビボでは、これらのリガンドは、胎盤、脾臓、リンパ節、胸腺、および心臓において発現されることが示されている。PD-L2はまた、膵臓、肺、および肝臓においても発現されるが、PD-L1は、胎児肝臓、活性化T細胞、および内皮細胞において発現される。いずれのPD-1リガンドの発現も、活性化単球および

樹状細胞においてアップレギュレートされる。

【０１２９】

PD-L1の例示的なアミノ酸配列（2000年10月4日に入手可能なGENBANK（登録商標）アクセッション番号AAG18508）を以下に記載する：

mrifavfifm tywhllnaft vtvpkdlyvv eygsnmtiec
kfpvekqldl aalivyweme dkniiqfvhg eedlkvqhss
yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag vyrcmisygg
adykritvkv napynkinqr ilvvdpvtse heltcqaegy
pkaeviwtss dhqvlsgktt ttnskreekl fnvtstlrin
tttneifyct frrldpeenh taelvipelp lahppnerth
lvilgaillc lgvaltfifr lrkgrmmdvk kcgiqdtnsk
kqsdthleet (SEQ ID NO: 3)

【０１３０】

例示的なPD-L2前駆体アミノ酸配列（2002年4月8日に入手可能なGENBANK（登録商標）アクセッション番号AAK15370）を以下に記載する：

mifllllmlsl elqlhqiaal ftvtvpkely iiehgsnvtl
ecnfdtgshv nlgaitaslq kvendtsphr eratlleeql
plgkasfhip qvqvrdegqy qciiiygvaw dykyltlkvk
asyrkinthi lkvpetdeve ltcqatgypl aevswpnvsv
pantshsrtp eglyqvtsvl rlkpppgrnf scvfwnthvr
eltlasidlq sqmeprthpt wllhifipsc iiafifiatv
ialrkqlcqk lysskdttkr pvtttkrevn sai (SEQ ID NO: 4)

【０１３１】

例示的な変種PD-L2前駆体アミノ酸配列（2006年12月12日に入手可能なGENBANK（登録商標）アクセッション番号Q9BQ51）を以下に記載する：

mifllllmlsl elqlhqiaal ftvtvpkely iiehgsnvtl
ecnfdtgshv nlgaitaslq kvendtsphr eratlleeql
plgkasfhip qvqvrdegqy qciiiygvaw dykyltlkvk
asyrkinthi lkvpetdeve ltcqatgypl aevswpnvsv
pantshsrtp eglyqvtsvl rlkpppgrnf scvfwnthvr
eltlasidlq sqmeprthpt wllhifipfc iiafifiatv
ialrkqlcqk lysskdttkr pvtttkrevn sai (SEQ ID NO:46)

【０１３２】

PD-1アンタゴニストには、PDリガンド1（PD-L1）もしくはPDリガンド2（PD-L2）の発現もしくは活性を低減させる、PD-1とPD-L1の相互作用を低減させる、またはPD-1とPD-L2の相互作用を低減させる物質が含まれる。例示的な化合物には、抗体（抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、および抗PD-L2抗体など）、RNAi分子（抗PD-1 RNAi分子、抗PD-L1 RNAi、および抗PD-L2 RNAiなど）、アンチセンス分子（抗PD-1アンチセンスRNA、抗PD-L1アンチセンスRNA、および抗PD-L2アンチセンスRNAなど）、ドミナントネガティブタンパク質（ドミナントネガティブPD-1タンパク質、ドミナントネガティブPD-L1タンパク質、およびドミナントネガティブPD-L2タンパク質など）、ならびに低分子阻害剤が含まれる。

【０１３３】

PD-1のアンタゴニストは、細胞におけるPD-1の発現または活性を低減させる能力を有する任意の物質である。PD-1発現または活性は、対照におけるそのような発現または活性と比較して少なくとも約10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、または100％低減される。例示的な活性の低減は、少なくとも約50％、少なくとも約60％、少なくとも約70％、少なくとも約80％、少なくとも約90％、少なくとも約95％、または検出可能な活性の完全な消失である。一つの例において、対照は、PD-1アンタゴニストによって

処置されていない細胞である。もう一つの例において、対照は標準値であるか、またはPD-1活性に影響を及ぼさないことが知られている担体などの物質に接触させた細胞である。PD-1発現または活性は、本明細書において記述される方法が含まれる当技術分野において任意の標準的な方法によって決定することができる。任意で、PD-1アンタゴニストは、PD-L1、PD-L2、またはその双方に対するPD-1の結合を阻害または低減させる。

【０１３４】

A. 抗体

PD-1、PD-L1、またはPD-L2（またはその組み合わせ）に特異的に結合する抗体は、本明細書に開示の方法において有用である。抗体には、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、脱免疫抗体、および免疫グロブリン（Ig）融合タンパク質が含まれる。ポリクローナル抗PD-1、抗PD-L1、またはPD-L2抗体は、適した対象（獣医学対象など）をPD-1リガンドまたはPD-1免疫原によって免疫することなどによって、当業者によって調製されうる。免疫した対象における抗PD-1、抗PD-L1、または抗PD-L2抗体力価を、固定されたPD-1リガンドまたはPD-1ポリペプチドを用いる酵素免疫測定法（ELISA）などの標準的な技術によって経時的にモニターすることができる。

【０１３５】

一つの例において、PD-1、PD-L1、またはPD-L2（またはその組み合わせ）に特異的に結合する抗体分子を哺乳動物（血清など）から単離して、当業者に公知の技術によってさらに精製することができる。たとえば、抗体は、IgG抗体を単離するために、プロテインAクロマトグラフィーを用いて精製することができる。

【０１３６】

抗体産生細胞を対象から得て、これを用いて標準的な技術によってモノクローナル抗体を調製することができる（Kohler and Milstein Nature 256:495 49, 1995；Brown et al, J. Immunol. 127:539 46, 1981；Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 96, 1985；Gefter, M. L. et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231 36；Kenneth, R. H. in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses. Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980)；Kozbor et al. Immunol. Today 4:72, 1983；Lerner, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54:387 402；Yeh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76:2927 31, 1976）。一つの例において、不死化細胞株（典型的に骨髄腫）を、PD-1、PD-L1、またはPD-L2によって免疫した哺乳動物からのリンパ球（典型的に脾細胞）に融合させて、得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、関心対象ポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定する。

【０１３７】

一つの態様において、ハイブリドーマを産生するために、不死化細胞株（骨髄腫細胞株など）を、リンパ球と同じ哺乳動物種から誘導する。たとえば、ネズミのハイブリドーマは、PD-1、PD-L1、またはPD-L2ペプチドによって免疫したマウスからのリンパ球を不死化マウス細胞株と融合させることによって作製することができる。一つの例において、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含有する培養培地（「HAT培地」）に対して感受性であるマウス骨髄腫細胞株を利用する。たとえば、American Type Culture Collection (ATCC)、Rockville、Mdから入手可能なP3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653、またはSp2/0-Ag14骨髄腫細胞株が含まれる、任意の多数の骨髄腫細胞株を、標準的な技術に従う融合パートナーとして用いることができる。HAT感受性のマウス骨髄腫細胞をポリエチレングリコール（「PEG」）を用いてマウス脾細胞に融合させることができる。融合に起因するハイブリドーマ細胞を、非融合（および無効な融合）骨髄腫細胞を殺すHAT培地を用いて選択する。関心対象のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、たとえば免疫アッセイ（たとえば酵素免疫測定法（ELISA）またはラジオイムノアッセイ（RIA））などを用いることによって、PD-1、PD-L1、またはPD-L2分子に結合する抗体の産生に関してハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって、検出することができる。

【０１３８】
モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する代わりに、ポリペプチドに特異的に結合する免疫グロブリンライブラリメンバーを単離するために、組み換え型組み合わせ免疫グロブリンライブラリ（抗体ファージディスプレイライブラリなど）をPD-1、PD-L1、またはPD-L2によってスクリーニングすることによって、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合するモノクローナル抗体を同定および単離することができる。ファージディスプレイライブラリを生成およびスクリーニングするためのキットは市販されている（PharmaciaおよびStratageneなどの、しかしこれらに限定されない）。抗体ディスプレイライブラリの生成およびスクリーニングにおいて用いるために特に感受性がある方法および試薬の例は、たとえばU.S. Pat. No. 5,223,409；PCT公開番号WO 90/02809；PCT公開番号WO 91/17271；PCT公開番号WO 92/18619；PCT公開番号WO 92/20791；PCT公開番号WO 92/15679；PCT公開番号WO 92/01047；PCT公開番号WO 93/01288；PCT公開番号WO 92/09690；Barbas et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978 7982, 1991；Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 19:4133 4137, 1991において見いだされうる。

【０１３９】
PD-1に結合する抗体のアミノ酸配列は、たとえば参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願第2006/0210567号において開示される。PD-1に結合する抗体も同様に、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第2006/0034826号において開示される。いくつかの例において、抗体は、少なくとも$10^8$ $M^{-1}$、少なくとも$5\times10^8$ $M^{-1}$、または少なくとも$10^9$ $M^{-1}$などの、少なくとも$10^7$ $M^{-1}$の親和性定数でPD-1、またはPD-1もしくはPD-2リガンドに特異的に結合する。

【０１４０】
一つの例において、それぞれのCDRの特異性決定領域の配列を決定する。SDR（非リガンド接触部位）の外部の残基を置換する。たとえば、先の表におけるいずれのCDR配列においても、多くてアミノ酸1個、2個、または3個を置換することができる。一つの抗体からのフレームワーク領域と、異なる抗体からのCDRとが含まれるキメラ抗体の産生は、当技術分野において周知である。たとえば、ヒト化抗体をルーチンとして産生することができる。抗体または抗体断片は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に結合するドナーモノクローナル抗体からの相補性決定領域（CDR）を有するヒト化免疫グロブリン、ならびにヒトアクセプター免疫グロブリン重鎖および軽鎖フレームワークからの免疫グロブリンおよび重鎖および軽鎖可変領域フレームワークとなりうる。一般的に、ヒト化免疫グロブリンは、少なくとも$10^8$ $M^{-1}$、少なくとも$5\times10^8$ $M^{-1}$、または少なくとも$10^9$ $M^{-1}$などの、少なくとも$10^7$ $M^{-1}$の親和性定数でPD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合する。

【０１４１】
ヒト化モノクローナル抗体は、ドナーマウス免疫グロブリン（PD-1、PD-L1、またはPD-L2など）の可変の重鎖および軽鎖からのドナー相補性決定領域（CDR）をヒト可変ドメインに移入して、次に親和性を保持するために必要であればフレームワーク領域におけるヒト残基を置換することによって産生されうる。ヒト化モノクローナル抗体に由来する抗体成分を用いることによって、ドナー抗体の定常領域の免疫原性に関連する、起こりうる問題が回避される。ヒト化モノクローナル抗体を産生するための技術は、たとえばJones et al, Nature 321:522, 1986；Riechmann et al., Nature 332:323, 1988；Verhoeyen et al, Science 239:1534, 1988；Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 89:4285, 1992；Sandhu, Crit. Rev. Biotech.12:437, 1992；およびSinger et al, J. Immunol.150:2844, 1993によって記述される。抗体は、任意のアイソタイプの抗体であってもよく、いくつかの態様において、抗体は、$IgG_1$、$IgG_2$、$IgG_3$、および$IgG_4$が含まれるが、これらに限定されるわけではないIgGである。

【０１４２】
一つの態様において、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列は、ドナー免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列と少なくとも約65％同一となりうる。このように、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列は、ドナー免

疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列と少なくとも約75％、少なくとも約85％、少なくとも約99％、または少なくとも約95％同一となりうる。ヒトフレームワーク領域およびヒト化抗体フレームワーク領域において作製することができる変異は当技術分野において公知である（たとえば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許番号 5,585,089を参照されたい）。

【０１４３】

例示的なヒト抗体は、LENおよび21/28 CLである。重鎖および軽鎖フレームワークの配列は当技術分野において公知である。ヒトMAb LENの例示的な軽鎖フレームワークは以下の配列を有する：

FR1: DIVMTQS PDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO: 5)

FR2: WYQQKPGQPPLLIY (SEQ ID NO: 6)

FR3: GVPDRPFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO: 7)

FR4: FGQGQTKLEIK (SEQ ID NO: 8)

【０１４４】

ヒトMAb 21/28' CLの例示的な重鎖フレームワークは、以下の配列を有する：

FR1: QVQLVQSGAEVKKPQASVKVSCKASQYTFT (SEQ ID NO: 9)

FR2: WVRQAPGQRLEWMG (SEQ ID NO: 10)

FR3: RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 11)

FR4: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 12).

【０１４５】

ネズミモノクローナル抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体などの抗体には、完全長の分子と共に、Fab、$F(ab')_2$、および重鎖と軽鎖可変領域が含まれ、特異的エピトープ決定基に結合することができるFvなどのその断片が含まれる。これらの抗体断片は、その抗原または受容体に対して何らかの選択的結合能を保持している。これらの断片には、以下が含まれる。

【０１４６】

（1）Fab、抗体分子の一価の抗原結合断片を含有する断片は、抗体全体を酵素パパインによって消化することによって産生され、無傷の軽鎖と一つの重鎖の一部とを生じる；

【０１４７】

（2）Fab'、抗体分子の断片は、抗体全体をペプシンによって処置した後、還元を行って、無傷の軽鎖と重鎖の一部とを生じることによって得ることができ、抗体分子あたりFab'断片2個が得られる；

【０１４８】

（3）$(Fab')_2$、抗体全体を酵素ペプシンによって処置した後に還元を行わずに得ることができる抗体の断片；$F(ab')_2$は、二つのジスルフィド結合によって共に保持されるFab'断片2個の二量体である；

【０１４９】

（4）Fv、二つの鎖として発現された軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域とを含有する遺伝子工学操作された断片；ならびに

【０１５０】

（5）遺伝子融合された一本鎖分子として適したポリペプチドリンカーによって連結された軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含有する遺伝子工学操作分子として定義される一本鎖抗体（scFvなど）。

【０１５１】
これらの断片を作製する方法は当技術分野において公知である（たとえば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照されたい）。いくつかの例において、可変領域には、個々のポリペプチドとして発現された軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域とが含まれる。Fv抗体は典型的に約25 kDaであり、それぞれの重鎖およびそれぞれの軽鎖あたりCDR 3個を有する完全な抗原結合部位を含有する。これらの抗体を産生するために、$V_H$および$V_L$を、宿主細胞において二つの個々の核酸構築物から発現させることができる。$V_H$および$V_L$が近接せずに発現される場合、Fv抗体の鎖は非共有的相互作用によって共に保持される。しかし、これらの鎖は、希釈すると解離する傾向があり、グルタルアルデヒド、分子間ジスルフィド、またはペプチドリンカーを通して鎖をクロスリンクさせるための方法が開発されている。このように、一つの例において、Fvは、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とがジスルフィド結合によって化学的に連結される、ジスルフィド安定化Fv（dsFv）となりうる。

【０１５２】
さらなる例において、Fv断片は、ペプチドリンカーによって接続された$V_H$および$V_L$鎖を含む。これらの一本鎖抗原結合タンパク質（scFv）は、オリゴヌクレオチドによって接続された$V_H$および$V_L$ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。構造遺伝子を発現ベクターに挿入して、これを大腸菌などの宿主細胞に導入する。組み換え型宿主細胞は、二つのVドメインを架橋するリンカーペプチドによって一つのポリペプチド鎖を合成する。scFvを産生する方法は当技術分野において公知である（Whitlow et al, Methods: a Companion to Methods in Enzymology, Vol. 2, page 97, 1991；Bird et al, Science 242:423, 1988；米国特許番号 4,946,778；Pack et al., Bio/Technology 11:1271, 1993；およびSandhu、前記を参照されたい）。

【０１５３】
抗体断片は、抗体のタンパク質分解加水分解によって、または断片をコードするDNAを大腸菌において発現させることによって調製することができる。抗体断片は、従来の方法によって抗体全体をペプシンまたはパパインによって消化することによって得ることができる。たとえば、抗体断片は、抗体をペプシンによって酵素的に切断して、$F(ab')_2$と表される5S断片を提供することによって産生することができる。この断片を、チオール還元剤と、任意でジスルフィド連結の切断に起因するスルフヒドリル基のためのブロッキング基を用いてさらに切断して、3.5S Fab'一価断片を産生することができる。または、ペプシンを用いる酵素的切断は、二つの一価のFab'断片およびFc断片を直接産生する（米国特許番号 4,036,945および米国特許番号 4,331,647、ならびにその中で引用されている参考文献；Nisonhoff et al, Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960；Porter, Biochem. J. 73:119, 1959；Edelman et al, Methods in Enzymology, Vol. 1, page 422, Academic Press, 1967；およびColigan et al. at sections 2.8.1-2.8.10 and 2.10.1-2.10.4を参照されたい）。

【０１５４】
一価の軽鎖-重鎖断片を形成するための重鎖の分離、断片のさらなる切断、または他の酵素的、化学的、もしくは遺伝的技術などの、抗体を切断する他の方法も同様に、断片が無傷の抗体によって認識される抗原に結合する限り、用いてもよい。

【０１５５】
当業者は、抗体の保存的変種を産生できることを認識するであろう。dsFv断片またはscFv断片などの抗体断片において使用されるそのような保存的変種は、正確なフォールディングにとって必要な不可欠なアミノ酸残基を保持して、$V_H$領域と$V_L$領域のあいだを安定化させ、分子の低いpIと低い毒性を保存するために残基の電荷特徴を保持するであろう。収率を増加させるために、アミノ酸置換（多くて1個、多くて2個、多くて3個、多くて4個、または多くて5個のアミノ酸置換など）を$V_H$および$V_L$領域に作製することができる。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換の表は、当業者に周知である。以下の六つの群は、互いの保存的置換であると見なされるアミノ酸の例である：

1）アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）；
2）アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；
3）アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；
4）アルギニン（R）、リジン（K）；
5）イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；および
6）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）。

このように、当業者は、関心対象抗体のアミノ酸配列を容易に再検討する、上記の簡易表におけるアミノ酸の一つまたは複数の位置を特定する、保存的置換を同定する、および周知の分子技術を用いて保存的変種を産生することができる。

【０１５６】

治療、診断、または検出部分などのエフェクター細胞を、当業者に公知の任意の数の手段を用いて、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合する抗体に連結させることができる。共有的および非共有的付着手段の双方を用いてもよい。エフェクター分子を抗体に付着させる技法は、エフェクターの化学構造に従って多様となる。ポリペプチドは典型的に、カルボン酸（COOH）、遊離のアミン（$-NH_2$）、またはスルフヒドリル（-SH）基などの多様な官能基を含有し、それらは抗体上の適した官能基との反応に利用可能であり、それによってエフェクター分子の結合が起こる。または、さらなる反応官能基を露出または付帯させるように抗体を誘導体化する。誘導体化は、Pierce Chemical Company, Rockford, ILから入手可能な分子などの多数の任意のリンカー分子の付帯を伴ってもよい。リンカーは、エフェクター分子に抗体を接合させるために用いられる任意の分子となりうる。リンカーは、抗体とエフェクター分子の双方に対して共有結合を形成することができる。適したリンカーは、当業者に周知であり、これには、直鎖または分岐鎖炭素リンカー、複素環炭素リンカー、またはペプチドリンカーが含まれるが、これらに限定されるわけではない。抗体およびエフェクター分子がポリペプチドである場合、リンカーをその側鎖を通して（システインに対するジスルフィド連結を通してなど）構成的アミノ酸に接合させてもよく、または末端アミノ酸のアミノおよびカルボキシル基のアルファ炭素に接合させてもよい。

【０１５７】

抗体をコードする核酸配列は、たとえば、適切な配列のクローニング、またはNarang et al., Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979のホスホトリエステル法；Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979のホスホジエステル法；Beaucage et al., Tetra. Lett. 22:1859-1862, 1981のジエチルホスホラミダイト法；たとえばNeedham- VanDevanter et al., Nucl. Acids Res. 12:6159-6168, 1984において記述される自動シンセサイザーを用いる、Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts. 22(20):1859-1862, 1981によって記述される固相ホスホラミダイトトリエステル法；および米国特許番号 4,458,066の固相支持体法などの方法による直接化学合成、が含まれる任意の適した方法によって調製することができる。化学合成は、一本鎖オリゴヌクレオチドを産生する。これを相補的配列とのハイブリダイゼーションによって、または鋳型として一本鎖を用いるDNAポリメラーゼによる重合化によって、二本鎖DNAに変換することができる。DNAの化学合成は約100塩基の配列に一般的に限定されるが、より短い配列のライゲーションにより、より長い配列が得られる可能性があることを当業者は認識するであろう。

【０１５８】

PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合する抗体をコードする例示的な核酸コード配列は、クローニング技術によって調製することができる。適切なクローニングおよびシークエンシング技術の例、および多くのクローニングの練習を通して当業者を指示するために十分な説明書は、Sambrook et al.、前記、Berger and Kimmel (eds.)、前記およびAusubel、前記において見いだされる。生物試薬および実験機器の製造元からの製品情報も同様に有用な情報を提供する。そのような製造元には、SIGMA Chemical Company（Saint Louis, MO）、R&D Systems（Minneapolis, MN）、Pharmacia Amersham（Piscataway, NJ）、CLONTECH Laboratories, Inc.（Palo Alto, CA）、Chem Genes Corp., Aldrich Chemic

al Company（Milwaukee, WI）、Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc.（Gaithersburg, MD）、Fluka Chemica-Biochemika Analytika（Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland）、Invitrogen（San Diego, CA）、およびApplied Biosystems（Foster City, CA）と共に、当業者に公知の他の多くの販売元が含まれる。

【０１５９】

核酸はまた、増幅法によっても調製することができる。増幅法には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、転写に基づく増幅系（TAS）、自立配列複製システム（3SR）が含まれる。広く多様なクローニング法、宿主細胞、およびインビトロ増幅方法論が当業者に周知である。

【０１６０】

一つの例において、有用な抗体は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合する抗体からの可変領域をコードするcDNAを、エフェクター分子（EM）をコードするcDNAを含むベクターに挿入することによって調製される。挿入は、一つの連続したポリペプチドが産生されるように、可変領域とEMとがインフレームで読み取られるように行われる。このように、コードされるポリペプチドは、機能的Fv領域と機能的EM領域とを含有する。一つの態様において、検出マーカー（酵素など）をコードするcDNAを、マーカーがscFvのカルボキシル末端に位置するように、scFvにライゲーションする。もう一つの例において、検出マーカーはscFvのアミノ末端に位置する。さらなる例において、マーカーが重鎖可変領域のカルボキシル末端に位置するように、検出マーカーをコードするcDNAを、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合する抗体の重鎖可変領域にライゲーションする。重鎖可変領域を次に、ジスルフィド結合を用いて、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合する抗体の軽鎖可変領域にライゲーションさせることができる。なおもう一つの例において、マーカーが軽鎖可変領域のカルボキシル末端に位置するように、マーカーをコードするcDNAを、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に結合する抗体の軽鎖可変領域にライゲーションさせる。次に、軽鎖可変領域を、ジスルフィド結合を用いて、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に特異的に結合する抗体の重鎖可変領域にライゲーションさせることができる。

【０１６１】

抗体またはその機能的断片をコードする核酸を単離およびクローニングした後、細菌、植物、酵母、昆虫、および哺乳動物細胞などの組み換えによって操作された細胞においてタンパク質を発現させることができる。適した宿主細胞にDNAを移入することによって、抗体またはその機能的断片をコードする一つまたは複数のDNA配列をインビトロで発現させることができる。細胞は原核細胞または真核細胞であってもよい。この用語にはまた、本発明の宿主細胞の任意の子孫が含まれる。全ての子孫が、複製の際に起こる変異が存在する可能性があることから、親細胞と同一ではない可能性があるとと理解される。異物DNAが宿主において連続的に維持されることを意味する安定な移入法は、当技術分野において公知である。

【０１６２】

抗体またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチド配列を、発現制御配列に機能的に連結させることができる。コード配列に機能的に連結した発現制御配列を、発現制御配列に適合性の条件でコード配列の発現が達成されるようにライゲーションさせる。発現制御配列には、適切なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、タンパク質コード遺伝子の前の開始コドン（すなわち、ATG）、イントロンのスプライシングシグナル、mRNAを適当に翻訳させるためのその遺伝子の正確な読み取り枠の維持、および終止コドンが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【０１６３】

抗体またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチド配列を、配列の挿入または取り込みを許容するように操作されうるプラスミド、ウイルス、または他の媒体が含まれるが、これらに限定されるわけではない発現ベクターに挿入することができ、原核細胞または真核細胞において発現させることができる。宿主には、微生物、酵母、昆虫、および哺乳動物生物が含まれうる。原核細胞において真核細胞配列またはウイルス配列を有するDN

A配列を発現させる方法は、当技術分野において周知である。宿主において発現および複製することができる生物学的に機能的なウイルスおよびプラスミドDNAベクターは、当技術分野において公知である。

【０１６４】

組み換え型DNAによる宿主細胞の形質転換は、当業者に周知である従来の技術によって行ってもよい。宿主が大腸菌などの原核細胞である場合、DNAを取り込むことができるコンピテント細胞を、指数的生育期後に細胞から調製して、当業者に周知の技法を用いて$CaCl_2$法によって処置することができる。または、$MgCl_2$もしくはRbCl法を用いることができる。形質転換はまた、望ましければ宿主細胞のプロトプラストの形成後に、または電気穿孔によって行うことができる。

【０１６５】

宿主が真核細胞である場合、リン酸カルシウム共沈殿のようなDNAのトランスフェクション法、マイクロインジェクション、電気穿孔、リポソームに封入したプラスミドの挿入などの通常の機械的技法、またはウイルスベクターを用いてもよい。真核細胞はまた、その機能的断片の抗体をコードするポリヌクレオチド配列と、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子などの選択可能な表現型をコードする第二の異物DNA分子によって同時形質転換されうる。もう一つの方法は、シミアンウイルス40（SV40）またはウシ乳頭腫ウイルスなどの真核細胞ウイルスベクターを用いて、真核細胞を一過性に感染または形質転換させて、タンパク質を発現させることである（たとえば、Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982を参照されたい）。当業者は、COS、CHO、HeLa、および骨髄腫細胞株などの高等真核細胞が含まれる細胞においてタンパク質を産生するために有用なプラスミドおよびベクターなどの発現系を容易に用いることができる。

【０１６６】

組み換え型発現ポリペプチドの単離および精製は、調整的クロマトグラフィーおよび免疫学的分離が含まれる従来の手段によって行うことができる。発現された後、組み換え型抗体を、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー等が含まれる、当技術分野において標準的な技法に従って精製することができる（一般的に、R. Scopes, Protein Purification, Springer- Verlag, N. Y., 1982を参照されたい）。少なくとも約90～95％均一である実質的に純粋な組成物が、本明細書において開示され、98～99％またはそれより高い均一性を薬学目的のために用いることができる。部分的または望ましい均一性まで精製された後、治療的に用いる場合には、ポリペプチドはエンドトキシンを実質的に含んではならない。

【０１６７】

大腸菌などの細菌から一本鎖抗体を発現させる、および／または一本鎖抗体が含まれる適切な活性化型にリフォールディングするための方法は、記述されていて、周知であり、本明細書において開示される抗体に応用可能である。全てが参照により本明細書に組み入れられる、Buchner et al., Anal. Biochem. 205:263-270, 1992；Pluckthun, Biotechnology 9:545, 1991；Huse et al., Science 246:1275, 1989；およびWard et al., Nature 341:544, 1989を参照されたい。

【０１６８】

しばしば、大腸菌または他の細菌からの機能的な異種タンパク質は封入体から単離されて、強い変性剤を用いる可溶化およびその後のリフォールディングを必要とする。可溶化段階のあいだ、当技術分野において周知であるように、ジスルフィド結合を分離するためには還元剤が存在しなければらない。還元剤を有する例示的な緩衝液は、0.1 M Tris pH 8、6 Mグアニジン、2 mM EDTA、0.3 M DTE（ジチオエリスリトール）である。ジスルフィド結合の再酸化は、参照により本明細書に組み入れられるSaxena et al., Biochemistry 9: 5015-5021, 1970において記述されるように、および特にBuchner et al、前記によって記述されるように、還元型および酸化型の低分子量チオール試薬の存在下で起こりうる。

【０１６９】

再変性は典型的に、変性および還元タンパク質をリフォールディング緩衝液において希釈する（たとえば、100倍）ことによって成就される。例示的な緩衝液は、0.1 M Tris、pH 8.0、0.5 M L-アルギニン、8 mM酸化グルタチオン（GSSG）、および2 mM EDTAである。

【０１７０】

二つの鎖の抗体精製プロトコールに対する改変として、重鎖および軽鎖領域を個別に可溶化して還元した後、リフォールディング溶液において合わせる。これらの二つのタンパク質を、一つのタンパク質が他のタンパク質に対して5倍モル過剰を超えないようなモル比で混合する場合に、例示的な収率が得られる。酸化還元シャッフリングが完了した後に、過剰量の酸化グルタチオンまたは他の酸化性の低分子量化合物をリフォールディング溶液に加えることが望ましい。

【０１７１】

組み換え法のほかに、本明細書において開示される抗体およびその機能的断片はまた、標準的なペプチド合成を用いて全体または部分的に構築することができる。長さがアミノ酸約50個未満のポリペプチドの固相合成は、不溶性支持体に配列のC-末端アミノ酸を付着させた後、配列における残りのアミノ酸を連続的に付加することによって成就されうる。固相合成の技術は、Barany & Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A. pp. 3-284；Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156, 1963、およびStewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chem. Co., Rockford, 111., 1984によって記述される。より長いタンパク質は、より短い断片のアミノ末端およびカルボキシル末端の縮合によって合成してもよい。カルボキシル末端端部の活性化によってペプチド結合を形成する方法（カップリング試薬N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドを用いることによるなど）は、当技術分野において周知である。

【０１７２】

B. 阻害性核酸

PD-1、PD-L1、またはPD-L2の発現および／または活性を減少させる阻害性核酸も同様に、本明細書において開示される方法において用いることができる。一つの態様は、標的遺伝子の発現の緩衝または阻害のための低分子阻害性RNA（siRNA）である。PD-1、PD-L1、またはPD-L2をコードする核酸配列は、GENBANK（登録商標）アクセッション番号NM_005018、AF344424、NP_079515、およびNP_054862において開示される。

【０１７３】

一般的に、siRNAは、ダイサーまたはDCL酵素によって比較的長い二本鎖RNA分子を切断することによって生成される（Zamore, Science, 296:1265-1269, 2002；Bernstein et al., Nature, 409:363-366, 2001）。動物および植物において、siRNAは、RISCにアセンブルされて、RISCの配列特異的リボヌクレオチド分解活性を誘導し、それによって細胞質においてmRNAまたは他のRNA標的分子の切断が起こる。核において、siRNAはまた、異質染色質関連ヒストンおよびDNAメチル化を誘導して、それによって個々の遺伝子または大きい染色質ドメインの転写沈黙化が起こる。PD-1 siRNAは、Santa Cruz Biotechnology, Incなどから市販されている。

【０１７４】

本開示は、標的遺伝子の発現の干渉または阻害にとって適したRNAを提供し、RNAには、それぞれの鎖にヌクレオチド0～5個の3'および／または5'オーバーハングを含有するヌクレオチド約15～約40個の二本鎖RNAが含まれる。RNAの配列は、それに関する発現の干渉または阻害が望ましい、PD-1、PD-L1、またはPD-L2などの標的遺伝子のmRNAまたは転写物の一部と実質的に同一である。本開示の目的に関して、発現の干渉または阻害が望ましい標的遺伝子のmRNAまたは転写物の特異的部分と「実質的に同一である」RNAの配列は、標的遺伝子のmRNAまたは転写物の特異的部分と約30％異なるに過ぎず、いくつかの態様において、約10％異なるに過ぎない。特定の態様において、RNAの配列は、標的遺伝子のmRNAまたは転写物の特異的部分と正確に同一である。

【０１７５】

このように、本明細書に開示のsiRNAには、長さがヌクレオチド約15～約40個の二本鎖RNAおよびそれぞれの鎖において長さがヌクレオチド0～5個の3'または5'オーバーハングが含まれ、二本鎖RNAの配列は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2をコードする核酸のmRNAまたは転写物の一部と実質的に同一である（上記を参照されたい）。特定の例において、二本鎖RNAは、PD-1、PD-L1、またはPD-L2をコードする核酸と実質的に同一であるヌクレオチド約19～約25個、たとえばヌクレオチド20、21、または22個を含有する。さらなる例において、二本鎖RNAは、PD-1、PD-L1、またはPD-L2をコードする核酸と100％同一であるヌクレオチド約19～約25個を含有する。この状況において、「約」は、整数の量のみを指すべきではない。一つの例において、ヌクレオチド「約」20個は、長さがヌクレオチド19～21個のヌクレオチドを指す。

【０１７６】

二本鎖RNAにおけるオーバーハングに関して、オーバーハングの長さは、一つのオーバーハングの長さが他の鎖におけるオーバーハングの長さに依存しないという点において、二つの鎖のあいだで独立している。特異的例において、3'または5'オーバーハングの長さは、少なくとも一つの鎖において0-ヌクレオチドであり、いくつかの場合において、双方の鎖において0-ヌクレオチドである（このように平滑dsRNA）。他の例において、3'または5'オーバーハングの長さは、少なくとも一つの鎖において1-ヌクレオチドから5-ヌクレオチドである。より詳しくは、いくつかの例において、3'または5'オーバーハングの長さは、少なくとも一つの鎖において2-ヌクレオチド、または双方の鎖において2-ヌクレオチドである。特定の例において、dsRNAは双方の鎖において2-ヌクレオチドの3'オーバーハングを有する。

【０１７７】

このように、一つの特定の提供されたRNAの態様において、二本鎖RNAはヌクレオチド20、21、または22個を含有し、3'オーバーハングの長さは双方の鎖に関して2-ヌクレオチドである。本明細書において提供されるRNAの態様において、二本鎖RNAは約40～60％アデニン+ウラシル（AU）および約60～40％グアニン＋シトシン（GC）を含有する。より詳しくは、特異的な例において、二本鎖RNAは約50％AUおよび約50％GCを含有する。

【０１７８】

同様に、たとえば二本鎖RNAのセンス鎖において少なくとも一つの改変ヌクレオチドがさらに含まれるRNAが本明細書において記述される。特定の例において、改変リボヌクレオチドは、少なくとも一つの鎖の3'オーバーハングに存在し、より詳しくはセンス鎖の3'オーバーハングに存在する。改変リボヌクレオチドの例には、検出可能な標識（たとえば、ローダミンまたはFITCなどの蛍光体）が含まれるリボヌクレオチド、チオホスフェートヌクレオチド類似体、デオキシヌクレオチド（塩基分子がリボ核酸であることから改変であると見なされる）、2'-フルオロウラシル、2'-アミノウラシル、2'-アミノシチジン、4-チオウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、5-(3-アミノアリル)-ウラシル、イノシン、または2'O-Me-ヌクレオチド類似体が含まれると特に企図される。

【０１７９】

PD-1、PD-L1、およびPD-L2に関するアンチセンスおよびリボザイム分子も同様に本明細書において開示される方法において有用である。アンチセンス核酸は、特異的mRNA分子の少なくとも一部と相補的であるDNAまたはRNA分子である（Weintraub, Scientific American 262:40, 1990）。細胞において、アンチセンス核酸は、対応するmRNAにハイブリダイズして、二本鎖分子を形成する。細胞は二本鎖であるmRNAを翻訳しないことから、アンチセンス核酸はmRNAの翻訳を干渉する。ヌクレオチド約15個のアンチセンスオリゴマーは、それらが容易に合成されて、PD-1、PD-L1、またはPD-L2を産生する標的細胞に導入した場合に、大きい分子より問題を引き起こす可能性がより低いことから、それらが好ましい。遺伝子のインビトロ翻訳を阻害するためにアンチセンスを用いる方法は、当技術分野において周知である（たとえば、Marcus-Sakura, Anal. Biochem. 172:289, 1988を参照されたい）。

【０１８０】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、たとえば長さがヌクレオチド約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50個となりうる。アンチセンス核酸は、当技術分野において公知の技法を用いる化学合成および酵素的ライゲーション反応を用いて構築することができる。たとえば、アンチセンス核酸分子は、天然に存在するヌクレオチドを用いて化学合成することができ、または分子の生物学的安定性を増加させるように、もしくはホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドなどのアンチセンスとセンス核酸とのあいだに形成された二重鎖の物理的安定性を増加させるように設計された様々な改変ヌクレオチドを用いることができる。アンチセンス核酸を生成するために用いることができる改変ヌクレオチドの例には、中でも5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β-D-ガラクトシルケオシン、イノシンが含まれる。

【０１８１】

転写を中止させるためにオリゴヌクレオチドを用いることは、ブルーマー（bloomer）が二重らせんDNAの周囲を取り巻いて、三重らせんを形成することから、三重らせん戦略として知られている。したがって、これらの三重らせん化合物は、選ばれた遺伝子上の独自の部位を認識するように設計することができる（Maher, et al, Antisense Res. and Dev. 1(3):227, 1991；Helene, C, Anticancer Drug Design 6(6):569, 1991）。このタイプの阻害性オリゴヌクレオチドはまた、本明細書において開示される方法においても有用である。

【０１８２】

DNA制限エンドヌクレアーゼと類似の方法で他の一本鎖RNAを特異的に切断する能力を保有するRNA分子であるリボザイムも同様に有用である。これらのRNAをコードするヌクレオチド配列の改変を通して、RNA分子において特異的ヌクレオチド配列を認識してそれを切断する分子を工学操作することが可能である（Cech, J. Amer. Med. Assn. 260:3030, 1988）。このアプローチの主要な長所は、それらが配列特異的であることから、特定の配列を有するmRNAのみが不活化される点である。

【０１８３】

リボザイムには二つの主なタイプ、すなわちテトラヒメナ型（Hasselhoff, Nature 334:585, 1988）と、「ハンマーヘッド」型が存在する。テトラヒメナ型リボザイムは、長さが4塩基である配列を認識するが、「ハンマーヘッド」型リボザイムは、長さが11～18塩基の塩基配列を認識する。認識配列がより長ければ、配列が標的mRNA種において排他的に起こる確率はより大きくなる。その結果、ハンマーヘッド型リボザイムは、特異的mRNA種を不活化するためにテトラヒメナ型リボザイムより好ましく、18塩基の認識配列は、より短い認識配列にとって好ましい。

【０１８４】

様々な送達系が公知であり、治療物質としてsiRNAおよび他の阻害性核酸分子を投与するために用いることができる。そのような系には、たとえば、リポソームにおける封入、微粒子、マイクロカプセル、ナノ粒子、治療分子（複数）を発現することができる組み換え型細胞（たとえば、Wu et al, J. Biol. Chem. 262, 4429, 1987を参照されたい）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての治療核酸の構築等が含まれる。

【０１８５】

C. 低分子阻害剤

PD-1アンタゴニストには、当技術分野において公知の方法に従って、天然物または合成（または半合成）抽出物の双方の大きいライブラリ、または化学ライブラリから同定される分子が含まれる。PD-1活性の減少（細胞死の検出など）を検出するスクリーニング法は、多様な活性源から化合物を同定するために有用である。初回スクリーニングは、種々の化合物ライブラリ、他の多様な化合物、および化合物ライブラリを用いて行ってもよい。このように、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に結合する分子、PD-1、PD-L1、および／またはP

D-L2の発現を阻害する分子、ならびにPD-1、PD-L1、および／またはPD-L2の活性を阻害する分子を同定することができる。これらの低分子は、組み合わせライブラリ、天然物ライブラリ、または他の低分子ライブラリから同定することができる。さらに、PD-1アンタゴニストは、市販の起源からの化合物と共に、同定された阻害剤の市販の類似体として同定することができる。

【０１８６】

試験抽出物または化合物の正確な起源は、PD-1アンタゴニストの同定にとって不可欠ではない。したがって、PD-1アンタゴニストは、実質的にいかなる数の化学抽出物または化合物からも同定することができる。PD-1アンタゴニストとなりうるそのような抽出物または化合物の例には、植物、真菌、原核細胞、または動物に基づく抽出物、発酵ブロス、および合成化合物と共に、既存の化合物の改変が含まれるが、これらに限定されるわけではない。糖類、脂質、ペプチド、および核酸に基づく化合物が含まれるが、これらに限定されるわけではない任意の数の化学化合物のランダムまたは定方向合成（たとえば、半合成または全合成）を生成するために、多数の方法が同様に利用可能である。合成化合物ライブラリは、Brandon Associates（Merrimack, N. H.）およびAldrich Chemical（Milwaukee, Wis.）から市販されている。PD-1アンタゴニストは、Maybridge Chemical Co.（Trevillet, Cornwall, UK）、Comgenex（Princeton, N. J.）、Brandon Associates（Merrimack, N. H.）、およびMicrosource（New Milford, Conn.）が含まれる多数の企業から市販されている合成化合物ライブラリから同定することができる。PD-1アンタゴニストは、Aldrich（Milwaukee, Wis.）から入手可能なライブラリなどのまれな化学ライブラリから同定することができる。PD-1アンタゴニストは、Biotics（Sussex, UK）、Xenova（Slough, UK）、Harbor Branch Oceangraphics Institute（Ft. Pierce, Fla.）、およびPharmaMar, U.S.A.（Cambridge, Mass.）が含まれる多数の販売元から市販されている細菌、真菌、植物、および動物抽出物の形での天然化合物ライブラリにおいて同定することができる。天然のおよび合成によって産生されたライブラリおよび化合物は、従来の化学、物理、および生化学手段を通して容易に改変される。

【０１８７】

有用な化合物は、多数の化学クラスにおいて見いだされる可能性があるが、典型的にそれらは低分子有機化合物が含まれる有機化合物である。約750未満、または約350ダルトン未満などの50ダルトンより大きいが約2,500ダルトン未満の分子量を有する低分子有機化合物を、本明細書において開示される方法において利用することができる。例示的なクラスには、複素環、ペプチド、糖類、ステロイド等が含まれる。化合物は、効能、安定性、薬学的適合性等を増強するように改変されてもよい。いくつかの態様において、有用な化合物は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に関して1 nM未満、10 nM未満、1μM未満、10μM未満、または1 mM未満のKdを有する。

【０１８８】

D. アンタゴニストとしてのPD-1ペプチド変種

一つの態様において、アンタゴニストとして機能するPD-1タンパク質の変種は、アンタゴニスト活性を有するタンパク質を同定するために、PD-1タンパク質の点突然変異、または切断変異などの変異体の組み合わせライブラリをスクリーニングすることによって同定することができる。一つの例において、アンタゴニストは、可溶性PD-1タンパク質である。

【０１８９】

このように、PD-1変種のライブラリは、核酸レベルでの組み合わせ変異誘発によって生成することができ、変化が与えられた遺伝子ライブラリによってコードされる。PD-1変種のライブラリは、たとえば、可能性があるPD-1配列の縮重の組が個々のポリペプチドとして発現可能であるように、またはPD-1配列の組を含有するより大きい融合タンパク質（ファージディスプレイの場合など）の組として発現可能であるように、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的にライゲーションすることによって、産生されうる。

【０１９０】

縮重オリゴヌクレオチド配列から可能性があるPD-1変種のライブラリを産生するために用いることができる多様な方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動DNAシンセサイザーにおいて行うことができ、次に合成遺伝子を適切な発現ベクターにライゲーションすることができる。遺伝子の縮重の組を用いることによって、可能性があるPD-1アンタゴニスト配列の所望の組をコードする配列の全てを一つの混合物において提供することが可能となる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は当技術分野において公知である（たとえば、Narang, et al., Tetrahedron 39:3, 1983；Itakura et al. Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984；Itakura et al. Science 198:1056, 1984）。

【０１９１】

さらに、PD-1タンパク質コード配列の断片のライブラリを用いて、PD-1アンタゴニストの変種のスクリーニングおよびその後の選択のためにPD-1断片集団を生成することができる。一つの態様において、コード配列断片のライブラリは、ニック形成が1分子あたり約1回のみ起こる条件で、PD-1コード配列の二本鎖PCR断片をヌクレアーゼによって処置する段階、二本鎖DNAを変性させる段階、DNAを変性させて、異なるニック産物からのセンス／アンチセンス対が含まれうる二本鎖DNAを形成する段階、S1ヌクレアーゼによる処置によって、再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去する段階、および得られた断片ライブラリを発現ベクターにライゲーションする段階によって生成されうる。この方法によって、PD-1の様々な大きさのN-末端、C-末端、および内部断片をコードする発現ライブラリを誘導することができる。

【０１９２】

点突然変異または切断によって作製された組み合わせライブラリの遺伝子産物をスクリーニングするために、および選択された特性を有する遺伝子産物に関してcDNAライブラリをスクリーニングするために、いくつかの技術が当技術分野において公知である。そのような技術は、PD-1タンパク質の組み合わせ変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリを迅速にスクリーニングするために適合可能である。大きい遺伝子ライブラリをスクリーニングするために、ハイスループット分析に対して感受性がある最も広く用いられている技術には、典型的に、遺伝子ライブラリを複製可能な発現ベクターにクローニングする段階、得られたベクターライブラリによって適切な細胞を形質転換する段階、および所望の活性を検出することによって、その産物が検出される遺伝子をコードするベクターの単離が容易となる条件で、組み合わせ遺伝子を発現させる段階が含まれる。PD-1アンタゴニストを同定するために、スクリーニングアッセイと組み合わせて再帰アンサンブル変異誘発（REM）を用いることができる（Arkin and Youvan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811 7815, 1992；Delagrave et al, Protein Eng. 6(3):327 331, 1993）。

【０１９３】

一つの態様において、PD-1変種のライブラリを分析するために、細胞に基づくアッセイを利用することができる。たとえば、発現ベクターのライブラリを、当初PD-1を合成して分泌する細胞株にトランスフェクトすることができる。次に、PD-1および特定のPD-1変種が分泌されるように、トランスフェクトされた細胞を培養する。細胞上清におけるPD-1活性に及ぼす変異体の発現の効果を、任意の機能的アッセイなどによって検出することができる。プラスミドDNAを、内因性のPD-1活性が阻害される細胞から回収することができ、個々のクローンをさらに特徴付けすることができる。

【０１９４】

ペプチド模倣体も同様にPD-1アンタゴニストとして用いることができる。ペプチド類似体は一般的に、鋳型ペプチドの特性と類似の特性を有する非ペプチド薬として製薬産業において用いられる。これらのタイプの非ペプチド化合物は、通常、コンピューター分子モデリングの助けを借りて開発される。治療的に有用なペプチドと構造的に類似であるペプチド模倣体を用いて、同等の治療または予防効果を産生することができる。一般的に、ペプチド模倣体は、典型となるポリペプチド（たとえば、PD-1生物活性を有するポリペプチド）と構造的に類似であるが、-$CH_2NH$-、-$CH_2S$-、-$CH_2$-$CH_2$-、-CH.=.CH-（シスおよびトランス）、-$COCH_2$-、-CH(OH)$CH_2$-、および-$CH_2SO$-連結によって任意で交換される一つま

たは複数のペプチド連結を有する。これらのペプチド連結は、当技術分野において公知の方法によって交換することができる（たとえば、Morley, Trends Pharm. Sci. pp. 463 468, 1980；Hudson et al. Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177 185, 1979；Spatola, Life Sci. 38:1243 1249, 1986；Holladay, et al. Tetrahedron Lett. 24:4401 4404, 1983を参照されたい）。ペプチド模倣体は、経済的に調達され、安定となりえて、増加した半減期または吸収を有しうる。ペプチド模倣体の標識は通常、直接またはスペーサー（アミド基などによる）を通して、定量的な構造-活性データおよび／または分子モデリングによって予測されるペプチド模倣体における非干渉部分（複数）に対する一つまたは複数の標識の共有的付着を伴う。そのような非干渉部分は、一般的にそれに対してペプチド模倣体が結合して治療効果を産生する高分子（複数）との直接接触を形成しない位置である。ペプチド模倣体の誘導体化は、ペプチド模倣体の望ましい生物活性または薬理活性と実質的に干渉すべきではない。

【０１９５】

ドミナントネガティブタンパク質、またはPD-1の生物活性（すなわち、PD-L1、PD-L2または双方に対するPD-1の結合）に干渉するドミナントネガティブタンパク質をコードする核酸も同様に、本明細書において開示される方法において用いることができる。ドミナントネガティブタンパク質は、それに対してドミナントネガティブタンパク質が対応する野生型タンパク質の少なくとも10、20、35、50、100、または150個より多いアミノ酸に対して少なくとも50％、70％、80％、90％、95％、または99％もの配列同一性を有する配列を有する任意のアミノ酸分子である。たとえば、ドミナントネガティブPD-L1は、それが本来の（野生型）PD-1によりPD-1に堅固に結合するが、PD-1を通してのいかなる細胞シグナル伝達も活性化しないように変異を有する。

【０１９６】

ドミナントネガティブタンパク質は、発現ベクターとして投与されてもよい。発現ベクターは非ウイルスベクターまたはウイルスベクター（たとえば、レトロウイルス、組み換え型アデノ随伴ウイルス、または組み換え型アデノウイルスベクター）であってもよい。またはドミナントネガティブタンパク質は、組み換え型タンパク質として全身に直接投与されてもよく、またはたとえばマイクロインジェクション技術を用いて感染領域に投与されてもよい。

【０１９７】

ポリペプチドアンタゴニストは、アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの発現によって、しばしばより大きいポリペプチド（rasまたは酵素などとの融合タンパク質）の一部として原核または真核宿主細胞において産生されうる。または、そのようなペプチドは、化学法によって合成することができる。組み換え型宿主における異種タンパク質の発現、ポリペプチドの化学合成、およびインビトロ翻訳の方法は当技術分野において周知である（Maniatis el al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N. Y.；Berger and Kimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.；Kaiser et al, Science 243:187, 1989；Merrifield, Science 232:342, 1986；Kent, Annu. Rev. Biochem. 57:957, 1988を参照されたい）。

【０１９８】

ペプチドは直接化学合成などによって産生することができ、リガンドとのPD-1相互作用のアンタゴニストとして用いることができる。ペプチドは、非ペプチド部分がN-末端および／またはC-末端に対する共有的連結によって付着した改変ペプチドとして産生されうる。一定の好ましい態様において、カルボキシ末端またはアミノ末端のいずれかまたは双方が化学改変される。末端のアミノおよびカルボキシル基の最も一般的な改変はそれぞれ、アセチル化およびアミド化である。アシル化（たとえば、アセチル化）またはアルキル化（たとえば、メチル化）などのアミノ末端修飾、およびアミド化などのカルボキシ末端修飾と共に、環状化が含まれる他の末端修飾を、様々な態様に組み入れることができる。一定のアミノ末端および／またはカルボキシ末端修飾および／またはコア配列へのペプチド

伸長は、増強された安定性、増加した抗力および／または効能、血清プロテアーゼに対する抵抗性、望ましい薬物動態特性、およびその他などの有利な物理的、化学的、生化学的、および薬学的特性を提供することができる。

【０１９９】

処置法：対象に対するPD-1アンタゴニストの投与

多様な感染症および癌を処置するための方法が本明細書において提供される。これらの方法において、感染症または癌は、PD-1アンタゴニストの治療的有効量を対象に投与することによって、処置、予防、または症状が緩和される。対象は、ヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、およびブタなどの任意の哺乳動物となりうる。いくつかの例において、対象は、ヒトなどの霊長類である。さらなる例において、対象は、マウスなどのネズミ対象である。ある態様において、この方法は、被検体由来の試料中のメモリーB細胞の増殖を測定する段階を含む（下記、参照）。ある実施例では、この方法は、被検体由来の試料中のナイーブB細胞の測定も含む。さらなる実施例では、CD28（CD28＋）細胞を発現するT細胞を測定する段階を含む。

【０２００】

いくつかの態様において、対象は感染症を発症するリスクを有する。感染症を発症するリスクを有する対象は、感染症をまだ有しないが、関心対象の感染物質によって感染されうる対象である。さらなる例において、対象は、持続的感染症などの感染症（例えば、慢性感染）を有する。慢性感染などの持続的感染症を有する対象は、医師などの当業者によって適した標準的な方法によって同定されうる。

【０２０１】

いくつかの例において、対象は、細菌、ウイルス、真菌、または寄生虫による持続的感染症を有する。一般的に、急性感染症とは対照的に持続的感染症は、宿主免疫応答の誘導によって有効に消滅しない。感染物質と免疫応答とは、感染した対象が必ずしも症状を発現することなく長期間にわたって感染状態であるように平衡に達する。持続的感染症には、たとえば潜伏性、慢性、および遅発型感染症が含まれる。持続的感染症は、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、麻疹ウイルス、パポバウイルス、プリオン、肝炎ウイルス、アデノウイルス、XMRV、ポリオーマJCウイルス、パルボウイルス、および乳頭腫ウイルスなどのウイルスによって起こる。

【０２０２】

慢性感染症において、感染物質は、全ての時期において体において検出されうる。しかし、疾患の徴候および症状は、長期間のあいだ存在してもよく、または存在しなくてもよい。慢性感染症の例には、B型肝炎ウイルス（B型肝炎ウイルス（HBV））およびC型肝炎ウイルス（C型肝炎ウイルス（HCV））、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン-バーウイルス、1型単純ヘルペスウイルス、2型単純ヘルペスウイルス、6型ヒトヘルペスウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、乳頭腫ウイルス、パルボウイルスB19、ポリオーマウイルスK、ポリオーマウイルスJC、XMRV、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトT細胞白血病ウイルスI、およびヒトT細胞白血病ウイルスIIが含まれる。寄生虫の持続的感染症は、リーシュマニア（Leishmania）、トキソプラズマ（Toxoplasma)、トリパノソーマ（Trypanosoma）、マラリア原虫（Plasmodium）、住血吸虫（Schistosoma）、およびエンセファリトゾーン（Encephalitozoon）による感染症の結果生じる可能性がある。

【０２０３】

潜伏性感染症において、感染物質（ウイルスなど）は、対象が常に徴候または症状を示すように、外観上、不活性で休止状態である。潜伏性ウイルス感染症において、ウイルスは、症状が再度現れるまで長い期間、宿主と平衡して留まっている；しかし実際のウイルスは、疾患の再活性化が起こるまでは検出できない。潜伏性感染症の例には、単純ヘルペスウイルス（HSV）-1（熱性疱疹）、HSV-2（性器ヘルペス）、および水痘-帯状疱疹ウイルスVZV（鶏痘-帯状ヘルペス）によって引き起こされる感染症が含まれる。

【０２０４】
遅発型感染症において、感染物質は、有意な徴候または症状が観察されない長期間のあいだに徐々に数が増加する。遅発型感染症の例には、AIDS（HIV-1およびHIV-2によって引き起こされる）、動物において腫瘍を引き起こすレンチウイルス、およびプリオンが含まれる。
【０２０５】
さらに、持続的感染症はしばしば、急性感染症の後期合併症として生じる。たとえば、亜急性硬化性汎脳炎（SSPE）は、急性の麻疹感染症の後に起こりえて、または退行性脳炎は、風疹感染症の結果として起こりうる。
【０２０６】
いくつかの非制限的な例において、対象は、PCR分析を用いてこの個体からの生体試料においてクラミジア（Chlamydial）種が検出された後に、持続的クラミジア感染症を有すると診断されてもよい。哺乳動物は、本開示に従って処置される持続的感染症を有すると診断されていない必要はない。持続的感染症を確立することができる微生物物質には、ウイルス（乳頭腫ウイルス、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびヘルペスウイルスなど）、細菌（大腸菌およびクラミジア種など）、寄生虫（リーシュマニア種、住血吸虫種、トリパノソーマ種、トキソプラズマ種など）、および真菌が含まれる。
【０２０７】
PD-1発現または活性を低減させる化合物のほかに、処置される対象は、ワクチンを投与されてもよい。一つの例において、ワクチンにはアジュバントが含まれうる。もう一つの例において、ワクチンには、プライムブースター免疫が含まれうる。ワクチンは熱死菌ワクチン、弱毒化ワクチン、またはサブユニットワクチンとなりうる。病原体に既に感染している対象は、PD-1アンタゴニストおよび抗原などの治療ワクチンによって処置することができる。対象は、処置によって症状の発生が防止されるように、無症候性となりうる。治療ワクチンはまた、一つまたは複数の既存の症状の重症度を低減させる、または病原体の負荷を低減させることができる。
【０２０８】
処置法のいくつかの例において、対象は、ウイルス抗原に関連したPD-1アンタゴニストの治療的有効量を投与される。適したウイルス抗原の非制限的な例には、中でも：インフルエンザHA、NA、M、NPおよびNS抗原；HIV p24、pol、gp41、およびgpl20；メタニューモウイルス（hMNV）FおよびGタンパク質；C型肝炎ウイルス（HCV）El、E2およびコアタンパク質；デングウイルス（DEN 1-4）El、E2、およびコアタンパク質；ヒト乳頭腫ウイルスLlタンパク質；エプスタイン-バーウイルスgp220/350およびEBNA-3Aペプチド；サイトメガロウイルス（CMV）gB糖タンパク質、gH糖タンパク質、pp65、IEl（エキソン4）、およびppl50；水痘-帯状疱疹ウイルス（VZV）IE62ペプチドおよび糖タンパク質Eエピトープ；単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Dエピトープ、ポリオーマJCウイルスポリペプチド、XMRVポリペプチドが含まれる。抗原性ポリペプチドは、天然に存在する動物もしくはヒトウイルス単離体のポリペプチドに対応しうる、または天然の（病原体または非病原体）単離体と比較して一つもしくは複数のアミノ酸置換を組み入れるように工学操作されうる。例示的な抗原を以下に記載する。
【０２０９】
（表１）例示的な関心対象抗原（標的抗原）

| ウイルス抗原 | 関心対象抗原からの例示的な抗原配列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| BK | TLYKKMEQDVKVAHQ | 13 |
| | GNLPLMRKAYLRKCK | 14 |
| | TFSRMKYNICMGKCI | 15 |
| JC | SITEVECFL | 16 |
| エプスタイン-バー (EBV) | QPRAPIRPI | 17 |
| サイトメガロウイルス (CMV) | NLVPMVATV | 18 |
| HPV | YMLDLQPET(T) | 19 |
| インフルエンザA | GILGFVFTL | 20 |
| 真菌抗原 | | |
| ブラストミセス・デルマチチディス | CELDNSHEDYNWNLWFKWCSGHGR | 47 |
| | TGHGKHFYDCDWDPSHGDYSWYLW | 48 |
| | DPSHGDYSWYLWDYLCGNGHHPYD | 49 |
| | DYLCGNGHHPYDCELDNSHEDYSW | 50 |
| | DPYNCDWDPYHEKYDWDLWNKWCN | 51 |
| | KYDWDLWNKWCNKDPYNCDWDPYH | 52 |

【０２１０】

さらなる態様において、対象は腫瘍を有する。方法には、PD-1アンタゴニストの治療的有効量を対象に投与して、それによって腫瘍を処置する段階が含まれる。いくつかの例において、腫瘍抗原の治療的有効量、または腫瘍抗原をコードするヌクレオチドも同様に対象に投与される。PD-1アンタゴニストと、腫瘍抗原または腫瘍抗原をコードするヌクレオチドとを、同時または連続的に投与することができる。

【０２１１】

PD-1アンタゴニストの投与によって、対象における腫瘍の大きさ、有病率、または転移能の減少が起こる。癌の査定は、標準的な臨床プロトコールを用いてなされる。効能は、特定の腫瘍を診断または処置するための任意の公知の方法に関連して決定される。

【０２１２】

腫瘍（「癌」とも呼ばれる）には、固形腫瘍および白血病が含まれる。例示的な腫瘍には、表2において記載される腫瘍（これらの癌に関連する公知の腫瘍抗原と共に）が含まれる。

【０２１３】

（表２）例示的な腫瘍およびその腫瘍抗原

| 腫瘍 | 腫瘍抗原 |
|---|---|
| 急性骨髄性白血病 | ウィルムス腫瘍 1 (WT1)、優先的に発現される黒色腫抗原 (PRAME)、PR1、プロテナーゼ 3、エラスターゼ、カテプシン G |
| 慢性骨髄性白血病 | WT1, PRAME, PR1, プロテナーゼ3、エラスターゼ、カテプシン G |
| 骨髄異形成症候群 | WT1, PRAME, PR1, プロテナーゼ3、エラスターゼ、カテプシン G |
| 急性リンパ芽球性白血病 | PRAME |
| 慢性リンパ球性白血病 | サーバイビン |
| 非ホジキンリンパ腫 | サーバイビン |
| 多発性骨髄腫 | New York esophageous 1 (NY-Eso1) |
| 悪性黒色腫 | MAGE, MART, チロシナーゼ, PRAME, GP100 |
| 乳癌 | WT1, ハーセプチン |
| 肺癌 | WT1 |
| 前立腺癌 | 前立腺特異抗原 (PSA) |
| 結腸癌 | 癌胎児抗原 (CEA) |
| 腎細胞癌 (RCC) | 線維芽細胞増殖因子 5 (FGF-5) |

【０２１４】

例示的な関心対象腫瘍抗原には、表3において以下に記載される抗原が含まれる。

【０２１５】

（表３）腫瘍抗原およびその誘導ペプチド

| | | |
|---|---|---|
| PRAME | LYVDSLFFL | 21 |
| WT1 | RMFPNAPYL | 22 |
| サーバイビン | ELTLGEFLKL | 23 |
| AFP | GVALQTMKQ | 24 |
| ELF2M | ETVSEQSNV | 25 |
| プロテナーゼ3およびそのペプチドPR1 | VLQELNVTV | 26 |
| 好中球エラスターゼ | VLQELNVTV | 27 |
| MAGE | EADPTGHSY | 28 |
| MART | AAGIGILTV | 29 |
| チロシナーゼ | RHRPLQEVYPEANAPIGHNRE | 30 |
| GP100 | WNRQLYPEWTEAQRLD | 31 |
| NY-Eso-1 | VLLKEFTVSG | 32 |
| ハーセプチン | KIFGSLAFL | 33 |
| 癌胎児抗原 (CEA) | HLFGYSWYK | 34 |
| PSA | FLTPKKLQCV | 35 |

【０２１６】

特異的な非制限的な例は、血管免疫芽球性リンパ腫または結節性リンパ球優性ホジキンリンパ腫である。血管免疫芽球性リンパ腫（AIL）は、肥大したリンパ節および高γグロブリン血症（血液中の抗体の増加）を特色とする攻撃的な（急速に進行する）型のT細胞非ホジキンリンパ腫である。他の症状には、皮膚の発疹、発熱、体重減少、クームス試験陽性、および寝汗が含まれてもよい。この悪性疾患は通常成人に起こる。患者の年齢は通常40～90歳であり（中央値はおよそ65歳）、よりしばしば男性である。AILが進行すると、肝脾腫大、溶血性貧血、およびポリクローナル高γグロブリン血症が発症する可能性がある。患者のおよそ40～50％において皮膚が罹患する。

【０２１７】

結節性リンパ球優性ホジキンリンパ腫は、変異した非機能的免疫グロブリン遺伝子を有

する胚中心B細胞に由来するように思われるB細胞新生物である。血管免疫芽球性リンパ腫と同様に、新生物細胞は、濾胞性樹状細胞の網に関連している。PD-1発現は、CD57+ T細胞に関して認められたパターンと類似のパターンで、結節性リンパ球優性ホジキンリンパ腫において新生物CD20+細胞に密接に関連するT細胞において認められる。CD57はCXCR5と共に、胚中心関連T細胞のもう一つのマーカーとして同定されており、この知見は結節性リンパ球優性ホジキンリンパ腫における新生物細胞が、胚中心関連T細胞に密接に関連しているという結論を支持する。

【０２１８】

関心対象の腫瘍抗原の発現は、当技術分野において公知の任意の方法を用いて、タンパク質または核酸レベルで決定することができる。たとえば、これらの配列の一つまたは複数を特異的に認識するプローブを用いるノザンハイブリダイゼーション分析を用いて、遺伝子発現を決定することができる。または、発現は、遺伝子の示差的に発現された配列に対して特異的なプライマーを用いるなどの、逆転写に基づくPCRアッセイを用いて測定される。発現はまた、本明細書において記述される遺伝子産物によってコードされるペプチドのレベル、またはその活性を測定することによるなどの、タンパク質レベルで決定される。そのような方法は、当技術分野において周知であり、これにはたとえば遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体に基づくイムノアッセイが含まれる。任意の生物材料を、タンパク質または活性の検出／定量のために用いることができる。

【０２１９】

一つの例において、対象は癌を有すると既に診断されている。さらなる例において、対象は、これまでに癌の処置を受けている。しかし、いくつかの例において、対象は、癌を有するとこれまで診断されていない。固形腫瘍の診断は、検査での腫瘍塊の同定を通して行うことができるが、これは、放射性診断または超音波などの他の手段を通して行ってもよい。癌の処置には、手術が含まれうる、またはドセタキセル、ビノレルビン、ゲムシタビン、カペシタビン、またはシクロホスファミド、メソトレキセート、およびフルオロウラシルの併用、シクロホスファミド、ドキソルビシン、およびフルオロウラシルの併用；ドキソルビシンとシクロホスファミドの併用；ドキソルビシンおよびシクロフォスファミドとパクリタキセルの併用；ドキソルビシンの後にCMF（シクロフォスファミド、エピルビシン、およびフルオロウラシル）などの化学療法剤を用いることが含まれうる。さらに、処置には、放射線を用いることが含まれうる。

【０２２０】

いくつかの例において、PD-1アンタゴニストの治療的有効量を対象に投与する。腫瘍抗原または抗原をコードする核酸の治療的有効量も同様に対象に投与される。投与は同時または連続的となりうる。

【０２２１】

持続的な感染症（慢性感染など）または腫瘍を有する対象の処置に関して、PD-1アンタゴニストの治療的有効量が、関心対象に投与される。一つの例において、PD-1アンタゴニストの治療的有効量は、CD8+ T細胞の細胞障害活性の増加、感染物質に対して特異的な免疫応答の増加を誘導する用量などの生物学的活性量である。望ましくは、PD-1アンタゴニストは、抗原特異的免疫細胞（たとえば、CD8+ T細胞などのT細胞）におけるPD-1の発現または活性を、無処置対照レベルと比較して少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%より多く低減させる能力を有する。免疫細胞におけるPD-1のレベルまたは活性は、たとえばウェスタンブロット分析、免疫組織化学、ELISA、およびノザンブロット分析が含まれる、当技術分野において公知の任意の方法によって測定される。または、PD-1の生物活性は、PD-L1、PD-L2、またはその双方に対するPD-1の結合を査定することによって測定される。PD-1の生物活性は、たとえば、サイトカイン産生、感染物質のクリアランス、および抗原特異的CD8+ T細胞の増殖が含まれる、CD8+ T細胞の細胞障害性を増加させるその能力に従って決定される。好ましくは、PD-1の発現または活性を低減させる物質は、感染物質または腫瘍に対して特異的な免疫応答を、無処置対照レベルより少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%

、90％、または100％より多く増加させることができる。したがって、本発明の物質は、これらの活性の任意の一つまたは複数を有する任意の物質である。物質は好ましくは、CD8+ T細胞において発現されるが、持続的感染症に対する免疫応答に影響を及ぼすことができる任意の細胞も同様に、本発明の方法に対して感受性があり、これにはたとえばB細胞が含まれると理解される。

【０２２２】

任意で、対象に一つまたは複数のさらなる治療物質を投与する。さらなる治療物質には、たとえば抗ウイルス化合物（たとえば、ビラダビン、アシクロビル、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤（NRTI）（たとえば、AZT（ジドブジン）、ddI（ジダノシン）、ddC（ザルシタビン）、d4T（スタブジン）、もしくは3TC（ラミブジン））、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（NNRTI）（たとえば、（ネビラピンまたはデラビルジン）、プロテアーゼ阻害剤（サキナビル、リトナビル、インジナビル、もしくはネルフィナビル）、リバビリン、またはインターフェロン）、抗菌化合物、抗真菌化合物、抗寄生虫化合物、抗炎症化合物、抗新生物剤（化学療法剤）または鎮痛剤が含まれる。

【０２２３】

さらなる治療物質は、PD-1アンタゴニストの投与前、同時、または投与後に投与される。たとえば、PD-1アンタゴニストおよびさらなる物質は、少なくとも1、2、4、6、10、12、18時間以内に、または24時間より長く離して個別の処方で投与される。任意で、さらなる物質は、PD-1アンタゴニストと共に処方される。さらなる物質が異なる組成物に存在する場合、異なる投与経路を用いてもよい。物質は、感染症を処置、低減、または予防するためにそのような物質にとって有効であることが知られている用量で投与される。

【０２２４】

PD-1アンタゴニストおよびさらなる物質の濃度は、投与手段、標的部位、哺乳動物の生理状態、および投与される他の投薬が含まれる異なる要因に依存する。このように、安全性および効能を最適にするために、処置用量を滴定してもよく、それらは当業者の範囲内である。特定の状況に関する適当な用量および投与療法の決定は、当業者の範囲内である。

【０２２５】

任意で、持続的感染症を引き起こす感染物質に対する保護的免疫応答を誘発するワクチンを、対象にさらに投与する。たとえば、対象は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、結核、インフルエンザ、XMRV、ポリオーマJCウイルス、またはC型肝炎などに対する免疫応答を誘発するワクチンを投与される。例示的なワクチンは、たとえばBerzofsky et al.（J. Clin. Invest. 114:456-462, 2004）において記述されている。望ましくは、ワクチンは、プライム-ブースターショットによってまたはアジュバントと共に投与される。ワクチンはまた、腫瘍抗原の治療的有効量などの腫瘍ワクチンとなりうる。いくつかの態様において、ウイルスまたは腫瘍抗原などの抗原性ポリペプチドの治療的有効量が対象に投与される。

【０２２６】

腫瘍抗原または腫瘍抗原をコードする核酸の治療的有効量を、対象に投与することができる。ポリヌクレオチドには、ベクターに、自立複製プラスミドもしくはウイルスに、または原核細胞もしくは真核細胞のゲノムDNAに組み入れられる、または他の配列とは独立した異なる分子（cDNAなど）として存在する組み換え型DNAが含まれる。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはいずれかのヌクレオチドの改変型であってもよい。用語には、DNAの一本鎖型および二本鎖型が含まれる。

【０２２７】

ポリオーマ、すなわちSV40（Madzak et al., 1992, J. Gen. Virol, 73:15331536）、アデノウイルス（Berkner, 1992, Cur. Top. Microbiol. Immunol, 158:39-6；Berliner et al, 1988, Bio Techniques, 6:616-629；Gorziglia et al, 1992, J. Virol, 66:4407-4412；Quantin et al, 1992, Proc. Nad. Acad. Sci. USA, 89:2581-2584；Rosenfeld e

t al, 1992, Cell, 68:143-155；Wilkinson et al, 1992, Nucl Acids Res., 20:2233-2239；Stratford- Perricaudet et al, 1990, Hum. Gene Ther., 1:241-256）、ワクシニアウイルス（Mackett et al, 1992, Biotechnology, 24:495-499）、アデノ随伴ウイルス（Muzyczka, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 158:91-123；On et al, 1990, Gene, 89:279-282）、HSVおよびEBVが含まれるヘルペスウイルス（Margolskee, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 158:67-90；Johnson et al, 1992, J. Virol, 66:29522965；Fink et al, 1992, Hum. Gene Ther. 3:11-19；Breakfield et al, 1987, Mol Neurobiol, 1:337-371；Fresse et al, 1990, Biochem. Pharmacol, 40:2189-2199）、シンドビスウイルス（H. Herweijer et al, 1995, Human Gene Therapy 6:1161-1167；U.S. Pat. Nos. 5,091,309および5,2217,879）、アルファウイルス（S. Schlesinger, 1993, Trends Biotechnol. 11:18-22；I. Frolov et al, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11371-11377）、ならびにトリ（Brandyopadhyay et al., 1984, Mol. Cell Biol, 4:749-754；Petropouplos et al., 1992, J. Virol, 66:3391-3397）、ネズミ（Miller, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 158:1-24；Miller et al, 1985, Mol Cell Biol, 5:431-437；Sorge et al, 1984, Mol Cell Biol, 4:1730-1737；Mann et al, 1985, J. Virol, 54:401-407）、およびヒト起源（Page et al, 1990, J. Virol, 64:5370-5276; Buchschalcher et al, 1992, J. Virol, 66:2731-2739）のレトロウイルスが含まれる、多数のウイルスベクターが構築されている。バキュロウイルス（オートグラファ・カリフォルニカ（Autographa californica）核多核体ウイルス；AcMNPV）ベクターも同様に当技術分野において公知であり、販売元（PharMingen, San Diego, Calif.；Protein Sciences Corp., Meriden, Conn.；Stratagene, La Jolla, Calif.など）から得てもよい。

【０２２８】

一つの態様において、腫瘍抗原またはウイルス抗原をコードするポリヌクレオチドがウイルスベクターに含まれる。適したベクターには、レトロウイルスベクター、オルトポックスベクター、アビポックスベクター、鶏痘ベクター、カプリポックスベクター、スイポックスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、およびポリオウイルスベクターが含まれる。特異的な例示的なベクターは、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、および高度弱毒化ワクシニアウイルス（MVA）、アデノウイルス、バキュロウイルスなどのポックスウイルスベクターである。

【０２２９】

有用なポックスウイルスには、オルトポックス、スイポックス、アビポックス、およびカプリポックスウイルスが含まれる。オルトポックスには、ワクシニア、エクトロメリア、およびラクーンポックスが含まれる。有用なオルトポックスの一つの例は、ワクシニアである。アビポックスには、鶏痘、カナリア痘および鳩痘が含まれる。カプリポックスには、ヤギ痘およびヒツジ痘が含まれる。一つの例において、スイポックスはブタ痘である。発現のためのポックスウイルスベクターの例は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許番号 6,165,460において記述される。用いることができる他のウイルスベクターには、ヘルペスウイルスおよびアデノウイルスなどの他のDNAウイルスならびにレトロウイルスおよびポリオなどのRNAウイルスが含まれる。

【０２３０】

いくつかの態様において、PD-1アンタゴニストは、CD8+ T細胞などのT細胞の細胞障害性を増加させるために十分な量で投与される。T細胞の細胞障害性の増加によって、免疫応答の増加、持続的感染症の低減、または腫瘍の徴候もしくは症状の減少が起こる。増加した免疫応答は、たとえば、T細胞またはB細胞増殖などの免疫細胞の増殖の増加、サイトカイン産生の増加、および感染物質のクリアランスの増加または腫瘍の荷重の低減によって測定することができる。このように、そのような方法によって、持続的感染症または腫瘍に関連する症状の一つまたは複数の緩和が起こりうる。このように、PD-1アンタゴニストの投与は、持続的感染症を低減させ、腫瘍の成長／大きさを阻害し、持続的感染症または腫瘍に関連する一つまたは複数の症状を、無処置対象と比較して少なくとも10%、20%

、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、または100％緩和する。

【０２３１】

処置によって、感染物質の負荷の低減、または対象における腫瘍荷重の低減などの臨床利益が得られれば、処置は効能を有する。処置が予防的に適用される場合、「効能を有する」とは、処置が感染症の形成を遅らせるまたは予防することを意味する（例えば、６ヶ月間、１年間、２年間、３年間、またはそれ以上）。効能は、特定の感染症または腫瘍を診断または処置するための任意の公知の方法を用いて決定してもよい。

【０２３２】

このように、方法には、PD-1アンタゴニストの治療的有効量が含まれる薬学的組成物を対象に投与する段階が含まれる。抗体などの治療化合物の有効量は、たとえば約0.1 mg/kg～約150 mg/kgとなりうる。有効量は、当業者によって認識されるように、投与経路、レシピエントの用途、および特定の感染症または癌の症状を処置、予防、または緩和するための他の抗感染物質または治療物質を用いることが含まれる他の治療的処置との同時投与に応じて、多様となる。治療養生法は、標準的な方法を用いて感染症または癌に苦しむ（または発症のリスクを有する）ヒト被験者のために利用される。

【０２３３】

PD-1アンタゴニストは、当技術分野において公知の方法を用いてそのような個体に投与される。本明細書において開示されるような、任意のPD-1アンタゴニストを利用することができる。さらに、一つより多いPD-1アンタゴニストを利用することができる。PD-1アンタゴニストは全身または局所投与することができる。たとえば、PD-1アンタゴニストは、経口、直腸内、鼻腔内、局所、非経口、皮下、腹腔内、筋肉内、および静脈内に投与される。PD-1アンタゴニストは、予防的に、または感染症もしくは腫瘍が検出された後に投与することができる。PD-1アンタゴニストは、任意で感染症を処置するために治療物質のカクテルの成分として処方される。非経口投与のための適した処方の例には、等張生理食塩液、5％グルコース溶液、またはもう一つの標準的な薬学的に許容される賦形剤における活性成分の水溶液が含まれる。PVPまたはシクロデキストリンなどの標準的な溶解剤も同様に、治療化合物を送達するための薬学的賦形剤として利用される。

【０２３４】

本明細書において記述される治療化合物は、従来の方法を利用する他の投与経路のための組成物に処方される。たとえば、PD-1アンタゴニストは、経口投与のためのカプセル剤または錠剤に処方される。カプセル剤は、ゼラチンまたはセルロースなどの任意の標準的な薬学的に許容される材料を含有してもよい。錠剤は、治療化合物と固体担体および潤滑剤との混合物を圧縮することによって、従来の技法に従って調製されてもよい。固体担体の例には、デンプンおよび糖ベントナイトが含まれる。PD-1アンタゴニストは、乳糖またはマンニトールなどの結合剤、従来の増量剤、および錠剤化物質を含有するハードシェルの錠剤またはカプセル剤の剤形で投与されうる。他の処方には、軟膏、坐剤、ペースト、スプレー、パッチ、クリーム、ゲル、吸収性のスポンジ、またはフォームが含まれる。そのような処方は当技術分野において周知の方法を用いて産生される。

【０２３５】

さらに、PD-1アンタゴニストは、対象の接する組織および周辺組織に化合物を徐々に放出する固体または吸収性のマトリクスを埋め込む（臓器（たとえば腸管もしくは肝臓）に直接、または皮下に）ことによって投与することができる。たとえば、胃腸管感染症の処置の場合、化合物は全身に（たとえば、静脈内、直腸内、もしくは経口）または局所に（たとえば、胃組織に直接）投与してもよい。または、PD-1アンタゴニストを含浸させたウェーハまたは吸収性のスポンジを、胃組織に直接接触させて留置する。PD-1アンタゴニストは、ウェーハからの薬物の拡散およびポリマーマトリクスの侵食によってインビボで徐々に放出される。もう一つの例として、肝臓の感染症（すなわち、肝炎）は、PD-1アンタゴニストを含有する溶液を肝血管に注入することによって処置される。

【０２３６】

治療化合物が、PD-1アンタゴニストをコードする核酸である場合、これを適切な核酸発

現ベクターの一部として構築する段階、およびこれが細胞内に入るように投与する段階（レトロウイルスベクター、直接注入、微粒子衝突、脂質によるコーティングまたは細胞表面受容体またはトランスフェクト剤を用いることなどによって）によって、または核に入ることが知られているホメオボックス様ペプチド（たとえば、Joliot, et al, Proc Natl Acad Sci USA 88:1864-1868, 1991を参照されたい）に連結させて投与する段階等によって、コードされるタンパク質の発現を促進するために、核酸をインビボで投与することができる。または、核酸治療物質を細胞内に導入して、相同的組み換えによって発現させるために宿主細胞DNAに組み入れる、またはエピソームとして維持する。

【０２３７】

DNAの局所投与の場合、標準的な遺伝子治療ベクターを用いることができる。そのようなベクターには、複製欠損肝炎ウイルス（HBVおよびHCVなど）、レトロウイルス（PCT公開番号WO 89/07136；Rosenberg et al., N. Eng. J. Med. 323(9):570-578, 1990を参照されたい）、アデノウイルス（Morsey et al., J. Cell. Biochem., Supp. 17E, 1993を参照されたい）、アデノ随伴ウイルス（Kotin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2211-2215, 1990）、複製欠損単純ヘルペスウイルス（HSV；Lu et al., Abstract, page 66, Abstracts of the Meeting on Gene Therapy, Sept. 22-26, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1992）に由来するベクター、およびこれらのベクターの任意の改変型が含まれる、ウイルスベクターが含まれる。核酸の真核細胞へのインビボ移入を成就する任意の他の送達システムを利用することができる。たとえば、核酸を、陽イオンリポソーム（Lipofectin）などのリポソーム、受容体媒介送達系、非ウイルス性の核酸に基づくベクター、赤血球ゴースト、またはミクロスフェア（微粒子など；たとえば米国特許番号 4,789,734；米国特許番号 4,925,673；米国特許番号 3,625,214を参照されたい）にパッケージングしてもよい。裸のDNAも同様に投与してもよい。

【０２３８】

核酸阻害剤に関して、治療的有効量は、医学的に望ましい結果、たとえば処置した動物におけるPD-1遺伝子産物の減少、を生じることができる量である。そのような量は、当業者によって決定されうる。任意の所定の患者の用量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時間および経路、全身健康、ならびに同時投与される他の薬物が含まれる多くの要因に依存する。用量は多様であってもよいが、DNAの静脈内投与にとって好ましい用量は、DNA分子およそ$10^{6}$～$10^{22}$コピーである。

【０２３９】

典型的に、プラスミドは、DNA約1ナノグラム～約5000マイクログラムの量で哺乳動物に投与される。望ましくは、組成物は、DNA約5ナノグラム～1000マイクログラム、DNA 10ナノグラム～800マイクログラム、DNA 0.1マイクログラム～500マイクログラム、DNA 1マイクログラム～350マイクログラム、DNA 25マイクログラム～250マイクログラム、またはDNA 100マイクログラム～200マイクログラムを含有する。または、PD-1アンタゴニストをコードする組み換え型アデノウイルスベクターの哺乳動物への投与は、少なくとも$10^{5}$、$10^{6}$、$10^{7}$、$10^{8}$、$10^{9}$、$10^{10}$、または$10^{11}$プラーク形成単位（pfu）の濃度で投与されてもよい。

【０２４０】

いくつかの態様において、神経感染症を処置する場合、PD-1アンタゴニストを、静脈内または鞘内に（たとえば、脳脊髄液内に直接注入することによって）投与することができる。局所投与の場合、化合物を含浸させたウェーハまたは吸収性のスポンジを中枢神経系（CNS）組織に直接接触させて留置する。化合物または化合物の混合物は、インビボでウェーハからの薬物の拡散およびマトリクスの侵食によって徐々に放出される。または、化合物は、標準的な方法を用いて脳または脳脊髄液内に注入される。たとえば、注入口として用いるためのカテーテルを有するバーホールリングを、頭蓋に穴を開けたバーホールで頭蓋とかみあうように配置する。カテーテルに接続した液体リザーバーを、バーホールリングの上部より上に配置した隔膜を通して針またはスタイレットによって査定する。カテーテルアセンブリ（たとえば、米国特許番号 5,954,687において記述される）は、一定期

間、薬物を投与させるために脳の選択された位置でまたは脳の近傍または脳内へのまたは脳からの液体の移入にとって適した液体流路を提供する。

【０２４１】

さらなる態様において、心臓の感染症の場合、PD-1アンタゴニストは、たとえば胸壁を通しての直接の冠血管内注射によって、または蛍光透視（fluoroscopic）による誘導下で標準的な経皮カテーテルに基づく方法を用いて、心組織（心筋、心膜、または内膜など）に送達することができる。このように、PD-1アンタゴニストを組織に直接注射してもよく、または体腔に挿入されたステントもしくはカテーテルから注入されてもよい。任意の多様な冠血管カテーテルまたは灌流カテーテルを用いて化合物を投与してもよい。または、PD-1アンタゴニストを、ステント上にコーティングする、または含浸させて、これを冠血管に留置する。

【０２４２】

肺の感染症は、たとえばPD-1アンタゴニストを吸入によって投与することによって処置することができる。化合物は、二酸化炭素などの気体などの適した推進剤を含有する加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエアロゾルスプレーの剤形で投与される。

【０２４３】

当業者は、処置される患者が、持続的に感染した被験者を診断するための同じ試験に供されうること、および検査を行うことなく、一つまたは複数の危険因子（感染物質に対する曝露、感染対象に対する曝露、遺伝的素因、または二次感染症に対する素因を有する病態を有するなど）の存在により高リスクである患者として同定される可能性があることを理解するであろう。持続的感染症の症状または損傷の低減にはまた、症状の緩和、疾患の程度の減損、疾患状態の安定化（または非悪化）、疾患の進行の遅延または遅れ、および疾患状態の改善または寛解が含まれてもよいがこれらに限定されるわけではない。処置は、健康管理提供者による厳密な監督下で自宅で行われえて、または健康管理施設において行いうる。

【０２４４】

本明細書に開示の方法を用いた処置後に免疫応答を測定する方法は、当技術分野において周知である。T細胞の活性は、たとえばサイトカイン産生を検出するアッセイによって、T細胞増殖を測定するアッセイによって、微生物のクリアランスを測定するアッセイによって、およびCD8+ T細胞の細胞障害性を測定するアッセイによって査定してもよい。これらのアッセイは、たとえばその全てが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許番号 6,808,710ならびに米国特許出願第20040137577号、第20030232323号、第20030166531号、第20030064380号、第20030044768号、第20030039653号、第20020164600号、第20020160000号、第20020110836号、第20020107363号、および第20020106730号において記述されている。B細胞応答（例えばメモリーB細胞応答）の測定は、以下に記載されている。

【０２４５】

任意で、PD-1アンタゴニストがCD8+ T細胞の細胞障害性を増加させる能力は、CD8+ T細胞の増殖を測定するアッセイ（たとえば、チミジン取り込み、BrdUアッセイ、およびたとえばDong et al.（Nature 5:1365-1369, 1999)によって記述される細胞周期マーカー（たとえば、Ki67およびCFSE）による染色）によって査定される。一つの例において、T細胞増殖は、PD-1を発現する精製T細胞をPD-1アンタゴニスト、先に記述された一次活性化シグナル、および$^{3}$H-チミジンと共に培養することによってモニターされる。T細胞増殖のレベルは、チミジン取り込みを測定することによって決定される。

【０２４６】

CD8+ T細胞の細胞障害性はまた、溶解アッセイ（$^{51}$Cr放出アッセイまたはパーフォリンもしくはグランザイムの放出を検出するアッセイ）、カスパーゼ活性化を検出するアッセイ、または感染対象からの微生物物質のクリアランスを測定するアッセイによっても査定されうる。たとえば、感染対象からの生物試料（たとえば、血清、脾臓、肝臓、肺、またはウイルスが向性である組織）におけるウイルス負荷を処置の前後に測定してもよい。

【０２４７】
IFNγ、TNF-α、およびIL-2などのサイトカインの産生も同様に、測定してもよい。たとえば、精製T細胞をPD-1タンパク質アンタゴニストおよび一次活性化シグナルの存在下で培養する。上清における様々なサイトカインレベルを、サンドイッチ酵素結合免疫測定アッセイ、またはたとえばDong et al.（Nature 5:1365-1369, 1999）において記述される他の従来のアッセイによって決定することができる。
【０２４８】
望ましければ、PD-1アンタゴニストの効能は、T細胞の共刺激誘導能によって査定される。たとえば、インビトロでT細胞を共刺激するための方法は、PD-1を発現する精製T細胞に、抗CD3モノクローナル抗体もしくはホルボールエステルによる、またはクラスII MHCに関連する抗原による第一または一次活性化シグナルを提供する段階を伴う。候補化合物物質がPD-1発現または活性を低減できるか否か、したがってこれらのT細胞に対して免疫機能を調節するために必要な二次または共刺激シグナルを提供できるか否かは、当技術分野において周知のいくつかの従来のアッセイの任意の一つによってアッセイすることができる。
【０２４９】
PD-1アンタゴニストに対するB細胞の応答は、LCMV特異的ELISA、プラスマ細胞ELISPOT、メモリーB細胞アッセイ、B細胞の表現型決定、および免疫組織化学による胚中心の分析によって評価することができる。
【０２５０】
処置法：養子免疫療法
本明細書において、持続的なウイルス感染症（慢性感染症などの）または腫瘍を有する被験対象などの関心対象の被験対象を処置するための方法が開示される。方法には、ウイルス抗原または腫瘍抗原などの関心対象抗原に対して特異的な細胞障害性T細胞の治療的有効量、およびPD-1アンタゴニストの治療的有効量の投与が含まれる。いくつかの態様において、方法にはまた、被験対象からの試料中のメモリーB細胞増殖を測定する段階が含まれうる（以下を参照されたい）。追加の態様において、方法には、被験対象からの試料中のナイーブB細胞を測定する段階が含まれる。さらなる態様において、方法にはまた、CD28を発現するT細胞を測定する段階が含まれる。いくつかの態様において、方法には中和抗体を測定する段階が含まれる。このように、開示の方法には、中和抗体、メモリーB細胞増殖、ナイーブB細胞、およびCD28を発現するT細胞の少なくとも1つを測定する段階が含まれる。本明細書において開示される方法を用いてこれらのパラメータの2つ、3つ、または全てを測定することができる。
【０２５１】
対象における免疫系の増強などの、免疫応答を増加させる方法が本明細書において開示される。本明細書において開示されるように、精製抗原特異的T細胞およびPD-1の投与は、病原体（ウイルスもしくは真菌など）または新生物に対して免疫応答を標的化することによって、感染疾患または腫瘍などの病態を克服する対象の能力を増加させるであろう。したがって、エクスビボで対象からの選択された抗原特異的T細胞の精製集団を精製および生成すること、ならびにこれらの細胞の治療量を導入することによって、レシピエント対象の免疫応答は増強される。PD-1アンタゴニストの治療的有効量の投与はまた、レシピエントの免疫応答を増強させる。
【０２５２】
レシピエントにおける関心対象抗原に対して免疫応答を誘導する方法が、本明細書において提供される。レシピエントは、ウイルスもしくは真菌感染症などの慢性感染症を有する対象、または腫瘍を有する対象が含まれる、任意の関心対象となりうる。これらの感染症は先に記述されている。
【０２５３】
免疫欠損者における感染症は、同種異系移植幹細胞レシピエントおよび永続的に免疫抑制された臓器移植レシピエントにおいて共通の問題である。これらの対象における得られ

たT細胞欠損感染症は、通常レシピエントに既に存在するウイルスの再活性化によって起こる。たとえば、獲得した後、ほとんどのヘルペス群のウイルス（CMV、EBV、VZV、HSVなど）は休止期にあり、T細胞によって抑制され続ける。しかし、患者が条件付け養生法によって免疫抑制されると、休止期のウイルスは再活性化されうる。たとえば、CMVの再活性化、B細胞において腫瘍を引き起こす（EBVリンパ増殖疾患）エプスタイン-バーウイルス（EBV）の再活性化、および出血性膀胱炎を引き起こすBKウイルスの再活性化は、免疫抑制後に起こりうる。さらに、HIV感染症および先天性の免疫欠損は、T細胞免疫欠損の他の例である。これらのウイルス感染症および再活性化は、免疫抑制対象における問題点となりうる。

【０２５４】

いくつかの態様において、腫瘍に対する免疫応答は、骨髄移植のレシピエントに提供される。抗腫瘍免疫は、腫瘍抗原を認識する抗原特異的T細胞の投与によって対象に提供されうる。レシピエントに対するそのような投与は、関心対象の腫瘍抗原を標的とする、認識する、および免疫反応するT細胞を提供することによって、腫瘍に対するレシピエントの免疫応答を増強するであろう。

【０２５５】

一つの例において、方法には、T細胞が含まれるドナー細胞集団（末梢血単核球など）をドナーから単離する段階、および任意でPD-1の存在下で、T細胞を含むドナー細胞集団を、関心対象抗原を提示するドナーからの抗原提示細胞（APC）集団に接触させて、それによって関心対象抗原を認識する異種反応性T細胞を枯渇した活性化ドナーCD4+および／またはCD8+ T細胞を含むドナー細胞集団を産生する段階が含まれる。ドナー活性化CD4+および／またはCD8+細胞集団の治療的有効量をレシピエントに投与して、それによって、レシピエントにおける関心対象抗原に対する免疫応答を産生する。精製抗原特異的T細胞の投与は、病原体（ウイルスまたは真菌など）または新生物に対する免疫応答を標的化することによって、感染疾患または腫瘍などの病態を克服する対象の能力を増加させることができる。このように、関心対象抗原に対する免疫応答を、レシピエントにおいて産生する。

【０２５６】

いくつかの態様において、方法にはまた、対象にPD-1アンタゴニストの治療的有効量を投与する段階が含まれる。PD-1アンタゴニストの投与は先に詳細に記述される。

【０２５７】

関心対象抗原からの任意の抗原性ペプチド（免疫原性断片など）を用いて、その関心対象抗原に対して特異的なT細胞集団を生成することができる。ウイルスおよび腫瘍抗原などの多数のそのような抗原性ペプチドが当技術分野において公知である（たとえば、表1～3を参照されたい）。本開示は、特異的抗原ペプチドを用いることに限定されない。関心対象抗原からの抗原性ペプチドの特定の実施例には、表1～3において示される抗原などの、ウイルス、真菌、および腫瘍抗原であるそれらの抗原が含まれるが、これらに限定されるわけではない。さらなる抗原性ペプチドが当技術分野において公知である（たとえば、双方が参照により本明細書に組み入れられる、Novellino et al, Cancer Immunol. Immunother. 54(3): 187-207, 2005、およびChen et al, Cytotherapy, 4:41-8, 2002を参照されたい）。

【０２５８】

表1および3は、関心対象の完全長の抗原の特定の断片を開示するが、当業者は、他の断片または完全長のタンパク質を同様に、本明細書に開示の方法において用いることができることを認識するであろう。一つの例において、関心対象抗原は、完全長の抗原配列の「免疫原性断片」である。「免疫原性断片」は、MHCの分子の状況において細胞によって提示された場合に、T細胞活性化アッセイにおいて、タンパク質を発現する細胞に対してT細胞を活性化することができるタンパク質の一部を指す。典型的に、MHCクラスI分子に結合するそのような断片は、完全長の抗原の8～12近接アミノ酸であるが、より長い断片も当然用いてもよい。いくつかの例において、免疫原性断片は、エピトープ配列をさらにプロ

セシングすることなく、APCの表面上のMHC分子に特異的に結合することができる断片である。特定の例において、免疫原性断片は、完全長の抗原配列からのアミノ酸8～20個、アミノ酸8～15個、アミノ酸8～12個、アミノ酸8～10個、または近接アミノ酸8、9、10、11、12、13、14、15、もしくは20個などの、完全長の抗原配列からの近接アミノ酸8～50個である。いくつかの例において、細胞内プロセシングを行う必要なく、APC表面上で免疫原性断片がMHC分子に特異的に結合するために十分な条件で、APCを免疫原性断片と共にインキュベートする。

【０２５９】

一つの例において、抗原には、対象のHLA分子の結合モチーフを有するアミノ酸配列を有する、関心対象抗原からのペプチドが含まれる。これらのモチーフは、当技術分野において周知である。たとえば、HLA-A2は、ヒト集団における一般的な対立遺伝子である。この分子に関する結合モチーフには、第二の位置でロイシンまたはメチオニンを有し、最後の位置でバリンまたはロイシンを有するアミノ酸9または10個を有するペプチドが含まれる（先の実施例を参照されたい）。これらのモチーフが含まれるペプチドは、当技術分野において公知の任意の方法（組み換え、化学など）によって調製することができる。関心対象抗原のアミノ酸配列がわかれば、MHCに結合することが予測される免疫原性断片配列を、公共に入手可能なプログラムを用いて決定することができる。たとえば、インターネット上のHLA結合モチーフプログラム（Bioinformatics and Molecular Analysis Section-BIMAS）を用いて、ルーチンの方法を用いて、任意の腫瘍、ウイルス、または真菌関連抗原のエピトープを予測することができる。関心対象抗原（完全長のタンパク質またはその免疫原性断片）を次に、標準的な技術を用いて産生および精製することができる。たとえば、関心対象のエピトープまたは完全長の抗原は、標準的な方法によって組み換えによって産生されうる、または化学合成されうる。実質的に純粋なペプチド調製物は、非還元ポリアクリルアミドゲルにおいて一つの主要なバンドを生じるであろう。他の例において、関心対象抗原には、粗ウイルス溶解物が含まれる。

【０２６０】

一つの例において、関心対象抗原は、腫瘍関連抗原であり、HLA結合モチーフを担うアミノ酸配列は、サブドミナントまたは隠れたエピトープをコードする配列である。それらのエピトープは、分子における他のエピトープに関してまたはHLA分子に結合する他の分子と比較して、HLA分子に対する比較可能な結合活性がより低いことによって同定されうる。

【０２６１】

一アミノ酸置換抗原アナログ研究や内因性に結合し、天然にプロセシングされたペプチドのシークエンシングを通して、HLA抗原分子に対する特異的な結合にとって必要なモチーフに対応する不可欠な残基が同定されている（たとえば、Southwood et al, J. Immunol. 160:3363, 1998；Rammensee et al, Immunogenetics 41:178, 1995；Rammensee et al, J. Curr. Opin. Immunol 10:478, 1998；Engelhard, Curr. Opin. Immunol. 6:13, 1994；Sette and Grey, Curr. Opin. Immunol. 4:79, 1992を参照されたい）。さらに、HLA-ペプチド複合体のx線結晶分析により、HLA分子のペプチド結合裂内に、ペプチドリガンドが担う残基を対立遺伝子特異的に適合させるポケットが存在することが明らかとなり、次にこれらの残基により、それらが存在するペプチドのHLA結合能が決定される（たとえば、Madden, Annu. Rev. Immunol. 13:587, 1995；Smith et al, Immunity 4:203, 1996；Fremont et al, Immunity 8:305, 1998；Stern et al, Structure 2:245, 1994；Jones, Curr. Opin. Immunol. 9:75, 1997；Brown et al, Nature 364:33, 1993を参照されたい）。

【０２６２】

関心対象抗原は、処置される対象に基づいて選択される。たとえば、対象が、抗ウイルスまたは抗真菌免疫の増加を必要とする場合、一つまたは複数の標的ウイルスまたは真菌関連抗原を選択する。ウイルスからの例示的な関心対象抗原には、中でも、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、サイトメガロウイルス（CMV）、単純

ヘルペスウイルス（HSV）、BKウイルス、JCウイルス、およびヒト免疫不全ウイルス（HIV）からの抗原が含まれる。例示的な関心対象抗原には、カンジダ・アルビカンス、クリプトコッカス、ブラストミセス、およびヒストプラスマ、または他の感染物質からの抗原が含まれる。もう一つの例において、対象は、増加した抗腫瘍免疫を必要とする。腫瘍からの例示的な関心対象抗原には、WT1、PSA、PRAMEが含まれる。感染性因子についての例示的な関心対象抗原を表1において記載する。いくつかの例において、関心対象抗原には、ウイルス抗原と腫瘍抗原の双方、真菌抗原と腫瘍抗原、またはウイルス抗原、真菌抗原、および腫瘍抗原が含まれる。

【０２６３】

腫瘍を有する対象の処置に関して、関心対象の腫瘍抗原は、レシピエントの腫瘍によるタンパク質の発現に基づいて選ばれる。たとえば、レシピエントが乳腺腫瘍を有する場合、乳腺腫瘍抗原が選択され、レシピエントが前立腺腫瘍を有する場合、前立腺腫瘍抗原が選択される等である。表2は、例示的な腫瘍、およびその特定の腫瘍を有する対象に投与することができる精製抗原特異的T細胞を生成するために用いることができるそれぞれの腫瘍関連抗原の一覧である。しかし、当業者は、さらなる腫瘍抗原を用いて同じおよび他の腫瘍を処置することができることを認識するであろう。

【０２６４】

一つの例において、腫瘍抗原を認識する抗原特異的T細胞は、幹細胞同種異系移植片または自己移植片を受けたもしくは受けるであろう対象、または腫瘍抗原をワクチン接種されている対象に治療的有効量で投与される。たとえば、一つまたは複数の腫瘍関連抗原、たとえば表2～3において記載される関心対象抗原の少なくとも一つを認識する抗原特異的T細胞の治療量を投与することができる。

【０２６５】

レシピエントが腫瘍を有し、幹細胞同種異系移植片を受けるまたは受けるであろう特定の例において、ドナー腫瘍抗原特異的T細胞およびPD-1アンタゴニストの治療的有効量は、腫瘍の再発を予防、減少、もしくは遅らせるために、または悪性の再発を処置するために、幹細胞同種異系移植後に治療的有効量で投与される。精製抗原特異的T細胞を減量後に対象に戻すように導入することができる。なおもう一つの例において、レシピエントは、関心対象の腫瘍抗原によってワクチン接種され、精製抗原特異的T細胞をレシピエントから精製した後、腫瘍に対するレシピエントの免疫系を増加させるためにPD-1アンタゴニストの治療的有効量と共にレシピエントに再度導入する。

【０２６６】

腫瘍抗原特異的T細胞の治療的有効量およびPD-1アンタゴニストの治療的有効量を、レシピエントにおける腫瘍の再発を防止するために、または腫瘍の再発を処置するために予防的に用いることができる。そのような抗原特異的T細胞は、腫瘍関連抗原を含有する細胞を殺す、または他の免疫細胞を補助することができる。

【０２６７】

特異的例において、レシピエントは、腫瘍を有し、免疫を再構成するために幹細胞同種異系移植片を受けるまたは受けるであろう。骨髄放射線の照射後、または骨髄機能を剥離するまたはそうでなければ損ねる細胞障害剤の投与後、少なくとも二つのタイプのドナー抗原特異的T細胞、すなわちウイルス関連抗原（または真菌関連抗原）を特異的に認識する抗原特異的T細胞と、腫瘍関連抗原を特異的に認識する抗原特異的T細胞とを、治療的有効量で投与する。さらに、PD-1アンタゴニストの治療的有効量を対象に投与する。そのような投与を用いて、抗腫瘍効果および抗ウイルス効果（抗ウイルス効果など）を誘導することができる。

【０２６８】

関心対象に投与するために抗原特異的T細胞集団を産生するために、T細胞が含まれる細胞集団を、関心対象抗原を提示するために、樹状細胞またはT-APCなどの抗原提示細胞（APC）に接触させることができる。いくつかの態様において、反応性T細胞（リンパ球またはPBMCなど）を、PD-1のアンタゴニストによって処置して、一つまたは複数の関心対象抗

原を提示するAPCに加えて、抗原を提示するAPCとT細胞とを相互作用させるために十分な条件でインキュベートして、抗原特異的T細胞を産生する。反応性T細胞のPD-1アンタゴニストによる処置は、APCとの接触と同時に行うことができる。PD-1アンタゴニストによる処置はまた、APCとの接触の直前となりうる。

【０２６９】

このように、抗原特異的T細胞の濃縮集団を産生するための方法が本明細書において提供される。一般的に、T-APCは、T細胞に対して抗原を提示して、クラスI（CD8+ T細胞）およびクラスII（CD4+ T細胞）拘束性でMHC拘束反応を誘導する。典型的なT細胞応答は活性化および増殖である。このように、関心対象抗原を特異的に認識するT細胞が含まれる集団が産生される。このように、この細胞集団の治療的有効量を、慢性感染症または腫瘍を有する対象などの対象に投与して、免疫応答を産生することができる。

【０２７０】

一般的に、APCおよびT細胞は自己である。特異的な非制限的な例において、APCおよび反応性T細胞は同じ個体に由来する。しかし、APCおよび反応性T細胞は同系となりうる。APCは、自己T細胞集団に対して任意の抗原を提示するために用いることができる。当業者は、MHCクラスIおよびクラスII分子に結合する抗原性ペプチドをエクスビボで生成できること（たとえば、細胞における完全長のタンパク質からプロセシングされる代わりに）、および細胞表面上のMHC IおよびII分子と相互作用させる（結合など）ことができることを認識するであろう。一般的にAPCは、MHCクラスIおよびIIの双方の状況において抗原を提示する。

【０２７１】

一つの例において、APCと共にインキュベートした関心対象抗原は、関心対象抗原からのアミノ酸配列（関心対象抗原からの近接アミノ酸8～50個、たとえば近接アミノ酸8～15個または8～12個など）が含まれる融合タンパク質である。このように、一連のMHC結合エピトープが一つの抗原性ポリペプチドに含まれうる、またはそれぞれのトリマーがMHCクラスI分子、b2ミクロブロブリン、および関心対象抗原性ペプチドを有する（Nature 2005; vol. 436, page 578を参照されたい）、一本鎖トリマーを利用することができる。いくつかの例において、一つのみの抗原を用いるが、他の態様において、少なくとも2個の異なる抗原、少なくとも3個の異なる抗原、少なくとも4個の異なる抗原、少なくとも5個の異なる抗原、少なくとも10個の異なる抗原、少なくとも15個の異なる抗原、少なくとも20個の異なる抗原、または少なくとも50個の異なる抗原などの、一つより多い抗原を用いる。

【０２７２】

なお他の例において、関心対象抗原は、完全長の抗原アミノ酸配列（完全長の真菌抗原、腫瘍抗原、またはウイルス抗原、たとえばウイルス溶解物もしくは完全長のカテプシンGなど）である。さらなる例において、任意の感染物質からの一つまたは複数の抗原を利用することができる。いくつかの例において、関心対象の完全長の抗原は、APCによって発現される。

【０２７３】

APCは、当業者に公知の方法を用いて産生することができる（参照により本明細書に組み入れられる、Melenhorst et al, Cytotherapy 7, supp. 1, 2005；Melenhorst et al., Blood 106: 671a, 2005；Gagliardi et al., Int. Immunol. 7: 1741-52, 1995を参照されたい）。一つの例において、T-APCを産生するために、ドナー末梢血単球を、IL-2およびCD3に特異的に結合する抗体（OKT3など）を用いて、約1～2週間などの、約7～10日などの、約3日間またはそれより長いあいだ活性化する。

【０２７４】

提示抗原の存在下で、抗原を認識するT細胞は、抗原に対して特異的ではない（およびこのように、抗原特異的に結合しない）T細胞より、関心対象抗原を提示する抗原提示細胞（APC）に強く結合することが観察されている。特定の例において、抗原特異的T細胞は、APCが主要組織適合抗原複合体（MHC）クラスIおよび／またはクラスIIに会合して抗原

を提示するように、それに対して望ましいT細胞がPD-1アンタゴニストの存在下で標的とされる標的ペプチド抗原（標的ウイルスまたは腫瘍関連抗原など）にAPCを曝露することによって選択される。たとえば、APCは、APCの表面上のMHC分子を十分に占有して（たとえば、MHC分子の少なくとも5%、少なくとも7.5%、または少なくとも10%などの、少なくとも1%が占有される）、およびPD-1アンタゴニストの存在下で関心対象抗原を提示するAPCに対する標的T細胞の優先的結合（関心対象抗原を提示しないAPCと比較して）を刺激するために関心対象抗原の十分量に曝露することができる。次に、関心対象抗原に関してプライミングされている集団などのT細胞集団を、細胞を優先的に活性化するために、任意で、PD-1に特異的に結合する抗体などのPD-1アンタゴニストの存在下でAPCと共にインキュベートして、それによって関心対象抗原を認識する所望のT細胞に関して濃縮された細胞集団を産生する。

【０２７５】

PBMCまたはリンパ球集団に存在する細胞などのT細胞を、任意で、PD-1アンタゴニストの存在下で、一つまたは複数の関心対象抗原に関してプライミングされているT細胞集団を生成するために、一つまたは複数の関心対象抗原と共にインキュベートすることができる。T細胞は、当技術分野において公知の任意の方法を用いてプライミングすることができる。特定の例において、PBMCまたはリンパ球を、精製標的ペプチド抗原の存在下で、任意でPD-1アンタゴニストの存在下でインキュベートする。いくつかの例において、関心対象抗原は、上記の表において記載される一つまたは複数の関心対象抗原などの、感染性因子の抗原または腫瘍抗原であるが、これらに限定されない。関心対象抗原は、化学合成ペプチドなどの精製型となりうる。他の例において、関心対象抗原は、粗溶解物、たとえばウイルス溶解物などの非精製型で存在する。

【０２７６】

T細胞をプライミングするために用いられる抗原の量は、当技術分野において公知の方法を用いて容易に決定することができる。一般的に、抗原を精製型で用いる場合、約1～10μg/mlペプチドを用いる。ウイルス溶解物を用いる場合、溶解物約75μlなどの、約0.1～100μlを用いることができる。T-APCを用いる場合、T細胞（またはリンパ球もしくはPBMC）4000万～6000万個あたり関心対象抗原を提示するT-APC約400万～600万個を用いることができる。

【０２７７】

特異的な例において、リンパ球は、T細胞のプライミングを容認する条件で、可溶性の抗原またはウイルス溶解物と共にそれらを5～7日間インキュベートすることによって、インビトロでプライミングされる。生存T細胞を、たとえばFicoll-Hypaque遠心によって回収して、それによってプライミングされたT細胞を生成する。望ましければ、生存プライミングT細胞を、たとえば第一のプライミングのために用いられる同じ条件でさらに5～7日間抗原と共にインキュベートすることによって1回または複数回プライミングして、生存T細胞を回収することができる。

【０２７８】

もう一つの例において、リンパ球は、たとえばワクチンの形で、対象に抗原を接種することによってインビボでプライミングされる。この例において、免疫後に対象から得られたT細胞は、既にプライミングされている。たとえば、対象から得られたリンパ球またはPBMCを、さらにプライミングする必要なく、本明細書において記述されるPD-1アンタゴニストの存在下でAPCと共にインキュベートする。

【０２７９】

方法にはさらに、関心対象抗原を提示するAPCを生成する段階が含まれうる。たとえば、APCを、標的ペプチド（複数）がAPCの表面上に提示されるために十分な条件で、一つまたは複数の異なるペプチド抗原の十分量と共にインキュベートすることができる。これは、APCの表面上のMHC分子上で関心対象抗原を提示するAPC集団を生成する。開示される方法は、APCの表面上で関心対象抗原を提示する特定の方法に限定されない。

【０２８０】

抗原はまた、天然に、または標的タンパク質（抗原）をコードするDNA配列を含有する遺伝子の挿入によりAPCによって発現されうる。関心対象抗原をコードする核酸を、メッセンジャーRNAとして、または哺乳動物発現ベクターもしくはウイルスベクター（たとえば、アデノウイルス、ポックスウイルス、またはレトロウイルスベクター）などのベクターを用いてT細胞に導入することができる。関心対象抗原をコードするポリヌクレオチドには、自立複製するプラスミドもしくはウイルスである、真核細胞のゲノムDNAに組み入れられる、または他の配列とは独立して異なる分子として存在する組み換え型DNAが含まれる。関心対象抗原をコードする核酸はまた、電気穿孔、リポフェクション、またはリン酸カルシウムに基づくトランスフェクションを用いて導入することができる。

【０２８１】

ポリオーマ、すなわちSV40（Madzak et al, 1992, J. Gen. Virol, 73:15331536）、アデノウイルス（Berkner, 1992, Cur. Top. Microbiol. Immunol, 158:39-6；Berliner et al, 1988, Bio Techniques, 6:616-629；Gorziglia et al, 1992, J. Virol, 66:4407-4412；Quantin et al, 1992, Proc. Nad. Acad. Sci USA, 89:2581-2584；Rosenfeld et al., 1992, Cell, 68:143-155；Wilkinson et al., 1992, Nucl. Acids Res., 20:2233-2239；Stratford- Perricaudet et al., 1990, Hum. Gene Ther., 1:241-256）、ワクシニアウイルス（Mackett et al., 1992, Biotechnology, 24:495-499）、アデノ随伴ウイルス（Muzyczka, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 158:91-123；On et al., 1990, Gene, 89:279-282）、HSV、CMV、およびEBVが含まれるヘルペスウイルス（Margolskee, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 158:67-90；Johnson et al., 1992, J. Virol, 66:29522965；Fink et al., 1992, Hum. Gene Ther. 3:11-19；Breakfield et al., 1987, Mol Neurobiol, 1:337-371；Fresse et al., 1990, Biochem. Pharmacol, 40:2189-2199）、シンドビスウイルス（H. Herweijer et al., 1995, Human Gene Therapy 6:1161-1167；U.S. Pat. Nos. 5,091,309および5,2217,879）、アルファウイルス（S. Schlesinger, 1993, Trends Biotechnol. 11:18-22；I. Frolov et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11371-11377）、ならびにトリ（Brandyopadhyay et al., 1984, Mol Cell Biol, 4:749-754；Petropouplos et al., 1992, J. Virol, 66:3391-3397）、ネズミ（Miller, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 158:1-24；Miller et al., 1985, Mol Cell Biol, 5:431-437；Sorge et al., 1984, Mol Cell Biol, 4:1730-1737；Mann et al., 1985, J. Virol, 54:401-407）、およびヒト起源（Page et al., 1990, J. Virol, 64:5370-5276；Buchschalcher et al., 1992, J. Virol, 66:2731-2739）のレトロウイルスが含まれる多くのウイルスベクターを構築することができる。バキュロウイルス（オートグラファ・カリフォルニカ核多核体ウイルス；AcMNPV）ベクターも同様に当技術分野において公知であり、販売元から得てもよい（PharMingen, San Diego, Calif.；Protein Sciences Corp., Meriden, Conn.；Stratagene, La Jolla, Calif.など）。

【０２８２】

一つの態様において、関心対象抗原をコードするポリヌクレオチドは、APCに移入するためのウイルスベクターに含まれる。適したベクターには、レトロウイルスベクター、オルトポックスベクター、アビポックスベクター、鶏痘ベクター、カプリポックスベクター、スイポックスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、およびポリオウイルスベクターが含まれる。特異的な例示的なベクターは、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、および高度弱毒化ワクシニアウイルス（MVA）、アデノウイルス、バキュロウイルスなどのポックスウイルスベクターである。

【０２８３】

有用なポックスウイルスには、オルトポックス、スイポックス、アビポックス、およびカプリポックスウイルスが含まれる。オルトポックスには、ワクシニア、エクトロメリア、およびラクーンポックスが含まれる。有用なオルトポックスの一つの例は、ワクシニアである。アビポックスには、鶏痘、カナリア痘、および鳩痘が含まれる。カプリポックスには、ヤギ痘およびヒツジ痘が含まれる。一つの例において、スイポックスはブタ痘であ

る。発現のためのポックスウイルスベクターの例は、たとえば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許番号 6,165,460において記述される。用いることができる他のウイルスベクターには、ヘルペスウイルスおよびアデノウイルスなどの他のDNAウイルス、ならびにレトロウイルスおよびポリオなどのRNAウイルスが含まれる。

【０２８４】

適したベクターは、たとえば参照により本明細書に組み入れられる米国特許番号 6,998,252において記述される。一つの例において、組み換え型ワクシニアウイルスなどの組み換え型ポックスウイルスは、ワクシニア調節配列、または本来は関心対象抗原をコードする隣接するワクシニア調節DNA配列に近接していないDNA配列に隣接するそれと機能的に同等なDNA配列を含有するキメラ遺伝子を挿入することによって合成的に改変される。そのようなキメラ遺伝子を含有する組み換え型ウイルスは、抗原の発現にとって有効である。一つの例において、ワクシニアウイルスベクターは、（A）ポックスウイルスプロモーターが抗原ポリペプチドをコードするDNA配列に対して接して、転写制御を発揮する（i）抗原をコードする第一のDNA配列、および（ii）ポックスウイルスプロモーター、を含むセグメント；および該セグメントに隣接する、（B）ポックスウイルスゲノムの非必須領域からのDNAを含む。ウイルスベクターは、選択マーカーをコードしうる。一つの例において、ポックスウイルスには、たとえばチミジンキナーゼ遺伝子（参照により本明細書に組み入れられる米国特許番号 6,998,252を参照されたい）が含まれる。

【０２８５】

十分な密度の抗原（複数）を提示するAPC集団を、任意で有効量のPD-1アンタゴニストの存在下で、T細胞（リンパ球またはPBMCなど）と共に、抗原を提示するAPCと、抗原に特異的に免疫反応するT細胞（抗原特異的T細胞）とを結合させるために十分な条件下でインキュベートする。APCに対する標的T細胞の結合の増強を刺激するために、MHCと共に十分な密度の抗原を発現する十分数のAPCを用いる。特定の例において、APCの少なくとも30％、APCの少なくとも40％、APCの少なくとも50％、またはAPCの少なくとも60％などの、APCの少なくとも20％がAPC表面上でMHC分子において望ましい抗原を提示する。加えられるT細胞の最適な量は、用いるAPCの量に応じて多様となりうる。いくつかの例において、少なくとも8：1、少なくとも10：1、少なくとも12：1、少なくとも15：1、少なくとも16：1、少なくとも20：1、または少なくとも50：1などの少なくとも6：1のT細胞：APC比を用いる。

【０２８６】

抗原特異的T細胞数を増加させるために、たとえばIL-2、IL-7、IL-12、およびIL-15などのサイトカインの存在下でインキュベートすることによって、細胞の増殖を刺激することができる。加えられるサイトカインの量は、T細胞の産生および増殖を刺激するために十分であり、ルーチンの方法を用いて決定することができる。いくつかの例において、加えられるIL-2、IL-7、IL-12、またはIL-15の量は、少なくとも1 IU/mL、少なくとも10 IU/mL、または少なくとも20 IU/mLなどの約0.1～100 IU/mLである。

【０２８７】

APCに対する抗原特異的T細胞の十分量の結合の後、関心対象抗原を特異的に認識するT細胞が産生される。これは関心対象抗原に対して特異的である濃縮（精製など）抗原特異的T細胞集団を生成する。いくつかの例において、関心対象抗原に対して特異的な得られたT細胞集団は、少なくとも40％純粋、または少なくとも50％純粋、などの少なくとも30％純粋である。抗原特異的T細胞集団の純度は、当業者に公知の方法を用いて査定することができる。

【０２８８】

一つの例において、抗原特異的T細胞の増殖の刺激の際に、細胞を計数して細胞数を決定することができる。望ましい細胞数が達成されると、純度を決定する。純度は、たとえばインターフェロン（IFN）γ、腫瘍壊死因子（TNF）α、インターロイキン（IL）-2、IL-10、トランスフォーミング増殖因子（TGF）β1、またはIL-4などの抗原認識時のサイトカイン産生の査定と共に、抗原特異的T細胞の表面に存在するマーカーを用いて決定する

ことができる。一般的に、抗原特異的T細胞は、CD4またはCD8マーカーおよびIFNγ（活性化T細胞に関して特異的）と共に、CD3マーカーに対して陽性である。たとえば、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）を用いて、異なる色の抗CD3、抗CD4、抗CD8、および抗IFNγを用いて、CD3、CD4、またはCD8、およびIFNγに関して陽性である細胞集団を同定（および望ましければソーティング）することができる。簡単に説明すると、刺激されたT抗原特異的細胞を、抗CD3、抗CD4、抗CD8、および抗IFNγ（それぞれに異なる蛍光体が付随している）の存在下で、抗体が細胞に結合するために十分な時間インキュベートする。未結合抗体を除去した後、細胞をルーチンの方法を用いてFACSによって分析する。抗原特異的T細胞は、IFNγ陽性およびCD8陽性またはCD4陽性である細胞である。特異的な例において、得られた抗原性T細胞集団は、CD4陽性またはCD8陽性細胞の総集団と比較して、少なくとも40％純粋、少なくとも50％純粋、少なくとも60％純粋、または少なくとも70％純粋などの、CD4+またはCD8+陽性細胞の総集団に対して少なくとも30％純粋である。

【０２８９】

もう一つの例において、方法にはさらに、抗原特異的T細胞の細胞障害性を決定する段階が含まれる。細胞障害性を決定するための方法は、当技術分野において公知であり、たとえば$^{51}$Cr放出アッセイである（たとえば、全てが参照により本明細書に組み入れられる、Walker et al. Nature 328:345-8, 1987；Qin et al. Acta Pharmacol. Sin. 23(6):534-8, 2002を参照されたい）。

【０２９０】

抗原特異的T細胞を1回または複数回の選択ラウンドに供して、抗原特異的T細胞の純度を増加させることができる。たとえば、先に生成された精製抗原特異的T細胞を、再度、APCと精製抗原特異的T細胞とを結合させるために十分な条件で、PD-1アンタゴニストの存在下で関心対象抗原を提示するAPCと共にインキュベートする。得られた抗原特異的T細胞を、たとえばIL-2によって刺激して増殖させることができる。一般的に、関心対象抗原と特異的に免疫反応する得られた抗原特異的T細胞は、1回のみの選択ラウンドを行った場合よりAPCによる連続刺激後ではより純粋である。一つの例において、産生された精製抗原特異的T細胞集団は、存在する全てのCD3+細胞に対して、少なくとも95％純粋または少なくとも98％純粋などの、少なくとも90％純粋である。特定の例において、産生された精製抗原特異的T細胞集団は、存在する全てのCD4+細胞と比較して、少なくとも98％純粋などの少なくとも95％純粋である。もう一つの例において、産生される精製抗原特異的T細胞集団は、存在する全てのCD3+細胞と比較して少なくとも93％純粋などの少なくとも90％純粋である。

【０２９１】

本開示はまた、濃縮された（精製されたなど）抗原特異的T細胞およびPD-1アンタゴニストが含まれる治療組成物を提供する。特定の例において、得られた抗原特異的T細胞の濃縮集団（関心対象抗原に対して特異的）は、それらを必要とする対象に投与するために治療的投与剤形で置かれる。PD-1アンタゴニストも同様に、処置を必要とする対象に投与するために治療的投与剤形で存在する。

【０２９２】

一つの例において、産生される精製抗原特異的T細胞集団は、存在する全てのCD3+細胞と比較して、少なくとも40％純粋、少なくとも50％純粋、少なくとも80％純粋、または少なくとも90％純粋などの、少なくとも30％純粋である。特定の例において、産生される精製抗原特異的T細胞集団は、存在する全てのCD3+細胞と比較して、少なくとも40％純粋、少なくとも50％純粋、少なくとも80％純粋、少なくとも90％純粋、少なくとも95％純粋、または少なくとも98％純粋などの、少なくとも30％純粋である。もう一つの例において、産生される精製抗原特異的T細胞集団は、存在する全てのCD3+細胞と比較して、少なくとも60％純粋、少なくとも75％純粋、少なくとも80％純粋、少なくとも90％純粋、または少なくとも93％純粋などの、少なくとも50％純粋である。拡大および選択された抗原特異的T細胞を、凍結保存の前に、またはレシピエントに注入する前に、マイコプラズマ、滅菌性、およびエンドトキシンに関して試験して、機能および純度に関して品質を管理するこ

とができる。

【０２９３】

抗原特異的T細胞の治療的有効量を対象に投与する。精製抗原特異的T細胞の治療的有効量の特異的な非制限的な例には、対象1キログラムあたり細胞約$1\times10^6$個～対象1キログラムあたり細胞約$1\times10^8$個などの、対象1キログラムあたり細胞約$5\times10^6$個～対象1キログラムあたり細胞約$75\times10^6$個などの、対象1キログラムあたり細胞約$25\times10^6$個または対象1キログラムあたり細胞約$50\times10^6$個などの、対象1キログラムあたり細胞約$1\times10^5$個～対象1キログラムあたり細胞約$1\times10^9$個の用量で投与される精製抗原特異的T細胞が含まれる。

【０２９４】

精製抗原特異的T細胞は、臨床医によって決定されるように、1回または複数回用量で投与することができる。たとえば、細胞は、望ましい応答および得られる応答に応じて、およそ2週間の間隔で投与することができる。いくつかの例において、望ましい応答が得られた後、さらなる抗原特異的T細胞は投与されない。しかし、レシピエントが、感染症に関連する一つもしくは複数の症状、または腫瘍の存在もしくは生育を示す場合、抗原特異的T細胞の治療的有効量をその時点で投与することができる。投与は局所または全身的となりうる。

【０２９５】

本明細書において開示される精製抗原特異的T細胞は、生理食塩液などの薬学的に許容される担体と共に投与することができる。PD-1アンタゴニストはまた、先に記述されるように薬学的に許容される担体において処方されうる。いくつかの例において、他の治療物質を抗原特異的T細胞およびPD-1アンタゴニストと共に投与する。他の治療物質は、望ましい効果に応じて、抗原特異的T細胞の投与の前、あいだ、または後に投与することができる。例示的な治療物質には、抗菌剤、インターフェロンαなどの免疫刺激剤、化学療法剤、またはインビトロでT細胞を刺激するために用いられる同じ抗原のペプチドワクチンが含まれるが、これらに限定されるわけではない。特定の例において、精製抗原特異的T細胞を含有する組成物にはまた、一つまたは複数の治療物質が含まれる。

【０２９６】

処置法および評価

PD-1アンタゴニストの治療的有効量の投与が、メモリーB細胞の増殖を増加させることなどによって、B細胞に影響を及ぼすことが本明細書において開示される。先に記述したように、被験対象に対するPD-1アンタゴニストの投与が含まれる処置法が本明細書において提供される。これらの方法には、被験対象におけるメモリーB細胞の増殖を測定する段階などの、しかしこれらに限定されないB細胞を測定する段階が含まれる。いくつかの例において、方法には、被験対象からの試料中のナイーブB細胞を測定する段階が含まれる。いくつかの態様において、方法には、CD28 T細胞を測定する段階、および／または関心対象抗原に対する中和抗体を測定する段階が含まれる。このように、方法には、メモリーB細胞増殖、ナイーブB細胞、CD28 T細胞、および中和抗体の1つまたは複数を測定する段階が含まれうる。

【０２９７】

本明細書においてまた、多様な感染症および癌を処置する、ならびに多様な感染症および癌におけるPD-1アンタゴニストの効能を測定する方法が提供される。本開示は、処置法が関心対象の任意の被験対象において有効であるか否かを決定するための方法を包含する。これらの方法において、持続的な感染症または癌を有する被験対象などの関心対象の被験対象が選択される。この被験対象は、PD-1アンタゴニストの治療的有効量を投与される。いくつかの例において、メモリーB細胞の増殖は、処置法が有効であるか否かを決定するために、および／またはPD-1アンタゴニストの用量を変化させるべきか否かを決定するために査定される。追加の例において、方法には、ナイーブB細胞を測定する段階が含まれる。さらなる例において、方法には、CD28 T細胞を測定する段階、および／または関心対象抗原に対する中和抗体を測定する段階が含まれる。このように、方法には、メモリーB細胞増殖、ナイーブB細胞、CD28 T細胞、および中和抗体の1つまたは複数を測定する段

階が含まれうる。

【０２９８】

被験対象は、ヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、およびブタなどの任意の哺乳動物でありうる。いくつかの例において、被験対象は、ヒトなどの霊長類である。追加の例において、被験対象は、マウスなどのネズミ被験対象である。いくつかの態様において、被験対象は先に考察したように感染症を発症するリスクを有する。感染症を発症するリスクを有する被験対象は、感染症をまだ有しないが、関心対象の感染物質に感染しうる被験対象である。追加の例において、持続的感染症などの感染症を有する被験対象が処置のために選択される。他の態様において、被験対象は、先に考察したように、癌を発症するリスクを有するまたは癌を有する。これらの被験対象は、医師などの当業者によって、適した標準的な方法によって同定されうる。開示される方法には、関心対象の被験対象を選択する段階、および先に記述したPD-1アンタゴニストを投与する段階が含まれる。次に、メモリーB細胞増殖を査定する。いくつかの例において、ナイーブB細胞の数も同様に査定される。

【０２９９】

いくつかの態様において、被験対象は、先に記述したように細菌、ウイルス、真菌、または寄生虫による持続的な感染症を有する。PD-1アンタゴニストの治療的有効量が被験対象を処置するために投与される。次に、処置法が有効であるか否かを決定するため、および／またはPD-1アンタゴニストの用量を変化させるべきか否かを決定するために、メモリーB細胞の増殖を査定する。一般的に、急性感染症とは対称的に、持続的感染症は、宿主免疫応答の誘導によって有効に除去されない。感染物質および免疫応答は平衡に達して、感染した被験対象が症状を必ずしも発現することなく長期間にわたって感染性であり続ける。持続的感染症には、たとえば、潜在性、慢性および遅延感染症が含まれる。持続的感染症は、ヒトT細胞白血病ウイルス、XMRV、ポリオーマJCウイルス、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、麻疹、パポバウイルス、プリオン、肝炎ウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、および乳頭腫ウイルスなどのウイルスによって起こる。追加の持続的感染症は先に記述されたとおりである。これらの方法には、ナイーブB細胞、CD28 T細胞、および／または中和抗体を測定する段階が含まれうる。

【０３００】

さらなる態様において、被験対象は腫瘍を有する。PD-1アンタゴニストの治療的有効量は、先に記述したように腫瘍を処置するために被験対象に投与される。次に、処置法が有効であったか否かを決定するため、および／またはPD-1アンタゴニストの用量を変化させるべきか否かを決定するために、メモリーB細胞の増殖を査定する。いくつかの例において、腫瘍抗原、または腫瘍抗原をコードするヌクレオチドの治療的有効量も同様に被験対象に投与される。PD-1アンタゴニストおよび腫瘍抗原、または腫瘍抗原をコードするヌクレオチドは、同時または連続的に投与されうる。これらの方法には、ナイーブB細胞、CD28 T細胞、および／または中和抗体を測定する段階が含まれうる。

【０３０１】

追加の態様において、被験対象は、ウイルス抗原または腫瘍抗原などの関心対象抗原に対して特異的な細胞障害性T細胞の治療的有効量、およびPD-1アンタゴニストの治療的有効量を投与される。本明細書において開示される精製された抗原特異的T細胞およびPD-1の投与は、病原体（ウイルスまたは真菌などの）または新生物に対する免疫応答を標的とすることによって、感染疾患または腫瘍などの病的状態を被験対象が克服する能力を増加させるであろう。ゆえに、選択された抗原特異的T細胞の精製集団をエクスビボで被験対象から精製および生成する段階、ならびにこれらの細胞の治療的量を導入する段階によって、レシピエント被験対象の免疫応答が増強される。PD-1アンタゴニストの治療的有効量の投与はまた、レシピエントの免疫応答を増強させる。次に、処置法が有効であるか否かを決定するために、および／またはPD-1アンタゴニストおよび／または細胞障害性T細胞の用量を変化させるべきか否かを決定するために、メモリーB細胞の増殖を査定する。こ

れらの方法には、ナイーブB細胞、CD28発現（CD28+）T細胞、および／または中和抗体を測定する段階が含まれうる。

【０３０２】

このように、PD-1アンタゴニストが有効であるか否かを決定するための、またはPD-1アンタゴニストの用量が有効であるか否かを決定するための、本明細書において開示される方法は、先に記述した任意の治療法（および任意の被験対象において）と併用して用いられうる。

【０３０３】

いくつかの態様において、メモリーB細胞が測定される。対照と比較して生物試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストの用量が被験対象の処置にとって有用であることを示しており、対照と比較してメモリーB細胞の増殖の有意な変化がなければ、PD-1アンタゴニストの用量が被験対象を処置するために有用ではないことを示している。

【０３０４】

追加の態様において、方法には、被験対象からの生物試料中の中和抗体を検出する段階が含まれ、対照と比較して中和抗体が増加すれば、PD-1アンタゴニストの用量が被験対象を処置するために有用であることを示し、対照と比較して中和抗体の有意な変化がなければPD-1アンタゴニストの用量が被験対象を処置するために有用ではないことを示している。さらなる態様において、方法には、被験対象からの生物試料におけるCD28発現（CD28+）T細胞を検出する段階が含まれ、対照と比較してCD28+ T細胞が増加すれば、PD-1アンタゴニストの用量が被験対象を処置するために有用であることを示しており、対照と比較してCD28+ T細胞に有意な変化がなければPD-1アンタゴニストの用量が被験対象を処置するために有用ではないことを示している。これらの測定は、メモリーB細胞の測定に加えて行われうるが、メモリーB細胞の測定を行わなくとも行われうる。

【０３０５】

特定のPD-1アンタゴニストまたはPD-1アンタゴニストの特定の用量が被験対象を処置するために有効であるか否かを決定するための追加の方法が、本明細書において開示される。これらの方法には、被験対象からの試料中などでのメモリーB細胞の増殖を測定する段階が含まれる。これらの方法にはまた、被験対象からの試料中のナイーブB細胞を測定する段階が含まれうる。たとえば、CD27、CD20、およびCD21の発現を評価することができる（以下を参照されたい）。いくつかの態様において、メモリーB細胞および／またはナイーブB細胞の測定は、PD-1アンタゴニストが被験対象におけるPD-1活性を減少させるために十分な期間の後に起こる。

【０３０６】

方法はまた、被験対象にとって治療的に有効であるPD-1アンタゴニストの用量を評価するためにも用いられうる。たとえば、本明細書において開示される方法は、関心対象の被験対象に投与された用量を低下させることができて、なおも有効でありうるか否かを決定するために用いられうる。本明細書において開示される方法はまた、被験対象に投与された用量が低すぎて、このように治療的に有効であるために増加させなければならないか否かを決定するために用いられうる。

【０３０７】

いくつかの態様において、PD-1アンタゴニストの第一の用量が被験対象に投与される。対照と比較して増殖メモリーB細胞が増加すれば、この用量が有効であることを示している。いくつかの場合において、副作用を減少させるためなどの、被験対象に投与された物質の量を減少させることが有利でありうる。このように、第一の用量がメモリーB細胞の増殖を増加させれば、PD-1アンタゴニストの第二のより低い用量を被験対象に投与することができ、B細胞が含まれる第二の試料を得ることができる。対照と比較して第二の試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストの第二の用量が被験対象の処置にとって有用であることを示しており、このように、被験対象を処置するためにより低い用量が治療的に有効であることを決定する。対照と比較して第二の試料におけるメ

モリーB細胞の増殖に有意な変化がなければ、PD-1アンタゴニストの第二の用量が被験対象を処置するために治療的に有効ではないことを示している。関心対象の被験対象にとって最低の治療的有効量を決定するために、方法を繰り返すことができる。

【０３０８】

追加の態様において、PD-1アンタゴニストの第一の用量が被験対象に投与される。対照と比較してメモリーB細胞の増殖が増加しなければ、この用量が被験対象を処置するために治療的に有効ではないことを示している。第一の用量がメモリーB細胞の増殖を増加させなければ、第二のより高用量を被験対象に投与することができ、B細胞が含まれる第二の試料を得ることができる。対照と比較して第二の試料からのメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストの第二のより高用量が被験対象を処置するために有用であることを示しており、このように、PD-1アンタゴニストのより高用量が被験対象を処置するために治療的に有効であることを決定する。対照と比較して第二の試料におけるメモリーB細胞の増殖に有意な変化がなければ、PD-1アンタゴニストの第二の用量は被験対象を処置するために治療的に有効ではなく、このように第三のより高用量が必要であることを示している。このように、関心対象の被験対象にとって治療的に有効な用量を決定するために、方法を繰り返すことができる。

【０３０９】

開示される方法はまた、特定のPD-1アンタゴニストが被験対象を処置するために治療的に有効であれば、このように継続すべきであること、または特定のPD-1アンタゴニストが被験対象を処置するために有効でなければ、このように被験対象を処置するために異なるPD-1アンタゴニストを利用すべきであることを決定するために用いられうる。これらの方法には、特定のPD-1アンタゴニストを被験対象に投与する段階、および被験対象からの試料中のメモリーB細胞の増殖を査定する段階が含まれる。対照と比較して試料中のメモリーB細胞の増殖が増加すれば、特定のPD-1アンタゴニストが被験対象を処置するために有用であることを示している。対照と比較して試料中のメモリーB細胞の増殖に有意な変化がなければ、特定のPD-1アンタゴニストが被験対象を処置するために治療的に有効ではなく、異なるPD-1アンタゴニストまたは他の治療物質を被験対象に投与すべきであることを示している。

【０３１０】

このように、特異的PD-1アンタゴニストの効能をモニターすることができ、またはPD-1アンタゴニストの有効量を、本明細書において開示される方法を用いて決定することができる。一般的に、対照と比較して、PD-1アンタゴニストを投与した被験対象からの試料中のメモリーB細胞の増殖が増加すれば、PD-1アンタゴニストが、被験対象にとって治療的に有効であることを示しており、および／または用量が被験対象を処置するために十分であることを示している。

【０３１１】

一般的に、メモリーB細胞の増殖を測定する段階には、被験対象からB細胞が含まれる試料を得る段階、および試料中の増殖メモリーB細胞の存在または数を決定する段階が含まれる。いくつかの例において、試料は生検試料、血液試料、または末梢血単核球試料である。試料はたとえば、メモリーB細胞および／またはナイーブB細胞などのB細胞を分離するために精製されうる。いくつかの態様において、方法には、関心対象のPD-1アンタゴニストを投与された被験対象からの試料において、増殖メモリーB細胞の量および／またはナイーブB細胞の量を測定する段階が含まれる。いくつかの例において、増殖メモリーB細胞の量および／またはナイーブB細胞の量を対照と比較する。増殖メモリーB細胞に関して、対照は既に決定された標準値、PD-1アンタゴニストを投与されていない被験対象からの増殖メモリーB細胞の量、またはビヒクル単独などの対照物質を投与された被験対象からの増殖メモリーB細胞の量でありうる。同様に、ナイーブB細胞に関して、対照はそれぞれ、既に決定された標準値、PD-1アンタゴニストを投与されていない被験対象からのナイーブB細胞の量、ビヒクル単独などの対照物質を投与された被験対象からのナイーブB細胞の量、または被験対象におけるナイーブB細胞の量でありうる。

【０３１２】
いくつかの例において、CD20およびCD21を発現するがCD27を発現しない（$CD20^{+}CD27^{-}CD21^{+}$）ナイーブB細胞と比較して、CD20およびCD27を発現するが、CD21を発現しない細胞（$CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$）などのCD27を発現するメモリーB細胞が同定される。メモリーB細胞およびナイーブB細胞は、CD20、CD21、およびCD27に特異的に結合する抗体を用いて単離および／または検出されうる。いくつかの態様において、メモリーB細胞はCD27を発現する（$CD27^{+}$）。いくつかの例において、メモリーB細胞は、$CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{+}$（活性化メモリー）などの$CD27^{+}CD21^{-}$ B細胞として同定される。
【０３１３】
B細胞を単離および検出するための方法は当技術分野において公知であり、例示的なプロトコールを本明細書において提供する。メモリーB細胞の増殖を測定するおよび／またはナイーブB細胞を測定するための方法もまた、当技術分野において公知である。これらの方法は一般的に、分子および／または生化学的技術を用いることを伴い、単純な視覚的観察ではない。いくつかの例において、蛍光活性化セルソーティング（FACS）が利用される。FACSを用いて、細胞に適当な標識抗体を接触させることによって、未成熟B細胞または分化した形質細胞もしくはメモリー細胞などの細胞をソーティング（単離）することができる。1つの態様において、いくつかの抗体（CD27、CD20、CD21、CD45R、CD40、CD19、および／またはIgMに結合する抗体などの）およびFACSソーティングを用いて、未成熟B細胞、形質細胞、および／またはメモリーB細胞の実質的に精製された集団を産生することができる。
【０３１４】
被験対象からの試料中のCD28 T細胞を測定するための方法も同様に公知である。これらの方法は一般的に、分子および／または生化学技術を用いることを伴い、単純な視覚的観察ではない。いくつかの例において、蛍光活性化セルソーティング（FACS）が利用される。FACSを用いて、適当に標識された抗体を細胞に接触させることによって、未成熟B細胞または分化した形質細胞もしくはメモリー細胞などの細胞をソーティング（単離）することができる。1つの態様において、いくつかの抗体（CD3、CD4、CD8、およびCD28に結合する抗体などの）およびFACSソーティングを用いて、CD28+ T細胞の実質的に精製された集団を産生することができる。中和抗体を検出するための方法も同様に当技術分野において公知である。これらのアッセイには、生物試料を得る段階、および関心対象抗原に対する抗体の結合を検出する段階が含まれるのみならず、ウイルス、たとえばHIVなどのための特異的中和アッセイが含まれる。
【０３１５】
FACSは、細胞を分離またはソーティングするために、他のより洗練された検出レベルの中でも、複数のカラーチャンネル、低角および鈍角の光散乱検出チャンネル、およびインピーダンスチャンネルを使用する。それが望ましい細胞の生存率にとって有害でない限り、いかなるFACS技術も用いることができる（FACSの例示的な方法に関しては、米国特許第5,061,620号を参照されたい）。
【０３１６】
しかし、異なる効能の他の技術を使用して望ましい細胞集団を精製および単離することができる。使用される分離技術は、収集される細胞の分画の生存率の保持を最大限にすべきである。使用される特定の技術は、当然分離効率、方法の細胞障害性、分離の容易さおよび速度、ならびにどのような装置および／または技術的熟練が必要であるかに依存するであろう。
【０３１７】
分離技法には、抗体コーティング磁気ビーズを用いる磁気的分離、アフィニティクロマトグラフィー、モノクローナル抗体に連結されたまたは補体と共に用いられる細胞障害剤、および固相マトリクスに付着されたモノクローナル抗体を利用する「パニング」、または別の簡便な技術が含まれる。磁気ビーズに付着した、ならびにアガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、中空繊維メンブレン、およびプラスチックペトリ皿などの他の固相マト

リクスに付着した抗体は、直接分離を可能にする。抗体に結合した細胞は、細胞浮遊液から固相支持体を単に物理的に分離することによって、細胞浮遊液から除去されうる。固相連結抗体と共に細胞をインキュベートする正確な条件および期間は、使用されるシステムに対して特異的ないくつかの要因に依存するであろう。しかし、適当な条件の選択は、当業者の範囲内である。

【０３１８】

次に、関心対象マーカー（たとえば、CD45RまたはCD27）を発現する細胞を固相連結抗体に結合させるために十分な時間の後、未結合の細胞を生理的緩衝液によって溶出または洗浄することができる。次に、結合した細胞は、主に固相の性質および使用される抗体に応じて、任意の適当な方法によって固相から分離される。

【０３１９】

細胞の分離を行うために、抗体をビオチンにコンジュゲートさせることができ、次にこれを支持体に結合したアビジンもしくはストレプトアビジンによって除去することができ、または蛍光活性化セルソーター（FACS）と共に用いられうる蛍光体にコンジュゲートさせることができる。

【０３２０】

たとえば、CD45Rおよび／またはCD27を発現する細胞は、CD45Rおよび／またはCD27の細胞表面発現によって他の細胞から最初に分離される。1つの特異的な非制限的な例において、$CD45R^+$または$CD27^+$細胞は、磁気ビーズがCD45またはCD27反応性モノクローナル抗体によってコーティングされる、磁気ビーズ分離によって陽性選択される。次に$CD45R^+$または$CD27^+$細胞を磁気ビーズから除去する。

【０３２１】

磁気ビーズからの$CD45R^+$細胞または$CD27^+$細胞の放出は、培養の放出または他の方法によって影響を受けうる。次に、単離された$CD45R^+$細胞または$CD27^+$細胞の純度を、望ましければFACSCAN（登録商標）フローサイトメーター（Becton Dickinson, San Jose, CA）などによってチェックする。1つの態様において、磁気ビーズから放出される細胞集団をソーティングするFACSなどのさらなる精製段階が行われる。1つの例において、このソーティングは、未成熟B細胞を検出または単離するために、MHCクラスII、IgM、CD19、およびCD40の発現を検出するために行われうる。もう1つの例において、MHCクラスII、IgM、CD14、およびCD40に加えて、IgDおよび／またはCD21の発現に基づいて、成熟B細胞を単離および／または検出することができる。

【０３２２】

メモリーB細胞の増殖の査定などのB細胞集団を分析するための方法は、当技術分野において公知である。たとえば、蛍光色素による関心対象細胞のエクスビボ化学標識が含まれる膜色素希釈アプローチを利用することができる。トリチウム化ヌクレオシド類似体（一般的に$^3$H-チミジンデオキシリボヌクレオシド、$^3$H-TdR）またはブロモデオキシウリジン（BrdU）による標識が利用されうる。FACS分析は、BrdU取り込みの測定のために利用可能である。DNA含有量および細胞周期関連タンパク質などの代替増殖マーカーも同様に用いられうる。

【０３２３】

1つの例において、Ki67またはPCNAの測定を利用することができる。Ki67抗原は、活性な細胞周期の全ての相（G1、S、G2、およびM期）において増殖する細胞によって発現される、基本形の細胞周期関連核タンパク質である。これは静止期（G0）細胞には存在しない。Ki67抗体は増殖を確立するために有用である。Ki67抗体を用いて、静止期細胞中の増殖細胞を定量することができる（Ki67指数）。Ki67は、細胞周期および増殖のマーカーとしてルーチンとして用いられる；ABCAM（登録商標）などのKi67に対する抗体は市販されており、方法は、免疫組織化学およびFACS分析においてこれらの抗体を用いるために利用可能である。

【０３２４】

他の方法を用いて、試料採取時間で活性な細胞周期に存在する細胞を検出することがで

きる。メモリーB細胞などのリンパ球の増殖も同様に、細胞が含まれる生物試料におけるDNAを標識するために安定な同位元素を利用する方法を用いることによって測定されうる。DNAは、デノボ合成経路によって均一かつ高度に標識される。用いられる安定な同位元素標識、たとえば$^{2}$H-グルコースまたは重水（$^{2}H_2O$または$H_2{}^{18}O$）は、動物およびヒトに対して非毒性であり、一般的に米国食品医薬品局（FDA）によって安全であると見なされている（米国特許出願公開第2009/0155179号を参照されたい）。リンパ球DNAへの安定な同位元素標識取り込みの測定は、以下の段階を含む：（i）DNAの抽出または染色質からのその放出の後、さらなる単離を行うことなくDNAのデオキシリボヌクレオチドへの加水分解、（ii）プリンデオキシリボヌクレオチドからのデオキシリボースの選択的放出、（iii）プリンデオキシリボースの、ガスクロマトグラフィー／質量分析（GC/MS）による分析にとって適した揮発性の誘導体（たとえば、ペンタン四酢酸、ペンタフルオロベンジルテトラアセチル誘導体、または別の適した誘導体）への誘導体化、（iv）誘導体のGC/MS分析、（v）誘導体の質量イソトポマー量のパターンの分析、および（vi）安定な同位体取り込みの測定である過剰な濃縮値のパターンからの計算。これらの方法の各々の特異的態様が教示されている（米国特許第5,910,40号を参照されたい）。

【０３２５】

インビトロアッセイ

PD-1アンタゴニストを選択するための方法が本明細書において開示される。これらの方法には、関心対象物質がPD-1アンタゴニストであるか否かを決定する段階が含まれる。このように、方法には、それらがPD-1アンタゴニストとして機能するか否かを決定するために多数の物質をスクリーニングする段階が含まれる。これは、化合物、低分子、または抗体のライブラリでありえて、アッセイはハイスループットフォーマットで行われうる。

【０３２６】

方法にはまた、特異的PD-1アンタゴニストが関心対象の特異的個体を処置するために有用であるか否かを決定する段階が含まれる。このように、これらの開示された方法は、細胞集団が関心対象の特異的個体の細胞であり、特定の個体を処置するために最も適したPD-1アンタゴニストを決定するために可能性がある多数のPD-1アンタゴニストが試験される、「個別化医療」のために用いられうる。

【０３２７】

方法には、メモリーB細胞を含む単離された細胞集団にインビトロで物質を接触させる段階が含まれる。いくつかの態様において、細胞集団は、活性化または静止期メモリーB細胞などの末梢血単核球または精製メモリーB細胞である。1つの例において、細胞集団はメモリーB細胞株である。

【０３２８】

方法には、メモリーB細胞の増殖を検出する段階および／またはメモリーB細胞の抗体分泌細胞への分化を検出する段階が含まれうる。いくつかの態様において、方法には、IgM、IgG、および抗体産生B細胞を検出するためのアッセイが含まれる。アッセイは、ELISPOTアッセイでありうる。ELISPOTアッセイは、サンドイッチ酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）技術と非常に類似の技術を利用する。モノクローナルまたはポリクローナル捕獲抗体のいずれかをPVDF（ポリフッ化ビニリデン）が裏打ちされたマイクロプレートに無菌的にコーティングする。これらの抗体は、調べる検体に関するその特異性のために選ばれる。プレートは、通常、アッセイ中の任意の抗体と非反応性である血清タンパク質によってブロックされる。この後、関心対象細胞を、抗原またはマイトジェンと共に様々な密度で平板培養した後、湿潤37℃ $CO_2$インキュベータに明記された期間入れる。

【０３２９】

活性化細胞によって分泌されたサイトカイン（またはIgMもしくはIgG抗体などの関心対象の他の細胞産物）は、表面積の広いPVDFメンブレン上でコーティングされた抗体によって局所的に捕捉される。ウェルを洗浄して細胞、破片、および培地成分を除去した後、選ばれた検体に対して特異的なビオチニル化ポリクローナル抗体をウェルに加える。この抗体は、標的の独自のエピトープと反応性であり、このように、関心対象の捕捉産物を検出

するために使用される。未結合のビオチニル化抗体を除去するために洗浄した後、アビジン-酵素および酵素の沈殿性の基質などを用いて、検出された産物を可視化する。着色した最終産物（スポット、通常着色された）は、典型的に個々の産物産生細胞を表す。スポットは、手動で（解剖顕微鏡などによって）、またはマイクロウェルイメージを捕捉してスポット数および大きさを分析するために自動リーダーを用いて計数されうる。

【０３３０】

メモリーB細胞の増殖も同様に査定されうる。適したアッセイが本明細書において開示される（上記を参照されたい）。メモリーB細胞の増殖の査定などのB細胞増殖を分析するための方法は当技術分野において公知である。たとえば、膜色素希釈アプローチ（一般的に$^{3}$H-チミジンデオキシリボヌクレオシド、$^{3}$H-TdR）またはブロモデオキシウリジン（BrdU）を利用することができる。FACS分析は、BrdU取り込みを測定するために利用可能である。DNA含有量および細胞周期関連タンパク質などの代替増殖マーカーも同様に用いられうる。1つの例において、Ki67またはPCNAの測定を利用することができる。他の方法を用いて、試料採取時期で活性な細胞周期にある細胞を検出することができる。メモリーB細胞などのリンパ球の増殖はまた、細胞が含まれる生物試料中のDNAを標識するために安定な同位元素を利用する方法を用いることによって測定されうる。有用な1つのアッセイのための例示的な非制限的なプロトコールを、以下の実施例の章に提供する。

【０３３１】

一般的に、メモリーB細胞の増殖の増加および／またはメモリーB細胞の抗体分泌細胞への分化の増加、および／または抗体産生の増加は、物質がPD-1アンタゴニストであることを示している。メモリーB細胞の増殖が増加すればおよび／またはメモリーB細胞の抗体分泌細胞への分化および／または抗体産生が増加すれば、特異的PD-1アンタゴニストが被験対象を処置するために有用であろうことを示しうる。

【０３３２】

本開示は以下の非制限的な実施例によって説明する。

【実施例】

【０３３３】

実施例1：抗PD-L1抗体を用いる慢性的に感染したマウスにおけるPD-1経路の阻害

リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）の様々な株を感染させたマウスを用いて、CD8+ T細胞機能に及ぼす慢性的なウイルス感染症の効果を調べた。LCMVアームストロング株は、8日以内に消滅する急性感染症を引き起こし、その後に高度に機能的な休止期メモリーCD8+T細胞の長命な集団が残る。LCMV Cl-13株は、対照的に3ヶ月まで持続するウイルス血症を特徴とする持続的感染症を宿主において確立する。ウイルスは、いくつかの組織において無限に留まり、抗原特異的CD8+ T細胞は、機能的に障害となる。DbNP396-404 CD8+ T細胞は物理的に枯渇するが、DbGP33-41およびDbGP276-286 CD8+ T細胞は持続するが、増殖能、またはIFN-γおよびTNF-αなどの抗ウイルスサイトカインの分泌能を失う。

【０３３４】

C57BL/6マウスは、National Cancer Institute（Frederick, MD）から購入した。マウスにLCMV-Cl-13 $2\times10^{6}$ pfuを静脈内に（i.v.）感染させた。CD4の枯渇は、感染日および感染翌日にGK1.5 500μgのPBS溶液を注射することによって行った。LCMV免疫マウスは、LCMVアームストロング$2\times10^{5}$ pfuの腹腔内注射によってマウスに感染させることによって生成される。

【０３３５】

FACS精製未経験DbGP33-41特異的P14トランスジェニックCD8+ T細胞、LCMVアームストロング免疫マウスに由来するDbGP33-41特異的メモリーCD8+ T細胞、およびCD4+枯渇LCMV Cl-13感染マウスに由来するDbGP33-41特異的またはDbGP276-286特異的CD8+ T細胞について遺伝子アレイ分析を行った。RNAの単離および遺伝子アレイ分析は、Kaech et al（Cell 111:837-51, 2002)において記述されるように行った。PD-1 mRNAは、メモリーCD8+ T細胞と比較して消耗したCD8+ T細胞において高度に発現された（図1A）。さらに、PD-1は、LCMV Cl-13感染マウスにおいてCD8+ T細胞の表面上に発現されたが、LCMVアームストロング

の消滅後のCD8+ T細胞の表面上には存在しなかった（図1B）。慢性的に感染したマウスはまた、非感染マウスと比較してほとんどのリンパ球およびAPCにおいてPD-1のリガンドの一つであるPD-L1のより高レベルを発現した。このように、ウイルス抗原の持続およびCD8+ T細胞の消耗は、PD-1発現の誘導と一致する。

【０３３６】

PD-1/PD-L1経路の遮断がT細胞機能を回復して、慢性LCMV感染症の際のウイルス制御を増強するという仮説を調べるために、αPD-L1ブロッキング抗体を用いて、慢性LCMV感染症の際にPD-1/PD-L1共刺激経路を破壊した。PD-L1に対するブロッキングモノクローナル抗体を、LCMV Cl-13を感染させたマウスに、感染後23日～37日まで3日ごとに腹腔内（i.p.)投与した（ラット抗マウスPD-L1 IgG2bモノクローナル抗体（クローン10F.5C5または10F.9G2）200μg）。37日目に、無処置対照と比較して、処置マウスでは、DbNP396-404特異的CD8+ T細胞はおよそ2.5倍多く、DbGP33-41特異的CD8+ T細胞は3倍多かった（図2A）。脾臓におけるCD4+ T細胞数が、処置マウスおよび無処置マウスの双方においてほぼ同じであったことから（CD4+ T細胞のIAbGP61-80は、～6×104個/脾臓）、増殖の誘導は、CD8+ T細胞に対して特異的であった。

【０３３７】

CD8+ T細胞増殖の増加のほかに、PD-1シグナル伝達の阻害によってまた、ウイルス特異的CD8+ T細胞における抗ウイルスサイトカインの産生の増加が起こった。異なるCTLエピトープ8個に対するCD8+ T細胞によるIFN-γおよびTNF-αの産生を決定した。合わせた応答は、無処置マウスと比較して、処置マウスにおいて2.3倍高かった（図2Bおよび2C）。TNF-α産生細胞の頻度の2倍増加も同様に処置後に観察された（図2D）。処置マウスの血清、脾臓、および肝臓からウイルスが消滅するにつれて、ウイルスのクリアランスも同様に加速した。処置マウスにおいて、感染後37日（処置開始後14日）までに低減されたウイルス力価が肺および腎臓（～10倍）において観察された。しかし、無処置マウスは、これら全ての組織において有意なウイルスレベルを示した（図2E）。血清および組織ホモジネートにおけるウイルス力価を、Ahmed et al.（J. Virol. 51:34-41, 1984)において記述されているようにVero細胞を用いて決定した。PD-1アンタゴニストがCD8+ T細胞増殖およびウイルスクリアランスを増加させることを示す結果は、したがって、PD-1シグナル伝達の阻害がCD8+ T細胞機能を回復することを示している。さらに、脾臓におけるLCMV特異的抗体分泌細胞の数も同様に処置後に増加した（＞10倍）ことから、PD-1シグナル伝達の阻害はまた、B細胞応答も増強した。

【０３３８】

CD4+ T細胞は、CD8+ T細胞応答の生成および維持において重要な役割を果たす。この点において、CD4+ T細胞の非存在下でプライミングされたCD8+ T細胞（いわゆる「無力な」CD8+ T細胞）は、正常な免疫応答を開始することができない。さらに、慢性的なLCMV感染症は、CD4+ T細胞の非存在下ではより重度である。したがって、LCMV-Cl-13感染症の際に生成された無力なT細胞は、CD4+ T細胞の存在下で生成されたT細胞よりはるかに深い機能障害を示す。DbNP396-404特異的CD8+ T細胞は、検出不能レベルまで欠失され、DbGP33-41およびDbGP276-286 CD8+ T細胞はIFN-γおよびTNF-αの分泌能を完全に喪失する。

【０３３９】

CD4+ T細胞を、LCMV-Cl-13感染症の際に枯渇して、マウスを感染後46日から60日まで抗PD-L1抗体によって処置した。LCMV特異的CD4+ T細胞は、処置の前後で細胞内IFN-γ染色によって検出不能であった。処置後、処置マウスは、その脾臓において無処置対照マウスよりおよそ7倍多いDbGP276-286 CD8+ T細胞および4倍多いDbGP33-41 CD8+ T細胞を有した（図3A）。脾臓におけるウイルス特異的CD8+ T細胞の数も同様に増加した（図3B）。処置マウスにおけるウイルス特異的CD8+ T細胞のこの増加は、BrdU取り込みによって検出される増殖の増加に帰因した。無処置マウスにおいて、DbGP276-286 CD8+ T細胞の43％が中間レベルのBrdUを取り込み、2％が高レベルのBrdUを取り込んだが、処置マウスでは、50％のDbGP276-286 CD8+ T細胞が中間レベルのBrdUを取り込み、37％が高レベルのBrdUを取り込んだ。BrdU分析は、処置のあいだ1 mg/ml BrdUを飲料水に導入することによって行い、

染色は製造元のプロトコール（BD Biosciences, San Diego, CA）に従って行った。その上、無処置マウスは、細胞周期関連タンパク質Ki67を発現するCD8+ T細胞（60％対無処置マウスにおいて19％、図3C）の高い割合を含有した。PBMC中のCD8+ T細胞における処置に対する応答は、CD8+ T細胞拡大の高レベルを有するマウスに限定された。

【０３４０】

PD-1阻害はまた、無力な消耗したウイルス特異的CD8+ T細胞において抗ウイルスサイトカイン産生を増加させた。処置後、IFN-γを産生するDbGP33-41およびDbGP276-286 CD8+ T細胞数は、顕著に増加したが（図4A）、処置マウスでは多数のDbNP396-404、KbNP205-212、DbNP166-175、およびDbGP92-101特異的CD8+ T細胞も同様に検出された（図4A）。対照の無処置マウスにおけるDbGP276-286特異的CD8+ T細胞の20％と比較して、処置マウスからのDbGP276-286特異的CD8+ T細胞の50％がIFN-γを産生することができる（図4B）。しかし処置マウスからのDbGP276-286特異的 CD8+ T細胞によって産生されたIFN-γおよびTNF-αレベルは、十分に機能的なDbGP276-286特異的メモリー細胞より低かった（図4C）。

【０３４１】

PD-1阻害はまた、無力な消耗したウイルス特異的CD8+ T細胞の溶解活性を増加させた。ウイルス特異的CD8+ T細胞のエクスビボ溶解活性を、$^{51}$Cr放出アッセイを用いて、処置後に検出した（Wherry et al., 2003. J. Virol. 77:4911-27）。ウイルス力価は、無処置マウスと比較して、処置2週間後に脾臓においておよそ3倍、肝臓において4倍、肺において2倍、および血清において2倍低減された（図4E）。

【０３４２】

したがって、これらの結果は、PD-1経路の遮断が、慢性的なウイルス感染症に対するCTLの末梢の寛容を切断すること、およびCD4+ T細胞のヘルプが欠乏した消耗したCD8+ T細胞が非可逆的に不活化されないことを証明している。

【０３４３】

実施例2：抗ウイルスワクチンおよびPD-1アンタゴニストの投与

持続的感染症の際のT細胞応答をブーストする一つのアプローチは、治療的ワクチン接種である。このアプローチの原理は、慢性的なウイルス感染症の際には、内因性の抗原が最適にまたは免疫原性で提示されない可能性がある、およびワクチンの形で抗原を提供することが、ウイルス特異的TおよびB細胞にとってより有効な刺激を提供する可能性がある点である。慢性的なLCMVモデルを用いて、LCMV GP33エピトープを発現する組み換え型ワクシニアウイルスを治療ワクチンとして（VVGP33）マウスに投与したところ、いくつかの慢性感染マウスにおいてCD8+ T細胞応答の中等度の増強が得られた。治療ワクチンを投与された慢性感染マウス9匹中4匹が陽性反応を示したが、対照マウスはいずれもGP33に対して免疫応答の有意な増加を示さなかった。この治療ワクチンをPD-L1阻害剤と併用すると、LCMV特異的T細胞応答は、いずれかの処置単独と比較してより大きいレベルまでブーストされ、併用処置の効果は相加的より大きかった。

【０３４４】

実施例3：PD-1 RNAiを用いる慢性感染マウスにおけるPD-1経路の阻害

RNA干渉（RNAi）は、哺乳動物細胞において遺伝子発現を沈黙化することができる。長い二本鎖RNA（dsRNA）を細胞に導入して、次にこれを、特異的mRNA分子または小さい群のmRNAを標的とするより低分子の沈黙化RNA（siRNA）にプロセシングする。この技術は、抗体が機能的でない状況において特に有用である。たとえば、RNAiは、独自のスプライス変種がPD-1およびCTLA-4の可溶性型を産生する状況において使用されてもよい。

【０３４５】

PD-1サイレンサーRNAを、pSilencer（商標）発現ベクターまたはアデノウイルスベクター（Ambion, Austin, TX）などの市販のsiRNA発現ベクターに挿入する。次に、これらのベクターをインビボまたはエクスビボで標的の消耗したT細胞に接触させる（以下の実施例4を参照されたい）。

【０３４６】

実施例4：消耗したT細胞のエクスビボでの若返り

ウイルス特異的な消耗したCD8+ T細胞を、磁気ビーズまたは密度遠心を用いてLCMV-Cl-13慢性感染マウスから単離する。トランスフェクトしたCD8+ T細胞をPD-L1、PD-L2、またはPD-1を標的とするモノクローナル抗体に接触させる。実施例1において記述されるように、PD-1経路の阻害によって、CD8+ T細胞の若返りが起こる。したがって、たとえばCD8+ T細胞の増殖およびサイトカイン産生の増加が起こる。これらの若返りしたCD8+ T細胞を感染マウスに再度導入して、ウイルス負荷を実施例1において記述されるように測定する。

【０３４７】

実施例5：新規CD8+ T細胞若返り化合物のインビトロスクリーニング

PD-1経路を調節する化合物を、慢性的なウイルス感染症に起因するCD8+ T細胞消耗の逆転能に基づいて、インビボおよびエクスビボスクリーニングアッセイにおいて同定することができる。

【０３４８】

消耗したCD8+ T細胞を、LCMV-Cl-13に慢性的に感染したマウスから誘導して、これを次に試験化合物に接触させる。接触したT細胞から放出された抗ウイルスサイトカイン（たとえば、IFN-γまたはTNF-α）の量を、たとえば、ELISAまたは他の定量的方法によって測定して、もしあれば、試験化合物に接触していない消耗したT細胞から放出された抗ウイルスサイトカインの量と比較する。無処置細胞におけるそのような量と比較して処置細胞によって放出された抗ウイルスサイトカインの量が増加すれば、T細胞活性を調節するために有用なPD-1アンタゴニストとして化合物が同定される。

【０３４９】

実施例6：新規CD8+ T細胞若返り化合物のインビボスクリーニング

化合物

消耗したCD8+ T細胞を、LCMV-Cl-13に慢性的に感染したマウスから誘導する。試験化合物を感染マウスに静脈内投与する。処置および無処置マウスの血清に放出された抗ウイルスサイトカイン（IFN-γまたはTNF-αなど）の量を、たとえばELISAまたは他の定量法によって測定して比較する。無処置マウスにおけるそのような量に対して処置マウスの血清中に見いだされる抗ウイルスサイトカインの量が増加すれば、試験化合物がPD-1アンタゴニストであると同定される。または、ウイルス力価（たとえば、血清ウイルス力価）を、試験化合物の処置の前後に決定することができる。

【０３５０】

実施例7：持続的HCV感染症の免疫療法のモデルとしてのチンパンジー

チンパンジーは、ヒトにおけるHCV持続のモデルを提供する。一生涯のウイルスの持続に至るT細胞免疫の欠損には、HCV-特異的CD4+ Tヘルパー細胞の欠損と、CD8+ Tエフェクター細胞活性の障害または変更の双方が含まれる。持続的に感染したチンパンジーを、CTLA-4、PD-1に対する抗体、または両者の併用によって処置する。組み換え型の構造および非構造HCVタンパク質を用いてワクチン接種と併用した場合の阻害経路の遮断効能、およびそのような戦略がウイルス特異的メモリーT細胞の頻度および寿命を増強できるか否かを決定する。T細胞免疫の欠損は、持続的に感染したヒトおよびチンパンジーにおいて専らHCV特異的である。感染したチンパンジーの血液および肝臓を、CTLA-4、PD-1、BTLAおよびそのリガンドの発現に関して、ならびにTreg細胞の存在に関して調べる。次に、これらの分子を通してシグナル伝達を遮断するチンパンジーのヒト化モノクローナル抗体を送達することによって、抗ウイルス活性を回復させてもよい。

【０３５１】

持続的に感染したチンパンジーをヒト化αCTLA-4抗体（MDX-010、Medarex）またはαPD-1抗体によって処置する。MDX-010の初回用量は、0.3 mg/kgであり、その2週間後に1.0 mg/kg、および次に3週間間隔で3、10、30 mg/kgである。共刺激分子に対する抗体による処置後、液性および細胞性免疫応答と共にHCV RNA負荷を決定する。試料を1、2、3、5、および8週目に採取した後1ヶ月間隔で採取する。試料には：1）トランスアミナーゼ、自己抗体、HCVに対する中和抗体、およびサイトカイン応答を分析するための血清、2）ウイル

ス負荷およびゲノムの進化のための血漿、3）免疫、共刺激／阻害性受容体発現および機能のインビトロ測定のためのPBMC、4）肝臓内リンパ球およびRNAを単離するための新鮮な（非固定）肝臓、ならびに5）組織学および免疫組織化学分析のための固定された（ホルマリン／パラフィン抱埋）肝臓が含まれる。限局的リンパ節も同様に、免疫組織化学および分子技術によって、共刺激分子およびスプライス変種の発現を査定するために2または3の時点で採取する。

【０３５２】

HCV抗原のワクチン接種がPD-1に対する抗体の治療効果を増強するか否かを決定するために、チンパンジーを以下のように処置する：1）組み換え型エンベロープ糖タンパク質E1およびE2（MF59アジュバントにおいて）および他のタンパク質（ISCOMSと共に処方されたコアプラスNS3、4および5）による0、4、および24週目での筋肉内免疫；2）1)において用いられたワクチンによる筋肉内免疫であるが、αCTLA-4抗体（各30 mg/Kg体重、ワクチンを与える0、4および24週目に静脈内投与）を同時投与する；3）αPD-1（またはBTLA）抗体をCTLA-4抗体の代わりに用いることを除き2）と同一；4）ワクチンに加えてCTLA-4およびPD-1（またはBTLA）抗体の併用を用いることを除き、2群および3群と同一。HCV特異的TおよびB細胞応答を1年間免疫後毎月モニターする。

【０３５３】

この分析においてHCV-テトラマー+および総T細胞について調べたマーカーには、分化（たとえば、CD45RA/RO、CD62L、CCR7、およびCD27）、活性化（たとえば、CD25、CD69、CD38、およびHLA-DR）、生存／増殖（たとえば、bcl-2およびKi67）、細胞障害能（たとえば、グランザイムおよびパーフォリン）、およびサイトカイン受容体（CD122およびCD127）のマーカーが含まれる。ケモカインIP-10の治療前レベルとPEG IFN-γ／リバビリンに対する応答のあいだには興味深い相関が存在する。負の調節経路またはHCV特異的T細胞応答とIP-10レベルのあいだの可能性がある相関を調べるためにIP-10レベルを測定する。PBMC上の阻害性受容体およびリガンドの発現をフローサイトメトリーによって行う。

【０３５４】

実施例8：反応性のリンパ様組織におけるPD-1免疫染色

症例材料を、施設内方針に従って、Brigham & Women's Hospital, Boston, MAから得た。診断は全て、世界保健機構のリンパ腫分類システム（Lymphoma Classification system、Jaffe ES, et al. 2001）において記述される組織学および免疫表現型特色に基づき、全ての症例において、診断材料を血液病理学者が再審査した。

【０３５５】

PD-1の免疫染色は、10 mMクエン酸緩衝液、pH 6.0におけるマイクロ波抗原回収後のホルマリン固定パラフィン抱埋組織切片について、既に記述されているように（Jones D, et al. 1999；Dorfman DM, et al. 2003）標準的な間接的アビジン-ビオチン西洋ワサビペルオキシダーゼ法、およびジアミノベンジジン発色を用いて、既に記述された抗ヒトPD-1モノクローナル抗体（2H7；5）によって行った。症例は、新生物細胞の少なくとも25％が陽性染色を示した場合に、PD-1に関して免疫反応性であると見なされた。PD-1染色を、染色特異性を確認するために、調べた全ての症例に関して同一のタンパク質濃度まで希釈したマウスIgGアイソタイプ対照抗体の染色と比較した。

【０３５６】

PD-1に関するモノクローナル抗体2H7を用いて、反応性のリンパ様組織、胸腺、および広範囲のB細胞およびT細胞リンパ増殖障害の症例のホルマリン固定パラフィン抱埋標本を染色した。濾胞状過形成が含まれる反応性の変化を示す扁桃標本において、胚中心における主に小さいリンパ球のサブセットは、濾胞間T細胞域において認められるまれなPD-1陽性細胞と共に、PD-1に関して細胞質染色を示した。胚中心におけるPD-1染色パターンは、汎T細胞マーカーであるCD3に対する抗体について認められたパターンと実質的に同一であったが、汎B細胞マーカーであるCD20に対する抗体は、胚中心B細胞の大多数を染色した。反応性リンパ節および脾臓の組織切片において類似の結果が認められた。成人胸腺にはPD-1染色は観察されなかった。

【０３５７】
実施例9：B細胞およびT細胞リンパ増殖障害のパラフィン胞埋組織切片におけるPD-1免疫染色
広範囲のB細胞およびT細胞リンパ増殖障害をPD-1発現に関して調べて、結果を表４にサマリーする。前駆体Bリンパ芽球性白血病／リンパ芽球性リンパ腫の代表的な症例と共に、濾胞性リンパ腫6例およびバーキットリンパ腫7例が含まれる多数の濾胞起源のB細胞非ホジキンリンパ腫が含まれる、広範囲の成熟B細胞リンパ増殖障害が含まれるB細胞リンパ増殖障害の症例42例を、PD-1発現に関して調べた。いずれのB細胞リンパ増殖障害もPD-1に関する染色を示さなかった。いくつかの場合において、非新生物反応性リンパ様組織が存在し、先に記したように、扁桃および他の反応性リンパ様組織において認められるPD-1染色パターンを示した。
【０３５８】
同様に、古典的なホジキンリンパ腫11例およびリンパ球優勢型ホジキンリンパ腫14例が含まれるホジキンリンパ腫25例において、新生物細胞は、PD-1に関する染色を示さなかった。興味深いことに、リンパ球優勢型ホジキンリンパ腫の14例全てにおいて、新生物CD20-陽性L&H細胞周囲のT細胞は、PD-1に関して免疫反応性であり、これはリンパ球優勢型ホジキンリンパ腫におけるCD57+ T細胞に関して認められた染色パターンと類似であった。これらのPD-1陽性細胞は、存在する総CD3+ T細胞集団のサブセットであった。
【０３５９】
広範囲のT細胞リンパ増殖障害をPD-1の発現に関して調べ、結果を表４にサマリーする。未成熟T細胞の新生物である前駆体T細胞リンパ芽球性白血病／リンパ芽球性リンパ腫の症例は、T細胞前リンパ球性白血病、不特定末梢T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、および成人T細胞白血病／リンパ腫の症例が含まれる末梢の胸腺後T細胞の新生物と同様に、PD-1に関して陰性であった。対照的に、血管免疫芽球性リンパ腫の症例は19例全てが、CD3などの汎T細胞マーカーに関しても免疫反応性であるPD-1陽性細胞の巣状塊を含有した。PD-1陽性細胞は、血管免疫芽球性リンパ腫の特徴的な特色である、拡大されたCD21+濾胞状樹状細胞（FDC）ネットワークの巣状塊においても一貫して認められた。
【０３６０】
（表４）リンパ増殖障害におけるPD-1免疫染色

| | PD-1 免疫染色 |
|---|---|
| | |
| B 細胞 LPDs | 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 |
| | |
| ホジキンリンパ腫 | 0/25 |
| 古典的 | 0/11 |
| 結節性リンパ球優勢型 | 0/14** |
| | |
| T 細胞 LPDs | 18/55 |
| T-LL/LL | 0/5 |
| T-PLL | 0/3 |
| AIL | 19/19 |
| PTCL, 不特定 | 0/14 |
| ALCL | 0/12 |
| ATLL | 0/3 |
| | |

省略語：B-LL/LL－前駆体B細胞リンパ芽球性リンパ腫／リンパ芽球性白血病；CLL－慢性リンパ球性白血病；MCL－マントル細胞リンパ腫；FL－濾胞性リンパ腫；MZL－辺縁層リンパ腫；HCL－ヘアリーセル白血病；DLBCL－びまん性大細胞型B細胞リンパ腫；BL－バーキットリンパ腫；LPL－リンパプラスマ細胞リンパ腫；MM－多発性骨髄腫；T-LL/L－前駆体Tリンパ芽球性白血病／リンパ芽球性リンパ腫；T-PLL－T細胞前リンパ球性白血病；AIL－血管免疫芽球性リンパ腫；PTCL－不特定末梢T細胞リンパ腫；ALCL－未分化大細胞リンパ腫；ATLL－成人T細胞白血病／リンパ腫。

* 免疫反応症例数／総症例数。

** PD-1陽性細胞は、14/14症例において新生物L&H細胞周囲でロゼットを形成する。

【０３６１】

実施例10：HIV特異的ヒトCD8+ T細胞上のPD-1発現を調べるための一般的方法

以下の方法を用いて実施例11～14において詳述される実験を行った。

【０３６２】

対象：慢性のクレードC HIV-1感染症の試験参加者を、McCord Hospital, Durban, South Africa、およびSt. Mary's Hospital, Mariannhill, South Africaの外来診療から募集した。このコホートにおける対象65人から末梢血を採取し、その全員が、分析時に抗レトロウイルス治療未経験であった。対象を、構築された（以下を参照されたい）クラスIテトラマー10個にマッチするその発現されたHLA対立遺伝子に基づいて参加させるか否かを選択した。コホートのウイルス負荷の中央値は、42,800 HIV-1 RNAコピー/ml血漿（範囲163～750,000）であり、絶対CD4数の中央値は362（範囲129～1179）であった。感染の持続に関する情報は入手できなかった。対象は全員試験に関するインフォームドコンセントを提出し、これは施設内倫理委員会によって承認された。

【０３６３】

PD-1およびPD-L1抗体の構築：ヒトPD-L1（29E.2A3、マウスIgG2b）およびPD-1（EH12、マウスIgG1）に対するモノクローナル抗体は、既に記述されているように調製され、PD-1：PD-L1相互作用を遮断することが示されている。

【０３６４】

MHCクラスIテトラマー：既に記述されたように（Altman JD, et al. 1996）合成されたHIV MHCクラスIテトラマー10個を、この試験のために用いた：

A*0205 GL9 (p24, GAFDLSFFL; SEQ ID NO:1), A*3002 KIY9 (インテグラーゼ, KIQNFRVYY; SEQ ID NO:2), B*0801 DI8 (p24, DIYKRWII; SEQ ID NO:3), B*0801 FL8 (Nef, FLKEKGGL; SEQ ID NO:4), B*4201 RM9 (Nef, RPQVPLRPM; SEQ ID NO:5), B*4201 TL9 (p24, TPQDLNTML; SEQ ID NO:6), B*4201 TL10 (Nef, TPGPGVRYPL; SEQ ID NO:7), B*4201 YL9 (RT, YPGIKVKQL; SEQ ID NO:8), B*8101 TL9 (p24, TPQDLNTML; SEQ ID NO:9), および Cw0304 YL9 (p24, YVDRFFKTL; SEQ ID NO:10)

【０３６５】

HLAクラスIテトラマー染色および表現型分析：新たに単離した末梢血単核球細胞（PBMC、50万個）をテトラマーによって37℃で20分間染色した。細胞をリン酸緩衝生理食塩液（PBS）によって1回洗浄した後、沈降させ、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）-共役抗CD8（Becton Dickinson）、フィコエリスリン共役抗PD-1（クローンEH12）、およびViaProbe（Becton Dickinson）によって直接染色した。細胞を室温で20分間インキュベートした後、PBSにおいて1回洗浄し、1％パラホルムアルデヒドを有するPBS 200μlに浮遊させて、蛍光活性化セルソーター（FACSCalibur（商標）、Becton Dickinson）において獲得した。少なくとも100,000事象をFACSCalibur（商標）において獲得した。

【０３６６】

CFSE増殖アッセイ：新たに単離したPBMC 100万個をPBSにおいて2回洗浄して、沈降させ、0.5μMカルボキシ-フルオレセインジアセテート、スクシニミジルエステル（CFSE、Molecular Probes）1 mlに37℃で7分間浮遊させた。細胞をPBSにおいて2回洗浄して、R10培地（グルタチオン、ペニシリン、ストレプトマイシン、および10％仔ウシ胎児血清[FCS]を添加したRPMI 1640）1 mlに浮遊させて、24ウェルプレートに播種した。初回試験により、最終濃度0.2μg/mlペプチドによって最適な増殖反応が得られることが明らかとなり、したがってこれは各アッセイのために用いられるウェルにおける最終的なペプチド濃度であった。陰性対照ウェルは、培地単独におけるPBMCまたは精製抗PD-L1（10μg/ml）を有する培地におけるPBMCからなり、陽性対照ウェルは10μg/ml植物血液凝集素（PHA）によって刺激した。37℃インキュベーターにおいて6日間インキュベートした後、細胞をPBS 2 mlによって洗浄して、PE-共役MHCクラスIテトラマー、ViaProbe（Becton Dickinson）、および抗CD8-APC抗体によって染色した。細胞をFACSCaliburにおいて獲得して、CellQuest（登録商標）ソフトウェア（Becton Dickinson）によって分析した。細胞をViaProbe-CD8+リンパ球に関してゲートを設定した。テトラマー+細胞の増加倍率を、ペプチド刺激の非存在下でのCD8+ テトラマー+細胞の百分率によってペプチドの存在下におけるCD8+ テトラマー+細胞の百分率を除することによって計算した。

【０３６７】

統計分析：GraphPad Prismバージョン4.0aを用いてスペアマン相関、マン・ホイトニー検定、および対応のあるt検定分析を行った。検定は全て、両側であり、p値がp＜0.05であれば、有意であると見なされた。

【０３６８】

実施例11：HIV特異的CD8+ T細胞におけるPD-1発現

優勢HIV-1クレードCウイルスCD8+ T細胞エピトープに対して特異的なMHCクラスIテトラマー10個のパネルを、優勢なHLA対立遺伝子、ならびにこれらの細胞における表面PD-1発現を直接可視化することができるGag、Nef、インテグラーゼ、およびRTにおいてしばしば標的化されるエピトープに基づいて合成した。高解像度HLAタイピングを、コホート全体について行い、抗レトロウイルス療法未経験者65人のサブセットを、関連するHLA対立遺伝子の発現に基づいて試験のために選択した。全体で個々のエピトープ120個を調べて、HIVテトラマー+細胞におけるPD-1の代表的なエクスビボ染色を図5Aに示す。PD-1発現は、これらのテトラマー+細胞において容易に明らかであり、同じ個体からの総CD8 T細胞集団より有意に高かった（$p<0.0001$）；次に、テトラマー+ CD8+ T細胞および総CD8+ T細胞集団の双方におけるPD-1発現は、HIV血清陰性対照より有意に高かった（図5B）。調べたテトラマー10個中8個に関して、抗原特異的CD8+ 細胞における発現レベルが100％である人が少なくとも1人同定された（図5C）。個体3～25人からのPBMCをそれぞれのHIVテトラマー応答のために染色して、中央値のPD-1発現レベルは、テトラマー+細胞の68％～94％の範囲であった（図5C）。これらの知見を、テトラマー+細胞および総CD8+ T細胞集団の双方に関するPD-1の平均蛍光強度（MFI）の分析によってさらに確認した（図5B、C）。

【０３６９】

次に、多数の検出可能な応答を有する人におけるPD-1発現レベルに関してエピトープ特異的な差に関する証拠が存在するか否かを決定した。調べた65人の中で、16人がそれぞれテトラマー3個～5個に対して陽性応答を有した。PD-1発現はほぼ同一であり、対象16人中3人に関して分析したそれぞれの応答に関して100％に達したが、他の13人はエピトープに応じてPD-1発現の異なるパターンを示した（図5D）。これらのデータは、PD-1発現が1人の人から同時に発生したエピトープ特異的CD8+ T細胞において異なるように発現される可能性があることを示しており、抗ウイルス効能のエピトープ特異的差を示す最近のデータとおそらく一貫する（Tsomides TJ, et al. 1994；Yang O, et al. 1996；Loffredo JT, et al. 2005）。

【０３７０】

実施例12：PD-1発現とHIV疾患進行のあいだの相関

そのそれぞれがHIV疾患進行の予測因子であるHIV特異的CD8+ T細胞におけるPD-1発現と、血漿ウイルス負荷およびCD4+細胞数の関係を決定した。これまでの試験と一貫して、テトラマー陽性細胞数とウイルス負荷またはCD4+細胞数のあいだの関係は、いかなる有意な相関も示すことができなかった（図6A、B）。対照的に、ウイルス負荷とHIVテトラマー陽性細胞におけるPD-1発現の百分率およびMFIの双方には有意な正の相関を認めた（それぞれ、$p=0.0013$および$p<0.0001$；図6A）。同様にCD4数とHIVテトラマー陽性細胞におけるPD-1の百分率およびMFIの双方のあいだには逆相関が存在した（それぞれ、$p=0.0046$および$p=0.0150$；図6B）。調べたテトラマーは、これらの対象におけるHIV特異的CD8+ T細胞集団の分画のみを表す可能性があることから、全てのCD8+細胞上のPD-1発現と、これらのパラメータの関係も同様に調べた。ウイルス負荷と総CD8+ T細胞集団におけるPD-1発現の百分率およびMFIの双方のあいだには有意な正の相関を認め（それぞれ、$p=0.0021$および$p<0.0001$；図6C）、CD4+細胞数と、総CD8+ T細胞集団におけるPD-1発現の百分率およびMFIの双方のあいだにも同様に逆相関が観察された（それぞれ、$p=0.0049$および$p=0.0006$；図6D）。この同じ群において、CMV特異的CD8+ T細胞におけるPD-1発現を対象5人において調べたところ、これらの細胞ではHIV特異的CD8 T細胞と比較して有意により少ないPD-1が発現され（中央値23％CMVテトラマー+PD-1+、$p=0.0036$）、これらの同じ個体におけるバルクCD8+ T細胞とは差がなく、高いPD-1発現が全てのウイルス特異的CD8+ T細胞の均一な特色ではないことを示している。これらのデータは、慢性的なHIV感染症における抗原量を増加させることによって、CD8+ T細胞におけるPD-1の発現の増加が起こり、これは、PD-1発現がCD8+ T細胞の機能的消耗に関連する、慢性LCMV感染症におけるネズミのデータと一貫することを示唆している（Barber DL, et al. 2005）。その上、それらは、多数のエピトープの分析が含まれる大規模試験において、HIV特異的CD8+ T細胞とウイルス負荷またはCD4数のあいだに最初の明確な関連を提供する。

【０３７１】
実施例13：PD-1発現とCD8 T細胞メモリー状態および機能の関係
次に、CD27、CD28、CD45RA、CD57、CD62L、CD127、CCR7、パーフォリン、グランザイムB、およびKi67が含まれる、CD8+ T細胞メモリー状態および機能に関連する多数のさらなる表現型マーカーの状況において、PD-1発現を分析した（図7）。1人の個体からのB*4201 TL9テトラマー+細胞におけるこれらのマーカーの代表的な染色を図7Aに示し、対象13人の凝集データを図7Bに示す。4色より多いマルチパラメータフローサイトメトリーが、Kwa Zulu Natalでは入手できなかったことから、これらの試験は、95％より多くPD-1陽性であったテトラマー応答に限定された。HIVテトラマー+ PD-1+細胞は、高レベルのCD27およびグランザイムBを発現し、非常に低レベルのCD28、CCR7、および細胞内Ki67を発現し、低レベルのCD45RAおよびパーフォリン、ならびに中間レベルのCD57およびCD62Lを発現する（図7B）。これらのデータは、HIV特異的PD-1+ T細胞がエフェクター／エフェクターメモリー表現型を示し、HIV特異的CD8+ T細胞の非対称成熟に関するこれまでの報告と一貫することを示している。さらに、ウイルスのシークエンシングを行って、これらの細胞が免疫学的逃避を駆動するか否かを決定した。評価したこれらのテトラマー陽性応答45例の中で、5例のみにおけるウイルスエピトープが南アフリカのクレードCコンセンサス配列とは異なり、これらの細胞がインビボでほとんど選択圧を発揮しないことを示している。
【０３７２】
LCMVモデルを用いたマウスにおけるこれまでの実験は、抗PD-L1ブロッキング抗体の注入によるPD-1/PD-L1相互作用のインビボ遮断によって、サイトカイン産生によって測定した場合に、LCMV特異的CD8+ T細胞の機能性の増強、殺細胞能、増殖能、および最も顕著にウイルス負荷の低減が起こることを示した。HIV+対象15人から新たに単離したPBMCの短期間（12時間）のインビトロ抗原特異的刺激は、1μg/mlの精製抗PD-L1抗体の存在下または非存在下で、IFN-γ、TNF-α、またはIL-2産生を増加することができなかった。
【０３７３】
実施例14：HIV特異的CD8+ T細胞の増殖に及ぼすPD-1/PD-L1経路の遮断の効果
HIV特異的CD8+ T細胞はまた、増殖能の障害（2004）を示したことから、PD-1/PD-L1の遮断がインビトロでこの機能を増強できるか否かを決定した。B* 4201陽性個体からの代表的なデータを図8Aにおいて示す。新しく単離したCFSE-標識PBMCを培地単独、または抗PD-L1抗体を有する培地と共にインキュベートすると、培養6日後もCFSEhiに留まっているB*4201-TL9特異的CD8+ T細胞集団の維持が起こった（1.2％CD8+ T細胞）。CFSE-標識PBMCをTL9ペプチド単独によって6日間シミュレートすると、CFSElo B*4201 TL9テトラマー+細胞の4.8倍の拡大が起こったが、CFSE-標識PBMCを抗PD-L1ブロッキング抗体の存在下でTL9ペプチドによって刺激すると、TL9-特異的細胞の増殖のさらなる増強が起こり、それによってテトラマー+細胞の10.3倍増加が得られる。CFSE増殖アッセイを、精製抗ヒトPD-L1ブロッキング抗体の存在下および非存在下で試料28個について行った。HIV特異的CD8+ T細胞の増殖の有意な増加が、ペプチド単独による刺激後の増殖量と比較して、ペプチドプラス抗PD-L1ブロッキング抗体の存在下で観察された（図8B；p＝0.0006、対応のあるt検定）。抗PD-L1ブロッキング抗体の存在下におけるテトラマー+細胞の増加倍率は、個体によっておよび所定の個体におけるエピトープによって多様となり（図8C）、この場合も、これらの応答の機能的消耗の程度にエピトープ特異的な差があることを示唆している。
【０３７４】
実施例15：PD-1阻害経路の遮断と組み合わせた治療的ワクチン接種は、慢性ウイルス感染症の免疫制御を相乗的に改善する：組み合わせ治療ワクチンの概念試験
サイトカイン産生、細胞溶解、および抗原特異的T細胞の増殖が含まれるT細胞の機能障害は、多くの慢性感染症を定義する特徴である。不活化T細胞免疫応答は、ヒトにおけるHIV、HBV、HCV、およびTBが含まれる多様な異なる持続的病原体感染症の際に観察される。慢性感染症の際のT細胞不活化は、抗原負荷の程度および持続と相関して、近位T細胞受容体シグナルの混乱、阻害性タンパク質のアップレギュレーション、または共刺激タンパク質のダウンレギュレーション、ならびにアクセサリシグナルおよびサイトカインシグナル

の欠損を起源とする可能性がある。消耗したT細胞における欠損は、宿主が持続的な病原体を消失させることができない主な理由である。慢性感染症の際に、消耗したウイルス特異的CD8 T細胞は、二つの重要な阻害性タンパク質：PD-1およびCTLA-4をアップレギュレートする。PD-1をインビボで遮断すると、ウイルス特異的CD8 T細胞の数および機能が増加して、それによってウイルス負荷の低減が起こる。

【０３７５】

慢性ウイルス感染症に関する現在のワクチン接種戦略にはいくつかの欠点がある。具体的に、治療ワクチン接種後に、抗ウイルスCD8 T細胞応答の有効なブーストが観察されない。さらに、慢性感染症の際の応答性T細胞の高いウイルス負荷および低い増殖能は、治療的ワクチン接種の有効性を制限する可能性がある。このように、慢性感染症を制御するために、宿主の内因性のT細胞応答を有効にブーストするために治療ワクチン戦略を開発することが重要である。

【０３７６】

LCMVクローン-13感染症によって誘導された周知の慢性感染症モデルを用いて、治療ワクチンと併用してPD-1アンタゴニストを用いる有効性を決定した。LCMVのGP33エピトープを発現するワクシニアウイルスを、エピトープ特異的CD8 T細胞免疫応答をモニターするために、治療ワクチンとして用いた。抗原特異的CD8 T細胞の増殖および持続的ウイルスの寛解に関する相乗効果を調べるために、治療ワクチンを、阻害経路を遮断するための抗PD-L1抗体と併用した。

【０３７７】

以下の方法をこれらの実験において用いた。

【０３７８】

マウスおよび感染症：C57BL/6マウス（4～6週齢雌性）を、Jackson Laboratory（Bar Harbor, ME）から得た。マウスをNIH動物飼育ガイドラインに従って病原体を含まない動物施設において維持した。慢性感染症を開始するために、既に記述されたようにマウスに$2\times10^6$ PFUのLCMVクローン-13（CL-13）を感染させた。ウイルス力価を決定するためのウイルスの生育およびプラークアッセイは、既に記述されている。

【０３７９】

インビボ抗体遮断および治療的ワクチン接種：ラット抗マウスPD-L1（10F：9G2）200マイクログラムをCL-13の感染後4週目から3日ごとに腹腔内に投与した。抗PD-L1の最初の処置の時点後、GP33-41エピトープ（VV/GP33）を発現する治療ワクチンとしての組み換え型ワクシニアウイルス、または対照ワクチンとしての野生型ワクシニアウイルス（VV/WT）$2\times10^6$ PFUを腹腔内に与えた。

【０３８０】

リンパ球の単離：リンパ球は、既に記述されたように組織および血液から単離された。肝臓および肺を、リンパ球単離のために除去する前に氷冷PBSによって灌流した。

【０３８１】

フローサイトメトリー：MHCクラスIペプチドテトラマーを生成して、既に記述されたように用いた。グランザイムB（Caltag）、Bcl-2（R&D Systems）、およびCD127（eBioscience）を除き、抗体は全てBD Pharmingenから得た。表面および細胞内サイトカイン染色は全て記述されたとおりに行った（Barber et al., Nature 439:682, 2006）。脱顆粒を検出するために、脾細胞をブレフェルジン、モネンシン、抗CD107a-FITC、および抗CD107b-FITCの存在下で5時間刺激した。

【０３８２】

共焦点顕微鏡：脾臓をマウスから摘出して、OCT（TissueTek）において凍結した。これらのブロックから10～20 mmの凍結切片を切断して、氷冷アセトンにおいて10分間固定した。免疫蛍光のために、切片を以下の抗体によって染色した：網様細胞を検出するためのER-TR7（Biogenesis, Kingston, NH）、およびポリクローナル抗LCMVモルモット血清。染色をAlexa Fluor-488ヤギ抗ラットおよびAlexa Fluor-568ヤギ抗モルモットIg（Molecular Probes）によって可視化して、共焦点顕微鏡（Leica Microsystems AG, Germany）によ

って分析した。画像はImageJ（National Institutes of Health）およびPhotoshop（Adobe Systems Inc.）用いて作製した。

【０３８３】

結果は、治療ワクチンと抗PD-L1抗体の併用が、抗原特異的CD8 T細胞の増殖および持続的ウイルスの寛解に対して相乗効果を示すことを証明した。治療ワクチンは、PD-1/PD-L1阻害経路の遮断によって機能的に回復したCD8 T細胞集団を有効にブーストすることができる。抗原特異的CD8 T細胞の増強された増殖および加速されたウイルス制御は、組み合わせ治療的ワクチン接種によって全身で達成された（図9A～9Dおよび図10A～10D）。組み合わせ治療ワクチンは、機能的に活性なCD8 T細胞の劇的な増加を誘導する（図11A～D）。さらに、PD-1/PD-L1経路の遮断の際に特異的エピトープを発現するベクターを用いる治療ワクチンは、ベクターにおいてコードされるエピトープに対して特異的なCD8 T細胞の増殖を増強する（図9および11）。組み合わせワクチンによって処置した群における抗原特異的CD8 T細胞について認められたCD127の発現レベルの増加は、長期のメモリーT細胞応答が生成されたことを反映するが、PD-1およびグランザイムBの発現レベルの減少は、持続的ウイルスの寛解と相関する（図12A～12B）。

【０３８４】

「無力な」消耗したCD8 T細胞における機能の回復に対して、PD-L1遮断と組み合わせた治療ワクチンの相乗効果が存在した（図13A～13Eを参照されたい）。マウスからCD4 T細胞を枯渇させて、次にLCMVクローン13を感染させた。いくつかのマウスに、野生型ワクシニアウイルス（VV/WT）またはLCMV GP33-41エピトープ発現ワクシニアウイルス（VV/GP33）を、感染後7週目にワクチン接種した。同時に、マウスをαPD-L1またはそのアイソタイプによって3日ごとに5回処置した。抗体の初回処置の2週間後、マウスを分析のために屠殺した。結果を図13Aに示す。GP33特異的CD8 T細胞の頻度も同様に調べた（図13B）。脾細胞を、αCD107a/b抗体の存在下でGP33ペプチドによって刺激した後、IFN-γに関して共染色した。示されるプロットは、CD8- T細胞に関してゲートを設定している（図13C）。Db-拘束GP33-41テトラマーに関して陽性の細胞あたりのGP33ペプチドによる刺激後のIFN-$\gamma^+$細胞の百分率も同様に（図13D）、ウイルス力価（図13E）と共に決定した。結果は、PD-1遮断と併用したワクチンの相乗効果を証明する。

【０３８５】

これらの結果は、負の調節経路の遮断と、慢性感染症の際のCD8 T細胞のブーストとの組み合わせを、慢性感染症または悪性疾患を有する患者におけるT細胞応答を改善するために治療ワクチンの開発に用いることができることを示している。T細胞応答をブーストして、ウイルス負荷を低下させるPD-1のアンタゴニストを用いることなどの治療的介入は、無病生存率を増加させて、ウイルスの伝播を減少させることができるであろう。有効な治療的ワクチン接種を慢性ウイルス感染症および持続性の細菌、寄生虫感染症のために用いることができるであろう。この戦略はまた、悪性疾患の処置のためにも用いられる。

【０３８６】

実施例16：PD1/PDL1経路の遮断を通してのT細胞免疫療法の増強

ヒト免疫不全ウイルスおよびC型肝炎などの慢性ウイルス感染症を処置および消失させるために戦略を開発することが重要である。CDCは最近、100万人を超えるアメリカ人がHIVと共に生存していると報告しており、より有効な治療の必要性を例証している。リンパ球に対する阻害性のシグナル伝達が、病原体が宿主免疫応答を持続的に回避する能力にどのように寄与しうるかを決定することは重要である。

【０３８７】

免疫受容体PD-1（B7/CD28共刺激受容体ファミリーメンバー）およびそのリガンド（PD-L1）は、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）による慢性感染症の状態のあいだに劇的にアップレギュレートされることが示されている。LCMVモデルを用いるさらなる試験は、PD1/PDL1経路の遮断によって、CD8 T細胞が消耗している場合、慢性感染症の後期相における内因性の抗ウイルスCD8 T細胞応答が有意に増強されることを証明した。消耗したT細胞は機能的に損なわれ、抗原に遭遇しても有効な免疫応答を行わない。しかし、PD1/PD-L

1経路の遮断は、消耗を逆転させて、その機能的能力を回復させるように思われる。データは、これらの効果が抗PDL1処置の即時的な期間を超えて十分に持続することを示唆している。

【０３８８】

以下の実験は、（1）免疫（メモリー）脾細胞を先天性の感染（キャリア）マウスに養子移入した際に、抗PDL1が抗ウイルスCD8 T細胞の増殖および生存を増強する能力を査定するため、（2）PD1/PDL1遮断の存在下で拡大されたウイルス特異的メモリーCD8 T細胞の機能性を評価するため、および（3）PD1/PDL1遮断の存在下で拡大されたウイルス特異的CD8 T細胞における様々な分化マーカーの発現を決定するために、行った。

【０３８９】

PD-1経路の役割を、慢性ウイルス感染症の細胞-免疫治療の十分に開発されたモデルにおいて査定した。本明細書において記述されたモデルは、免疫学的障壁、これらの治療の限界、応用性（T細胞／抗腫瘍応答の改悪または抑制など）に関して腫瘍に関するT細胞の細胞-免疫療法のモデルに匹敵する。新生児または子宮内でLCMVに感染したマウスは、内因性のLCMV特異的免疫応答を行わず、その生存のあいだ血液および全ての組織において感染性のLCMVを高レベルで有し続ける。これらの動物は先天性のキャリアであり、病原体に対して本質的に寛容である。LCMV免疫マウスからの脾細胞を先天性のキャリアに養子移入すると、移入された免疫メモリー細胞は、急速な拡大を受けて、ウイルスに対して力強い免疫応答を確立する。大量の脾細胞を移入した場合、養子細胞-免疫療法を受けている動物のおよそ2/3が感染症を完全に消滅させ続ける。

【０３９０】

以下の材料および方法をこれらの実験において用いた。

【０３９１】

マウスおよび感染症。4～6週齢の雌性B57BL/6マウスを、Jackson Laboratory（Bar Harbor, Maine）から購入した。LCMVアームストロング$2\times10^5$ PFUを腹腔内注射することによって、急性の感染症を開始した。先天性のキャリアマウスを、新生児感染マウス（LCMVクローン13 $10^4$ PFU、脳内）に由来するコロニーからEmory University（Atlanta, GA）で飼育した。

【０３９２】

養子免疫療法とインビボ抗体遮断。LCMV免疫マウス（感染後30～90日目）から全脾細胞$40\times10^6$個を単離して、6～12週齢のLCMVキャリアマウスの静脈内に移入した。ラット抗マウスPD-L1（10F.9G2）200μgを養子免疫療法後に3日ごとに15日間投与した。

【０３９３】

フローサイトメトリーおよびテトラマー染色。LCMV $GP_{33-41}$と複合体を形成したH-2DbのMHCクラスIテトラマーを、既に記述されたように生成した。抗体は全て、BD/Pharmingen（San Diego, CA）から購入した。末梢血単核球および脾細胞を単離して、既に記述されているように染色したデータをFACSCalibur（商標）フローサイトメーター（BD)を用いて獲得し、FlowJoeソフトウェア（Tree Star Inc. Ashland, OR）を用いて分析した。

【０３９４】

細胞内サイトカイン染色。細胞内サイトカイン染色の場合、脾細胞$10^6$個を表記のペプチド（.2μg/ml）およびブレフェルジンAの存在下または非存在下で37℃で5～6時間培養した。表面マーカーに関する染色後、細胞を透過性にして、Cytofix/Cytoperm preparation（BD/Pharmigen）を用いて細胞内サイトカインに関して染色した。

【０３９５】

以下の結果を得た。

【０３９６】

抗PD-L1療法はウイルス特異的CD8 T細胞数を増加させる：末梢血単核球（PBMC）を、7、11、15、22および35日目に処置および無処置動物から単離した。$D^b$ GP33エピトープに対して特異的な細胞を、テトラマー染色によって査定した。独立した2回の実験において、養子移入後最初の15日間のあいだに抗PD-L1治療によって処置した動物は、PBMC 100万

個あたりの$D^b$GP33陽性細胞数に対して標準化した場合にLCMV特異的CD8 T細胞の有意により多数を発生させることが見いだされた（図14）。これらのデータは、正常なメモリーT細胞における何らかの程度の増殖抑制の付与におけるPD-1/PD-L1経路の役割を支持する。その上、これらの結果は、この経路の治療的阻害が、高い抗原負荷を有する慢性感染症の状況への養子移入後に生成された二次免疫応答の発生および維持を増強しうることを示唆している。

【０３９７】

PD-1/PD-L1遮断は特異的CD8 T細胞の機能性を増強する：養子移入後17日目に処置および無処置動物から脾細胞を単離して、炎症性サイトカイン（IFN-γおよびTNFα）またはCD107ab（ライソゾーム関連膜タンパク質、LAMP）の発現に関して分析した。定義された全てのCD8エピトープを超えて、IFNγ発現は、無処置動物と比較して抗PD-L1遮断を受ける動物において増強されることが見いだされた（図15a）。さらに、IFNγ、TNFα、およびCD107abの同時発現も同様に、抗PD-L1療法後に増加した（図15B～15E）。これらの知見は、PD-L1遮断の存在下で拡大した養子移入されたメモリー脾細胞が、無処置動物からの脾細胞と比較して、炎症性サイトカイン産生および細胞溶解性顆粒の放出に関して機能的に優れていることを示している。

【０３９８】

実施例17：PD-1遮断の際のネズミB細胞応答

PD-1遮断が慢性的なLCMV感染症の際にB細胞応答を増強するか否かを決定するために、以下の実験を行った。B細胞およびT細胞応答はいずれも慢性LCMV感染症の制御において不可欠であり、このように、慢性LCMV感染マウスにおいてB細胞応答を改善することは、ウイルス負荷を低下させて、T細胞機能を増強するために役立つ可能性がある。

【０３９９】

以下の材料および方法をこれらの実験において用いた。

【０４００】

マウスおよびウイルス：4～6週齢の雌性C57Bl/6マウスをJackson Laboratory（Bar Harbor, Maine）から購入した。感染の前に、gk1.5抗体を投与することによって、慢性LCMVマウスからCD4 T細胞を枯渇させた。これまでのデータは、gk1.5 500μgをウイルスチャレンジの-2および0日目に投与すると、脾臓およびリンパ節におけるCD4 T細胞数の95～99％減少が起こり、CD4 T細胞数は2～4週間のあいだに徐々に回復することを証明している。マウスにLCMVのクローン-13株$2\times10^6$ PFUを0日目に静脈内投与して、慢性炎症を開始させた。ウイルスの力価をVero細胞において6日目にプラークアッセイによって決定した。

【０４０１】

ELISPOTによるASCの検出：脾臓および骨髄の単細胞浮遊液から、0.84％$NH_4Cl$処置によって赤血球細胞を枯渇させて、5％FCSを添加したRPMIに浮遊させた。ニトロセルロース底の96ウェルMultiscreen HA filtration plates（Millipore）に細胞を播種することによって、抗体分泌細胞を検出した。プレートを5μg/mlヤギ抗マウスIgG＋IgM＋IgA（Caltag/Invitrogen）100μlによって4℃で終夜予めコーティングした。次に、プレートをPBS/0.2％Tweenによって3回洗浄した後、PBSによって1回洗浄し、非特異的結合を防止するためにRPMI+10％FCSによって2時間ブロックした。ブロッキング培地をRPMI 5％FCS 100μlに交換して、細胞$1\times10^7$個/ml 50μlをプレートを超えて連続3倍希釈で播種した。プレートを37℃および5％$CO_2$で6時間インキュベートした。細胞を除去してプレートをPBSによって3回洗浄して、PBS／0.2％Tweenによって3回洗浄した。次に、ウェルを、PBS／0.2％Tween／1％FCSにおいて1/1000倍希釈したビオチン化ヤギ抗マウスIgG（Caltag/Invitrogen）によってコーティングして、4℃で終夜インキュベートした。二次抗体を除去して、プレートをPBS／0.2％Tweenによって3回洗浄した。PBS／0.2％Tween／1％FCSにおいて1/1000倍希釈したアビジン-D HRP（Vector）を、RTで1時間インキュベートした。プレートをPBS／0.2％Tweenによって3回洗浄して、PBSによって3回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ-$H_2O_2$色素原基質100 mlを加えることによって検出を行った。基質は、新しく作製したAEC溶液150μl（3-アミノ-9-エチルカルバゾール（ICN）10 mgをジメチルホルムアミド（Sig

ma）1 mlに溶解した）を0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液pH 4.8 10 mlに加えて、孔径0.2 mmのメンブレンによって濾過して、使用直前に3%$H_2O_2$ 150mlを加えることによって調製した。顆粒状の赤いスポットが3～5分で現れ、水道水で十分にすすぐことによって反応を終了させた。垂直な白色光を備えた実体顕微鏡によってスポットを計数した。

【０４０２】

総骨髄細胞の決定：$^{59}$Fe分布試験により、総骨髄細胞の12.6%が2本を合わせた大腿骨に位置することが示されていることから、骨髄における総ASC応答を計算するために、二つの大腿骨の骨髄細胞による応答に係数7.9を乗じた。大腿骨、脛骨、液性（humorous）、肋骨、または胸骨からの骨髄細胞のASC活性に、差は検出されなかった。典型的に、成体の二つの大腿骨は総骨髄細胞$2.0\times10^7$～$2.5\times10^7$個を生じた。

【０４０３】

フローサイトメトリー：直接共役抗体をPharmingen（抗-B220、抗-CD4、抗-CD138、抗-CD95、抗-Ki67、抗-IgDビオチニル化）、またはVector labs（PNA）から購入した。ストレプトアビジン-APCは、Molecular Probesから購入した。染色は全て、1%FCSおよび0.1%アジ化ナトリウムを添加したPBSにおいて4℃で行った。次に、細胞を2%ホルムアルデヒド（PBSにおいて）において固定して、CellQuestソフトウェア（BD Biosciences）を用いてFACS Caliburにおいて分析した。

【０４０４】

統計分析：検定は、 Prism 4.0（GraphPad, SanDiego, CA）を用いて行った。統計学は、95%信頼区間で両側の対応のないT検定を用いて行った。

【０４０５】

脾臓における抗体分泌細胞の総数はインビボPD-1遮断後に増強される：LCMV-クローン-13に感染したマウスを、感染後およそ60日目に抗（α）PD-L1によって処置した。マウスにαPD-L1 200μgを3日ごとに2週間投与した。αPD-L1処置の14日目に、マウスを屠殺して脾臓における抗体分泌細胞数をELISPOTおよびフローサイトメトリー染色によって測定した。異なる三つの実験において、αPD-L1によって処置したマウスは、無処置マウスと比較して脾臓において抗体分泌細胞（ASC）の有意に増加したレベルを示した（$p=0.011$）（図16a）。ASCは、B細胞マーカーB220のダウンレギュレーションによって、およびCD138（syndecam-1）の発現によって脾臓におけるB細胞から分化することができる。ELISPOTの結果と一致して、B220$^{low/int}$CD138+細胞数の増加は、αPD-L1によって処置した感染マウスにおいて認められた（図16b）。

【０４０６】

慢性LCMV感染マウスのαPD-L1による処置は骨髄ASCレベルの上昇に至らない。骨髄内の抗体分泌細胞がαPD-L1処置の際に同様に増強されるか否かを決定した。長命なプラスマ細胞の大多数は骨髄内に常在しており、これらのプラスマ細胞は、血清抗体レベルの長期間の維持にとって不可欠である。慢性的なLCMV感染マウスを、感染後およそ60日目にαPD-L1によって処置した。αPD-L1処置の14日目に、脾臓および骨髄ASCレベルをELISPOTによって測定した。脾臓におけるASCの数は処置後2週目で上昇したが、この時点で骨髄におけるASC数に変化はなかった（図17）。

【０４０７】

慢性LCMV感染マウスをαPD-L1および$^{130}$αCTLA-4によって同時処置すると、脾臓ASCレベルの相乗的増加が起こる：もう一つの負の調節分子であるCTLA-4によるシグナル伝達の遮断が、PD-1遮断の際に認められた効果を増強するか否かをさらに調べた。B7に対するCTLA-4の結合は、正の共刺激分子CD28と競合して、および／またはTCRシグナルの直接拮抗を提供すると考えられている。LCMVクローン-13に感染したマウスをαPD-L1、αCTLA-4、その両者のいずれかによって処置するか、または無処置のままとして、処置後2週目に抗体分泌細胞のレベルをELISPOTによって測定した。αCTLA-4による処置はASCレベルに影響を示さなかったが、αPD-L1とαCTLA-4との同時処置によって、αPD-L1処置単独について認められた場合より大きいASCの相乗的増加に至った（図18）。

【０４０８】

αPD-L1処置マウスにおける増強されたB細胞およびCD4 T細胞増殖および胚中心活性：αPD-L1によって処置した慢性マウスにおける脾臓集団のフローサイトメトリー分析は、CD4 T細胞およびB細胞の双方におけるKi-67染色の増加によって増殖レベルの増強を示した。胚中心反応内のB細胞は、高レベルのPNAおよびFAS染色によって脾臓において同定することができる。αPD-L1処置後、無処置対照と比較してPNA+FAS+ B細胞の頻度の大きい増加を認めた（図19a～19b）。

【０４０９】

実施例17：ヒトT細胞におけるPD-1発現

CD8 T細胞は、多くの慢性感染症の制御にとって必須である。本明細書において開示されるように、これらのCD8 T細胞は、慢性的な抗原刺激後に消耗するようになり、これは過増殖状態の誘導と抗ウイルスサイトカインの産生能の喪失を特徴とする。消耗したT細胞はprogrammed death- 1（PD-1）の高い発現を有し、同様にPD-1は、T細胞活性化によってアップレギュレートされて、PD-1リガンドであるPD-L1およびPD-L2によって誘発されうる。PD-1阻害経路はマウスにおける慢性ウイルス感染症の際のCD8 T細胞消耗の重要なメディエータであることが本明細書において開示される。ウイルス特異的CD8 T細胞は、慢性感染症に反応して高レベルのPD-1発現を維持するが、消失に成功した感染症には反応しなかった。PD-1/PD-L1相互作用の遮断によって、CD8 T細胞増殖の増強、抗ウイルスサイトカインの産生、およびウイルス負荷の低減が起こった。

【０４１０】

ヒトにおける慢性感染症に対して特異的なCD8 T細胞がPD-1を発現するか否か、およびPD-1の遮断がCD8 T細胞応答を増強するか否かを評価した。本試験は、（1）ヒト末梢血単核球（PBMC）のサブセット、すなわちCD4、CD8、B細胞、NK、単球、DCに及ぼすPD-1の発現パターンを決定した；（2）PD-1を発現するCD4およびCD8 T細胞の表現型を決定した；（3）慢性の持続性抗原[エプスタイン-バーウイルス（EBV）およびサイトメガロウイルス（CMV）]および急性の消散した抗原（インフルエンザおよびワクシニア）特異的細胞におけるPD-1発現を決定した；ならびに（4）抗原特異的細胞の増殖に及ぼすPD-1/PD-L1相互作用を遮断する効果を決定した。

【０４１１】

以下の材料および方法をこれらの試験において用いた。

【０４１２】

血液試料：末梢血試料を、EBV、CMV、インフルエンザまたはワクシニアウイルスに対して血清陽性であった健康な個体36人から得た。これらの対象は、EBV、CMV、インフルエンザまたはワクシニアウイルスタンパク質に対して特異的なHLAクラスIテトラマーにマッチするそのHLA対立遺伝子発現に基づいて選択した。PBMCを、リンパ球分離培地（Cellgro, Herndon, VA）に対して血液試料から単離した。

【０４１３】

抗体、ペプチド、およびテトラマー：フィコエリスリン共役抗ヒトPD-1（EH12、マウスIgG1）および非共役ヒトPD-L1（29E.2A3、マウスIgG2b）を得た。直接共役抗体は、Beckman Coulter, San Diego, CA（抗CD3、CD11a、CD27、CD28、CD38、CD45RA、CD57、CD62L、およびグランザイム-B）、BD Pharmingen, San Diego, CA（CD8、CD95、CD195、HLA-DR、Ki-67、およびパーフォリン）、ならびにR&D systems, Minneapolis, MA（CCR7）から得た。ペプチドをEmory University, Atlanta, GAのペプチド合成研究室で作製した。HLA-A2、-B7、および-B8を発現するプラスミド構築物は、NIH Tetramer Core Facility, Atlanta, GAによって供与され、APC標識MHCクラスI／ペプチドテトラマーは、

EBV (HLA-A2-GLCTLVAML (SEQ ID NO:
36), HLA-B8-RAKFKQLL (SEQ ID NO: 37) および FLRGRAYGL (SEQ ID NO: 38)),
CMV(HLA-A2-NLVPMVATV (SEQ ID NO: 39), HLA-B7-TPRVTGGGAM (SEQ
ID NO: 40)), インフルエンザ (HLA-A2-GILGFVFTL (SEQ ID NO: 41)) ならびにワクシニア
(HLA-A2-CLTEYILWV (SEQ ID NO: 42) および KVDDTFYYV (SEQ ID NO: 43))

のCTLエピトープを運ぶ。

【０４１４】

免疫表現型決定およびCFSE増殖：ヘパリン加ヒト全血試料（200μl）を抗体またはテトラマーによって染色した後、CellQuestソフトウェアを用いてFACS-Caliburにおいて、またはFACSDivaソフトウェア（BD Immunocytometry Systems）を用いてLSRIIフローサイトメーターにおいて分析した（Ibegbu et al, J Immunol.174: 6088-6094, 2005）。CFSEアッセイに関して、PBMC（$2\times10^6$個/ml）を十分に洗浄して、3μMカルボキシ-フルオレセインジアセテート、スクシニミジルエステル（CFSE、Molecular Probes）によって室温の暗所で5分間標識した（たとえば、Weston and Parish, J Immunol Methods 133:87-97, 1990を参照されたい）。CFSE標識PBMCを、ペプチド単独（1μg/ml）または抗PD-L1抗体（10μg/ml）と共にペプチドによって刺激した。対照培養は、PBMC単独、抗PD-L1抗体と共にPBMC、またはアイソタイプ対照抗体（IgG2b；10μg/ml）と共にPBMCのいずれかから構成した。37℃で6日間インキュベートした後、細胞を洗浄して、抗CD3および抗CD8抗体と共にテトラマーによって細胞外で染色した。

【０４１５】

以下の結果を得た。

【０４１６】

PBMCサブセットにおけるPD-1の発現パターン：PD-1発現を健康な個体におけるPBMCサブセットにおいて調べた。CD8+ T細胞、CD4+ T細胞および単球（CD14+）は、高レベルのPD-1を発現し、B細胞（CD20+）は、低レベルのPD-1を発現し、NK細胞（CD56+）およびDC（CD11c+）はPD-1を発現しないことが観察された。

【０４１７】

PD-1は、エフェクターメモリーCD8およびCD4 T細胞において優先的に発現される：正常な健康な個体からのCD8 T細胞を分化状態および機能に関連する様々な表現型マーカーとPD-1との同時発現に関して調べた（図20A）。要約すると、未経験および中心メモリー表現型CD8 T細胞は、低レベルのPD-1を発現したに過ぎないが、エフェクター／エフェクターメモリー／または消耗表現型に関連する様々なマーカーを発現するCD8 T細胞は、同様に高レベルのPD-1を発現した（図20B）。これらのデータは、PD-1がエフェクターメモリーCD8 T細胞において優先的に発現されたことを示唆した。CD4 T細胞を調べたところ、本発明者らは類似の傾向を見いだした（図20C）。

【０４１８】

PD-1は、持続的な抗原特異的メモリーCD8 T細胞においてアップレギュレートされる：ヒトにおける慢性感染症に対して特異的なCD8 T細胞がPD-1の発現の増加を示すか否かを評価するために、慢性的な持続的ウイルス（EBVおよびCMV）に対して特異的なメモリーCD8 T細胞におけるPD-1発現を、EBV、CMV、インフルエンザおよびワクシニアウイルス特異的テトラマーによる染色によって、健康な個体36人における急性のウイルス特異的T細胞（インフルエンザおよびワクシニア）と比較した（図21A～21B）。図21Aは、EBV、CMV、インフルエンザおよびワクシニアウイルス特異的CD8 T細胞の代表的なPD-1 GMFIを示す。PD-1発現は、インフルエンザ（$p=0.0335$）およびワクシニア（$p=0.0036$）ウイルス特異的CD8 T細胞よりEBV特異的CD8 T細胞において増加することが見いだされた（図21A～21B）。同様に、CMV特異的CD8 T細胞は、インフルエンザ（$p=0.0431$）およびワクシニア（$p=0.019$）より頻繁にPD-1を発現した（図21A～21B）。これらの結果は、PD-1発現と抗原

の経験のあいだに相関があることを示唆している。

【０４１９】

抗PD-L1遮断は慢性の持続的なウイルス特異的CD8 T細胞の増殖を増加させる：PD-1遮断がマウスにおいて観察された結果と類似の持続的な抗原特異的CD8 T細胞応答を増強するか否かを査定した。CFSE標識細胞を、抗PD-L1抗体の存在下または非存在下でEBV、CMV、インフルエンザ、またはワクシニアウイルス特異的ペプチドのいずれかによって刺激した。6日後、テトラマー$^{+}$CFSE$^{lo}$細胞およびCD8+CFSE$^{lo}$細胞の百分率を、ペプチド単独によって刺激した培養物およびペプチドによって刺激した後に抗PD-L1によって遮断した培養物のあいだで比較した。CMVおよびEBV特異的CD8 T細胞の増殖に関する代表的なフローサイトメトリープロットを図22Aに示す。CMV（ｎ＝５）、EBV（ｎ＝６）、インフルエンザ（ｎ＝２）およびワクシニア（ｎ＝２）血清陽性個体からの集合データを図22Bに示す。抗PD-L1抗体によるPD-1/PD-L1相互作用の遮断によって、EBVおよびCMV-特異的CD8 T細胞の増殖の増加が起こったが、インフルエンザおよびワクシニアウイルス特異的CD8 T細胞は、抗PD-L1による遮断後に増殖を示さなかった。これらの結果は、ペプチドプラス抗PD-L1ブロッキング抗体の存在下では、ペプチド単独による刺激と比較して、EBVまたはCMV特異的CD8 T細胞の頻度が3.5倍まで増加することを示している。抗PD-L1抗体の遮断後の抗原特異的CD8 T細胞の増殖がこれらの細胞によるPD-1発現に関連するか否かを査定した。データは、PD-1発現と、抗原特異的CD8 T細胞の増殖のあいだに正の相関があることを示している（ｐ＝0.0083）（図22C）。

【０４２０】

実施例18：慢性ヒトHCV感染症における肝臓浸潤リンパ球は、高いPD-1および低いCD127発現を有する消耗表現型を示す

以下に記述する実験は、慢性HCV感染症、末梢HCV特異的T細胞が、高レベルのPD-1を発現すること、およびPD-1/PD-L1相互作用の遮断により、増殖能が増強されたことを報告する。重要なことに、肝臓内HCV特異的T細胞は高レベルのPD-1を発現するのみならず、HCV抗原特異的であって、ウイルス複製部位である肝臓に分画される消耗表現型であるIL-7受容体α（CD127）を減少させた。

【０４２１】

現在のところ、HCV感染症を防止するためのワクチンは存在せず、唯一認可された治療、すなわちαインターフェロン（IFNα）の単独またはヌクレオシド類似体であるリバビリンとの併用は、高価であり、ほとんどの優勢な遺伝子型（遺伝子型1）に関して最善でも50％のクリアランス率に関連するに過ぎず、有意な副作用を併発する。効能を有する抗HCV治療選択肢が不足していることから、単独または抗ウイルス剤療法と共に、HCV感染症の有害な結末を予防することができる天然の免疫応答を増強または補助することをねらいとした有効な介入の必要性が強調される。

【０４２２】

現在、慢性HCV感染症、特に活動的な感染部位、すなわち肝臓におけるT細胞消耗におけるPD-1の発現およびその役割に関してはほとんどわかっていない。本試験は、慢性HCV感染症患者の肝臓および末梢血の双方における抗原特異的CD8+ T細胞におけるPD-1発減を測定することによって、HCV感染症におけるT細胞表現型をよりよく理解するために企てた。

【０４２３】

以下の材料および方法をこれらの試験において用いた。

【０４２４】

対象：慢性HCV感染症（HCV抗体およびHCV PCR陽性）であって、抗体のスクリーニングによってHIVに関して陰性である患者17人が試験に登録した。患者は全員、登録前、HCV抗ウイルス療法に対して未経験であった。患者15人中7人は、FACS分析によってHLA-A2に関して陽性であった。患者の特徴を表1に要約する。

【０４２５】

（表５）患者のコホート人口統計学および臨床データ

| 患者の識別番号 | 性別 | 年齢 | HLA-A2 | HCV遺伝子型 | ベースラインのウイルス負荷 (IU/ml) | ALT |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 153 HCV* | M | 43 | + | 2b | 7,340,000 | 25 |
| 178 HCV* | F | 48 | + | 2 | 18,330,000 | 62 |
| 179 HCV | M | 54 | - | 1a | 197,000 | 197 |
| 183 HCV | F | 56 | + | 1a | 1,170,000 | 45 |
| 190 HCV | M | 52 | - | 1a | 5,990,000 | 27 |
| 193 HCV | M | 66 | + | 1a | 16,120,000 | 30 |
| 601 HCV | M | 60 | - | 1b | 4,690,000 | 25 |
| 602 HCV | M | 48 | - | 1a | 586,000 | 80 |
| 603 HCV | M | 58 | + | 1a | 1,820,000 | 36 |
| 604 HCV | M | 58 | - | 1a | 2,850,000 | 57 |
| 605 HCV | F | 30 | - | 1 | 819,000 | 57 |
| 606 HCV | M | 50 | - | 1b | 591,000 | 18 |
| 607 HCV | M | 59 | + | 3a | 343,000 | 31 |
| 608 HCV | M | 57 | - | 1b | 395,000 | 16 |
| 609 HCV | M | 55 | + | 1a | 833,000 | 67 |
| 611 HCV | M | 53 | - | 1a | 1,220,000 | 88 |
| 613 HCV | M | 59 | - | 1b | 6,160,000 | 40 |

【０４２６】

HCV抗体試験、ウイルス負荷の決定、および遺伝子型決定：ELISAによるHCV抗体試験を、キットを用いて製造元（Abbott Diagnostics, Abbott Park, Ill；Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA）の説明書に従って行った。HCVウイルス負荷の定量は、リアルタイムRT-PCRアッセイを用いて行った（Roche Molecular Systems, Alameda CA）。HCV遺伝子型決定は、リアルタイムRT-PCRアッセイを用いて（Abbott Diagnostics, Abbott Park, Ill）およびラインプローブアッセイ（LIPA）（Bayer Diagnostics, Research Triangle Park, NC）を用いて行った。

【０４２７】

末梢血単核球：EDTAおよびヘパリン抗凝固血（50～70 ml）を各患者から採取して、FACS染色またはPBMC単離のために直接用いた。PBMCを、Ficoll-Paque PLUS密度勾配（Amersham, Oslo, Norway）を用いて単離して、PBSにおいて2回洗浄して、直ちに分析するか、または90％仔ウシ胎児血清（Hyclone）および10％ジメチルスルホキシド（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を含有する培地において凍結保存した。

【０４２８】

肝生検：肝組織を超音波誘導針生検または経顎蛍光透視技術のいずれかによって得て、免疫学アッセイのために10％仔ウシ胎児血清（Hyclone, Logan, UT）を含有するRPMI-1640培地（Gibco）に直ちに入れた。もう一つの断片を組織学検査のためにホルマリンにおいて固定した。

【０４２９】

肝臓内T細胞単離：10％仔ウシ胎児血清（Hyclone, Logan, UT）を含有するRPMI-1640培地（Gibco, Carlsbad, CA）において得た肝生検試料を同じ培地によって3回洗浄して、細胞の破片およびRBCを除去した。肝臓浸潤リンパ球の単離は、自動の機械的分離システム（Medimachine, Becton Dickinson, San Jose,, CA）を用いて行った。試料を50 μm Mediconに挿入してMedimachineに挿入して15秒間運転した。分離した細胞を、シリンジポートのシリンジを用いて除去した。最大の細胞回収率を確保するために、Mediconを10％仔ウシ胎児血清（Hyclone, Logan, UT）を含有するRPMI培地（Gibco, Carlsbad, CA）によって2回すすいだ。細胞をFACS染色のために直ちに用いた。

【０４３０】

抗体、HLA-A2テトラマー、およびフローサイトメトリー。細胞を、製造元の説明書に従ってFITC、PE、PerCPおよびAPC標識モノクローナル抗体またはテトラマーによって染色し

て、FACS Calibur（Becton Dickinson, San Jose, CA）を用いてフローサイトメトリーを行った。FACSデータをFlowJoソフトウェア（Treestar）によって分析した。BD Pharmingen（BD Biosciences, San Jose, CA）からの以下のモノクローナル抗体を用いた：抗CD8 PerCPおよび抗CD45RA APC。抗CD62L FITC、CD3 FITC、およびCD 127 PEは、Beckman Coulter（Fullerton, CA）から得た。抗PD-1 PE共役抗体（クローンEH12）を記述のように生成した（Dorfman et al, Am. J. Surg. Pathol. 30:802-810, 2006）。HLA-A2テトラマーは、次のCD8+ T細胞エピトープに対して特異的であった：HCV 1073: CINGVCWTV (SEQ ID NO: 44); HCV-1406: KLVALGINAV (SEQ ID NO: 45)。フローサイトメトリーのコレクションをFACSCaliber（商標）（BD Biosciences, San Jose, CA）において行って、FlowJoソフトウェア（v8.1.1）を用いて分析を行った。

【０４３１】

CFSE標識および抗体の遮断：PBMC $10\times10^6$個をPBSによって洗浄して、3μM CFSE（Molecular Probes）によって標識した。細胞を$1\times10^6$個/mlに調節して、2μg/mlのA2-HCV 1073 (CINGVCWTV, SEQ ID NO: 44)ペプチドの存在下で培養した。10 U/ml IL-2を刺激後3日目に加えた。非刺激対照を各アッセイに含めた。特異的ブロッキング抗体（抗PD-L1；クローン#29Eおよび抗PD-1；クローン#EH12（Dofman et al.,前記））を、刺激時に細胞培養物に10μg/mlの濃度で加えた。細胞を6日間インキュベートして、回収し、表面抗体およびテトラマーによって染色して、フローサイトメトリーによって分析した。

【０４３２】

統計分析：結果をGraphPad Prism（v4）を用いてグラフにして分析した。同じ患者内で行った比較を対応のあるt検定を用いて行った。患者間で行った比較を対応のないt検定を用いて行った。

【０４３３】

以下の結果を得た。

【０４３４】

HCV抗原特異的CD8+ T細胞におけるPD-1発現：HCV感染症（全てHIV陰性）患者17人を調べた（表1）。患者15人は、フローサイトメトリー分析による表現型決定のために血液および肝臓試料採取を受け、全員が試験登録前に薬理学的抗ウイルス治療によって処置されていなかった。コホートにおける患者7人が、HLA-A2陽性であり、HLAテトラマー染色によって末梢にHCV特異的CD8+ T細胞集団が存在することを証明した（表1）。これらのHCV特異的CD8+ T細胞をPD-1発現に関して評価した（図23A）。健康なドナーからの末梢血における総CD8+ T細胞におけるPD-1発現レベルは、HCV感染患者からの末梢のCD8+ T細胞の総プールの発現レベルとは有意差がなかった（図23B）。対照的に、末梢血から採取したHCV特異的テトラマー陽性CD8+ T細胞の大多数は、PD-1陽性であり（平均値85%、SEM 3.6）（図23A）、総CD8+ T細胞集団の発現より有意に高い発現であった（$p<0.0001$）（図23B）。抗原特異的CD8+ T細胞における分化、共刺激、細胞内輸送、およびエフェクター機能分子の発現も同様に調べた。HCV特異的テトラマー陽性細胞は、メモリー表現型（高いCD11a、低いCD45RA）、初期分化マーカー（高いCD27、高いCD28、CCR7およびCD62Lの中間発現）、およびエフェクター機能メディエータであるグランザイムBおよびパーフォリンの低レベルを示す。興味深いことに、末梢血におけるこれらのHCVテトラマー陽性T細胞は、低レベルで発現された場合にはメモリーT細胞機能分化障害を同定する表現型マーカーである、CD127（IL-7受容体α鎖）を高レベルで発現した。

【０４３５】

CD8+ T細胞の表現型が非慢性感染症の状況において異なるか否かを決定するために、Flu特異的T細胞を、HCVに感染していない健康なHLA-A2+ドナー5人において調べた。PD-1を発現する末梢のFluテトラマー+ CD8+ T細胞の百分率は、49%であった（SEM 14.1）（図23C）。HLA-A2陽性の慢性HCV患者7人中5人が同様に、テトラマー分析によって、Flu特異的CD8+ T細胞を有すると同定された。これらの慢性的に感染したHCV患者においてPD-1を発現するFlu特異的T細胞の百分率は、健康なドナーにおける同じ集団とは有意差がなかった（図23C）。重要なことにHLA-A2+ HCV患者7人中5人が同様に検出可能なFlu特異的CD8+ T

細胞を有したことから、各患者において非慢性（Flu）および慢性（HCV）感染症に関して特異的なT細胞についてPD-1の比較を行うことができた。PD-1を発現するFlu-特異的およびHCV特異的T細胞発現の差は、有意であった（図23C）。PD-1を発現するHCV特異的CD8+ T細胞の百分率（平均値83％、SEM 6.4）は、PD-1+ Flu特異的CD8+ T細胞の百分率より大きかった（49％、SEM 12.3）（p＝0.048）（図23C）。

【０４３６】

ヒト末梢血および肝浸潤リンパ球におけるPD-1発現：末梢血および肝生検を、HCVに慢性的に感染した患者15人からPD-1の発現に関して分析した。患者5人からの代表的なフローサイトメトリー分析を図24Aに示す。末梢血において、CD8+ T細胞の27％（SEM 3.4）がPD-1+であり、そのような細胞の頻度は肝臓では2倍増加した（57％、SEM 3.6）（図24B）。したがって、肝臓は、高レベルのPD-1を発現する細胞が濃縮されている。ナイーブな細胞は、肝臓においてCD62LおよびCD45RAの双方の高レベルを発現するはずであるが、大多数のCD8+ T細胞はメモリー表現型と一貫してCD62 Llow/CD45RA lowであった（図24C）。具体的に肝臓および末梢の双方におけるこのメモリー集団の分析は、PD-1発現が末梢と比較して肝臓において上昇していることを示した（図24C）。これらのデータは、肝臓内T細胞においてPD-1を発現する細胞の百分率の増加が、単にこの区画に未経験集団が存在しないことによるものではないことを示唆している。むしろ、末梢血と比較して肝臓では、PD-1+ CD8+ Tエフェクターメモリー（CD62L low/CD45RA low）細胞の優先的濃縮が存在する（図23C）。

【０４３７】

ヒト末梢血および肝浸潤リンパ球におけるCD127発現：IL-7は、メモリーCD8+ T細胞を維持するために必要であり（Kaech et al., Nat Immunol 4: 1191-8, 2003）、その受容体のα鎖であるCD127は、持続的LCMVおよびγヘルペスウイルス感染症において抗原特異的T細胞においてダウンレギュレートされる（たとえば、Fuller et al., J Immunol 174: 5926- 30, 2005を参照されたい）。慢性感染症の際のCD127のこの喪失は、サイトカイン産生障害、アポトーシスに対する感受性の増加、およびメモリーウイルス特異的CD8+ T細胞が宿主において持続する能力の低減に相関する。したがって、急性B型肝炎ウイルス（HBV）感染症の消散は、CD127発現のアップレギュレーションおよびPD-1発現の同時の喪失と相関する（Boettler et al., J Virol 80:3532-40, 2006）。興味深いことに、慢性HCV患者において、総末梢CD8+ T細胞のわずか20％（SEM 4.8）がCD127陰性であるが、肝臓CD8+ T細胞浸潤物において、この百分率は58％（SEM 4.4）まで有意に増加した（図24D）。したがって、肝臓は、高いPD-1および低いCD127細胞が優勢である消耗表現型を発現する細胞が濃縮される。これらのデータは、慢性HCV患者における肝臓浸潤性のCD8+ T細胞が、末梢のCD8+ T細胞集団の表現型を反映していないことを示唆する。ウイルスが末梢血におけるT細胞および単球に感染するHIV感染症の状況において、低レベルのCD127は機能的またはメモリーT細胞の欠損に関連する（Boutboul et al., Aids 19:1981-6, 2005）。この試験において、この消耗表現型を示す細胞の肝臓区画化は、表現型が持続的ウイルス複製部位に密接に結びつくことを示唆している。

【０４３８】

肝臓におけるHCV抗原特異的CD8+ T細胞におけるPD-1およびCD127発現：コホートにおける本発明者らのHLA-A2患者2人はまた、肝臓においてテトラマー染色によって同定可能なHCV特異的集団を有した（図25）。PD-1およびCD127の発現を、これらの個体の肝臓対末梢におけるHCV特異的テトラマー陽性CD8+ T細胞における発現と比較した。末梢からのHCV特異的CD8+ T細胞は、ほとんどがPD-1陽性（平均値85％、SEM 3.6）およびCD127陽性（平均値84％、SEM 4.0）であったが、肝臓HCV特異的CD8+ T細胞はほとんどがPD-1陽性（平均値92％）であり、ごくまれにCD127陽性であるに過ぎなかった（平均値13％）（図25）。ウイルス複製部位で、高レベルのPD-1を発現するCD127陰性細胞の拡大が存在するように思われた。肝臓内区画と比較してCD127を異なるように発現するその末梢抗原特異的CD8+ T細胞は、CD127のダウンレギュレーションを引き起こすために必要な抗原曝露のレベルまたは時期に関連しうる。マウスのLCMV感染症において、慢性感染症による持続的抗原負荷

に曝露されると、CD127は持続的にダウンレギュレートされたが、GP33を用いてLCMV抗原に短期間曝露すると、CD127発現の抑制はごく一時的であり、T細胞消耗を誘導することができなかった（Lang et al., Eur J Immunol 35:738-45, 2005）。抗原の利用可能性および曝露時間に対する依存はまた、CD62LおよびCD127の発現に影響を及ぼすことが観察されたが、持続的な抗原により、CD62LおよびCD127の双方の持続的ダウンレギュレーションが起こった（Bachmann et al., J Immunol 175:4686-96, 2005）。理論に拘束されることを望むものではないが、慢性HCV感染症において、末梢で検出された少数のHCV特異的CD8+ T細胞は、低レベルのCD127を維持するに十分な抗原に持続的に曝露されない可能性がある。そうして、T細胞が、ウイルスが消滅したと「考える」可能性がある。

【０４３９】

PD-1/PD-L1の遮断によりHCV特異的テトラマー陽性CD8+ T細胞の拡大の増加が起こる：患者集団からの証拠は、抗PD-L1または抗PD-1抗体とのPD-1/PD-L1相互作用の遮断が、HCV特異的T細胞の増殖能を増加させることを示唆している（図26）。IL-2およびHCV特異的ペプチドの存在下で遮断抗体を加えることによって、同源のペプチドによって6日間刺激した後、カルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル（CFSE）$^{low}$テトラマー標識CD8+ T細胞の頻度をモニターすることによって証明されるように、HCV-特異的T細胞の拡大の4倍増加が起こった。

【０４４０】

結果は、感染部位、すなわち肝臓において、PD-1を発現するHCV特異的CD8+ T細胞の頻度が高いことを示している。第二に、慢性HCV感染症患者の末梢血からのHCV特異的CD8+ T細胞の大多数は、高レベルのCD127を発現する。慢性HCV感染症におけるT細胞の表現型を、エフェクター機能の障害およびT細胞消耗に連鎖するPD-1分子の発現を調べることによって特徴付けした。結果は、肝臓内区画におけるHCV特異的T細胞の大多数がPD-1を発現するがCD127を欠損することを示しており、これはT細胞消耗に一貫する表現型である。このように、PD-1アンタゴニストは、HCV感染症を処置するための治療物質として有用である。

【０４４１】

実施例19：PD-1遮断はインビトロでSIV特異的CD8細胞の拡大を誘発する

抗ウイルスCD8 T細胞は、HIV/SIV感染症の制御において不可欠な役割を果たす。CD8 T細胞の中心的な役割は、SIV感染マカクにおける一過性のインビボ枯渇のあいだのウイルスの再出現によって示されている。これと一貫して、抗ウイルスCD8 T細胞の高い頻度を誘発するように設計される現在のワクチン戦略は、マカクにおける病原性のSHIVおよびSIVチャレンジを含有した（たとえば、Barouch et al, Science 290, 486-92 (2000)；Casimiro et al, J Virol 79, 15547-55 (2005)を参照されたい）。

【０４４２】

抗ウイルスCD8 T細胞の機能および頻度はいずれもHIV（Migueles et al. Nat Immunol 3, 1061-8, 2002）、およびリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）などの慢性ウイルス感染症の制御にとって非常に重要である。有効な抗ウイルスCD8 T細胞は、異なるサイトカインの産生能、細胞障害能、および高い増殖能および低いアポトーシスが含まれる、多数の機能的特性を保有する。慢性のウイルス感染症において、ウイルス特異的CD8 T細胞は、これらの機能の多くの喪失に関連する消耗を受ける（Zajac et al., J Exp Med 188, 2205-13, 1998）。同様に、進行性の疾患を有する個体からのHIV特異的CD8 T細胞は、その機能が損なわれていることが示されている。これらのCD8 T細胞は、IFN-γなどのサイトカインを産生することができるが、T細胞の増殖および生存にとって不可欠なサイトカインであるIL-2の産生；細胞溶解機能にとって不可欠な分子であるパーフォリンの発現（Appay et al., J Exp Med 192, 63-75, 2000）；ならびにHIV（たとえば、Harari et al., Blood 103, 966-72, 2004を参照されたい）およびSIVを制御するために不可欠であるように関係している特性である増殖能が損なわれている。HIV特異的T細胞は、高レベルのPD-1を発現して、この発現は、ウイルス血症レベルに直接比例する。PD-1およびPD-L1の相互作用をインビトロで一過性に遮断すると、HIV特異的T細胞機能が回復する。

【０４４３】
マカクにおける病原性SIV239による感染後のSIV特異的CD8 T細胞におけるPD-1の発現を調べた。結果は、SIV特異的CD8 T細胞が高レベルのPD-1を発現して、インビトロでのPD-1/PDL-1経路の遮断によってこれらの細胞の拡大の増強が起こることを証明している。以下の結果が得られた。
【０４４４】
SIV239感染後のSIV特異的CD8 T細胞におけるPD-1発現の上昇：正常で健康なマカクおよびSIV-感染マカクからのCD8 T細胞におけるPD-1発現レベルを、PD-1発現の役割およびSIV感染の制御に対するその関係を理解するために調べた。正常で健康なマカクからの総CD8 T細胞の有意な比率（40～50％）がPD-1を発現した（図27A）。PD-1発現は、メモリー細胞に主に限定され、ナイーブなCD8 T細胞には存在しなかった。類似のPD-1発現パターンはまた、SIVmac239感染マカクからの総CD8 T細胞についても観察された（図27BおよびC）。しかし、SIV Gag CM9特異的CD8 T細胞の大多数（＞95％）がPD-1発現に関して陽性であり、これらの細胞の有意な比率が、総CD8 T細胞（MFI 220）と比較してPD-1発現をさらにアップレギュレートした（MFI 580）（図27D）。集合的に、これらの結果は、正常およびSIV感染マカクからのメモリーCD8 T細胞の有意な比率がPD-1を発現して、PD-1発現レベルは、SIV特異的CD8 T細胞においてさらに上昇することを証明している。
【０４４５】
PD-1のインビトロ遮断によってSIV特異的CD8 T細胞の拡大の増強が起こる：SIV-特異的CD8 T細胞の機能に及ぼすPD-1遮断の効果を調べるために、マカクPD-1に対して交叉反応するヒトPD-1分子に対するブロッキング抗体の存在下および非存在下で、増殖アッセイを行った。病原性のサルおよびヒト免疫不全ウイルス89.6P（SHIV 89.6P）に感染したMamu A*01陽性アカゲザルからのPBMCを、抗PD-1ブロッキング抗体の非存在下および存在下でP11Cペプチド（Gag-CM9エピトープ）によって6日間刺激した。Gag-CM-9テトラマー陽性細胞の頻度を刺激終了時に評価した。非刺激細胞を陰性対照とした。図28A～28Bにおいて認められるように、P11Cペプチドによる刺激によって、テトラマー陽性細胞の頻度の約4～80倍の増加が得られた。さらに、調べたマカク6匹中4匹において、抗PD-1ブロッキングAbの存在下でのP11Cペプチドによる刺激によって、ブロッキング抗体の非存在下でのP11Cペプチドによる刺激に対してテトラマー陽性細胞の頻度が約2～4倍さらに増強された。
【０４４６】
これらの結果は、PD-1遮断がSIV感染マカクにおけるSIV特異的CD8 T細胞の増殖能を増強することを証明している。
【０４４７】
実施例20：PD-L2の役割
二つのPD-1リガンドは、その発現パターンが異なる：PD-L1は、構成的に発現されて、造血細胞および非造血細胞の双方においてより高い量までアップレギュレートされるが、PD-L2は、樹状細胞（DC）およびマクロファージにおいて誘導的に発現されるに過ぎない。PD-L2がT細胞活性化において果たす役割を評価するいくつかの研究は、PD-L2の阻害機能を証明したが、他の研究はPD-L2がT細胞増殖およびサイトカイン産生を刺激すると報告した。T細胞免疫応答に及ぼすPD-L2の役割を明確に描写するために、エクスビボで異なる細胞タイプにおけるPD-L2発現の速度論を、LCMVアームストロング感染症後に調べた（図29）。PD-L1発現とは対照的に、PD-L2発現は、非常に短期間のあいだ（感染後1～4日）、DCにおいて制限的に発現された。この結果は、PD-L2発現がDC調節に厳密に関連して、それによってT細胞活性化の調節が起こることを示唆している。
【０４４８】
実施例21：PD-1は健康なヒトの血液におけるエフェクターメモリーCD8 T細胞の大多数によって発現される
健康なヒト成人の血液からのCD3+/CD8+ T細胞におけるPD-1発現を調べた。ヒトの血液において、CD8 T細胞の20～60％がPD-1を発現した。T細胞の分化状態とPD-1発現の関係を調べた。CD3+/CD8+ T細胞を、CD45RAおよびCCR7発現パターンに基づいて、未経験、中心

メモリー（$T_{CM}$）、エフェクターメモリー（$T_{EM}$）、および最終分化エフェクター（$T_{EMRA}$）サブセットに表した。PD-1は、未経験T細胞によって発現されず、$T_{CM}$および$T_{EMRA}$のおよそ3分の1によって発現されなかった。対照的に$T_{EM}$の60％がPD-1を発現した。これらのデータは、健康なヒト成人の血液から単離した$T_{EM}$の大多数がPD-1を発現することを証明している。

【０４４９】

これらの分析に基づいて、T細胞を、CD45RAおよびCCR7発現に基づいて多数の集団に細分した。CD45RA発現とPD-1発現のあいだにさらなる関係が見いだされた。具体的に、最低のCD45RA発現を有するCCR7-/CD8+ T細胞は、最高比率のPD-1+細胞を含有した。結論すると、PD-1は$T_{EM}$によって主に発現され、$T_{EMRA}$および$T_{CM}$によって比較的少ない程度に発現されたが、ナイーブなCD8 T細胞では発現されなかった。これらのデータは、健康なヒト成人において、高い割合の$T_{EM}$ CD8 T細胞がPD-1を発現することを例証している。

【０４５０】

PD-1+ CD8 T細胞の特性をさらに特徴付けするために、PD-1といくつかのT細胞分化マーカーとの同時発現を調べた。PD-1+ CD8 T細胞の大多数は、抗原経験およびエフェクター／メモリー分化に関連するマーカーを担っていた。たとえば、CD11a+/CCR7-/CD62L-/CD45RA-/KLRGl+/グランザイムB+/パーフォリン+ CD 8 T細胞は、PD-1発現が濃縮された。対照的に未経験表現型（CD11a-/CCR7+/CD62L+/CD45RA+/KLRG1-）CD8 T細胞は、低レベルのPD-1を発現した。このように、PD-1は、エフェクター／メモリー性質を有する抗原経験CD8 T細胞において優先的に発現された。

【０４５１】

実施例22：PD-1は健康なヒトの血液におけるエフェクターメモリーCD4 T細胞の大多数によって発現される

次に、CD3+CD4+ T細胞におけるPD-1発現を調べた。健康な成人の血液において、CD4 T細胞の30％がPD-1を発現した。CD8 T細胞と同様に、未経験CD4 T細胞は、ほとんどPD-1を発現しなかった。$T_{CM}$ CD4 T細胞の大多数がPD-1を発現したが、PD-1発現は、$T_{EM}$ CD4 T細胞において優先的に濃縮された（50％）。

【０４５２】

PDを発現するCD4 T細胞の特性をさらに特徴付けするために、CD4+/CD3+ T細胞を、PD-1といくつかのT細胞分化マーカーとの同時発現に関して、健康な個体の血液からアッセイした。CD8 T細胞と同様に、PD-1発現は、CD62L-、CD95+、CD45RA-、CCR7-、およびCCR5+細胞が含まれるエフェクター／エフェクターメモリー表現型を有するCD4 T細胞において濃縮された。

【０４５３】

実施例23：PD-1はヒトにおけるEBVおよびCMV感染症に対して特異的なCD8 T細胞においてより高度に発現される

PD-1発現がウイルス抗原持続に関連するか否かを調べるために、PD-1発現をEBV、CMV、インフルエンザおよびワクシニアウイルス特異的CD8 T細胞における発現と比較した。EBVおよびCMV特異的CD8 T細胞は、高レベルのPD-1を発現した。対照的に、インフルエンザウイルス特異的メモリーCD8 T細胞は、中間レベルのPD-1を発現して、ワクシニアウイルス特異的CD8 T細胞は低レベルのPD-1を発現した。よって、慢性感染症（EBVおよびCMV）に対して特異的なメモリーCD8 T細胞は、急性感染症（インフルエンザおよびワクシニア）より高レベルのPD-1を発現した。これらの結果は、慢性感染症（EBVおよびCMV）に対して特異的なCD8 T細胞が急性感染症（インフルエンザおよびワクシニアウイルス）より高レベルのPD-1を発現することを示した。非常に一般的な慢性感染症に対して特異的なCD8 T細胞は高レベルのPD-1を発現することができる。

【０４５４】

実施例24：高PD-L1遮断は、ヒトにおけるEBVおよびCMV感染症に対して特異的なCD8 T細胞の増殖を増加させる

PD-1阻害経路の遮断によって、インビトロで刺激するとHIV特異的CD8 T細胞のクローン

的拡大の増強が起こる。一般的な慢性感染症に対して特異的なCD8 T細胞も同様にPD-1を発現することから、PD-1/PD-L1経路の遮断がEBV、CMVおよび同様にワクシニアウイルス（PD-1メモリーCD8 T細胞が起こる急性感染症である）に対しても特異的なCD8 T細胞の増殖を増強しうるか否かを調べた。CMV、EBV、またはVVに対して特異的なCD8 T細胞を含有する個体の血液からリンパ球を単離して、CFSEによって標識して、様々な条件で6日間培養した。予想されたように、新しく単離した末梢血単核球（PBMC）を培地単独または抗PD-L1抗体を有する培地と共にインキュベートしても、ウイルス特異的CD8 T細胞の増殖を誘導しなかった。PBMCをウイルス由来ペプチドによって6日間刺激すると、テトラマー+ CD8 T細胞の分裂が起こった。しかし、抗PD-L1ブロッキング抗体の存在下でPBMCをペプチド刺激すると、EBVおよびCMV特異的CD8 T細胞の分裂がさらに増強されて、ペプチド単独より大きい倍率の拡大が得られた。抗PD-L1ブロッキング抗体によって誘導された分裂の増強は、個体間で多様であり、所定の個体内でも異なるエピトープのあいだで多様であった。その上、PD-1遮断によって、ワクシニアまたはインフルエンザ特異的CD8 T細胞の拡大の増強は起こらなかった。培養におけるPD-L1の遮断によって誘導された分裂の増強の程度は、刺激前の抗原特異的CD8 T細胞によって発現されたPD-1の量に関連しうる。これらのデータは、慢性感染症に対して特異的なCD8 T細胞におけるPD-1発現が、抗原刺激時のその増殖能を阻害することを示唆している。

【０４５５】

実施例25：維持されたPD-L1遮断は慢性感染症に対して特異的なCD8 T細胞の増殖をさらに増加させる

インビトロで刺激すると、PD-L1ブロッキング抗体の付加によって、EBVおよびCMVに対して特異的なCD8 T細胞の分裂の増加が起こった。抗PD-L1 mAbを1回（0日目）加えて、6日間の培養期間の終了時に増殖を査定した。インビボで、マウスにおける抗PD-L1処置は、ブロッキング抗体の複数回注射を伴った。さらに、これらのネズミの試験において、インビボPD-L1遮断によって、慢性ウイルス抗原に対して特異的なCD8 T細胞においてPD-1発現の急速なアップレギュレーションが起こった。これらの理由から、刺激されたT細胞培養物に抗PD-L1を繰り返し加えると、増殖をさらに増強するか否かを試験した。αPD-L1 mAbを培養0、2、および4日目に加えると、0日目にmAbを1回加えたのみである場合よりEBV特異的CD8 T細胞のかなり大きい蓄積が起こった。類似のデータは、CMV特異的CD8 T細胞についても観察された。これらのデータは、PD-1シグナル伝達の継続的な遮断が、慢性的な抗原に対して特異的なCD8 T細胞数を増加させる能力を最適にしうることを示唆している。

【０４５６】

実施例26：実施例27において記述された試験のための追加の方法。

試験群：SIVに感染したインドアカゲザル（アカゲザル（Macaca mulatta））14匹を調べた。マカク8匹を初期慢性期のために用いてSIV 251の200 TCID50を静脈内経路によって感染させた。マカク6匹を後期慢性期のために用いて3匹にSIV251を直腸内経路によって感染させて、3匹にSIV239を静脈内経路によって感染させた。RDb11を除く全てのマカクがMamu B08およびMamu B17対立遺伝子に関して陰性であった。RDb11はMamu B17対立遺伝子に関して陽性であった。

【０４５７】

インビボ抗体処置：マカクに部分的ヒト化マウス抗ヒトPD-1抗体（クローンEH12-1540）（Dofrman et al., Am J Surg Pathol 30, 802-810 (2006)）または対照抗体（SYNAGIS）のいずれかを注入した。抗PD-1抗体は、ヒトIgG1に連結されたマウス可変重鎖ドメイン（FcRおよび補体結合を低減させるように変異した）（Xu et al., Cell Immunol 200, 16 - 26 (2000)）およびヒトκに連結されたマウス可変軽鎖ドメインを有する。クローンEH12は、マカクPD-1に結合して、インビトロでPD-1とそのリガンドのあいだの相互作用を遮断する（Velu et al., J Virol 81, 5819-5828 (2007)）。SYNAGISは、RSウイルスのFタンパク質に対して特異的なヒト化マウスモノクローナル抗体（IgG1κ）（Medimmune）である。抗体を、0、3、7および10日目に3 $mg/kg^{-1}$体重で静脈内に投与した。

【０４５８】
免疫応答：血液からの末梢血単核球および直腸ピンチ（pinch）生検からのリンパ球を、既に記述されているように単離した（Velu et al., J Virol 81, 5819-5828 (2007)）。テトラマー染色（Amara et al., Science 292, 69-74 (2001)）、細胞内サイトカイン産生（Kannanganat et al, J Virol 81, 8468-8476 (2007)）、および抗SIV Env結合抗体の測定（Lai et al., Virology 369, 153-167 (2007)）は、既に記述されたように行われた。

【０４５９】
B細胞応答：全体で血液100μlを、各々が異なる蛍光体にコンジュゲートされたCD3（クローンSP34-2、BD Biosciences）、CD20（2H7、e-Biosciences）、CD21（B-ly4、Becton Dickson）、CD27（M-T2712、Becton Dickson）およびPD-1（クローンEH-12）に対する抗体によって表面を染色した。細胞をFACS溶解液によって溶解および固定して、FACS perm（BD Biosciences）を用いて製造元の説明書に従って透過性にした。次に細胞を、フィコエリスリン（PE）（クローンB56、Becton Dickson）にコンジュゲートさせた抗Ki67抗体を用いて細胞内Ki67に関して染色した。染色後、細胞を洗浄してLSRII（BD Biosciences）を用いて獲得し、FLOWJO（商標）ソフトウェアを用いて分析した。

【０４６０】
抗PD-1抗体の力価および血清中の抗PD-1抗体に対するサルの抗体応答：抗PD-1抗体レベルを測定するために、プレートをヤギ抗マウス免疫グロブリン（ヒト免疫グロブリンに予め吸収させた、Southern Biotech）によってコーティングして、ブロックして、ブロッキング抗体を捕捉するために異なる希釈の血清と共にインキュベートした。HRPにコンジュゲートした抗マウスIgG（ヒト免疫グロブリンに予め吸収させた、Southern Biotech）を用いて結合抗体を検出した。同じように捕捉された公知の量のブロッキング抗体を用いて検量線を生成した。抗PD-1抗体に対するサル抗体応答レベルを測定するために、プレートを抗PD-1抗体（5μg/ml$^{-1}$）によってコーティングして、ブロックして、抗ブロック抗体を捕捉するために異なる希釈の血清と共にインキュベートした。結合抗体を、HRP（Southern Biotech）にコンジュゲートさせた抗ヒトλ鎖特異的抗体を用いて検出した。この検出抗体は、重鎖および軽鎖の定常領域のみがヒト化されて、軽鎖の定常領域はκであることから、ブロッキング抗体には結合しない。捕捉されたサル免疫グロブリンの量を、抗マカク免疫グロブリンを用いて捕捉されている精製マカク免疫グロブリンの公知の量からなる検量線から推定した。

【０４６１】
SIVコピー数の定量：既に記述されているように（Amara et al., Science 292, 69-74 (2001)）定量的リアルタイムPCRを用いてSIVコピー数を決定した。標本を全て抽出して、1試料あたり2個ずつ増幅し、結果の平均値を報告した。

【０４６２】
Tat TL8エピトープの増幅およびシークエンシング：Tat TL8エピトープが含まれる350ヌクレオチドの断片を限界希釈RT-PCRによって増幅した。QIAamp（商標）Viral RNAミニキット（Qiagen）を用いて血漿からウイルスRNAを抽出した。vRNAをSIVmac239特異的プライマーTat-RT3

(5′- TGGGGATAATTTTACACAAGGC-3′)

およびSuperscript III（Invitrogen）によって製造元のプロトコールを用いて逆転写した。得られたcDNAを希釈して、本発明者らのネステッドPCRプロトコールにおいてコピー数を経験的に決定した。限界希釈、ネステッドPCRを、以下のプライマー：

外側のプライマー：

Tat-F1 (5′-GATGAATGGGTAGTGGAGGTTCTGG-3′)(SEQ ID NO: 53)

Tat-R2 (5′-CCCAAGTATCCCTATTCTTGGTTGCAC-3′) (SEQ ID NO: 54)

内側のプライマー：

Tat-F3 (5′-TGATCCTCGCTTGCTAACTG-3′) (SEQ ID NO: 55)

Tat-R3 (5′-AGCAAGATGGCGATAAGCAG-3′) (SEQ ID NO: 56)

によってExpand HiFi PCRキット（Roche Applied Sciences）を用いて反応あたり～0.2コピーで行った。以下のプログラムを用いて第一ラウンドの反応を繰り返した：94℃で1分の後に94℃で30秒、55℃で30秒、および68℃で1分を10サイクルの後に、各サイクル毎に伸長時間に5秒を追加したことを除き最初の10回と同一のサイクルをさらに25サイクル行った後に、68℃で7分間の最後の伸長を行った。以下のプログラムを用いて第二のラウンドの反応を繰り返した：94℃で1分の後に、94℃で30秒、53℃で30秒、および68℃で1分を35サイクルの後に、68℃で7分間の最後の伸長。ExoSap-IT（USB Corporation）によって洗浄した後、PCR産物を、自動シークエンサーにおいて内部プライマーを用いて直接シークエンシングした。Sequencher 4.8（Gene Codes Corporation）を用いてコンティグをアセンブルした。二本のクロマトグラムピークを有するヌクレオチドを含有するアンプリコンを除外した。

【０４６３】

統計分析：抗PD-1抗体処置および対照抗体処置動物のあいだでの血液化学および完全な血球計算値の差を決定するために、線形混合効果モデルを用いた。ボンフェローニ法を用いて、多数の試験のP値を調整した。PD-1遮断の前後での免疫応答を比較するために対応のあるt-検定を用いた。データが正規分布でないが対数正規である場合、対数変換データを用いた。Wilcoxon符号順位検定を用いて群のあいだのウイルス量の低減倍率を比較した。Mantel-Haenszelログランク検定を用いて、群のあいだの生存曲線を比較した。S-PLUS 8.0を用いて統計分析を行った。両側でP＜0.05であれば、統計学的に有意であると見なされた。

【０４６４】

実施例27：PD-1遮断によって誘導されたメモリーB細胞の増殖

慢性免疫不全ウイルス感染症は、細胞性および液性の抗ウイルス免疫応答の機能障害を特徴とする。そのため、ウイルス特異的免疫の機能を増強および／または回復する免疫モジュレート治療は、疾患が進行しないように防止する可能性がある。慢性のサル免疫不全ウイルス（SIV）感染症の際のco-inhibitory receptor programmed cell death-1（PD-1）の遮断の安全性および免疫回復能をマカクにおいて調べた。PD-1に対する抗体を用いるPD-1遮断は良好に認容され、それによって機能の質が改善されたウイルス特異的CD8 T細胞の急速な拡大が起こることが証明された。この増強されたT細胞免疫は血液中において認められ、SIV感染症の主要なリザーバーである腸管においても認められた。PD-1遮断によってまた、メモリーB細胞の増殖が起こり、SIVエンベロープ特異的抗体の増加が起こった。これらの改善された免疫応答は、血漿中のウイルス量の有意な低減に関連して、SIV感染マカクの生存も延長した。遮断は、重度のリンパ球減少症の条件下であっても、慢性感染症の初期相（10週）のみならず後期相（～90週）のあいだでも有効であった。これらの結果は、1つの阻害経路を遮断することによって、病原性の免疫不全ウイルス感染症の際の細胞および液性免疫応答の双方が増強されることを証明し、ヒト免疫不全ウイルス／後天性免疫不全症候群に対する新規治療アプローチを同定し、およびB細胞応答のモニタリングを用いて治療の効能を査定することができることを証明している。

【０４６５】

ウイルス特異的T細胞は、慢性感染症の際に様々な程度の機能障害を示す（Wherry et a

l., Immunity 27, 670-684 (2007)；Klenerman et al., Nat Immunol 6, 873-879 (2005))。これらのT細胞は何らかの抗ウイルス機能を保持しているが、それらは、急性感染症の際に認められる抗ウイルスT細胞と比較してあまり多機能的ではない。T細胞機能のこの欠損は、宿主が持続的な病原体を消失できないことに大きく寄与する。本明細書において、マウスの持続的LCMV感染症（Zajac et al., J Exp Med 188, 2205-2213 (1998)；Galimore et al., J Exp Med 187, 1383-1393 (1998)）、ならびにヒトにおけるヒト免疫不全ウイルス（HIV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、およびC型肝炎ウイルス感染症（HCV）が含まれる他のウイルス感染症（Letvin et al, Nat Med 9, 861-866 (2003)；Pantaleo et al, Nat Med 10, 806-810 (2004)；Rehermann et al, Nat Rev Immunol 5, 215-229 (2005)）の際に、ウイルス特異的T細胞の消耗が存在することが開示される。共阻害性受容体PD-1は、消耗したウイルス特異的CD8 T細胞によって高度に発現される（Barber et al., Nature 439, 682-687 (2006)；Sharpe et al., Nat Immunol 8, 239-245 (2007)）。PD-1はまた、HIV-1特異的（Petrovas et al., J Exp Med 203, 2281-2292 (2006)；Day et al., Nature 443, 350-354 (2006)）、およびSIV特異的（Velu et al., J Virol 81, 5819-5828 (2007)）CD8 T細胞においてアップレギュレートされて、PD-1をインビボで遮断すると、これらの細胞のサイトカイン産生および増殖能を増強した。SIV/マカクモデルを用いて、慢性の免疫不全ウイルス感染症の際のウイルス特異的な細胞性および液性免疫の安全性および回復に及ぼすPD-1のインビボ遮断の効果を評価した。

【０４６６】

インビトロでマカクPD-1とそのリガンド（PDL）とのあいだの相互作用を遮断するヒトPD-1に対して特異的な抗体を用いてPD-1遮断を行った（Velu et al., J Virol 81, 5819-5828 (2007)）。遮断は、慢性SIV感染症の初期（10週）のみならず後期（～90週）相のあいだ行われた。マカク9匹（初期相のあいだ5匹および後期相のあいだ4匹）に抗PD-1抗体を与えて、マカク5匹（初期相3匹および後期相2匹）にアイソタイプ対照抗体（Synagis、抗ラウス肉腫ウイルス（RSV）特異的）を与えた（Malley et al., J Infect Dis 178, 1555-1561 (1998)）。

【０４６７】

慢性SIV感染症の際のPD-1遮断によって、全てのマカクの血液中でSIV-特異的CD8 T細胞の急速な拡大が起こった（図30a、b）。2つの免疫優性エピトープGag CM9およびTat SL8/TL8（Allen et al., Nature 407, 386-390. (2000)）に対するCD8 T細胞応答を、Mamu A* 01組織適合抗原分子を発現する抗PD-1抗体処置マカク7匹および対照抗体処置マカク3匹において、主要組織適合抗原複合体（MHC）Iテトラマー複合体を用いて調べた。Gag-CM9テトラマー特異的CD8 T細胞のほとんど（＞98％）が、遮断前にPD-1を発現した。PD-1遮断後、Gag-CM9テトラマー特異的CD8 T細胞は急速に拡大して、7～21日目までにピークに達した。ピーク応答では、これらのレベルは、0日目でのそのそれぞれのレベルより約2.5～11倍高く（P＝0.007）、28～45日目まで上昇したままであった（図30b）。類似の結果が、慢性SIV感染症の初期相のみならず後期相の際の遮断についても観察された。Gag特異的インターフェロン（IFN）-γ陽性CD8 T細胞の出現率の3～4倍増加も、Mamu A* 01陰性動物（RTd11およびRDb11）2匹において遮断後14日目までに観察され、非Mamu A* 01対立遺伝子によって拘束されるウイルス特異的CD8 T細胞の出現率をPD-1遮断が増強しうることを証明している。予想されたように、SIV特異的CD8 T細胞の拡大は対照抗体処置マカクでは観察されなかった（図30）。

【０４６８】

PD-1遮断はまた、機能の質が改善されたインビボで活発な細胞分裂を受けているウイルス特異的CD8 T細胞の出現率の有意な増加に関連した（図30b）。SIV特異的CD8 T細胞の急速な拡大と一貫して、Ki67（増殖する細胞のマーカー）を同時発現するGag-CM9テトラマー特異的CD8細胞の出現率も同様に、遮断後7日もの早期に増加した（P＝0.01）。同様に、パーフォリンおよびグランザイムB（細胞溶解能；それぞれ、P＝0.001およびP＝0.03）、CD28（共刺激能：P＝0.001）、CD127（増殖能；P＝0.0003）（Kaech et al., Nat Immunol 4, 1191-1198 (2003)）およびCCR7（リンパ節ホーミング能；P＝0.001）を同時発現

するGag-CM9テトラマー特異的CD8 T細胞の出現率の増加が観察された（Salusto et al, Nature 401, 708-712. (1999)）。遮断後にテトラマー陰性およびKi67陽性CD8 T細胞の出現率の一過性の1.5～2倍増加も同様に観察された。これは、Gagにおける他のエピトープのみならず、SIVの他のタンパク質に対して特異的なCD8 T細胞の拡大、およびこれらの動物における他の慢性ウイルス感染症のせいでありうるであろう。抗体処置マカク3匹において、これらのマーカーに関する有意な増強は観察されなかった。

【０４６９】

特に、遮断後のTat-TL8特異的CD8 T細胞に関して拡大は観察されなかった。T細胞がT細胞受容体を通してシグナルを同時に受ける場合に限って、PD-1遮断によってT細胞の拡大が起こることが知られていることから、これは、Tat-TL8特異的CD8 T細胞による認識をウイルスが逃れたためである可能性がある。この可能性を試験するために、SIV251に感染して、感染の初期相のあいだにブロッキング抗体を投与されたMamu A* 01陽性マカク3匹全てから遮断の開始直前に血漿中に存在するウイルスゲノムをシークエンシングした。実際に、Tat TL8エピトープ領域に対応するウイルスゲノムの変異が見いだされた。これらの変異は全てMamu A* 01 MHC分子に対するTat SL8/TL8ペプチドの結合を低減することが示されているか、または予想されており、それによってTat SL8/TL8特異的CD8 T細胞による認識からの逃避が起こる（Allen et al., Journal of Immunology 160, 6062-6071 (1998)；Allen et al., Nature 407, 386-390. (2000)）。これらの結果は、PD-1のインビボ遮断によって、ウイルスエピトープの逃避変異体に対して特異的なT細胞の拡大が起こらない可能性があることを示唆している。

【０４７０】

PD-1遮断によってまた、SIV/HIV複製の選択的部位である結腸直腸粘膜組織（腸管）でのGag-CM9特異的CD8 T細胞の拡大が起こった（Pierson et al., Annu Rev Immunol 18, 665-708 (2000)）（図30c）。拡大は、マカク7匹中2匹では観察されなかったが、血液中ではそれらの1匹について拡大が証明された。血液とは対照的に、腸管での拡大は、42日目までにかなり遅れてピークに達し、そのそれぞれの0日目レベルと比較して2倍～3倍（P＝0.003）の範囲であった。血液と同様に、Ki67（P＝0.01）、パーフォリン（P＝0.03）、グランザイムB（P＝0.01）およびCD28（P＝0.01）を同時発現したGag-CM9テトラマー特異的細胞も同様に、遮断後に腸管において増加した。

【０４７１】

PD-1遮断はまた、抗ウイルス性CD8 T細胞の機能的な質を増強して、それによってサイトカインであるIFN-γ、腫瘍壊死因子（TNF）-α、およびインターロイキン（IL）-2を同時産生することができる多機能細胞の生成が起こった（図31）。感染症の後期慢性期の際のPD-1遮断の開始日では、Gag特異的IFN-γ陽性細胞の出現率は低く、それらはTNF-αとIL-2を同時発現することができなかった（図31a）。しかし、遮断後、IFN-γ陽性細胞の出現率は4匹全てのPD-1抗体処置マカク（P＝0.03）で増加して、細胞はTNF-αとIL-2の同時発現能を獲得した。IFN-γ陽性細胞の拡大は14～21日目までにピークに達し、ピークレベルはそのそれぞれの0日目レベルより2～10倍高かった。21日目に、総Gag-特異的細胞の約16％が3つ全てのサイトカインを同時発現して、約30％がIFN-γおよびTNF-αを同時発現した（図31b）。これは、0日目では、3つ全てのサイトカインを同時発現する総Gag特異的細胞が＜1％であったこと（P＝0.01）、ならびにIFN-γおよびTNF-αを同時発現する細胞が約14％であったこと（P＝0.04）と対照的である。類似の結果はまた、感染の初期慢性期の際の遮断後にも観察された。

【０４７２】

慢性免疫不全ウイルス感染症はB細胞機能障害に関連しているが（De Milito, Current HIV Research 2, 11-21 (2004)：Moir and Faucci, J Allergy Clin Immunol 122, 12-19; quiz 20-11 (2008)）、B細胞機能／消耗の調節におけるPD-1の役割に関してはほとんどわかっていない。SIV感染マカクにおけるPD-1遮断後のB細胞応答の特徴を調べた（図32）。PD-1遮断前の異なるB細胞サブセット上のPD-1発現の分析によって、ナイーブB細胞（$CD20^+CD27^-CD21^+$；図32a、P＜0.001）と比較してメモリーB細胞（$CD20^+CD27^+CD21^-$）による

PD-1の選択的発現が明らかとなった。PD-1のインビボ遮断によって、遮断後28日目までにSIV特異的結合抗体の力価の2～8倍増加が起こった（P＜0.001；図32b）。

【０４７３】

メモリーB細胞の増殖を、抗PD-1抗体および抗レトロウイルス治療によって同時に処置したSIV感染マカクにおいて調べたところ、3日もの早期にKi67$^{+}$（増殖する）メモリー細胞の有意な増加を観察したが、ナイーブB細胞は観察されなかった（図32c）。これらの結果は、慢性SIV感染症の際のB細胞機能障害の調節におけるPD-1-PDL経路の役割を証明している。中和アッセイによって、容易に中和可能な実験室で馴化させたSIV251に対する力価が2倍増加して、中和が困難な野生型SIV 251またはSIV239に対する力価は増加しないことが明らかとなった。抗PD-1抗体を処置した動物9匹中2匹では、SIV特異的抗体の最小の（＜2倍）拡大のみが遮断後に観察された。特に、遮断前では、これらの動物2匹における総メモリーB細胞の出現率（総B細胞の～40％）は、残りの動物7匹（総B細胞の60～90％）と比較して低く、遮断前のSIV特異的メモリーB細胞のレベルが遮断後のSIV特異的抗体の拡大レベルを決定しうることを示している。

【０４７４】

PD-1遮断によって、血漿のウイルス血症の有意な低減が得られ（P＝0.03）、同様にSIV感染マカクの生存を延長した（P＝0.001；図33）。初期慢性期の際に抗PD-1抗体によって処置したマカク5匹中2匹において、ウイルス量は10日目までに低下して、90日目までこのレベルまたはこのレベル未満で持続した（図33a）。マカク1匹では、ウイルス量が一過性に低下して、残りのマカク2匹では一過性に増加して、遮断前のレベルに戻った。初期慢性期とは対照的に、後期慢性期のあいだ抗PD-1抗体によって処置したマカク4匹全てが7日目までにウイルス血症の一過性の増加を示したが、ウイルス量は21日目までにそのそれぞれの0日目のレベル未満であるレベルまで急速に低減した（図33b）。しかし、ウイルスRNAレベルは43日目までに遮断前のレベルに回復した。予想されるように、血漿中のウイルス量の有意な低減は、対照抗体を処置した5匹のマカクのいずれにおいても観察されなかった（図33c）。遮断後21～28日目までに、抗PD-1抗体処置動物のウイルスRNAレベルは、そのそれぞれの0日目のレベルより2～10倍低かった（P＝0.03；図33d）。遮断後150日目までに、対照群のマカク5匹中4匹がAIDS関連症状（たとえば、食欲喪失、下痢、体重減少）のために死亡したが、抗PD-1抗体処置群では9匹全ての動物が生存した（P＝0.001；図33e）。

【０４７５】

後期相処置の全ての動物および初期相処置動物の何匹かにおいて観察された血漿中ウイルス血症レベルの初回上昇は、活性化CD4 T細胞の出現率が増加したためでありうる。遮断後の、Ki67陽性総CD4 T細胞の百分率のみならず、SIV Gag特異的IFN-γ産生CD4 T細胞（ウイルス複製に関する選択的標的）（Douek et al., Nature 417, 95-98 (2002)）の出現率を測定した。これらの分析により、遮断後7～14日目までにKi67陽性CD4 T細胞の百分率が一過性に増加することが明らかとなり（P＝0.002）、この増加は、初期感染相より後期相の際に処置した動物において高かった（P＝0.015）。同様に、Gag特異的CD4 T細胞の出現率の増加も同様に観察されたが、これは感染の後期相の際に処置した動物に限られた。対照抗体処置マカクにおけるこれらの活性化CD4 T細胞に関して有意な増加は観察されなかった。これらの結果は、活性化CD4 T細胞が遮断後の血漿中ウイルス血症レベルの観察された初回上昇に寄与しうることを示唆している。

【０４７６】

PD-1遮断の開始前、血漿中の設定点でのウイルス量ならびに血液および腸管における総CD4 T細胞は、抗PD-1抗体処置群と対照抗体処置群のあいだで類似であった。しかし、Gag CM9$^{+}$細胞およびパーフォリン、グランザイムB、またはCD28を同時発現するGag CM9$^{+}$細胞の出現率は、インビボ遮断前では2つの処置群のあいだで類似ではなかった（図30b）。これは、これらの差が、PD-1遮断後のGag CM9$^{+}$細胞の拡大に寄与しうる可能性を高める。遮断後のその拡大に及ぼす遮断前のGag CM9$^{+}$細胞の出現率の影響を試験するために、1群が対照抗体処置群と比較してGag CM9$^{+}$細胞の類似のレベルを有し、他の群が高レベルを有す

るように、抗PD-1抗体処置群を、遮断開始前のGag CM9$^+$細胞の出現率に基づいて2つの亜群に分けた。これらの亜群を、遮断後のCM9$^+$細胞の拡大に関して分析した。CM9$^+$細胞の拡大は、遮断前のレベルが低いまたは高いかにかかわらず、PD-1の遮断後の動物の双方の亜群において明らかであった。類似の結果はまた、パーフォリン、グランザイムB、CCR7、CD127、またはCD28などの、より良好なT細胞機能に関連する分子を同時発現するCM9$^+$細胞の出現率に基づく亜群分析の場合でも観察された。しかし、遮断前により高レベルのCM9$^+$CD28$^+$細胞を有する動物では、CM9$^+$CD28$^+$細胞のより良好な拡大傾向が認められ、このことは、CD28発現がインビボPD-1遮断の転帰を予測するためのバイオマーカーとして役立つことを示唆している。

【０４７７】

PD-1遮断の安全性を評価するために、遮断後の血清タンパク質、イオン、脂質、肝酵素および腎酵素、ならびに全血球計算の完全な分析。これらの分析により、抗PD-1抗体処置マカクと対照抗体処置マカクのあいだで、試験した全てのパラメータに関して有意な変化は認められなかった。同様に、血清中の抗核抗体（ANA）レベル（自己免疫の測定）もまた、抗PD-1抗体による処置後に有意に変化しなかった。

【０４７８】

（表６）抗PD-1抗体処置後の血液の生化学パラメータ

| マーカー | 感染前* (n=8) | SIV感染後、PD−1遮断後の日数* (n=5) | | |
|---|---|---|---|---|
| 生化学プロフィール | | 0日目 | 14日目 | 56日目 |
| ALT (U/L) | 16.8 ± 5.0 | 27 ± 11.6 | 24.8 ± 7.7 | 27 ± 7.9 |
| AST (U/L) | 33.1 ± 8.2 | 35.0 ± 8.3 | 29.8 ± 3.6 | 49.0 ± 18.5 |
| アルカリホスファターゼ (U/L) | 466 ± 135 | 410 ± 367 | 367 ± 78 | 451 ± 89 |
| ビリルビン(g/L) | 0.2 ± 0.1 | 0.16 ± 0.1 | 0.12 ± 0.0 | 0.2 ± 0.2 |
| クレアチニン(mg/dL) | 0.9 ± 0.1 | 0.7 ± 0.1 | 0.66 ± 0.1 | 0.6 ± 0.1 |
| 総タンパク質 (g/dL) | 7.3 ± 0.3 | 7.0 ± 0.3 | 7.24 ± 0.4 | 6.9 ± 0.4 |
| アルブミンg/L | 4.5 ± 0.3 | 4.28 ± 0.2 | 4.1 ± 0.2 | 4.1 ± 0.2 |
| グロブリン (g/dL) | 2.7 ± 0.2 | 2.72 ± 0.3 | 3.14 ± 0.3 | 2.8 ± 0.2 |
| アルブミン／グロブリン（比) | 1.7 ± 0.2 | 1.62 ± 0.2 | 1.32 ± 0.1 | 1.4 ± 0.1 |
| グルコース(mg/dL) | 82 ± 16 | 69 ± 8 | 66 ± 9 | 64 ± 8.0 |
| コレステロール(mg/dL) | 161 ± 32 | 149 ± 32 | 145 ± 20 | 140 ± 18 |
| トリグリセリド(mg/dL) | 58 ± 19 | 64 ± 12 | 60 ± 7 | 73 ± 34 |
| 血中尿素窒素 (mg/dL) | 18 ± 3 | 17 ± 3 | 17 ± 3 | 16 ± 3 |
| 血中尿素窒素−クレアチニン（比) | 21 ± 3 | 24 ± 5 | 26 ± 5 | 26 ± 5 |
| リパーゼ(U/L) | 21 ± 17 | 20 ± 7 | 21 ± 9 | 23 ± 10 |
| クレアチニンホスホキナーゼ (U/L) | 428 ± 272 | 537 ± 303 | 486 ± 129 | 462 ± 312** |
| γグルタミルトランスペプチダーゼ(U/L) | 74 ± 23 | 66 ± 16 | 58 ± 18 | 71 ± 15 |
| カルシウム(mg/dl) | 10 ± 0.5 | 10 ± 0.2 | 10 ± 0.5 | 10 ± 0.3 |
| 塩素(mEq/L) | 110 ± 3 | 107 ± 3 | 108 ± 1 | 107 ± 2 |
| カリウム (mEq/L) | 4 ± 0.3 | 4 ± 0.2 | 4 ± 0.1 | 4 ± 0.6 |
| ナトリウム(mEq/L) | 150 ± 5 | 149 ± 3 | 149 ± 1 | 147 ± 2 |
| リン(mg/dL) | 5 ± 0.9 | 5 ± 0.6 | 5 ± 0.8 | 6 ± 0.4 |

* 値は平均値±標準偏差を表す

** 56日目でのRBC溶解のために91日目の値を用いた

【０４７９】

（表７）抗PD-1抗体処置後の全血球計算

| 細胞タイプ | 感染前* (n=8) | SIV感染後、PD-1遮断後の日数* (n=5) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 0日目 | 14日目 | 56日目 |
| 赤血球（百万個/mm³） | 5.7 ± 0.3 | 5.9 ± 0.3 | 5.4 ± 0.4 | 5.9 ± 0.3 |
| ヘマトクリット(%) | 41 ± 1 | 42 ± 1 | 38 ± 2 | 41 ± 2 |
| 白血球（/μl） | 8500 ± 2171 | 9260 ± 3685 | 7500 ± 2068 | 7800 ± 1972 |
| 好中球（個/μl） | 3685 ± 1883 | 3274 ± 2124 | 2573 ± 865 | 2028 ± 1585 |
| リンパ球（個/μl） | 4477 ± 1583 | 4700 ± 1791 | 4235 ± 1880 | 5041 ± 1705 |
| 単球（個/μl） | 166 ± 116 | 635 ± 374 | 336 ± 123 | 350 ± 206 |
| 好酸球（個/μl） | 161 ± 155 | 591 ± 580 | 277 ± 275 | 342 ± 175 |
| 抗塩基球（個/μl） | 10 ± 29 | 29 ± 65 | 78 ± 78 | 37 ± 53 |
| 血小板（個/μl） | 341 ± 64 | 275 ± 45 | 364 ± 79 | 241 ± 74 |

* 値は平均値±標準偏差を表す。

【０４８０】

マカク1匹において、ANAのレベルは遮断後10日目までに約3倍増加したが、56日目までに0日目のレベルに戻った。これらの結果は、慢性SIV感染症の際の抗PD-1抗体処置によって、観察可能な毒性が起こらないことを証明している。このことは、進行した血液悪性疾患を有する患者におけるPD-1遮断の安全性を証明する最近の試験（Berger et al., Clin Cancer Res 14, 3044-3051 (2008)）と一貫する。

【０４８１】

インビボ遮断後の血清中の部分的ヒト化抗PD-1抗体の薬物動態を調べた。抗PD-1抗体の力価は、遮断後14日目から28日目のあいだに急速に低下して、抗PD-1抗体のマウス免疫グロブリン可変ドメインに対して抗体応答を生じるマカクと一致した。よって、完全なヒト化抗PD-1抗体はより長期間の処置を可能にする可能性があり、それによってインビボ遮断の効能をさらに増強する可能性がある。

【０４８２】

結果は、慢性SIV感染症の際のPD-1のインビボ遮断が安全であり、それによってSIV特異的多機能CD8 T細胞の急激な拡大および回復が起こり、B細胞応答が増強されることを証明している。拡大は、持続的な高レベルのウイルス血症およびAIDSの条件下であっても、慢性感染症の初期相のみならず後期相のあいだでも行われた遮断についても観察された。拡大はまた、SIV/HIV複製の選択的部位である結腸直腸粘膜組織でも観察された（Pierson et al., Annu Rev Immunol 18, 665-708 (2000)）。重要なことに、PD-1遮断によって、血漿中のウイルス量の有意な低減が起こり、SIV感染マカクの生存も同様に延長した。これらの結果は、SIV感染マカクにおいてウイルス特異的CD8 T細胞を拡大させるためおよび血漿ウイルス量を低減させるために、関連する共阻害分子CTLA-4の遮断ができなかったことを考慮すると、非常に意味がある（Cecchinato et al. J Immunol 180, 5439-5447 (2008)）。PD-1遮断の治療的恩典は、抗レトロウイルスおよび／または治療的ワクチン接種との併用治療を用いることによってさらに改善されうるであろう。

【０４８３】

実施例28：実施例29のための材料および方法

動物、SIV接種および感染段階：インドアカゲザル（アカゲザル）およびスーティマンガベイを利用した。静脈内接種によってSIV感染を行い、動物を感染段階によって群分けした：急性期（感染後2週間）、初期慢性期（感染後10～12週間）、および後期慢性期（感染後≧1.5年）。

【０４８４】
ウイルス量の測定：血漿中のウイルス量を、既に記述されているように（Amara et al., Science 292:69-74, 2001）、定量的リアルタイムPCRによって決定した。ウイルスRNA標本を全て、1試料あたり2個ずつ抽出およびアッセイして、結果の平均値を報告して分析に用いた。
【０４８５】
フローサイトメトリーによる表現型分析：表面リンパ球染色を、マルチパラメータのマルチカラー分析を用いて全血試料100μｌを用いて行った。リンパ球を剖検組織から得た。以下の抗体を用いた：全てBD BIODSCIENCES（登録商標）から得られたCD3（クローンSP34-2）、CD21（クローンB-Ly4）、CD27（クローンM-T2712）、CD80（クローンL307.4）、CD11c（クローンS-HCL-3）；CD20（クローン2H7、eBIOSCIENCES（登録商標））、CD40（クローンMAB89、BECKMAN COULTER（登録商標））、CD95（クローンDX2、CALTAG（登録商標））、およびPD-1（クローンEH-12）に対するマウス抗ヒト抗体。細胞をLSRIIフローサイトメーターにおいて分析して、データをFLOWJO（登録商標）ソフトウェアバージョン8.8.2によって分析した。
【０４８６】
SIV env特異的抗体力価およびアビディティを測定するためのコンカナバリンAのELISA：抗env IgG Abの力価を、DNA/89.6 VLP（51）による293T細胞の一過性のトランスフェクションにおいて産生されたエンベロープタンパク質を用いて測定した。簡単に説明すると、96ウェルELISAプレート（Costar, Corning Life Sciences）に25μg/mlコンカナバリンA（ConA）の10 mM Hepes緩衝液溶液をコーティングして、4℃で終夜インキュベートした。プレートを、0.05％Tween-20を含有するPBS（PBS-T）によって6回洗浄して、VLP 100μｌを各ウェルに加えた後、室温で1時間インキュベートして、もう1回洗浄して、ウェルあたりブロッキング緩衝液（4％乳清および5％ドライミルクを有するPBS-T）100μｌと共に室温で1時間ブロックした。プレートを洗浄して、PBS-T/4％乳清中で連続希釈した試験血清を1試料あたり2個ずつウェルに加えて、室温で1時間インキュベートした。ELISAアッセイに関して、プレートをPBS-Tによって6回洗浄して、結合したAbを西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗サルIgG（Rockland Immunochemicals）およびテトラメチルベンゼン（TMB）基質（KPL）を用いて検出して、2 N $H_2SO_4$ 100μｌによって反応を停止させた。各プレートには、ヤギ抗サルIgG（Rockland Immunochemicals）およびアカゲザルIgG（Accurate chemicals）を用いて生成した検量線が含まれた。検量を適合させて、SOFTMAX（登録商標）2.3ソフトウェアを用いて血清1 mlあたりのAbのμgとして試料濃度を外挿した。
【０４８７】
ウイルスエンベロープタンパク質に対するAbのアビディティは、env Ab ELISAを改変してカオトロピック剤NaSCNによる溶出に対する抗体-エンベロープ複合体の抵抗性を測定することによって決定された。試験血清を、1：100から開始して3倍希釈で1試料あたり4個ずつプレートに添加した。ConA env eLISAにおいて試験血清を結合させた後、1試料あたり2個1組をPBSによって処置して、他の組を1.5 M NaSCNによって10分間処置した後、洗浄して、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗サルIgGおよびTMB基質によって検出した。反応を2 N $H_2SO_4$ 100μｌによって停止させた。NaSCN処置によってO.D. 0.5を生じる血清の希釈倍数を、PBS処置によってO.D. 0.5を生じる血清の希釈倍数で除して100を乗じることによってアビディティ指数を計算した。
【０４８８】
中和アッセイ：中和は、既に報告されたように（51、52）、5.25 EGFP.Luc.M7細胞（TCLA SIVmac25）およびTZM-b1細胞（293T偽ウイルス）における1ラウンドの感染後のルシフェラーゼ（luc）レポーター遺伝子発現の低減の関数として測定された。報告された値は、ウイルス対照ウェルと比較して相対発光量（RLU）が50％低減された血清希釈を表す。
【０４８９】
アポトーシスアッセイ：SIV感染マカク7匹からのPBMCを、異なる4つの培養条件下で2.5

×$10^5$個/ウェルで96ウェル丸底組織培養プレートにおいて平板培養した：完全なRPMI-1640のみ（自然発生アポトーシス）、完全なRPMI-1640培地＋10 ng/ml可溶性HisタグrhFasL（R & D Systems）（Fas媒介アポトーシス）、および完全なRPMI-1640培地＋10 ng/ml可溶性HisタグrhFasL＋10μg/ml抗PD-1ブロッキングAb。プレートを37℃で24時間インキュベートした後、細胞をCD20、CD27、CD21、およびアネキシン-Vに関して染色して、LSRIIフローサイトメーターにおいて直ちに分析した。

【０４９０】

Huh-7.5細胞（53）に、ネオマイシン抵抗性遺伝子と共にCMVプロモーターの下でHLA-A2を発現するプラスミドをトランスフェクトさせた。クローンを選択して、繁殖させた後、完全長のINCYTE（登録商標）ヒトcDNA PD-L1（OPEN BIOSYSTEMS（登録商標）、Huntsville, AL）を発現する第二のプラスミド（pCDNA3.1-Zeo）をトランスフェクトした。ネオマイシンとゼオシンの双方に対して抵抗性のクローンの選択および繁殖の第二ラウンドを行った。HLA-A2およびPD-L1の発現の確認をフローサイトメトリーによって行った。Huh-7.5.A2.PD-L1細胞を用いて、対照としてHuh-7.5細胞を用いて活性化メモリーB細胞のPD-L1媒介アポトーシスを査定した。実験の前日に、双方の細胞株を異なる24ウェルプレート上に播種して、37℃でインキュベートした。NHP-特異的CD20マイクロビーズ（Miltenyi Biotec）を用いてB細胞をPBMCから単離して、単離されたB細胞を細胞株に加えて、プレートを37℃で24時間インキュベートした後、細胞をCD20、CD27、CD21、およびアネキシン-Vに関して染色し、LSRIIフローサイトメーターにおいて直ちに分析した。

【０４９１】

インビトロPBMC刺激およびメモリーB細胞ELISpotアッセイ：PBMCを刺激して、Crotty et al (23)によって記述された方法の改変を用いてメモリーB細胞ELISpotアッセイにおいて用いた。簡単に説明すると、PBMCを、異なる3つの培養条件下で滅菌24ウェル組織培養プレート（Costar）においてβ2-メルカプトエタノールを含有する完全なRPMI-1640培地中で0.5×$10^6$個/ウェルで1試料あたり3個ずつ播種した：培地のみ（対照）；マイトジェンカクテル－1：1000倍希釈したアメリカヤマゴボウマイトジェン、固定された黄色ブドウ球菌Cowan株（Staphylococcus aureus Cowan）、1：10,000倍希釈したSAC（SIGMA（登録商標））、および6μg/ml CpG ODN-2006（Qiagen-Operon）；マイトジェンカクテル＋10μg/ml抗PD-1ブロッキングAb（クローン1540-29C9、GFによって提供）。細胞を37℃で5％$CO_2$中で6日間培養した。

【０４９２】

培養5日目、96ウェルフィルターELISpotプレートを10μg/mlアフィニティ精製ヤギ抗サルIgMおよびIgG（Rockland Immunochemicals）ならびに1μg/ml SIVmac239 gp130によってコーティングして、4℃で終夜インキュベートした。

【０４９３】

6日目、プレートをPBS-Tによって1回洗浄して、PBSによって3回洗浄し、RPMI-1640によって37℃で2時間ブロックした。培養PBMCを2回洗浄して、準備したELISpotプレートに加えて、37℃で6時間インキュベートした。次に、プレートをPBSによって3回洗浄して、PBS-Tによって3回洗浄し、PBS-T/1％FCS中で希釈した1μg/mlビオチンコンジュゲート抗サルIgM（総IgM ASCを検出するため）または1μg/ml抗サルIgG（総IgGおよび抗gp130 ASCを検出するため）と共に4℃で終夜インキュベートした。次にプレートをPBS-Tによって4回洗浄して、PBS-T/1％FCS中で希釈した5μg/ml HRPコンジュゲートアビジンD（Vector Laboratories）と共に室温で1時間インキュベートした。プレートを4回洗浄して、3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）を用いて展開した。展開されたプレート上でのスポットを、ELISpotプレートリーダーを用いて計数した。データは、PBMC $10^6$個あたりのスポット数（ASC）として表される。

【０４９４】

統計分析：統計分析はGRAPHPAD PRISM（登録商標）を用いて行われた。

【０４９５】

実施例29：慢性感染症の進行におけるメモリーB細胞およびPD-1

アカゲザルの末梢血では、4つの別個のB細胞サブセットが同定されうる。アカゲザルB細胞画分の特徴を調べた。健康なRMの末梢血における4つの別個のB細胞サブセットは、CD20$^{int}$/CD21$^{+}$/CD27$^{-}$（ナイーブ）、CD20$^{int}$/CD21$^{+}$/CD27$^{+}$（静止期メモリー）、CD20$^{hi}$/CD21$^{-}$/CD27$^{+}$（活性化メモリー）、およびCD20$^{hi}$/CD21$^{-}$/CD27$^{-}$（異型または組織メモリー）であり、全てが統計学的に異なるCD20の平均蛍光強度（MFI）を有した（P＜0.0001）。ナイーブおよび活性化メモリーB細胞は、主要なサブセットであり、総B細胞のそれぞれ、37％および36％を構成し、これに次いで組織（18％）および静止期（9％）メモリーB細胞であった。細胞を表面IgMおよびIgDに関して染色したところ、ヒトとは異なり、IgMのみの細胞は実質的に存在しないことが見いだされた。ナイーブB細胞は最終的にIgDのみとIgD$^{+}$IgM$^{+}$に枝分かれした。3つ全てのメモリーサブセットは、～20％のIgDのみの細胞で構成された。残りの静止期メモリーB細胞は、IgD$^{+}$IgM$^{+}$（～50％）およびIgD$^{-}$IgM$^{-}$（～30％）であった。活性化メモリーB細胞は、最もクラススイッチしたサブセットであり、それらの～60％はIgD$^{-}$IgM$^{-}$であり、～20％がIgD$^{+}$IgM$^{+}$であった。一方、組織様メモリーB細胞は、ほとんどがIgD$^{+}$IgM$^{+}$（～70％）であり、IgD$^{-}$IgM$^{-}$はわずか～10％であった。このように、新規B細胞サブセットがアカゲザル（RM）に関して同定されたが、それらは活性化メモリーB細胞サブセットとは異なり、CD27発現を欠損するが、CD21$^{-}$でもあった。これらのB細胞は、独自の組織様メモリーB細胞サブセットの細胞と類似でありえて、それらの定義する表面マーカーは、ヒトにおける免疫調節分子FCRL4である。

【０４９６】

サブセットの特徴さらに調べるために、活性化および分化マーカーCD40、CD80、CD95、およびCD11cの発現を査定した。実質的に全てのナイーブおよび静止期メモリーB細胞および静止期メモリーB細胞の＞70％がCD40$^{hi}$であったが、活性化メモリーB細胞の大部分（＞70％）はCD40$^{int}$であった。活性化メモリーB細胞は、最も多くのCD80、CD95、およびCD11cを発現して、これに次いで静止期メモリーB細胞であった。CD11cは、活性化および異型メモリーB細胞上に限って発現され、ナイーブB細胞が発現するCD80、CD95、およびCD11cは無視できる量であった。

【０４９７】

SIV感染によって活性化メモリーB細胞の枯渇が起こる：本試験において本発明者らが用いたSIV感染の静脈内経路は、非ヒト霊長類におけるより急速な疾患進行過程に関連しており、この経路によって接種された動物の30％までが感染の6ヶ月以内にAIDSに進行する。AIDS様症状または完全なAIDSを発症して、感染後24週目までに死亡した動物を急速な進行例として分類して、他の全ての動物を典型的な進行例として分類した。HIVおよびSIV感染後のB細胞画分で起こる最初に観察可能な変化の1つは、総B細胞数の顕著な減少であるが、どの特異的B細胞サブセットが欠失されるかは明確ではない。SIV感染後2週間もの早期に、疾患の進行速度にかかわらず、末梢血総B細胞が重度に枯渇することが見いだされた。急速および典型的進行例の双方において、感染の12週目までにB細胞数のリバウンドが起こったが、B細胞数は感染前レベルとは有意に異なったままであった（P＜0.0001）。一般的に、メモリーB細胞は、SIV感染後枯渇して、活性化メモリーB細胞の百分率および数は有意に減少する。感染後12週目までに、急速な進行例はその活性化メモリーB細胞の82％を失ったが、典型的進行例では23％失ったに過ぎなかった。急速進行例とは対照的に、活性化メモリーB細胞の割合は、典型的進行例では感染の12週目までに感染前のレベルに戻った。急速および典型的進行例のあいだの活性化メモリー細胞の枯渇の程度のこの顕著な対比により、活性化メモリーB細胞の枯渇が疾患の進行およびSIV発病にとって何らかの重要性を有するか否かに関する試験を行った。

【０４９８】

活性化メモリーB細胞の枯渇は、急速な疾患進行の初期予測因子である：設定点でのウイルス量（感染後12週目）は、SIV感染の臨床転帰の良好な予測因子であることが示された。急速な疾患進行とウイルス量とのあいだの関係を分析したところ、興味深いことに急速進行例と典型的進行例はいずれも、類似のピーク（感染後2週目）ウイルス量（P＝0.8）を有した。しかし、急速進行例における設定点でのウイルス量は、典型的進行例より1

対数大きかった（P＜0.0001）。感染後2週間もの早期に活性化メモリーB細胞の割合に差が観察されたことを考慮して、活性化メモリーB細胞の枯渇は、急速な疾患進行のかなり早期の予測因子であり得るという仮説を立てた。血液中心メモリー（$CD28^+CD95^+$、$T_{CM}$）および腸管$CD4^+$ T細胞はまた、SIV感染症における疾患進行のマーカーとして示唆されており、各々の予測値を評価するためにこれらの全てのマーカーについて比較を行った。SIV感染後2週目で、急速進行例は、典型的進行例と比較して活性化メモリーB細胞の割合が有意により低く、活性化メモリーB細胞は、その分布が急速進行例と典型的進行例のあいだで有意に異なる（P＜0.001）唯一の細胞サブセットであった。感染後12週目までに、活性化メモリーB細胞は急速進行例ではさらに枯渇して（P＜0.0001）、急速進行例と典型的進行例のあいだの有意差はまた、$T_{CM}$および腸管$CD4^+$ T細胞（P＜0.01）の割合に関しても現れた（図3B、下のパネル）。疾患進行の初期マーカーとしての活性化メモリーB細胞の2週間での枯渇の有用性をさらに確認するために、設定点（SIV感染後12週目）でのウイルス量対2週目および12週目での活性化メモリーB細胞、腸管$CD4^+$ T細胞、および$T_{CM}$細胞の百分率の相関分析を行った。2週目および12週目の活性化メモリーB細胞はいずれも設定点でのウイルス量と反比例したが、12週目の腸管$CD4^+$の百分率のみが、設定点のウイルス血症と相関して、$T_{CM}$は設定点のウイルス血症と全く相関を示さなかった。ゆえに、活性化メモリーB細胞の喪失は、アカゲザル（RM）における急速な疾患進行の初期予測因子であり、ピークウイルス量、$T_{CM}$、および腸管$CD4^+$ T細胞より良好な早期予測値を有する。

【０４９９】

急速に進行するSIV感染症における活性化メモリーB細胞の枯渇は、SIV特異的液性免疫応答および他の非SIV感染症に対する抵抗性を障害する。急速に進行するSIV感染症を有するRMは、B細胞画分が急性に破壊された結末として低い抗体応答を有することが示された。日和見感染および非SIV関連Agsは、SIV感染動物の死亡率の有意な原因である。活性化メモリーB細胞がなければ、SIVおよび非SIV Agに対する急速に進行する動物の液性免疫応答の重要な結末を有するであろう。このように、SIV env-結合Abの血清力価を、急速および典型的進行例の双方において測定した。アッセイした急速な進行例9例中、2例のみが12週目までに中等度のenv Ab応答を開始して、20週目までAb力価を持続したのは動物のわずか1例に過ぎないことが見いだされた。残りの7匹の急速進行例は、感染の20週を通して検出不可能なSIV env Ab力価を有した。他方、典型的進行例は、感染後12週目までに強いenv Ab応答を生じ、20週目までにさらに高い力価を生じた。

【０５００】

細菌の日和見感染症はSIV感染動物の罹病率の有意な原因であり、これらの感染症の原因物質は通常、鞭毛虫である。フラジェリン（ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）から単離されたFliC）に対する血清Ab力価を、既存の液性免疫に及ぼす活性化メモリーB細胞喪失の効果を査定するための手段として測定した。抗FliC Ab力価と同等から開始したにもかかわらず、急速進行例は、力価が変化しなかった（P＝0.9）典型的進行例と比較して、感染後20週目までに有意に低い（P＝0.001）力価を有した（図5C）。臨床感染データを初回SIV感染後6ヶ月間にわたって双方の群について分析したところ、SIV感染後の動物において多様な他の感染症が起こることが見いだされた。これらには、細菌（カンピロバクター（Campylobacter）、赤痢菌（Shigella）、腸病原性大腸菌（E. coli））、寄生虫（トリコモナス（Trichomonas）、鞭虫、ジアルジア（Giardia））、および酵母（カンジダ（Candida））感染症が含まれた。急速進行例は、感染後1ヶ月もの早期にこれらの感染症に圧倒され、感染後3ヶ月までに、急速進行例の＞50％がこれらに感染したのに対し、典型的進行例では＜10％であった。急速進行例におけるこの感染率は、6ヶ月間を通して持続した。

【０５０１】

インビトロPD-1遮断は、Fas媒介アポトーシスを減少させて、PD-1のライゲーションは活性化メモリーB細胞のアポトーシスを誘導する：PD-1は、アカゲザルのメモリーB細胞上で主に発現される。PD-1の発現を、SIV感染症の前後でより詳細に全てのB細胞サブセットについて査定したところ、3つ全てのメモリーB細胞サブセットのより高い割合が、ナイー

ブB細胞と比較してPD-1のより高い量（平均蛍光強度、MFI）を発現することが見いだされた（P＜0.001）。活性化メモリー細胞は、PD-1の最高量を発現したのみならず、他のサブセットと比較して最高の割合のPD-1$^{+}$細胞を有した（P＜0.001）。SIV感染後、疾患進行状態にかかわらず、PD-1$^{+}$メモリーB細胞の選択的枯渇が起こった。これにより、PD-1が活性化メモリーB細胞の枯渇において役割を果たす可能性が高まった。

【０５０２】

HIV感染ヒトにおけるメモリーB細胞は、特にFas-FasL経路を通して自然発生およびデス受容体誘導アポトーシスの双方を受けるようにプライミングされるが、Fas-FasL経路がSIV感染症の際にB細胞アポトーシスにおいてどのような役割を果たすかに関してはほとんど情報がない。Fas媒介アポトーシスに対する活性化メモリーB細胞の感受性を決定するため、および活性化メモリーB細胞枯渇におけるPD-1に関する可能性がある役割を同定するために、SIV-感染動物7匹からのPBMCを、PD-1遮断と共にsFasLの存在下および非存在下で培養して分析した。活性化メモリーB細胞上のアネキシン-V発現を培養24時間後に査定した。動物6匹全てにおいて、培養にsFasLを添加すると、アポトーシスの有意な増加が認められ、動物4匹ではPD-1の遮断後にFasL媒介アポトーシスの減少が観察され、PD-1が活性化メモリーB細胞のアポトーシスに寄与しうることを示した。

【０５０３】

活性化メモリーB細胞のアポトーシスに及ぼすPD-1の役割をさらに証明するために、PD-L1をトランスフェクトしたヒト肝腫細胞株Huh-7.5（Huh-7.5.A2.PD-L1）をPD-1発現活性化メモリーB細胞に関するリガンド源として用いた。フローサイトメトリーによって確認したPD-L1の発現は、Huh-7.5.A2.PD-L1細胞における＞90％のPD-L1発現と比較して、非トランスフェクトHuh-7.5細胞（対照）ではPD-L1の発現を示さなかった。試験した動物7匹中5匹では、対照ウェルと比較してPD-L1の存在下で培養した活性化メモリーB細胞におけるアポトーシス率が増加した。動物1匹（4）において、類似のアポトーシス率がPD-L1の存在下または非存在下で観察されたが、他の動物（3）では、自然発生アポトーシス率は＞30％であり、PD-L1を添加してもアポトーシスは有意に変化しなかった。このように、SIV感染症の際のPD-1シグナル伝達は、活性化メモリーB細胞アポトーシスにおいて役割を果たす。

【０５０４】

PD-1-PD-L1相互作用を遮断すると、HIV特異的CD8$^{+}$ T細胞の増殖能および生存能が増加することが示された。このように、自然発生およびFas媒介活性化メモリーB細胞アポトーシスに及ぼすインビトロPD-1遮断の効果。インビトロ遮断の効果を、SIV感染動物からのメモリーB細胞が生存する、ポリクローナル刺激に応答して増殖する、およびメモリーB細胞ELISPo+アッセイにおいて抗体分泌細胞（ASC）に分化する能力に関して査定した。遮断によって、活性化メモリーB細胞のFas媒介アポトーシスのわずかが減少が見られたが、自然発生アポトーシスに対しては効果を有しなかった。PD-1遮断Abの存在下で刺激された細胞はより良好に増殖して、総IgMおよびIgGに対してASCのより高い数値を生じたが、同様にenv-特異的スポットも生じた。

【０５０５】

RM活性化メモリーB細胞は、BAFF-Rのより低い発現を有し、これはSIV感染によってさらに減少する：TNFファミリーに属するB細胞活性化因子であるBAFF（B-lysとしても知られる）は、B細胞恒常性の重要な調節因子であり（21）、カニクイザルにおけるCD21$^{-}$ B細胞は、その受容体の1つであるBAFF-Rのより低い発現を発現することが示された。HIVウイルス血症患者のCD21$^{low}$ B細胞もまた、BAFF-Rのより低いレベルを発現することが示された。活性化および組織メモリーB細胞は、ナイーブおよび静止期メモリーB細胞と比較してBAFF-Rの最低レベルを発現することが見いだされた。発現は、感染後2週間でさらに減少するが、興味深いことに12週目までに回復した。このように、BAFF-Rの低い発現は、活性化メモリーB細胞の枯渇における寄与因子である可能性がある。

【０５０６】

インビトロPD-1遮断は、メモリーB細胞増殖および抗体産生を増加させる：メモリーB細

胞上のPD-1の存在が抗体分泌細胞（ASC）へのその増殖および分化能に影響を及ぼすか否かを調べた。記述されているアッセイに基づいて、IgM、IgG、およびSIV gp130産生メモリーB細胞を追跡するためにインビトロelispotアッセイを設計した。ポリクローナル刺激後、初期（12週、n＝3）および後期慢性（＞1年、n＝2）感染症の双方においてIgM（P＜0.05）およびIgG（P＜0.01）ASCの有意な増加が認められた。α-PD-1遮断Abの存在下で刺激された細胞は一般的に、ブロッキングAbの非存在下で刺激された細胞より良好に増殖して、より高いスポット数を生じた。しかし、gp130特異的ASCは、後期慢性期のサルに限って検出可能であり、IgMおよびIgG ASCの場合と同様に、ポリクローナル刺激によって、gp130特異的ASCの有意により高い数が得られ、PD-1を遮断すると、ASCの数はさらに増加した。

【０５０７】

インビボPD-1遮断によって、より高いアビディティを有するSIV env結合抗体が増加して、中和Ab力価が増加する：慢性SIV感染症を有するアカゲザルにおいてPD-1をインビトロで遮断すると、SIV env結合Abの力価の増加が起こった。インビボPD-1遮断後のenv Abのアビディティを測定した。処置動物においてenv Abの力価が増加したのみならず、結合Absのアビディティも同様に増加することが見いだされた。これは、アビディティが処置後に減少した対照Ab処置動物では当てはまらなかった。

【０５０８】

中和活性も同様にPD-1処置動物において査定したところ、一次SIV単離体に対する中和は有意差はなかったが、TCLA SIV株に対する中和は、処置動物において有意に異なり、動物2匹は、中和Ab力価の3～6倍増加を示すことが見いだされた。

【０５０９】

スーティマンガベイにおけるB細胞サブセットの分布：SIVの天然の宿主の1つであるスーティマンガベイは、アカゲザルと同等の持続的な高いウイルス力価にもかかわらず、AIDSを発症しない。このため、SMは、RMにおける病原性のSIV感染症の研究に関する興味深い「対照」モデルとなる。非感染（n＝8）およびSIV-感染（n＝10）スーティマンガベイ（SM）のコホートを調べた。健康なSMは健康なRMよりはるかに少ない循環中の総B細胞を有し、RMとは異なり、本発明者らはSMにおけるSIV感染後の循環中の総B細胞の百分率の減少を認めなかった。同一のB細胞サブセットがSMにおいて同定されたが、SMにおけるサブセットの分布はRMの分布とは非常に異なっていた。ナイーブB細胞は主要な末梢血B細胞サブセット（＞40％）を構成し、大部分のメモリーB細胞サブセットは組織様メモリーB細胞であり、RMの場合のように活性化メモリーB細胞ではなかった。RMと同様に、SMにおける循環中のメモリーB細胞の＜10％が静止期メモリーB細胞であったが、RMと比較すると、活性化メモリーB細胞の百分率はSMでは有意に低かった。SIV感染後、活性化メモリーB細胞の枯渇は起こらなかった；実際に静止期および活性化メモリーB細胞の百分率はいずれもわずかに増加したが、これらの変化は統計学的有意性に達しなかった。SMのB細胞サブセットにおけるPD-1発現は、RMの場合と同様に活性化メモリーB細胞において最高であったが、RMとは異なり、PD-1発現は組織メモリーB細胞において等しく高かった。RMとSMのあいだのもう1つの有意な差は、RMとは異なり、PD-1発現細胞の割合がSMではSIV感染後に増えたことであった。

【０５１０】

実施例30：PD-1アンタゴニストの効能を決定する方法

被験対象を処置するためのPD-1アンタゴニストの効能は、中和抗体の存在、メモリーB細胞の増殖、ナイーブB細胞の増殖を測定する段階、および／またはCD28$^+$ T細胞を測定することなどの、B細胞を測定する段階によって決定されうる。一般的に、中和抗体、メモリーB細胞の増殖、ナイーブB細胞の統計学的に有意な増加、および／またはCD28+ T細胞を測定することは、PD-1アンタゴニストが被験対象を処置するために有効であることを示している。B細胞は、たとえばその双方が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,378,276号および／または米国特許第6,376,459号において記述されるように測定されうる。PD-1アンタゴニストには、PD-L1およびPD-L2に対して特異的に結合する抗体が含

まれ、たとえば米国特許第7,432,059号を参照されたい。

【０５１１】

PD-1アンタゴニストの効能を決定する段階は、被験対象から生物学的試料を得る段階を伴う。血液試料または末梢血単核球試料などの生物試料を、持続的感染症を有する被験者などのヒト被験者から採取する。増殖メモリーB細胞、ナイーブB細胞、および／またはCD28$^+$ T細胞の存在を、FACS分析を用いて測定する。中和抗体の存在は、ELISAを用いることなどによって測定されうる。増殖メモリーB細胞、ナイーブB細胞、および／またはCD28+ T細胞、および／または中和抗体の存在を、PD-1アンタゴニストによる処置の前に得られた被験者からの試料などの対照と比較することができる。統計学的検定を行う。対照と比較して被験者に投与後の被験者からの血液試料中の増殖メモリーB細胞および／または中和抗体および／またはCD28+ T細胞が統計学的に有意に増加すれば、PD-1アンタゴニストが被験者を処置するために有効であることを証明している。しかし、ナイーブB細胞は、PD-1アンタゴニストの投与によって影響を受けなかった。

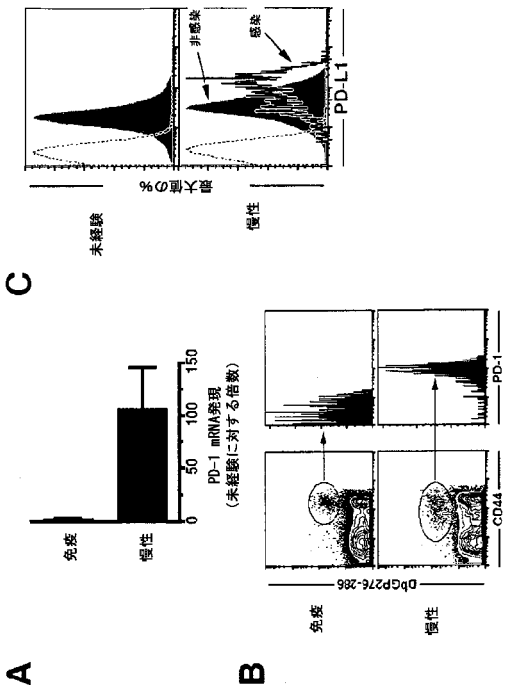
【０５１２】

多数のタイプの被験者を処置して試験した。これらの被験者には、HIV感染症を有する被験者、異種栄養性マウス白血病ウイルス関連ウイルス（XMRV）感染症を有する被験者、およびポリオーマウイルスJC感染症を有する被験者が含まれる。PD-1アンタゴニストは、HIVおよびXMRVを処置するためなどの抗レトロウイルス治療と共に投与されうる。適した被験者にはまた、固形腫瘍、リンパ腫、または白血病などの腫瘍を有する被験者が含まれる。これらの被験者はまた、化学療法剤および／または腫瘍抗原を投与されうる。

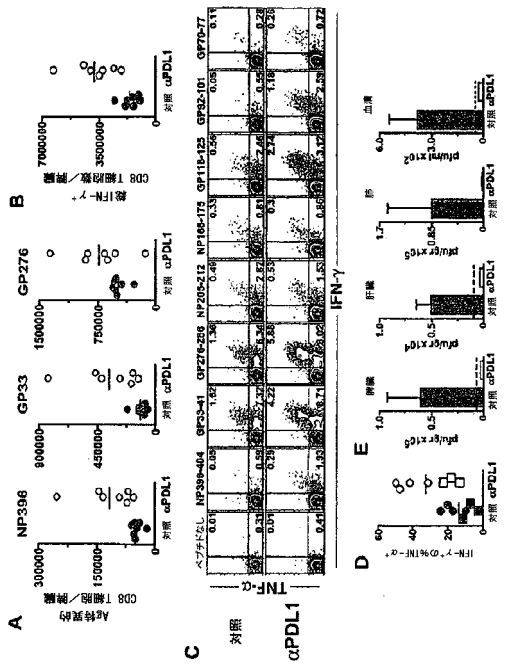
【０５１３】

記述の方法または組成物の正確な詳細を多様化または変更してもよく、それでも記述の本発明の趣旨に含まれることは明らかであろう。本発明者らは、以下の特許請求の範囲の範囲および趣旨に含まれるそのような全ての改変および多様化を請求する。

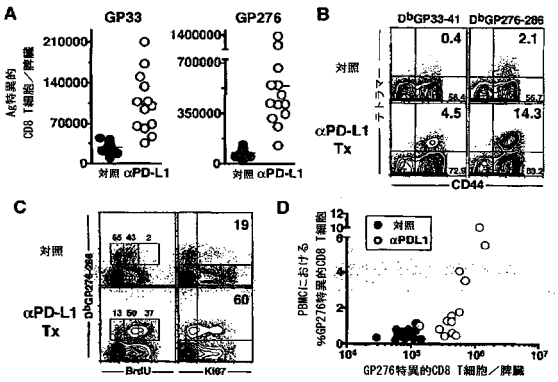
【図１】



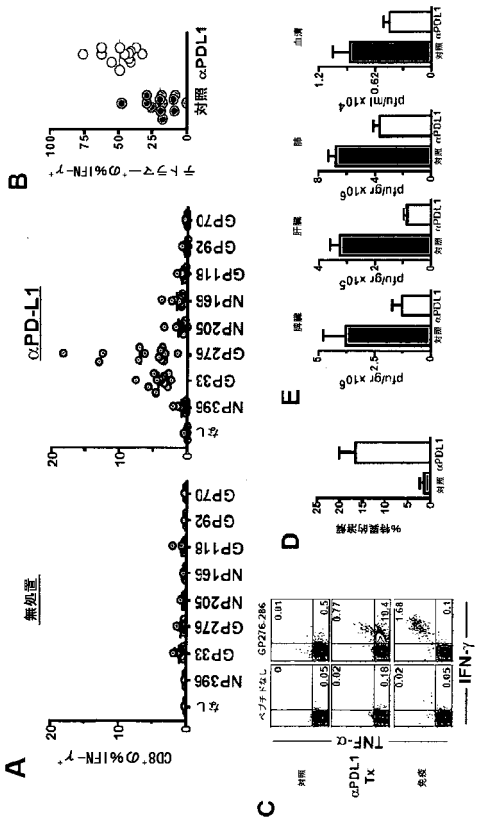

【図２】



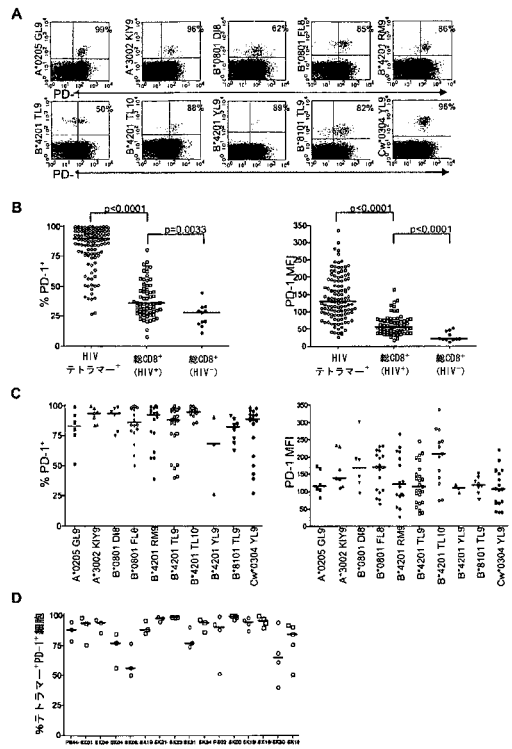
【図３】


A
GP33
GP276
210000
140000
70000
0
1400000
700000
350000
対照 αPD-L1
対照 αPD-L1
B
DbGP33-41
DbGP276-286
対照
αPD-L1 Tx
0.4
2.1
4.5
14.3
CD44
C
対照
αPD-L1 Tx
19
60
BrdU
Ki67
D
対照
αPDL1
GP276特異的CD8 T細胞／脾臓

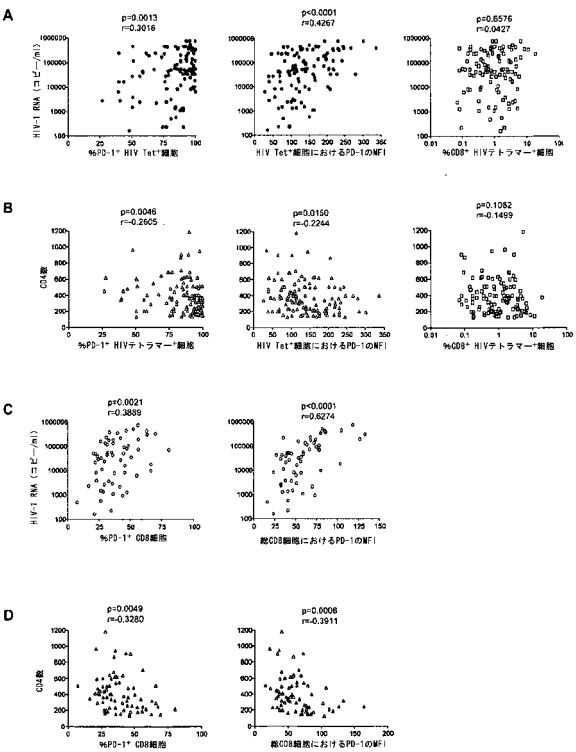
【図４】


A
B
C
D
E
無処置
αPD-L1
対照
αPDL1 Tx
免疫
IFN-γ
TNF-α
%特異的溶解
GP70
GP92
GP118
NP166
NP205
GP276
GP33
NP396
なし

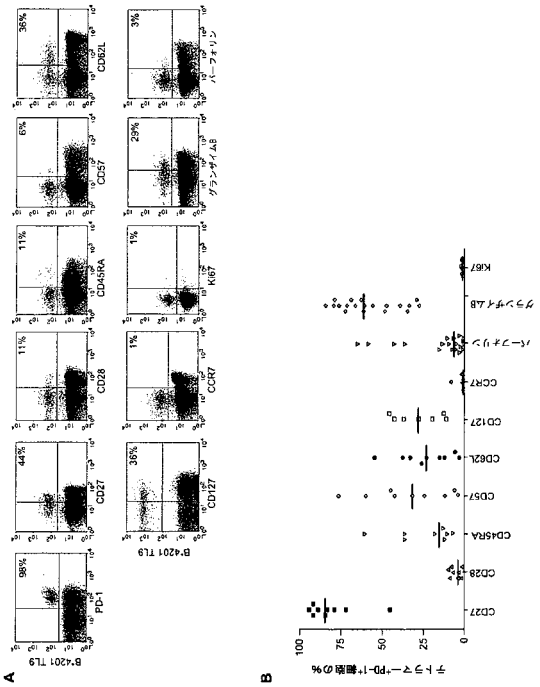
【図５】


A
PD-1
B
p<0.0001
p=0.0033
% PD-1+
PD-1 MFI
HIV テトラマー+
総CD8+ (HIV+)
総CD8+ (HIV-)
C
D
%テトラマー+PD-1+細胞

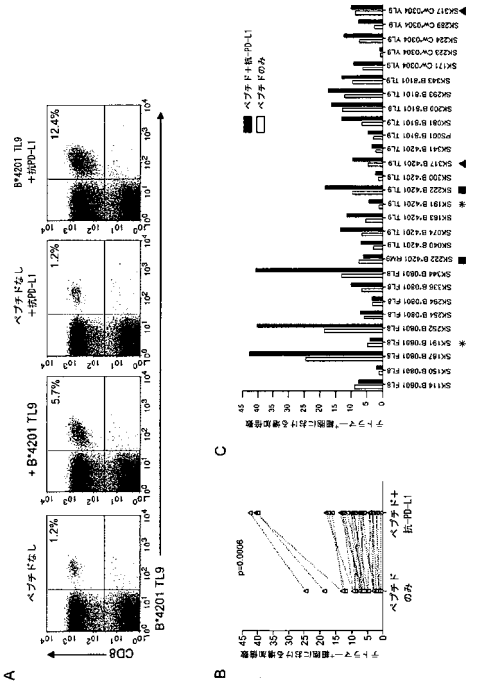
【図６】


A
B
C
D
HIV-1 RNA (コピー/ml)
CD4数
%PD-1+ HIV Tet+細胞
HIV Tet+細胞におけるPD-1のMFI
%CD8+ HIVテトラマー+細胞
%PD-1+ CD8細胞
総CD8細胞におけるPD-1のMFI

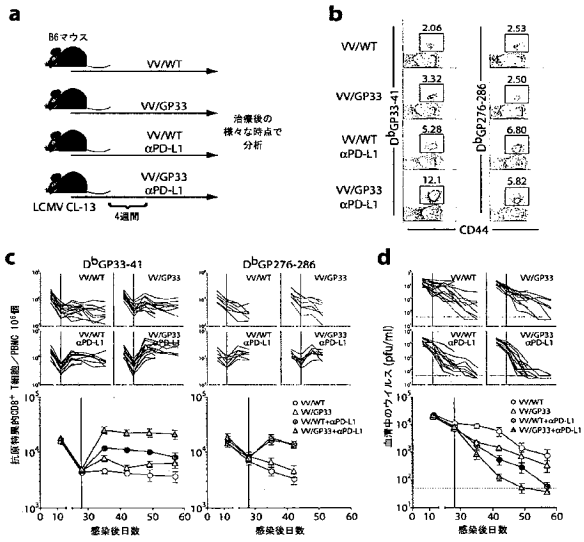
【図７】



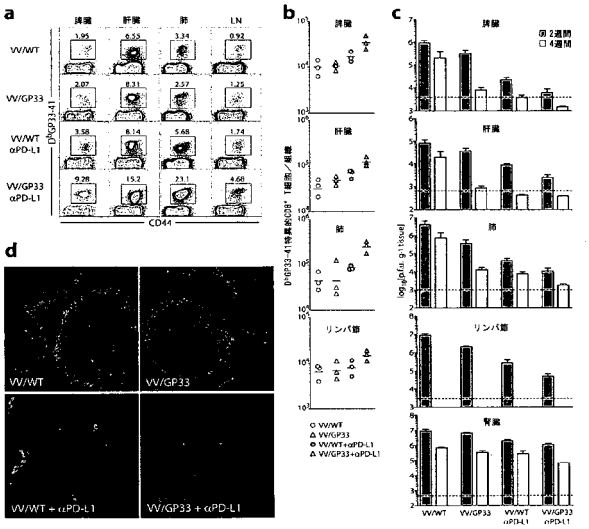
【図８】



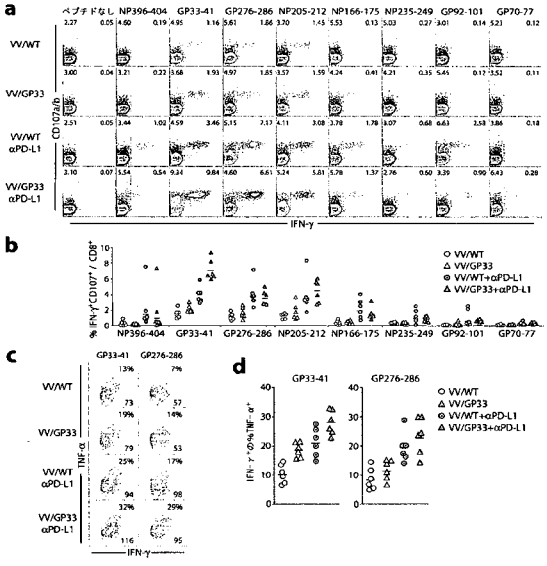
【図９】



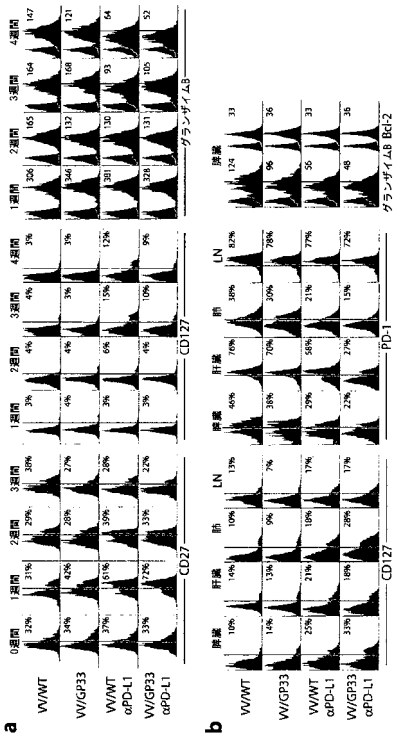
【図１０】



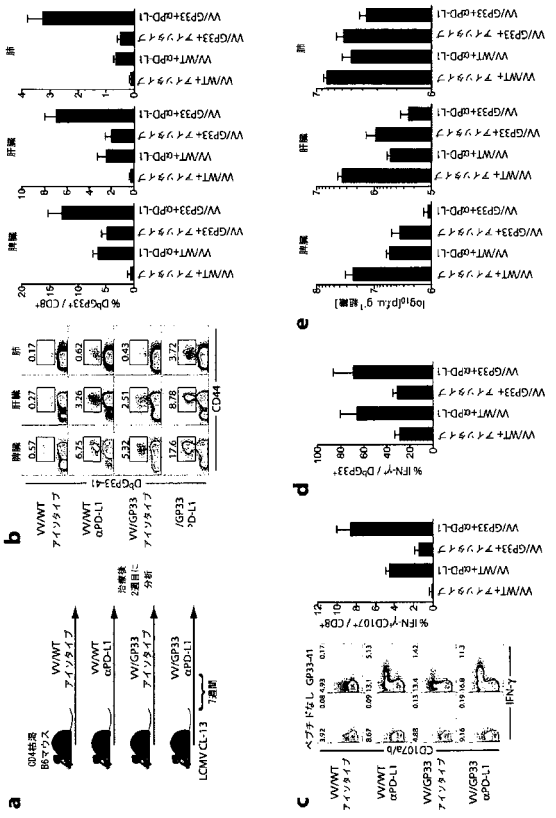
【図１１】



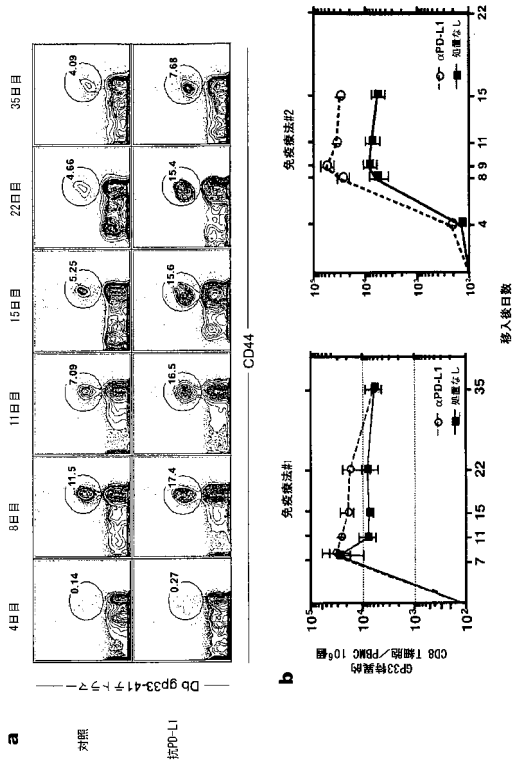
【図１２】



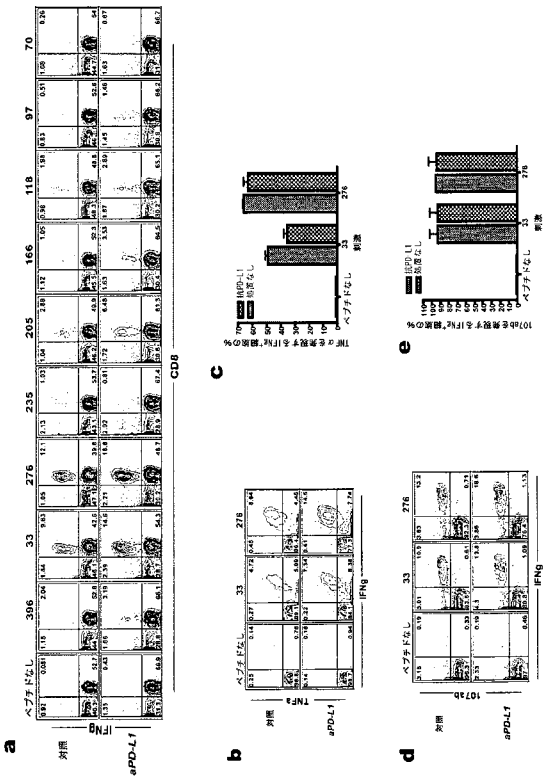
【図１３】



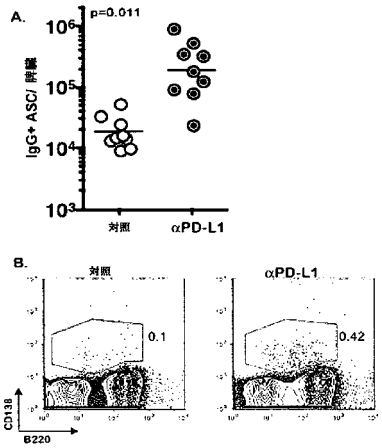
【図１４】



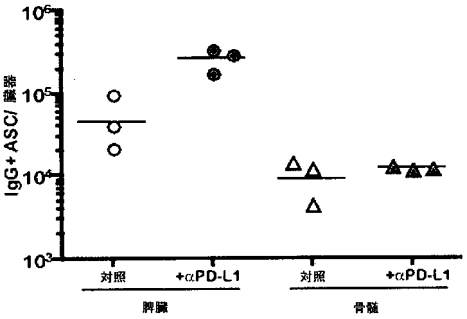
【図１５】



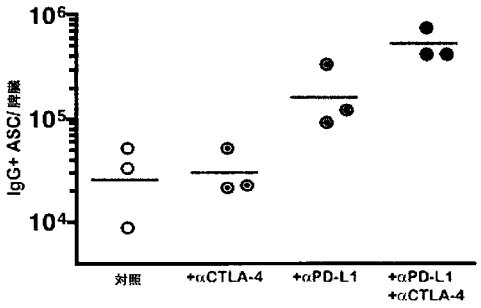

【図１６】



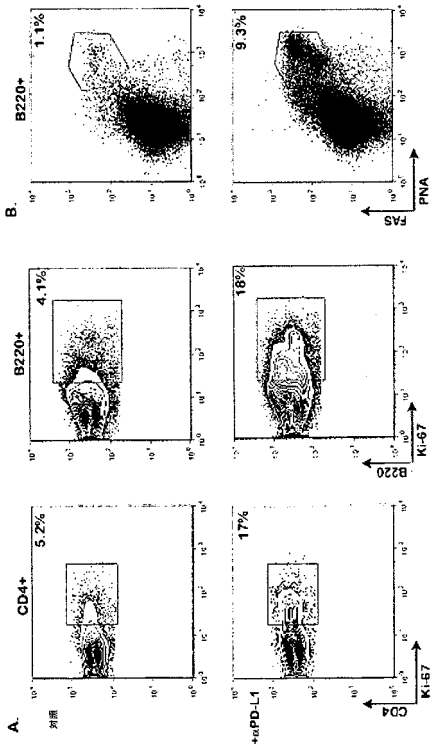

【図１７】



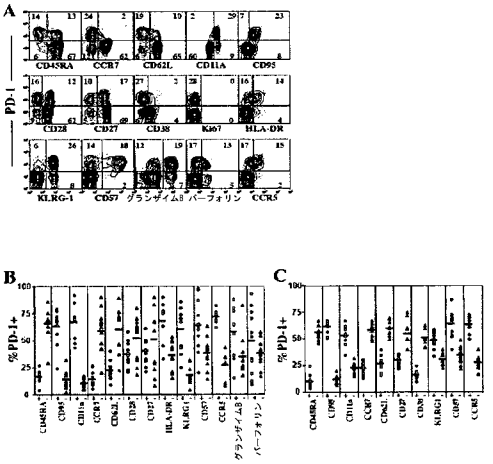

【図１８】



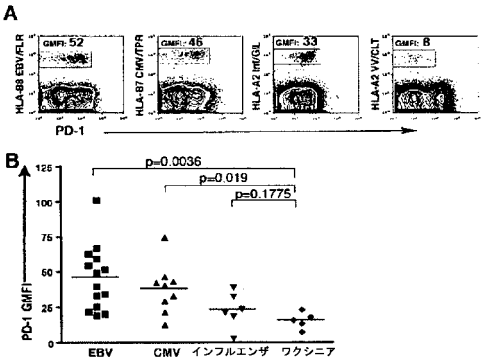

【図１９】



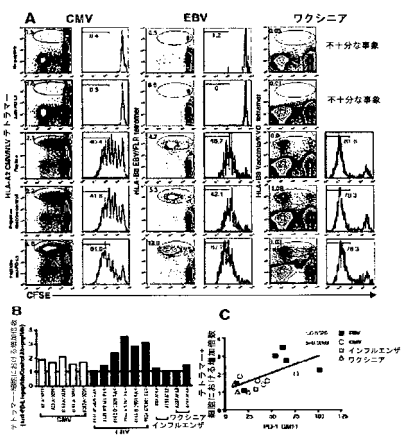
【図２０】



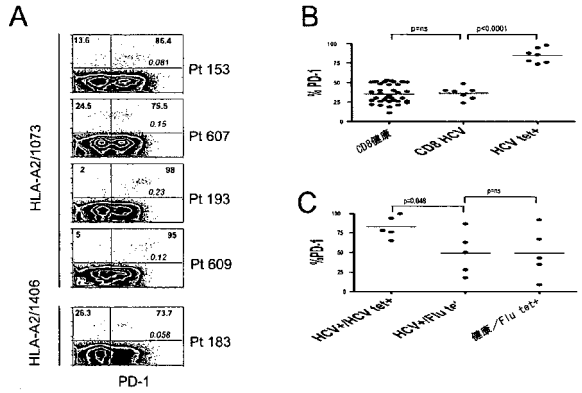

【図２１】



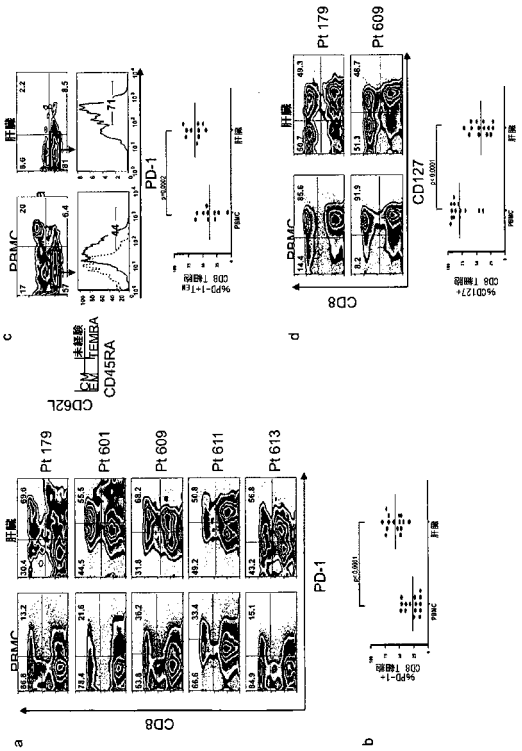

【図２２】



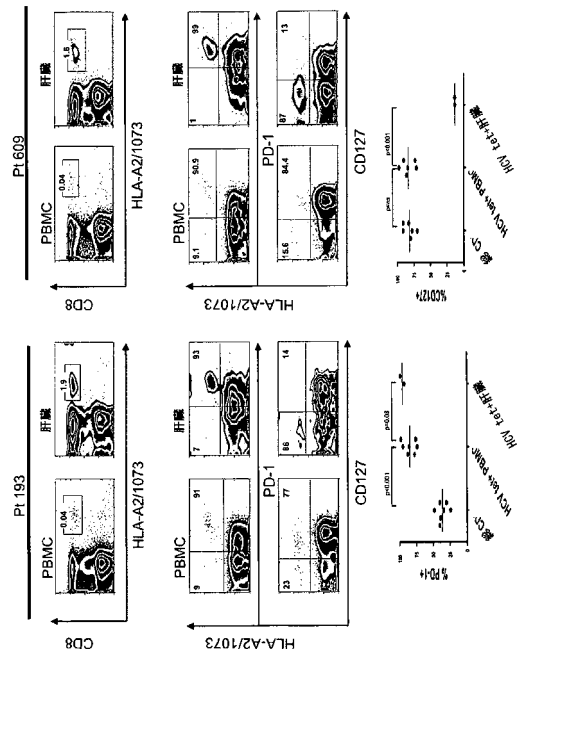

【図２３】



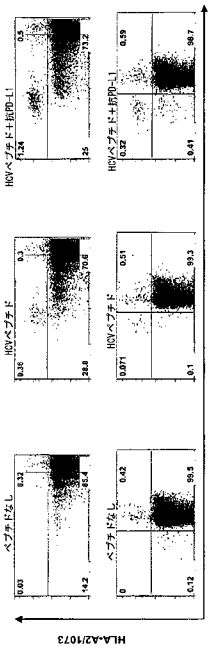

【図２４】



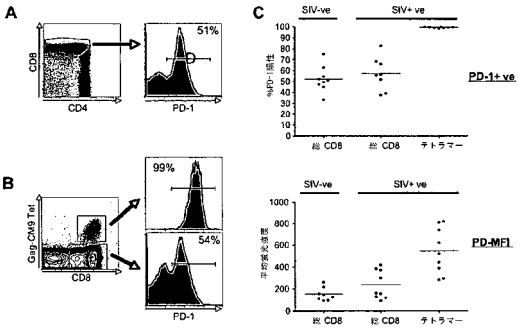

【図２５】



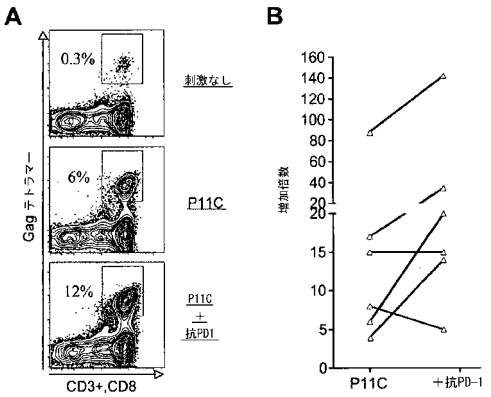
【図２６】



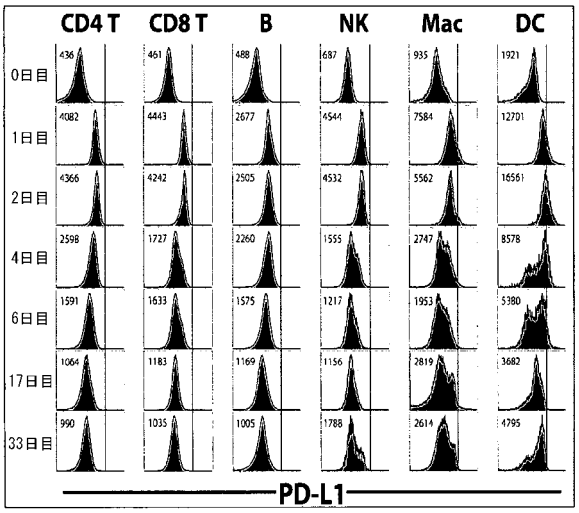

【図２７】



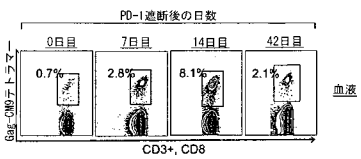

【図２８】



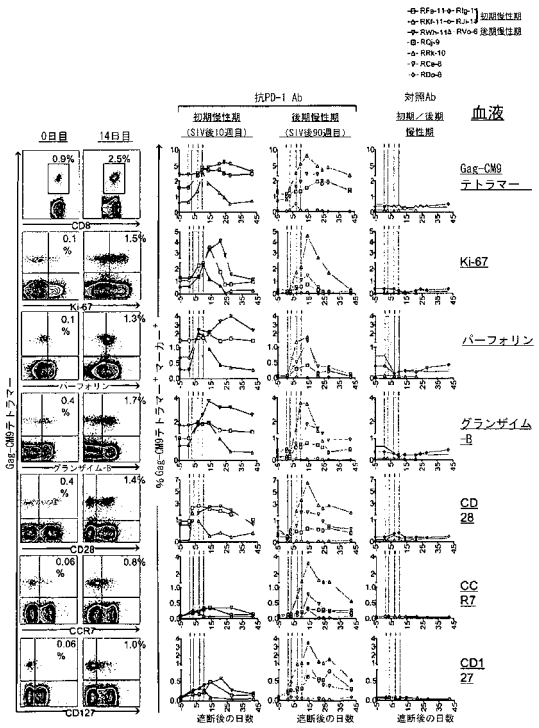

【図２９】



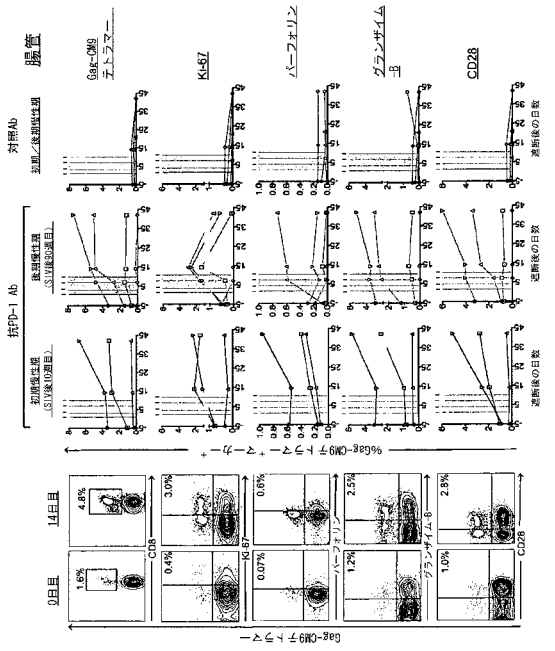

【図３０ａ】



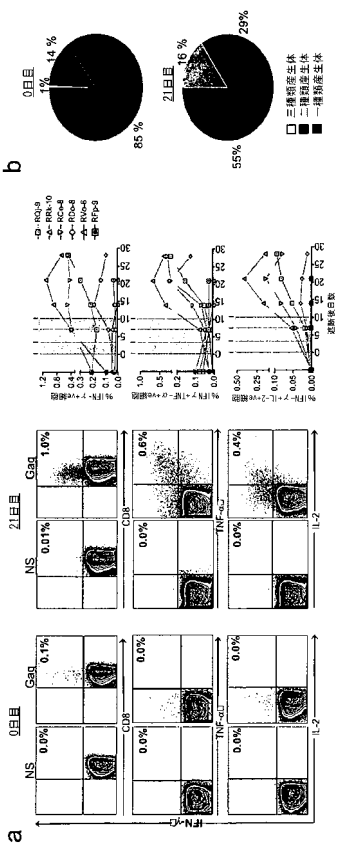

【図３０ｂ】



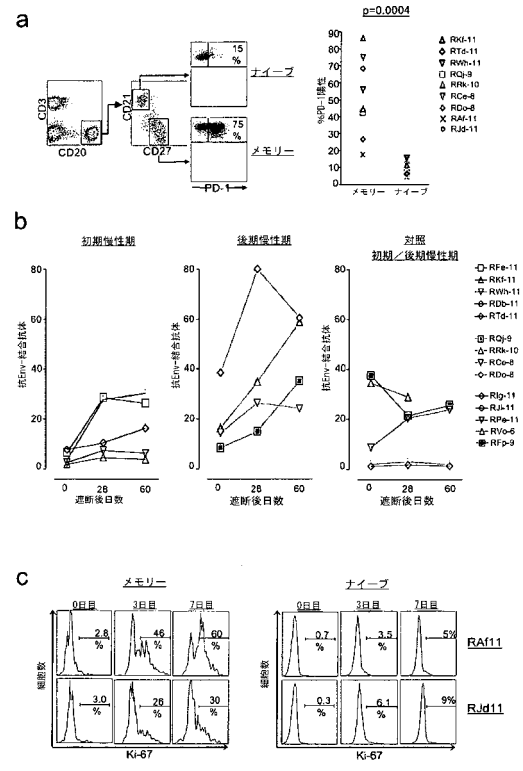
【図３０ｃ】



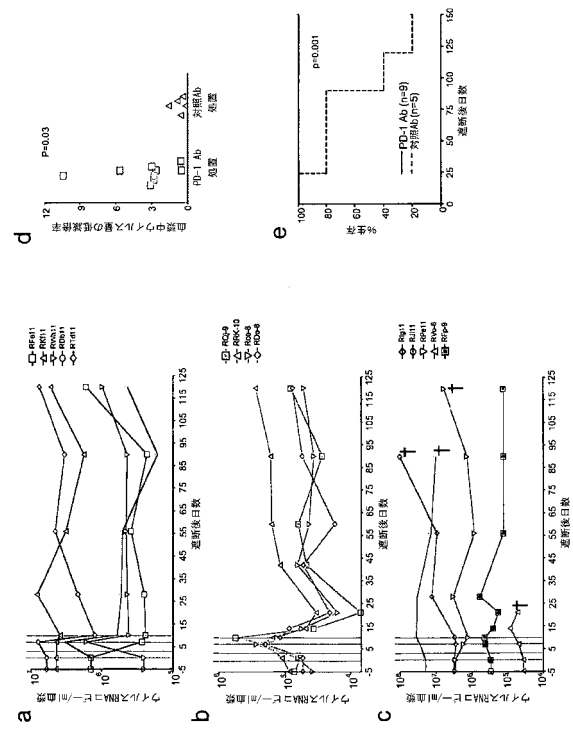
【図３１】



【図３２】



【図３３】



【配列表】
0005520961000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | FI | |
|---|---|---|---|
| ***A61K 39/245*** | ***(2006.01)*** | A61K 39/29 | |
| ***A61K 39/00*** | ***(2006.01)*** | A61K 39/21 | |
| ***A61K 39/02*** | ***(2006.01)*** | A61K 39/245 | |
| ***A61P 35/00*** | ***(2006.01)*** | A61K 39/00 | K |
| ***A61P 31/10*** | ***(2006.01)*** | A61K 39/02 | |
| ***A61P 31/12*** | ***(2006.01)*** | A61K 39/00 | Z |
| ***A61P 31/22*** | ***(2006.01)*** | A61K 39/00 | H |
| ***A61P 31/18*** | ***(2006.01)*** | A61P 35/00 | |
| ***G01N 33/569*** | ***(2006.01)*** | A61P 31/10 | |
| ***G01N 33/53*** | ***(2006.01)*** | A61P 31/12 | |
| ***G01N 33/574*** | ***(2006.01)*** | A61P 31/22 | |
| ***G01N 33/15*** | ***(2006.01)*** | A61P 31/18 | |
| | | G01N 33/569 | H |
| | | G01N 33/53 | D |
| | | G01N 33/574 | E |
| | | G01N 33/569 | L |
| | | G01N 33/569 | A |
| | | G01N 33/569 | B |
| | | G01N 33/50 | Z |
| | | G01N 33/15 | Z |

(74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 アハメド ラフィ
アメリカ合衆国 ジョージア州 アトランタ デュランド ミル ドライブ １８１１
(72)発明者 アマラ ラーマ
アメリカ合衆国 ジョージア州 ジケーター ラビスタ コロニー コート ２８４９

(72)発明者　ビル　ビジャヤクマール
アメリカ合衆国　ジョージア州　タッカー　ランフォード　ロード　１６
(72)発明者　チタンジ　ケミア
アメリカ合衆国　ジョージア州　アトランタ　ビルトモア　ドライブ　ノースイースト　１４３７
(72)発明者　フリーマン　ゴードン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ブルックライン　ウォールナット　ストリート　３０５

審査官　吉田　将志

(56)参考文献　国際公開第２００７／０３０５２３（WO，Ａ1）
国際公開第２００８／０７８６７３（WO，Ａ1）
国際公開第２００６／１３３３９６（WO，Ａ1）
特開２００７－０８９４９６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００８／０８３１７４（WO，Ａ1）
国際公開第２００４／００４７７１（WO，Ａ1）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／４８－９８
Ａ６１Ｋ　３９／００
Ａ６１Ｋ　３９／０２
Ａ６１Ｋ　３９／２１
Ａ６１Ｋ　３９／２４５
Ａ６１Ｋ　３９／２９
Ａ６１Ｋ　３９／３９５
Ａ６１Ｋ　４５／００
Ａ６１Ｐ　３１／１０
Ａ６１Ｐ　３１／１２
Ａ６１Ｐ　３１／１８
Ａ６１Ｐ　３１／２２
Ａ６１Ｐ　３５／００