(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월30일
(11) 등록번호 10-1721707
(24) 등록일자 2017년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7014219
(22) 출원일자(국제) 2009년11월27일
심사청구일자 2014년11월26일
(85) 번역문제출일자 2011년06월20일
(65) 공개번호 10-2011-0099109
(43) 공개일자 2011년09월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/066023
(87) 국제공개번호 WO 2010/063011
국제공개일자 2010년06월03일
(30) 우선권주장
61/118,570 2008년11월28일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008083174 A2*
WO2004004771 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에모리 유니버시티
미국 조지아주 30322 아틀란타 포쓰 플로어 엔이 클리프턴 로드 1599
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴 450
(72) 발명자
아메드 라피
미국 30307 조지아주 아틀랜타 듀랜드 밀 드라이브 1811
아마라 라마
미국 30033 조지아주 디케이터 라비스타 콜로니 코트 2849
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희

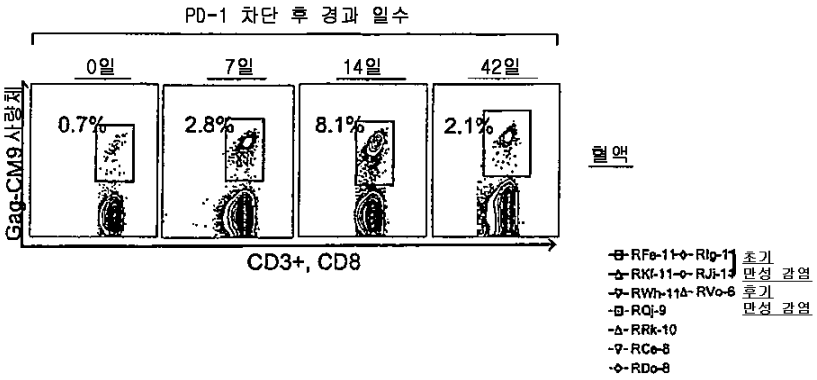
전체 청구항 수 : 총 30 항 심사관 : 김도헌

(54) 발명의 명칭 **감염 및 종양 치료 방법**

(57) 요 약

피험체에서 PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는데 사용될 수 있는 PD-1 길항제가 개시된다. 감염제 또는 종양 세포에 특이적인 면역 반응은 이러한 PD-1 길항제를 상기 감염제 또는 종양과 함께 사용하여 향상될 수 있다. 따라서, 지속성 감염 등의 감염을 앓고 있는 피험체는 PD-1 길항제를 사용하여 치료될 수 있다. 또한, 종양이 있는 피험체도 상기 PD-1 길항제를 사용하여 치료될 수 있다. 일부 사례에서, 피험체는 해당 항원을 인식하는 치료적 유효량의 활성화 T 세포의 이식 및 치료적 유효량의 PD-1 길항제의 투여에 의해 치료될 수 있다. PD-1 길항제를 투여한 피험체에서 PD-1 길항제의 효능을 결정하는 방법 또한 개시되어 있다. 일부 실시 양태에서, 이들 방법은 PD-1 길항제를 투여한 피험체로부터의 샘플에서 기억 B 세포의 증식을 측정하는 것을 포함한다.

대 표 도 - 도30a



(72) 발명자

벨루 비자야쿠마르

미국 30084 조지아주 터커 랑포드 로드 16

티탄지 케미아

미국 30329 조지아주 아틀랜타 발티모어 드라이브 노스이스트 1437

프리맨 고든

미국 매샤츄세츠주 02445 브룩클린 윌넛 스트리트 305

명 세 서

청구범위

청구항 1

피험체를 치료하는데 유용한 PD-1 길항제의 용량을 결정하는 방법으로서, 제1 용량의 PD-1 길항제가 투여된 피험체 유래의 제1 샘플에서 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식을 시험관내(*in vitro*) 측정하는 단계를 포함하고,

대조군과 비교하여 제1 샘플로부터의 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식 증가는 PD-1 길항제의 제1 용량이 피험체 치료에 유용함을 나타내고, 대조군과 비교하여 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포 증식의 유의적인 변경의 부재는 PD-1 길항제의 제1 용량이 피험체를 치료하는데 충분하지 않다는 것을 나타내는 결정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제2 용량의 PD-1 길항제가 투여된 피험체 유래의 제2 샘플에서 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식을 시험관내(*in vitro*) 측정하는 단계를 더 포함하고,

대조군과 비교하여 제2 샘플로부터의 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식 증가는 PD-1 길항제의 제2 용량이 피험체 치료에 유용함을 나타내고, 대조군과 비교하여 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포 증식의 유의적인 변경의 부재는 PD-1 길항제의 제2 용량이 피험체를 치료하는데 충분하지 않다는 것을 나타내는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 대조군과 비교하여 제1 샘플에서 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포 증식의 유의적인 변경이 부재하고, 제2 용량이 제1 용량보다 높은 것인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 대조군과 비교하여 제1 샘플로부터의 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식이 증가하고, 제2 용량이 제1 용량보다 낮은 것인 방법.

청구항 5

PD-1 길항제의 효능을 결정하는 방법으로서, PD-1 길항제가 투여된 피험체 유래의 샘플에서 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식을 시험관내(*in vitro*) 측정하는 단계를 포함하고,

대조군과 비교하여 샘플로부터의 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식 증가는 PD-1 길항제가 피험체를 치료하는데 효과가 있음을 나타내는 결정 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 피험체 유래의 샘플에서 $CD20^{+}CD27^{-}CD21^{+}$ 나이브(naive) B 세포를 시험관내(*in vitro*) 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식을 측정하는 단계는 Ki67의 발현을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식을 측정하는 단계는 Ki67에 특이적으로 결합하는 항체의 사용을 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식을 측정하는 단계는 브로모데옥시우리딘의 혼입을 측정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식을 측정하는 단계는 형광 활성화 세포 분류법(FACS)의 사용을 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 피험체는 바이러스 감염된 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 피험체는 지속성 바이러스 감염된 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 피험체에게 바이러스 항원이 투여되는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 바이러스 감염은 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-림프영양성 바이러스(HTLV), 포진 바이러스, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스, 또는 인간 유두종 바이러스에 의한 감염인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 피험체는 종양을 갖는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 피험체에게 종양 항원이 투여되는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 종양 관련 항원이 PRAME, WT1, 서바이빈(Survivin), 사이클린 D, 사이클린 E, 프로테이나아제 3 및 이의 펩티드 PR1, 호중구 엘라스타제, 카텝신 G, MAGE, MART, 티로시나아제, GP100, NY-Eso-1, 허셉틴(herceptin), 암태아 항원(CEA), 또는 전립선 특이 항원(PSA)인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 피험체는 진균 감염 또는 박테리아 감염된 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 PD-1 길항제는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체, PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체, PD-L2에 특이적으로 결합하는 항체, 소형 억제성 항-PD-1 RNAi, 소형 억제성 항-PD-L1 RNA, 소형 억제성 항-PD-L2 RNAi, 항-PD-1 안티센스 RNA, 항-PD-L1 안티센스 RNA, 항-PD-L2 안티센스 RNA, 우성 음성(dominant negative) PD-1 단백질, 우성 음성 PD-L1 단백질, 우성 음성 PD-L2 단백질, PD-1의 소형 분자 억제제, 또는 이들의 조합인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체는 (1) 단일클론 항체 또는 이의 기능적 단편, (2) 인

간화 항체 또는 이의 기능적 단편, 또는 (3) 면역글로불린 융합 단백질인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체는 (1) 단일클론 항체 또는 이의 기능적 단편, (2) 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편, 또는 (3) 면역글로불린 융합 단백질인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 PD-L2에 특이적으로 결합하는 항체는 (1) 단일클론 항체 또는 이의 기능적 단편, (2) 인간화 항체 또는 이의 기능적 단편, 또는 (3) 면역글로불린 융합 단백질인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 대조군은 제1 농도의 PD-1 길항제를 투여하기 전에 얻은 피험체로부터의 샘플 또는 표준값인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 피험체는 피험체에서 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식을 증가시키는 것으로 측정된 용량을 투여받은 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 피험체는 치료학적 유효량의 추가 화합물을 투여받은 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 추가 화합물이 항바이러스 화합물, 항박테리아 화합물, 항진균 화합물, 항기생충 화합물, 항염증 화합물, 또는 진통제인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 피험체가 면역억제된 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 피험체가 무증상인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 피험체가 인간인 방법.

청구항 30

유용한 PD-1 길항제를 선별하는 방법으로서,

$CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포를 포함하는 세포군을 제제와 시험관내(*in vitro*) 접촉시키는 단계; 및

$CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식 및/또는 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 항체 분비 세포로의 분화를 시험관내(*in vitro*) 검출하는 단계를 포함하고, 상기 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 증식 증가 및/또는 $CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$ 기억 B 세포의 항체 분비 세포로의 분화 증가는 상기 제제가 PD-1 길항제임을 나타내는 것인 선별 방법.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **우선권 주장**

[0002] 본 출원은 2008년 11월 28일에 출원된 미국 가출원번호 제61/118,570호를 우선권으로 주장하며, 이 출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다.

[0003] **정부 지원에 대한 언급**

[0004] 본 발명은 NIH의 인가번호 RO1 AI057029, R01 AI071852 및 RO1 AI074417 하에 미국 정부의 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에 있어서 일정 권리를 갖는다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 출원은 길항제의 용도, 특히 지속성 감염 및 종양의 치료를 위한 PD-1 길항제의 용도, 및 PD-1 길항제의 유효량을 결정하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 숙주 세포 면역 반응의 면역억제는 지속성 감염 및 종양에 있어서 면역억제 역할을 한다. 지속성 감염은 바이러스가 없어지지 않고 감염된 개체의 특정 세포 내에 잔류하는 감염을 말한다. 지속성 감염은 흔히 숙주 세포의 급성 치사 또는 지나친 손상 유발조차 없이 무증상 감염(silent infection) 및 증식성 감염(productive infection)의 단계를 모두 수반한다. 세 가지 유형의 지속성 바이러스-숙주 상호작용을 들 수 있다: 잠복성, 만성 및 지발성 감염. 잠복성 감염(latent infection)은 재발성 질환의 발병 기간 중 감염성 바이러스가 부족한 것을 특징으로 한다. 만성 감염은 일차 감염 후 감염성 바이러스가 지속적으로 존재하는 것이 특징이며, 만성 또는 재발성 질환을 포함할 수 있다. 지발성 감염(slow infection)은 진행성 질환에 의해 수반되는 지연형 잠복기를 특징으로 한다. 잠복성 감염 및 만성 감염과는 달리, 지발성 감염은 단시간의 바이러스 복제로 시작되지 않을 수 있다. 지속성 감염 중에, 바이러스 유전체는 세포성 DNA에 안정하게 삽입될 수 있거나 또는 부체 상태로 존재할 수 있다. 지속성 감염은 인간 T 세포 백혈병 바이러스, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스, 시토메갈로바이러스, 포진바이러스, 수두 대상포진(varicella-zoster) 바이러스, 홍역 바이러스, 파포바바이러스, 숙주외 세포증식 뮤린 백혈병 바이러스 관련 바이러스(XMRV), 프리온, 간염 바이러스, 아데노바이러스, 파보바이러스 및 유두종 바이러스와 같은 바이러스로 인해 발생된다.

[0008] 지속성 감염이 유지되는 기전은 바이러스와 세포 유전자 발현의 조절 및 숙주의 면역 반응의 변경을 수반할 수 있다. 잠복성 감염의 재활성화는 세포 생리기능의 변화, 또다른 바이러스에 의한 중복 감염 및 물리적 응력 또는 외상과 같은 다양한 자극에 의해 시발될 수 있다. 숙주의 면역억제는 대개 다수의 지속성 바이러스 감염의 재활성화와 관련이 있다.

[0009] 암으로 진단받은 환자에 있어서 면역 반응에 결함이 있다는 사실은 여러 연구에서 밝혀진 바 있다. 다수의 종양 항원들이 특정 암과 관련이 있는 것으로 확인되었다. 많은 종양 항원들이 다발성 고형 종양이라는 관점에서 정의되었다: MAGE 1, 2, & 3(면역성에 의해 규정됨); MART-1/Melan-A, gp100, 암태아 항원 (CEA), HER-2, 무친(즉, MUC-1), 전립선 특이 항원 (PSA) 및 전립선 산성 인산효소 (PAP). 또한, B형 간염 (HBV), 엡스타인-바 (EBV) 및 인간 유두종 (HPV)과 같은 바이러스 단백질은 간세포암종, 임파종 및 자궁경부암의 발달에 있어서 중요한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 암으로 진단된 환자의 면역억제 때문에, 이러한 환자의 선천적인 면역 체계는 종양 항원에 종종 반응하지 못한다.

[0010] 수동적 면역요법과 능동적 면역요법 모두를 종양의 치료에서 사용하는 것이 제안되었다. 수동면역은 해당 피험체에게 항체 또는 세포독성 T 세포와 같은 면역 반응의 구성 요소를 제공한다. 능동 면역요법은 사이토킨, 항체 또는 화학적 화합물과 같은 치료제를 이용하여 면역계가 초회 항원자극을 받아 종양을 외래인자로 인식하는 내인성 면역 반응을 활성화시킨다. 특정 유형의 암의 치료에서 수동 및 능동 면역 모두 성공적으로 유도되었다.

[0011] 일반적으로, 자가면역 질환, 염증성 질환, 알러지, 이식 거부반응, 암, 면역 결핍, 바이러스 감염 및 기타 면역계 관련 장애와 같은 질환을 치료하기 위해 제제의 안전한 용량을 확립하고 안전하고 유효한 치료법을 제공하고자 하는 요구가 지속되고 있다. 또한, PD-1 길항제와 같은 치료제의 특정 용량이 피험체를 효과적으로 치료하는지를 결정하는 방법도 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0012] **발명의 개요**

[0013] PD-1 길항제는 PD-1의 발현 및/또는 활성을 감소시킨다. 지속성 감염 등의 감염 피험체도 PD-1 길항제를 이용하여 치료할 수 있다. 종양이 있는 피험체도 PD-1 길항제를 이용하여 치료할 수 있다. 추가로, PD-1 길항제의 치료적 유효량과 함께 해당 항원을 인식하는 활성화된 T 세포의 치료 유효량을 이식함으로써 피험체를 치료할 수 있다.

[0014] 포유동물 수여자에서 면역 반응을 측정할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 본원에 개시된 치료 방법은 B 세포를 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이 방법은 피험체로부터 얻은 샘플 중에서 기억 B 세포의 증식을 측정하는 것을 포함한다.

[0015] 일부 실시 양태에서, PD-1 길항제가 투여된 피험체에서 PD-1 길항제의 효능을 측정하는 방법이 개시된다. 이들 방법은 PD-1 길항제가 투여된 피험체로부터 얻은 샘플 중 기억 B 세포의 증식을 측정하는 것을 포함하는데, 대조군과 비교하여 샘플의 기억 B 세포의 증식 증가는 PD-1 길항제가 피험체를 치료하는데 효능이 있음을 나타내는 것이다.

[0016] 피험체를 치료하는데 유용한 PD-1 길항제의 용량을 측정하는 방법이 또한 본원에 개시되어 있다. 이들 방법은 PD-1 길항제의 제1 용량을 피험체에게 투여하는 단계, 및 상기 피험체로부터 유래한 제1 샘플 중 기억 B 세포의 증식을 측정하는 단계를 포함한다. 대조군과 비교하여 제1 샘플의 기억 B 세포의 증식 증가는 PD-1 길항제의 제1 용량이 피험체를 치료하는데 유용함을 나타내는 것이다. 대조군과 비교하여 기억 B 세포의 증식이 유의적으로 변경되지 않는다는 것은 PD-1 길항제의 제1 용량이 피험체를 치료하는데 충분하지 않다는 것을 나타낸다.

[0017] 앞서 언급한 특징과 장점 그리고 기타의 특징과 장점들은 첨부된 도면을 참조로 하기에 기술된 여러 실시 양태들의 상세한 설명을 통해 보다 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] **도 1A**는 나이브(naive) 형질전환(transgenic) 마우스, 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV) 암스트롱 면역 감염 마우스(감염 후 약 30일 지남), 또는 CD4-결핍 LCMV-Cl-13 감염 마우스(감염 후 약 30일 지남)의 D^bGP33-41 및/또는 D^bGP276-286 특이적 T 세포에서의 PD-1 mRNA의 수준을 유전자 어레이 분석에 의해 측정하여 나타낸 막대 그래프이다. **도 1B**는 감염 후 약 60일이 지난 LCMV 암스트롱 면역 감염 마우스 및 CD4-결핍 LCMV-Cl-13 감염 마우스에 있어서, $CD8^+$ 사량체$^+$ T 세포에서의 PD-1 표면 발현을 나타내는 유세포 분석(flow cytometry) 실험의 일련의 이미지들이다. 무반응 $CD8^+$ T 세포는 LCMV-Cl-13 바이러스("만성"으로 표지함)에 의한 만성 감염 후 대략 60일이 지난 시점에서 세포 표면에서의 높은 수준의 PD-1 폴리펩티드를 발현하지만, 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세

포는 급성 LCMV 암스트롱 감염("면역"으로 표지함) 상태의 제거 후에 PD-1 폴리펩티드를 발현하지 않는다. **도 1C**는 만성 감염 마우스 및 감염시키지 않은 마우스의 비장 세포에 있어서 PD-L1의 존재를 입증하는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. 이는 바이러스에 의해 감염된 비장 세포에서 PD-L1 발현이 가장 좋음을 입증한다.

도 2A는 Cl-13 감염 마우스를 감염 후 23일 내지 37일이 지난 시점에 처리한 경우, 처리되지 않은 대조군과 비교했을 때 $D^bNP396-404$ 및 $D^bGP33-41$ 특이적 $CD8^+$ T 세포의 수에 있어 약 3배가 증가되었음을 나타내는 일련의 산점도(scatter plot)이다. 기능에 있어서 변화가 있었는지를 측정하기 위해, 8가지의 서로 다른 LCMV 에피토프에 따른 IFN-γ 및 TNF-α 생산성을 측정하였다. **도 2B**는 공지된 모든 $CD8^+$ T 세포 특이성을 측정했을 때, LCMV 특이적 $CD8^+$ T 세포의 총 개수에 있어서 2.3배의 증가가 있었음을 보여주는 산점도이다. **도 2C**는 8가지 서로 다른 LCMV 에피토프에 따른 IFN-γ 및 TNF-α 생산성을 보여주는 일련의 유세포 분석 그래프들이다. **도 2D**는 처리된 마우스에서 보다 더 바이러스 특이적인 $CD8^+$ T 세포가 TNF-α를 생산하는 능력이 있다는 것을 보여주는 산점도이다. **도 2E**는 PD-L1을 차단하는 것도 비장, 간, 폐 및 혈청에 있어서 증진된 바이러스 조절 능력을 유도하였음을 보여주는 일련의 막대 차트들이다.

도 3A는 대조군("untx"로 표지함)과 비교했을 때, 감염 후 46일 내지 60일이 지나 항-PD-L1로 처리된 CD4-결핍 Cl-13 감염 마우스("αPD-L1"로 표지함)에 있어서 $D^bGP33-41$ 및 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포("GP33" 및 "GP276"로 표지함)의 증가를 나타내는 그래프로서, 이 그래프는 처리되지 않은 대조군에 비해 항-PD-L1로 처리된 마우스가 약 7배가 더 많은 $D^bGP276-286$ 특이적 비장 CD8+ T 세포 및 약 4배가 더 많은 $D^bGP33-41$ 특이적인 비장 $CD8^+$ T 세포를 함유하고 있음을 입증한다. **도 3B**는 대조군("untx"로 표지함)과 비교했을 때, 감염 후 46일 내지 60일이 지나 항-PD-L1로 처리된 CD4-결핍 Cl-13 감염 마우스("αPD-L1 Tx"로 표지함)의 비장 내에 $D^bGP33-41$ 및 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포의 증가된 빈도수를 입증하는 유세포 분석의 일련의 이미지들이다. **도 3C**는 BrdU 도입 및 Ki67 발현에 의해 측정하였을 때, 항-PD-L1-처리된 마우스에서 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포 증식이 증가되었음을 입증하는 유세포 분석의 일련의 이미지들이다. **도 3D**는 비장 내의 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포와 비교하여, PBMC 내의 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포를 대비함으로써 알 수 있는 바와 같이, 높은 수준으로 $CD8^+$ T 세포가 확장되는 마우스가 말초혈 단핵 세포(PBMC)에서 뚜렷한 반응을 나타내고 있음을 보여주는 차트이다.

도 4A는 대조군과 비교했을 때, 항-PD-L1-처리된 마우스 내에서 IFN-γ를 생성하는 $D^bGP276-286$ 및 $D^bGP33-41$ 특이적 CD8+ T 세포가 증가됨을 입증하는 일련의 차트들이다. $D^bNP396-404$, $K^bNP205-212$, $D^bNP166-175$ 및 $D^bGP92-101$ 특이적 $CD8^+$ T 세포의 더 높은 빈도수도 항-PD-L1-처리된 마우스에서 검출되었다. **도 4B**는 대조군 마우스에서 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포 중 20%가 IFN-γ를 생성하고 있는 것과 비교하여, 항-PD-L1-처리된 마우스에서는 DbGP276-286 특이적 $CD8^+$ T 세포 중 50%가 IFN-γ를 생성하였음을 나타내는 차트이다. **도 4C**는 처리되지 않은 만성 감염된 마우스보다, 항-PD-L1-처리된 만성 감염된 마우스가 더 높은 수준의 TNF-α를 생성하나, LCMV 암스트롱 바이러스로 면역 감염된 마우스보다는 여전히 더 낮은 수준의 TNF-α를 생성함을 입증하는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. **도 4D**는 ^{51}Cr 유리 시험법(release assay)을 이용하여 측정할 때, 처리되지 않은 감염된 마우스와 대비하여, 항-PD-L1을 이용한 LCMV-Cl-13 감염 마우스의 처리가 바이러스-특이적 T 세포의 생체외 분해 활성을 재개시킨다는 것을 나타내는 차트이다. **도 4E**는 α-PD-L1을 이용하여 LCMV-Cl-13 감염 마우스를 처리한 후, 다양한 장기들 내 바이러스 역가의 감소를 입증하는 일련의 차트들이다. 바이러스 역가는 처리되지 않은 마우스와 비교하여, 항-PD-L1로 처리하고 2주가 지나서 비장에서 약 3배 감소하였고, 간에서 4배 감소하였으며, 폐에서 2배 감소하였고, 혈청에서는 2배 감소하였다.

도 5A는 만성 클레이드 C HIV 감염에서 표적이 되는 우성적 에피토프에 대해 특이적인 10 HIV 사량체를 이용한 PD-1 표면 발현을 보여주는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. 백분율은 $PD\text{-}1^+$인 사량체$^+$ 세포의 백분율을 가리킨다. **도 5B**는 PD-1의 백분율과 MFI가 항레트로바이러스 요법에 나이브한(요법을 적용하지 않은) 개체에 있어서, 총 $CD8^+$ T 세포 집단에 비해 HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포에서 유의적으로 상향 조절되며($p<0.0001$), HIV-감

염군 대 HIV-혈청음성 대조군에서는 PD-1이 총 $CD8^+$ T 세포 집단에 대해서 증가됨(각각 p=0.0033 및 p<0.0001)을 입증하는 일련의 차트들이다. 65개의 HIV-감염 개체 및 11개의 HIV 혈청음성 대조군의 120개의 HIV 사량체 염색이 분석에 포함되었다. **도 5C**는 에피토프 특이성에 의한 사량체$^+$ 세포에 대한 PD-1 발현의 백분율 중간값과 MFI를 보여주는 일련의 차트들이다. **도 5D**는 다수의 검출가능한 반응을 갖는 개체 내에 서로 다른 에피토프-특이적 군집에서 $PD\text{-}1^+$ 세포의 백분율의 변동을 나타내는 차트이다. 수평 막대는 각 개체에서 $PD\text{-}1^+$ HIV 사량체$^+$ 세포의 백분율 중간값을 가리킨다.

도 6A는 사량체 염색에 의해 측정되는 HIV-특이적 CD8+ T 세포의 수와 혈장 바이러스 양(load) 간의 상관 관계가 없는 반면에, 사량체$^+$ 세포에서의 PD-1의 백분율 및 MFI와 혈장 바이러스 양 간에 양(+)의 상관 관계가 있음(각각 p=0.0013 및 p<0.0001)을 나타내는 일련의 차트들이다. **도 6B**는 HIV 사량체$^+$ 세포의 수와 CD4 계수 간에 상관 관계가 없는 반면에, HIV 사량체$^+$ 세포에서의 PD-1의 백분율 및 MFI와 CD4 계수 간에는 역의 상관 관계가 있음(각각 p=0.0046 및 p=0.0150)을 나타내는 일련의 차트들이다. **도 6C**는 총 $CD8^+$ T 세포 군집에서의 PD-1의 백분율 및 MFI가 혈장 바이러스 양과 양의 상관 관계를 가짐(각각 p=0.0021 및 p<0.0001)을 입증하는 일련의 차트들이다. **도 6D**는 총 $CD8^+$ T 세포 집단에서의 PD-1 발현의 백분율 및 MFI가 CD4 계수와 역의 상관 관계를 가짐(각기 p=0.0049 및 p=0.0006)을 보여주는 일련의 차트들이다.

도 7A는 B*4201 TL9-특이적 $CD8^+$ T 세포의 98%가 $PD\text{-}1^+$인 실험 피험체 SK222의 B*4201 TL9-특이적 $CD8^+$ T 세포의 대표적인 표현형 염색을 보여주는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. **도 7B**는 HIV-특이적 CD8+ T 세포의 >95%가 $PD\text{-}1^+$인 사람의 표현형 데이터의 개요를 나타내는 차트이다. 7개 내지 19개 샘플을 각각의 표시된 표현형 마커에 대해 분석하였다. 수평 막대는 표시된 표현형 마커에 대해 양성인 사량체$^+$ $PD\text{-}1^+$ 세포의 백분율 중간값을 가리킨다.

도 8A는 B*4201 양성 피험체의 대표적인 증식 검정 데이터를 보여주는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. 펩티드를 이용하여 6일간 자극한 후에 B*4201 TL9-특이적 CD8+ T 세포의 백분율이 항-PD-L1 차단(blocking) 항체의 존재 하에 5.7%에서 12.4%로 증가하였다. **도 8B**는 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에 HIV-특이적 CD8+ T 세포의 증식이 유의적으로 증가함을 나타내는 개략적인 증식 검정 데이터를 나타내는 선 그래프이다(n=28, p=0.0006, 대응표본 t-검정(paired t-test)). **도 8C**는 개별 환자에 기초한 HIV-특이적 CD8+ T 세포의 증식에 대한 PD-1/PD-L1 차단의 차별적인 효과를 보여주는 막대 그래프이다. 흰색 막대는 펩티드 단독의 존재 하에서의 사량체$^+$ 세포의 증가 배수를 가리키고, 흑색 막대는 펩티드 + 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에서의 사량체$^+$ 세포의 증가 배수를 가리킨다. 하나 이상의 에피토프에 대해 CFSE 검정을 수행했던 개체를 별 기호, 사각형 기호 또는 삼각형 기호로 표시한다.

도 9A-9D는 만성 감염된 마우스에서 항원-특이적 CD8-T 세포 빈도수 및 바이러스 역가에 대한 PD-L1 차단을 겸한 치료 백신의 상승 효과를 보여주는 다이어그램과 한 세트의 그래프이다. **도 9A**는 실험 프로토콜의 개략적인 다이어그램이다. LCMV 클론-13 (CL-13)-감염된 마우스를 감염 4(주) 후에 야생형 우두 바이러스 (VV/WT) 또는 LCMV GP33-41 에피토프-발현 우두 바이러스 (VV/GP33)로 백신 접종하였다. 동시에, 상기 마우스를 3일 간격으로 항-PD-L1을 사용하여 혹은 이의 사용없이 5회 처리하였다. **도 9B**는 요법 1주일 후 PBMC에서 GP33- 및 GP276-특이적 CD8-T 세포의 빈도수를 보여주는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. 숫자는 CD8-T 세포 당 사량체$^+$ 세포의 빈도수를 나타낸다. 데이터는 3개의 실험에 대해서 나타낸 것이다. 도 **9C-9D**는 요법 후 혈액에서의 GP33- 및 GP276-특이적 CD8-T 세포의 빈도수 (도 **9C**) 및 바이러스 역가 (도 **9D**)의 그래프이다. 사량체$^+$ CD8-T 세포 및 바이러스 역가의 수변화를 각각 사량체 염색 및 플라크 분석을 통해 정해진 시점에 혈액 내에서 모니터링하였다. VV/WT 또는 VV/GP33으로 감염 (직선) 및 항-PD-L1로 처리 (음영 부분)한 후, 개개의 마우스 개체(위쪽 4개의 패널) 및 여러 개체의 마우스(아래 패널)에 대해 사량체$^+$ CD8-T 세포수 및 바이러스 역가의 수를 나타내었다. 점선은 바이러스 검출 한계를 나타낸다. 3개의 실험으로부터 결과를 수집하였다.

도 10A-10D는 PD-L1 차단을 겸한 치료 백신이 투여된 마우스의 서로 다른 조직에서 항원-특이적 CD8-T 세포가 증가하였음과 바이러스 조절이 향상되었음을 보여주는 그래프와 디지털 이미지들이다. **도 10A**는 치료 후 4주가 지난 뒤 서로 다른 조직에서 GP33-특이적 CD8-T 세포의 빈도수를 보여주는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들

이다. 숫자는 CD8-T 세포 당 GP33 사량체+ 세포의 빈도수를 나타낸다. 데이터는 2개의 실험에 대해서 나타낸 것이다. **도 10B**는 치료 후 4주가 지난 뒤 서로 다른 조직에서의 GP33-특이적 $CD8^+$ T 세포수 그래프이다. **도 10C**는 치료 후 2주 후(채워진 부분) 및 4주 후(빈 부분)에 지정된 조직에서 바이러스 역가를 보여주는 한 세트의 막대 그래프이다. 점선은 바이러스 검출 한계를 나타낸다. 그룹당 n=6 마우스. 2개의 실험으로부터 결과를 수집하였다. **도 10D**는 치료 후 2주가 지난 뒤 LCMV 항원(적색)을 갖는 비장을 면역-염색한 것의 디지털 이미지이다. 확대(×20).

도 11A-11D는 PD-L1 차단을 겸한 치료 백신에 의해, 소진된 CD8-T 세포에서의 향상된 기능 회복을 보여주는 플롯과 그래프이다. **도 11A**는 치료 후 4주가 지난 뒤 백신 접종한 마우스의 비장 세포에 의한 IFN-γ 생산과 탈과립화를 보여주는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. 비장 세포를 αCD107a/b 항체의 존재 하에 정해진 펩티드로 자극시킨 후 IFN-γ에 대해 공동 염색하였다. 나타낸 플롯은 CD8-T 세포에 대해서 게이팅하였으며 2개의 독립적인 실험에 대해 나타낸 것이다. **도 11B**는 도 11A의 각각의 LCMV 펩티드에 대해 특이적인 CD8-T 세포 당 $IFN\text{-}\gamma^+CD107^+$ 세포의 백분율을 여러 개체의 마우스에 대해서 개괄하였음을 보여주는 그래프이다(각 반응에 있어서 n=6). 2개의 실험으로부터 결과를 수집하였다. **도 11C**는 백신 접종한 마우스에서 IFN-γ를 생산할 수 있는 CD8-T 세포의 TNF-α 생성을 보여주는 한 세트의 플롯이다. GP33-41 또는 GP276-286 펩티드로 비장 세포를 자극시킨 후, IFN-γ를 생성하는 CD8-T 세포를 차단한 후에 IFN-γ (x-축) : TNF-α (y-축)에 대해 플롯팅하였다. 플롯 상의 위와 아래의 숫자는 각각 $IFN\text{-}\gamma^+$ 세포들 사이에서 $TNF\text{-}\alpha^+$ 세포들의 빈도수 및 $IFN\text{-}\gamma^+$ 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 나타낸다. 데이터는 2개의 독립적인 실험에 대한 것이다. **도 11D**는 도 11C의 GP33-41 또는 GP276-286 펩티드에 있어서 $IFN\text{-}\gamma^+$ 세포에 대한 $TNF\text{-}\alpha^+$ 세포의 백분율을 여러 개체의 마우스에 대해 개괄하였음을 보여주는 그래프이다(각 반응에 있어서 n=6).

도 12A-12B는 PD-L1 차단을 겸한 치료 백신의 효과가 만성 감염된 마우스의 항원-특이적 CD8-T 세포의 표현형을 변화시킴을 보여주는 한 세트의 플롯이다. **도 12A**는 요법 후 정해진 시점에 PBMC 내에서 GP33 사량체-특이적 CD8-T 세포의 표현형을 보여주는 한 세트의 플롯이다. 막대 그래프는 $GP33^+$ CD8-T 세포에 게이팅하였다. 높은 수준의 CD27 또는 CD127을 발현하는 군집의 빈도수는 플롯 상에 백분율로 표시하였다. 그랜자임 B의 막대 그래프 상의 숫자는 발현의 MFI를 나타낸다. 데이터는 3개의 독립적인 실험에 대해서 나타낸 것이다. **도 12B**는 치료 후 4주가 지나 서로 다른 조직에서 GP33 사량체-특이적 CD8-T 세포의 표현형 변화를 보여주는 한 세트의 플롯이다. 히스토그램은 $GP33^+$ CD8-T 세포에 게이팅하였다. 높은 수준의 CD127 또는 PD-1을 발현하는 군집의 빈도수는 플롯 상에 백분율로 표시하였다. 그랜자임 B 및 Bcl-2의 막대 그래프 상의 숫자는 발현의 MFI를 나타낸다. 데이터는 2개의 독립적인 실험에 대해서 나타낸 것이다.

도 13A-13E는 '무력'하여 소진된 $CD8^+$ T 세포에서 기능 복원에 대한 PD-L1 차단과 조합된 치료 백신의 상승적 효과를 보여주는 개략적인 다이어그램, 플롯 및 그래프들이다. **도 13A**는 프로토콜의 개략적인 다이어그램이다. 마우스에 CD4 T 세포를 결핍시긴 후 LCMV 클론-13으로 감염시켰다. 일부 마우스를 감염 후 7주가 지난 뒤에 야생형 우두 바이러스 (VV/WT) 또는 LCMV GP33-41 에피토프-발현 우두 바이러스 (VV/GP33)로 백신 접종하였다. 동시에, 마우스를 αPD-L1 또는 그의 이소타입을 이용해 3일 간격으로 5회 처리하였다. 항체의 초기 처리 후 2주가 지나서, 마우스를 희생시켜 분석하였다. **도 13B**는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들과 요법 후 4주째에 지정된 조직에서 GP33-특이적 CD8-T 세포의 빈도수를 나타내는 막대 그래프이다. 숫자는 CD8-T 세포 당 GP33 사량체$^+$ 세포의 빈도수를 나타낸다. 서로 다른 조직에서 $CD8^+$ T-세포 당 GP33-특이적 세포의 빈도수도 요약하였다. **도 13C**는 비장세포를 αCD107a/b 항체의 존재 하에 GP33 펩티드로 자극시킨 후 IFN-γ에 대해 공동 염색한 실험의 결과를 보여주는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. 나타낸 플롯은 CD8-T 세포에 대해 게이팅하였다. GP33 펩티드에 대해 특이적인 CD8-T 세포 당 $IFN\text{-}\gamma^+CD107^+$ 세포의 백분율을 여러 마우스에 대해 개괄하였다. **도 13D**는 여러 개체의 마우스에 대해 개괄한, Db-제한된 GP33-41 사량체$^+$ 세포 당 GP33 펩티드로 자극한 후의 $IFN\text{-}\gamma^+$ 세포의 백분율의 막대 그래프이다. **도 13E**는 요법 후 2주 시점에 지정된 조직에서의 바이러스 역가의 막대 그래프를 나타낸 것이다. 모든 플롯은 두 실험에 대해 나타낸 것이며 모든 요약된 실험 결과는 두 실험으로부터 수집하였다(그룹 당 n=6 마우스).

도 14A-14B는 선천적인 담체 마우스로의 입양 전달 후 PD1/PD-L1 신호 전달 경로의 차단이 항원-특이적 T 세포의 총수를 증가시키는 것을 보여주는 한 세트의 플롯과 그래프이다. 비장 세포 전부를 항-PD-L1을 이용한 요법

을 사용하거나 사용하지 않고 선천적인 담체 마우스 내로 입양 전달시켰다. **도 14A**는 $CD8^+$ T 세포에 게이팅된 특정 시점에서의 대표적인 한 세트의 유세포 분석 플롯이다. **도 14B**는 두 독립적인 실험으로부터 말초 혈액 내의 D^bGP33-특이적 $CD8^+$ T 세포 증식의 역동적 변화를 보여주는 그래프이다(그룹당 n=4 동물).

도 15A-15E는 입양 T 세포 면역요법 후 PD-1/PDL1 경로의 차단이 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포에서 사이토킨 생성을 증대시키는 것을 보여주는 플롯과 그래프이다. 비장 세포를 입양 전달 후 17일째에 단리하여 항원성 펩티드로 자극할 때의 사이토킨 발현에 대해 분석하였다. **도 15A**는 정해진 CD8 에피토프로 자극하거나 또는 펩티드 조절 없이 5시간 동안 자극 후, 세포 내 사이토킨 염색에 의해 평가된 IFN-γ의 발현에 대하여 나타낸 대표적인 한 세트의 플로우 플롯이다. **도 15B 및 15D**는 TNFα 또는 107ab 및 IFN-γ의 이중 발현에 대해 나타낸 대표적인 플롯이다(4분면의 통계 수치는 CD8 게이트의 백분율임). **도 15C 및 15E**는 TNFα 또는 107ab를 발현하는 IFN-γ 생성 세포의 백분율 그래프이다 (그룹 당 n=3 동물).

도 16A-16B 는 LCMV 클론-13 감염된 마우스에서 항체 분비 세포의 증가된 수준을 보여주는 그래프와 플롯이다. ELISPOT 및 CD138 염색에 의한 αPD-L1 처리 후 만성 LCMV 감염된 마우스에서 총 ASC 수준을 측정하였다. **도 16A**는 3개의 독립적인 실험 결과들을 개괄한 비장 ASC의 총수를 그래프로 나타낸 것이다. **도 16B**는 비장에서 항체 분비 세포 (ASC)의 증가가 마커 CD138에 의해 측정될 수 있다는 것을 보여주는 한 세트의 그래프이다. 한 대표적인 플롯은 ASC가 $CD138^+$이고 B220(낮은 수준/중간수준)임을 나타낸다(림프구에 게이트됨).

도 17은 만성 LCMV 감염된 마우스의 항-PD-L1을 이용한 처리가 골수 ASC의 수준을 상승시키지 않는다는 것을 보여주는 그래프이다. ASC의 총수는 ELISPOT에 의한 항-(α)PD-L1 처리 후 14일째에 만성 LCMV 감염된 마우스의 비장과 골수로부터 계산하였다.

도 18은 αPD-L1 및 αCTLA-4의 공동 투여가 비장 ASC의 상승적 증가를 유도하는 것을 보여주는 그래프이다. 만성 LCMV 감염된 마우스에 αPD-L1, αCTLA-4, 또는 양자 모두를 14일간 투여하고 비장의 ASC를 ELISPOT로 계산하였다. 실선은 처리군 내의 기하학적 평균을 나타낸다.

도 19A-19B는 αPD-L1 처리된 마우스에서 증대된 B 세포 및 CD4 T 세포 증식과 배중심 활성을 나타내는 플롯이다. **도 19A**는 αPD-L1 처리 후 상승된 Ki-67 수준을 보여주는 CD4 T 세포 및 B 세포의 유세포 분석 플롯이다. 결과들은 각 칼럼에 위에 열거된 바와 같이 CD4 또는 B 세포에 대해 게이팅되었다. **도 19B**는 αPD-L1로 처리된 마우스에서 증진된 배중심 활성을 의미하는 것으로서, PNA 및 높은 수준의 FAS를 발현하는 B 세포의 증가된 빈도수를 보여주는 한 세트의 플롯이다. 플롯은 두 개의 별개 실험의 결과를 개괄하는 하나의 대표적인 그래프이다.

도 20A-20C는 CD8 및 CD4 T 세포 하위군에 있어서 PD-1 발현을 보여주는 플롯과 그래프이다. **도 20A**는 혈액 중 $CD8^+/CD3^+$ 림프구들 사이에 있어서 PD-1 및 다양한 표현형 마커들의 공동 발현을 나타내는 실험의 유세포 분석 일련의 이미지들이다. **도 20B**는 PD-1을 발현하는 다양한 $CD8^+/CD3^+$ 및 (D) $CD4^+/CD3^+$ T 세포 하위군의 백분율을 나타낸 한 세트의 플롯이다. 수평 막대들은 지정된 마커에 대해 양성(빈 원) 및 음성 (검게 칠한 삼각형)인 T 세포에 대한 PD-1의 평균 백분율을 의미한다. **도 20C**는 한 피험체에서 PD-1을 발현하는 $CD4^+$ T 세포의 표현형 데이터를 나타내는 한 세트의 플롯이다.

도 21A-B는 만성 감염에 특이적인 $CD8^+$ T 세포 중에서 PD-1이 보다 높게 발현되는 것을 입증하는 플롯 및 그래프이다. **도 21A**는 엡스타인 바 바이러스 (EBV), 시토메갈로바이러스 (CMV), 인플루엔자 및 우두 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 대표적인 PD-1 염색을 보여주는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. 사량체$^+$ 세포들 중에 PD-1 발현의 기하학적 평균 형광 강도(GMFI)는 지정되어 있다. **도 21B** 는 건강한 자원자들 (n=35)의 EBV, CMV, 인플루엔자 및 우두 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포에 대한 PD-1 GMFI를 요약한 것을 나타내는 플롯이다.

도 22A-C는 항-PD-L1 차단이 만성 감염에 특이적인 $CD8^+$ T 세포의 시험관 내 증식을 증가시키는 것을 입증하는 플롯과 그래프이다. **도 22A**는 CFSE로 표지된 후, 정해진 조건 하에 6일간 배양한 림프구를 보여주는 유세포 분석 실험의 일련의 이미지들이다. 이 이미지들은 EBV 및 CMV 양성 피험체의 대표적인 염색 패턴을 보여준다. **도 22B**는 항-PD-L1 차단 항체로 차단한 후의 EBV, CMV, 인플루엔자 및 우두 바이러스 항원-특이적 반응의 막대 그래프이다. 막대는 펩티드 단독일 때와 비교한 펩티드 및 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에서의 사량체$^+$ 세포의

증가된 배수를 나타낸다. **도 22C**는 항-PD-L1 차단 후의 사량체+ 세포에서의 배수 증가와 PD-1 발현과의 관계(배양 전)를 보여주는 직선 그래프이다.

도 23B-23C는 인간 만성 HCV 감염에서 PD-1을 발현하는 C형 간염 바이러스 (HCV) 특이적 $CD8^+$ T 세포를 보여주는 플롯과 그래프이다. **도 23A**는 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포에서 PD-1의 발현을 보여주는 만성 HCV 감염을 앓고 있는 5명의 환자에 대한 대표적인 플롯이다. 볼드체 숫자는 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포 (y-축)에 대한 PD-1 발현 (x-축)의 빈도를 나타낸다. 플롯 내의 이탤릭체 숫자는 총 $CD8^+$ T 세포들 중에서 사량체 양성 세포의 빈도를 나타낸다. y-축 상에서, 1073 및 1406은 사량체의 HCV 에피토프 특이성을 나타낸다. 환자들은 환자 번호가 수반되는 "Pt"로 확인된다. 세포를 $CD8^+$ 림프구에 게이팅하였다. 플롯은 로그 스케일로 구성하였다. **도 23B**는 건강한 공여자(CD8 Healthy), HCV 감염된 환자(CD8 HCV)의 $CD8^+$ T 세포 및 $CD8^+$ HCV 특이적 T 세포 (HCV tet+)에서의 PD-1 발현을 비교한 것이다. **도 23C**는 HCV (HCV tet+)에 특이적인 $CD8^+$ T 세포에 있어서 PD-1 발현과 비교하여, HCV 감염자 (HCV+) 및 건강한 공여자 (Healthy)의 인플루엔자 바이러스 (Flu tet+)에 특이적인 $CD8^+$ T 세포에 있어서의 PD-1 발현 그래프이다. 대응표본 t 시험을 사용하여 동일한 환자에서 총 $CD8^+$ T 세포 : HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포에 있어서의 PD-1의 발현 차이를 비교하였다.

도 24A-24D는 간에서 PD-1을 발현하는 $CD8^+$ T 세포의 빈도가 말초 혈액에서 보다 높다는 것을 보여주는 플롯과 그래프이다. **도 24A**는 만성 HCV 감염을 앓고 있는 5명의 환자의 간과 말초 혈액에서 총 $CD8^+$ T 세포의 발현을 보여주는 대표적인 플롯이다. 플롯 내의 볼드체 숫자는 림프구 게이트 내 총 $CD8^+$ T 세포들 중에서 PD-1 발현을 보이는 세포들의 빈도수를 나타낸다. 플롯은 로그 스케일로 구성하였다. **도 24B**는 HCV 만성 감염된 환자의 간과 말초 혈액의 $CD8^+$ T 세포에 있어서 PD-1 발현을 비교한 것이다. 대응표본 t 시험을 사용하여 동일한 환자에서 PD-1 발현에 있어서 차이를 비교하였다. **도 24C**는 간과 말초 혈액의 $CD8^+$ 효과기 기억 (T_{EM}) 세포에서의 PD-1 발현을 비교한 것이다. 기억 하위군들을 CD62L 및 CD45RA의 차별적 발현에 의해 확인하였다. 플롯 상부의 볼드체 숫자들은 각 사분면에서 세포의 빈도를 나타낸다. 세포들을 $CD8^+$ 림프구에 게이팅하였다. T_{EM} 하위군을 게이팅하고(박스친 부분) PD-1의 발현을 하기 히스토그램 플롯에 나타내었다. 점선은 나이브한 $CD8^+$ T 세포 (음성 군집으로 사용됨)에서의 PD-1 발현을 보여준다. 히스토그램 플롯 내의 숫자는 PD-1을 발현하는 세포의 빈도수를 나타낸다. 만성 HCV 감염을 앓고 있는 10명의 환자에 대해서 $CD8^+$ T_{EM} 세포에서의 PD-1 발현의 빈도수를 비교한 것을 히스토그램 플롯 아래에 요약하였다. 대응표본 t 시험을 사용하여 동일한 환자에 있어서 간과 말초 혈액의 $CD8^+$ T_{EM} 세포에서의 PD-1 발현의 차이를 비교하였다. **도 24D**는 만성 HCV 감염을 앓고 있는 2명의 환자의 간과 말초 혈액의 총 $CD8^+$ T 세포에 있어서 CD127 발현의 차이를 보여주는 대표적인 플롯이다. 볼드체 숫자는 총 $CD8^+$ 세포에 있어서 CD127 발현의 빈도수를 나타낸다. 세포들을 $CD8^+$ 림프구에 게이팅하였다. 플롯은 로그 스케일로 구성하였다. 간에 대한 말초 혈액 내에서의 총 $CD8^+$ T 세포에 대한 CD127 발현을 FACS 플롯 아래 요약하여 나타내었다. 대응표본 t 시험을 통계학적 분석을 위해 사용하였다.

도 25는 간에서 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포가 소진된 표현형을 발현함을 보여주는 한 세트의 그래프와 플롯이다. 만성 HCV 감염을 앓고 있는 2명의 환자에 있어서 말초 혈액과 간에서의 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포에 대한 PD-1 및 CD127 발현의 대표적인 플롯을 나타내었다. 플롯의 첫 번째 열은 HCV 사량체 양성인 군집(박스 부분)을 나타낸다. 박스 위에 숫자는 $CD3^+$ 림프구 중에서 사량체 양성인 세포의 빈도수를 나타낸다. HCV 사량체의 에피토프 특이성은 y-축 상에서 확인된다 (1073). 플롯의 두 번째와 세 번째 열은 만성 HCV 감염을 앓고 있는 2명의 환자에 있어서 말초 혈액과 간에서의 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포에 대한 PD-1 및 CD127 발현을 보여준다. 볼드체 숫자는 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포에 대한 PD-1 및 CD127 발현의 빈도수를 나타낸다. 플롯은 로그 스케일로 구성하였고 CD3+ CD8+ 림프구에 게이팅하였다. FACS 플롯 아래에는, 총 $CD8^+$ T 세포 : 말초의 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포(HCV

tet+ PBMC) : 간의 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포(HCV tet+ 간)에 있어서 PD-1 발현 (좌측) 및 CD127 발현 (우측)에 대해 비교 요약한 것을 나타내었다. 대응표본 t 시험을 사용하여 동일한 환자에서 발현을 비교하였다.

도 26은 PD-1/PD-L1 경로의 차단이 항원 자극된 HCV-특이적 T 세포의 증식을 증가시키는 것을 보여주는 한 세트의 플롯이다. 2명의 별개 HLA-A2 환자에서 유래한 CFSE 표지된 PBMC를 IL-2 및 항-PD-L1 항체 (위쪽) 또는 항-PD-1 항체 (아래쪽)의 존재 하에 6일간 동종의 펩티드 항원을 이용하여 자극시켰다. 자극시키지 않은 대조군도 나타내었다. $CFSE^{low}$- 및 $CFSE^{high}$-HCV-특이적 HLA-$A2^+$ $CD8^+$ T 세포의 증식 백분율을 각 사분면에 나타내었다.

도 27A-27D 는 SIV239 감염 후 유인원 면역결핍 바이러스 (SIV) 특이적 $CD8^+$ T 세포에 있어서 상승된 PD-1 발현을 보여주는 플롯과 그래프이다. **도 27A**는 정상적인 짧은꼬리원숭이의 총 $CD8^+$ T 세포에 있어서 PD-1 발현을 보여주는 플롯이다. **도 27B**는 정상적인 짧은꼬리원숭이의 총 $CD8^+$ T 세포 및 SIV gag-특이적 $CD8^+$ T 세포에 있어서 PD-1 발현을 보여주는 플롯이다. SIV-감염 후 12주째에 PBMC 상에서 분석을 행하였다. **도 27C**는 정상적인 짧은꼬리원숭이 및 SIV-감염된 짧은꼬리원숭이의 총 $CD8^+$ T 세포 및 SIV 특이적 $CD8^+$ T 세포에 대한 $PD\text{-}1^+$ 세포의 개요를 제공하는 그래프이다. SIV-감염된 짧은꼬리원숭이에 대한 데이터는 감염 후 12주째에 나타냈다. **도 27D** (마지막 패널)는 정상적인 짧은꼬리원숭이 및 SIV-감염된 짧은꼬리원숭이의 총 $CD8^+$ T 세포 및 SIV 특이적 $CD8^+$ T 세포에 있어서 PD-1 발현의 평균 형광 강도(MFI)의 개요를 제공하는 그래프이다.

도 28A-28B는 각각 시험과 내 PD-1의 차단이 SIV-특이적 $CD8^+$ T 세포의 향상된 증식을 유도한다는 것을 보여주는 플롯과 그래프이다. SHIV89.6P로 감염된 *Mamu A*01*$^+$ 짧은꼬리원숭이의 PBMC를 항-PD-1 차단 Ab (10㎍/㎖) 의 부재 및 존재 하에 P11C 펩티드 (0.1㎍/㎖)로 6일간 자극시켰다. 3일간의 자극 후, IL-2 (50 유닛/㎖)를 첨가하였다. 자극의 마지막에 세포를 CD3, CD8 및 Gag-CM9 사량체의 표면에 대해 염색하였다. 자극되지 않은 세포(nostim)는 음성 대조군으로서 역할을 하였다. 세포를 산점도에 기초하여 림프구에 게이팅한 후, CD8 및 사량체의 발현에 대해 분석하였다. **도 28A** 는 대표적인 FACS 플롯이다. 그래프 상의 숫자는 총 $CD8^+$ T 세포의 백분율로서 사량체 양성 세포의 빈도수를 나타낸다. **도 28B** 는 6마리의 짧은꼬리원숭이의 데이터 개요를 나타내는 그래프이다. 감염 후 12주에 수득된 세포를 이용하여 분석을 수행하였다. P11C 자극된 배양물 및 자극되지 않은 세포에서의 사량체 양성 세포의 빈도수 비율로서 배수 증가를 산출하였다.

도 29는 LCMV 감염 후 서로 다른 세포 유형에 대한 PD-L1, PD-L2 및 PD-1 발현의 역동적 변화를 보여주는 한 세트의 플롯이다. 마우스를 2×10^6 pfu의 클론-13 (CL-13)으로 감염시켰다. 서로 다른 세포 유형에 대한 PD-L1, PD-L2 및 PD-1 발현을 감염 후 정해진 시점에서의 히스토그램으로 나타냈다. 세포의 지정된 유형에 대한 PD-1 발현의 평균 형광 강도(MFI)를 나타내었다.

도 30a-30c는 만성 SIV 감염 동안 생체내 PD-1 차단이 혈액과 장(gut)에서 기능성이 개선된 Gag-CM9-특이적 CD8 T 세포를 증가시킨다는 것을 보여주는 FACS 플롯이다. **도 30a**은 짧은꼬리원숭이 RRk10의 대표적인 FACS 플롯이다. **도 30b 및 30c**는 혈액(도 30b) 및 장(결장직장 점막 조직)(도 30c)에서 Gag-CM9-사량체 양성 CD8 T 세포의 양 및 표현형을 보여주는 FACS 플롯이다. 대표적인 FACS 플롯은 좌측에 도시되어 있고, 모든 Mamu A*01 양성 동물에 대한 요약은 우측에 도시되어 있다. FACS 플롯상의 수는 총 CD8 T 세포의 백분율로서 사량체 양성 세포의 빈도를 나타낸다. 화살표 및 수직선은 항-PD-1 항체 또는 대조군 항체 치료를 나타낸다.

도 31a-31b는 만성 SIV 감염 동안 생체내 PD-1 차단이 다작용성 바이러스 특이적 CD8 T 세포를 증가시킨다는 것을 보여준다. **도 31a**는 총 CD8 T 세포의 백분율로서 Gag-특이적 사이토킨 분비성 CD8 T 세포의 빈도를 나타낸다. 대표적인 FACS 플롯은 좌측에 도시되어 있고, 모든 그룹에 대한 요약은 우측에 도시되어 있다. 화살표 및 수직선은 항-PD-1 항체 또는 대조군 항체 치료를 나타낸다. 선들은 항-PD-1-항체 치료된 짧은꼬리원숭이를 나타내며, 적색선은 대조군 항체 치료된 짧은꼬리원숭이를 나타낸다. 도 31b는 총 사이토킨 양성 세포의 백분율로서 발현된 사이토킨 동시발현 서브세트를 도시한다. 각 그룹에 대한 평균 백분율이 도시되어 있다.

도 32a-32b는 만성 SIV 감염 동안의 생체내 PD-1 차단이 SIV 특이적 체액성 면역을 증가시킨다는 것을 보여준다. **도 32a**는 SIV 감염 후 및 생체내 PD-1 차단 전에 혈액 중 기억($CD20^+CD27^+CD21^-$) 및 나이브 ($CD20^+CD27^-CD21^+$) B 세포에서의 PD-1 발현을 도시한다. **도 32b**는 차단 후 혈청에서의 항-SIV Env 결합 항체의 역가를 도시한다. **도 32c**는 차단 후에 기억 및 나이브 B 세포에서의 Ki67 발현(증식 마커)을 도시한다. FACS 플

롯 상의 수는 각각의 총 세포의 백분율로서 Ki67 양성 세포를 나타낸다. 짧은꼬리원숭이 RAf11 및 RJd11을 SIV 감염 22주 후에 항-PD-1 항체 및 항-레트로바이러스 요법으로 동시에 치료하였다.

도 33a-33e는 생체내 PD-1 차단이 혈장 바이러스 혈증을 감소시키고 SIV 감염된 짧은꼬리원숭이의 생존을 연장시켰다. 짧은꼬리원숭이의 혈장 바이러스 양을 초기 만성 감염 동안 항-PD-1 항체로 처리하고(**도 33a**), 짧은꼬리원숭이를 후기 만성 감염 동안 항-PD-1 항체로 처리하고(**도 33b**), 짧은꼬리원숭이를 초기/후기 SIV 만성 감염 동안 대조군 항체로 치료하였다(**도 33c**). 별표는 동물의 사망을 나타낸다. **도 33d**는 0일 내지 28일(초기 만성 연구) 또는 0일 내지 21일(후기 만성 연구)의 혈장 바이러스 양의 감소 배수를 도시한다. **도 33e**는 PD-1 차단 후에 SIV 감염된 짧은꼬리원숭이의 생존을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] **서열 목록**

[0020] 첨부된 서열 목록에 기재된 핵산과 아미노산 서열을 37 C.F.R. 1.822에 규정된 바와 같이 뉴클레오티드 염기에 대한 표준 문자 약어 및 아미노산에 대한 3문자 코드를 사용하여 나타내었다. 각 핵산 서열의 한 가닥만을 나타내지만, 상보적 가닥은 제시된 가닥을 참조하여 포함시킬 수 있는 것으로 이해하면 될 것이다. 첨부된 서열 목록은 다음과 같다:

[0021] 서열번호: 1은 인간 PD-1의 대표적인 아미노산 서열이다.

[0022] 서열번호: 2는 마우스 PD-1의 대표적인 아미노산 서열이다.

[0023] 서열번호: 3은 인간 PD-L1의 대표적인 아미노산 서열이다.

[0024] 서열번호: 4는 인간 PD-L2의 대표적인 아미노산 서열이다.

[0025] 서열번호: 5-12는 인간 기본골격 영역(framework region)의 대표적인 아미노산 서열이다.

[0026] 서열번호: 13-35는 항원 펩티드의 대표적인 아미노산 서열이다.

[0027] 서열번호: 36-43은 주조직적합성 펩티드의 아미노산 서열이다.

[0028] 서열번호: 44 및 서열번호: 45는 T 세포 에피토프의 아미노산 서열이다.

[0029] 서열번호: 46은 변형체 인간 PD-L2의 대표적인 아미노산 서열이다.

[0030] 서열번호: 47-52 항원 펩티드의 대표적인 아미노산 서열이다.

[0031] 서열번호: 53-56은 프라이머의 핵산 서열이다.

[0032] **발명의 상세한 설명**

[0033] 본원은 종양 또는 지속성 바이러스 감염 등에 대한 면역 반응 유도를 위한 PD-1 길항제의 용도에 관한 것이다. 또한, 본원은 피험체의 치료에 효과적인 PD-1 길항제의 용량을 결정하는 방법에 관한 것이다.

[0034] **용어**

[0035] 달리 언급되지 않는 한, 기술적 용어들은 통상적인 용법에 따라 사용된다. 분자 생물학에서 통상적인 용어들의 정의는 문헌 [Benjamin Lewin, *Genes V,* Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9)]; [Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)]; 및 [Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)]에서 찾을 수 있다.

[0036] 본원의 다양한 실시 양태 검토의 용이한 검토를 위해, 하기 구체적인 용어의 설명을 제공한다:

[0037] **변경:** 파라미터에 대한 대조값과 비교하여 그 파라미터의 통계학적으로 유의적인 변화. 일례에서, "증가"는 대조군과 비교하여 기억 B 세포의 수 또는 증식과 같은 파라미터의 통계학적으로 유의적인 상승이다. 적절한 통계학적 분석은 당업계에 잘 알려져 있으며, 스튜던츠 T 테스트 및 ANOVA 분석을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 예에서, p 값 ≤ 0.05이다. 다른 예에서, 증가 또는 감소와 같은 유의적인 변경은 평균으로부터 2 표준 편차 또는 그 이상의 변화이다. "유의적인 변경 부재"는 적절한 통계학적 시험을 이용한 값의 변화가 통계

학적 유의성을 실현하지 않는다는 것을 의미한다. 일부 실시예에서, p 값 > 0.05이다. 다른 예에서, "유의적인 변경의 부재"는 평균으로부터의 2 표준 편차 미만인 감소 또는 증가이다. 일부 실시 양태에서, 기억 B 세포의 증식에서와 같이 "증가" 또는 "상승"은 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 2배, 3배, 4배 또는 5배 증가이다. 일례에서, "감소" 또는 "저하"는 대조군과 비교하여 기억 B 세포의 수 또는 증식과 같은 파라미터의 통계학적으로 유의적인 하락이다. 적절한 통계학적 분석은 당업계에 잘 알려져 있으며, 스튜던츠 T 테스트 및 ANOVA 분석을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 실시 양태에서, 기억 B 세포의 증식에서와 같은 "감소"는 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 2배, 3배, 4배 또는 5배 감소이다.

[0038] **안티센스, 센스, 및 안티진(Antigene):** DNA는 두 역평행(antiparallel) 가닥인, (+)가닥으로 언급되는 5'→3' 가닥과 (-)가닥으로 언급되는 3'→5' 가닥을 가진다. RNA 중합효소가 5'→3' 방향으로 핵산을 첨가하기 때문에, DNA의 (-)가닥은 전사 중 RNA에 대한 주형으로서 작용한다. 따라서, RNA 전사체는 (-)가닥에 상보적인 서열, (+)가닥과 동일한 서열을 가질 것이다(U가 T로 대체되는 것은 예외).

[0039] 안티센스 분자는 RNA 또는 DNA의 (+)가닥에 특이적으로 하이브리드될 수 있거나 또는 특이적으로 상보적인 분자이다. 센스 분자는 DNA의 (-)가닥에 특이적으로 하이브리드될 수 있거나 또는 특이적으로 상보적인 분자이다. 항원 분자는 DNA 표적에 배당된 안티센스 또는 센스 분자이다. 안티센스 RNA (asRNA)는 센스 (코딩) 핵산 분자에 상보적인 RNA 분자이다.

[0040] **증폭:** 핵산과 관련하여 사용되는 경우, 이는 샘플 또는 시험편에서 핵산 분자의 복제수를 증가시키는 기술을 일컫는다. 증폭의 예로서는 중합효소 연쇄 반응이 있는데, 이것은 개체로부터 수집된 생물학적 샘플과 한쌍의 올리고뉴클레오티드 프라이머를, 상기 샘플 내의 핵산 주형에 프라이머의 하이브리드화가 가능한 조건 하에 접촉시키는 것이다. 프라이머는 적절한 조건 하에 신장되고, 주형으로부터 해리된 후, 재결합되고, 신장된 후 해리하여 핵산의 복제수를 증폭시킨다. 시험관 내 증폭의 산물은 표준 기법을 이용한 전기영동, 제한효소 절단 패턴, 올리고뉴클레오티드 하이브리드화 또는 라이게이션, 및/또는 핵산 시퀀싱이 특징이다. 시험관 내 증폭 기법의 다른 예로서는 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification, 미국 특허 제5,744,311호 참조); 비전사 등온(transcription-free isothermal) 증폭 (미국 특허 제6,033,881호 참조); 복구 연쇄 반응(repair chain reaction) 증폭 (WO 90/01069 참조); 리가아제 연쇄 반응 증폭 (EP-A-320 308 참조); 갭 필링(gap filling) 리가아제 연쇄 반응 증폭 (미국 특허 제5,427,930호 참조); 커플링된 리가아제 검출(coupled ligase detection)과 PCR(미국 특허 제6,027,889호 참조); 및 NASBA™ RNA 비전사 증폭 (미국 특허 제6,025,134호 참조)을 포함한다.

[0041] **항체:** 에피토프 (예를 들어, 종양 또는 바이러스 항원 또는 이의 단편과 같은 항원)를 특이적으로 인식하여 결합하는 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 가변부를 적어도 포함하는 폴리펩티드 리간드. 이는 온전한 면역글로불린 및 당업계에 잘 알려진 이들의 변형체 및 일부, 예컨대 Fab' 단편, $F(ab)'_2$ 단편, 단쇄 Fv 단백질 ("scFv") 및 이황화물 안정화(disulfide stabilized) Fv 단백질 ("dsFv")을 포함한다. scFv 단백질은 한 면역글로불린의 경쇄 가변부와 하나의 면역글로불린의 중쇄 가변부가 링커에 의해 결합된 융합 단백질인 반면에, dsFv에서는 이황화 결합을 도입해 사슬의 결합을 안정화시키기 위해 사슬들이 변화되었다. 또한, 이 용어는 유전공학적으로 가공된 형태, 예컨대 키메라 항체 (예를 들어, 인간화된 쥐과 항체), 헤테로접합 항체 (예를 들어, 이중특이성 항체)도 포함한다. 문헌 [*Pierce Catalog and Handbook*, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)]; [Kuby, J., *Immunology*, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997]도 참조한다.

[0042] 일반적으로, 면역글로불린은 중쇄와 경쇄를 가진다. 각각의 중쇄와 경쇄는 불변 부위와 가변 부위를 포함한다 (부위는 "도메인"으로도 알려져 있음). 중쇄 및 경쇄 가변 부위는 협력하여 항원에 특이적으로 결합한다. 경쇄 및 중쇄 가변 부위는 "상보성 결정 부위(complementarity-determining 영역)" 또는 "CDR"이라고도 불리는 3개의 극가변부위(hypervariable)에 의해 게재된 "기본골격" 부위를 포함한다. 기본골격 부위 및 CDR의 크기는 정의되어 있다(문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991]을 참조하며, 이 내용은 본원에 참조로서 포함됨). 카바트(Kabat) 데이터베이스가 온라인 상으로 제공되고 있다. 서로 다른 경쇄 또는 중쇄의 기본골격 부위의 서열은 하나의 종 내에서는 비교적 보존되어 있다. 경쇄 및 중쇄 성분이 합해진 항체의 기본골격 부위는 3차원 공간에서 CDR들을 위치시키고 정렬하는 역할을 한다.

[0043] CDR은 항원의 에피토프에 대한 결합을 일차적으로 담당한다. 각 사슬의 CDR은 일반적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 언급되며(숫자들은 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 매겨짐), 보통 특정 CDR이 위치한 사슬에 의해 확인

되기도 한다. 따라서, V_H CDR3는 그것이 발견된 항체 중쇄의 가변 도메인에 위치하는 반면에, V_L CDR1은 그것이 발견된 항체 경쇄의 가변 도메인의 CDR1이다.

[0044] "V_H" 또는 "VH"는 면역글로불린 중쇄의 가변 부위를 지칭하며, Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 것도 포함한다. "V_L" 또는 "VL"은 면역글로불린 경쇄의 가변 부위를 지칭하며, Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 것도 포함한다.

[0045] "단일클론 항체"는 B-림프구의 단일 클론에 의해 또는 단일 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자가 형질 감염된 세포에 의해 생성된 항체이다. 단일클론 항체는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 비장 면역 세포와 골수종 세포를 융합시켜 하이브리드 항체 형성 세포를 만듦으로써 생성된다. 단일클론 항체는 인간화 단일클론 항체를 포함한다.

[0046] "인간화" 면역글로불린은 인간 기본골격 부위 및 하나 이상의 비인간 (예컨대 마우스, 랫트, 또는 합성물) 면역글로불린의 CDR를 포함하는 면역글로불린이다. CDR을 제공하는 비인간 면역글로불린은 "공여체(donor)"로 칭하며, 기본골격을 제공하는 인간 면역글로불린은 "수용체(acceptor)"로 부른다. 한 실시 양태에서, 모든 CDR은 인간화 면역글로불린의 공여체 면역글로불린으로부터 유래한다. 불변 부위는 있을 필요까지는 없지만, 존재하는 경우에 이들은 인간 면역글로불린 불변 부위와 실질적으로 동일해야 하는데, 즉 약 85-90% 이상, 예컨대 약 95% 이상 동일해야 한다. 따라서, 인간화 면역글로불린의 모든 부위(CDR은 제외 가능함)는 본래의 인간 면역글로불린 서열에 상응하는 부위와 실질적으로 동일하다. "인간화 항체"는 인간화 경쇄 및 인간화 중쇄 면역글로불린을 포함하는 항체이다. 인간화 항체는 CDR을 제공하는 공여체 항체와 같이 동일한 항원에 결합한다. 인간화 면역글로불린 또는 항체의 수용체 기본골격은 공여체 기본골격으로부터 취한 아미노산에 의해 치환되는 수가 제한될 수 있다. 인간화 또는 다른 단일클론 항체는 항원 결합이나 면역글로불린의 다른 기능들에는 실질적으로 영향을 주지 않는 추가의 보존적 아미노산 치환을 보유할 수 있다. 인간화 면역글로불린은 유전공학에 의해 구축될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호 참조).

[0047] "중화 항체"는 PD-1 폴리펩티드와 같은 폴리펩티드의 임의의 생물학적 활성을 방해하는 항체이다. 예를 들어, 중화 항체는 PD-1 폴리펩티드의 성능을 방해하여 T 세포의 세포독성과 같은 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 일부 실시예에서, 중화 항체는 PD-1 폴리펩티드의 성능을 감소시켜 면역 반응을 약 50%, 약 70%, 약 90% 이상까지 감소시킬 수 있다. 본원에 기술된 것들을 포함하여 면역 반응을 측정하기 위한 임의의 표준 검정 방법들이 잠재적 중화 항체를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0048] **항원:** 동물 내에서 항체의 생성 또는 T 세포 반응을 자극할 수 있는 화합물, 조성물, 또는 물질로서, 동물에 주입 또는 흡수되는 조성물도 포함함. 항원은 특이적인 체액성 또는 세포성 면역의 산물과 반응하며, 이종성 면역원에 의해 유도된 산물들도 포함한다. "항원"이라는 용어는 모든 관계된 항원성 에피토프를 포함한다. "에피토프" 또는 "항원 결정기(antigenic determinant)"는 B 세포 및/또는 T 세포가 반응하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 한 실시 양태에서, T 세포는 에피토프가 MHC 분자와 함께 제공되는 경우에 에피토프에 반응한다. 에피토프는 단백질의 3차 구조 접힘에 의해 병치된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산 모두로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 변성 용매에 노출시 일반적으로 유지되는 반면, 3차 구조 접힘에 의해 형성된 에피토프는 변성 용매로 처리시 변성된다. 에피토프는 일반적으로 독특한 공간 구조 내에 3개 이상, 및 보다 흔하게는 5개 이상, 약 9개, 또는 약 8-10개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간 구조를 결정하는 방법은 예를 들어, x-선 결정학 및 2차원 핵자기공명법을 포함한다.

[0049] 항원은 조직-특이적 항원, 또는 질병-특이적 항원일 수 있다. 이러한 용어들은 양립할 수 있는 것으로서, 조직-특이적 항원이 질병 특이적 항원일 수도 있다. 조직-특이적 항원은 제한된 수의 조직, 예컨대 단일 조직에서 발현된다. 조직 특이적 항원의 비제한적인 구체적 예로서는 전립선 특이 항원, 자궁 특이적 항원, 및/또는 고환 특이적 항원이 있다. 조직 특이적 항원은 하나 이상의 조직, 예컨대, 이에 제한되지는 않지만, 전립선과 자궁 조직 모두에서와 같이 하나 이상의 생식 조직에서 발현되는 항원에 의해 발현될 수 있다. 질병-특이적 항원은 질병의 진행 과정과 동시에 발현된다. 질병-특이적 항원의 비제한적인 구체적 예로서는 발현이 종양 형성과 상관 관계가 있거나, 또는 종양 형성의 전조가 되는 항원이 있다. 질병-특이적 항원은 T 세포 또는 B 세포에 의해 인식되는 항원일 수 있다.

[0050] **항원 제시 세포 (APC):** MHC I 부류 또는 II부류에 결합된 항원을 T 세포에게 제공할 수 있는 세포. APC는 이에 제한되지는 않지만, 단핵 세포, 대식 세포, 수지상 세포, B 세포, T 세포 및 랑게르한스 세포를 포함한다. 다른 T 세포 ($CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포 포함)에게 항원을 제공할 수 있는 T 세포는 항원 제공 T 세포 (T-APC)이다.

[0051] **B 세포:** 림프구, 즉 백혈구(류코사이트)의 서브세트. 성숙 B 세포는 혈장 세포로 분화하여, 항체 및 기억 B 세포를 생성한다. "B 세포 전구세포"는 성숙 B 세포로 발생될 수 있는 세포이다. B 세포 전구세포는 줄기 세포,

초기 프로-B 세포, 후기 프로-B 세포, 대형 프레-B 세포, 소형 프레-B 세포 및 미성숙 B 세포 및 이행 B 세포를 포함한다. 일반적으로, 초기 프로-B 세포(예를 들어, CD43 또는 B220을 발현함)는 면역글로불린 중쇄 재배열을 진행하여 후기 프로 B 및 프레 B 세포가 되며, 또한 면역글로불린 경쇄 재배열을 진행하여 미성숙 B 세포가 된다. 미성숙 B 세포는 T1 및 T2 B 세포를 포함한다. 예를 들어, 마우스에서, 미성숙 B 세포는 $AA41^{hi}CD23^{lo}$ 세포인 T1 B 세포를 포함한다. 마우스 미성숙 B 세포의 또 다른 예는 $AA41^{hi}CD23^{hi}$ 세포인 T2 B이다. 인간에서, 미성숙 B 세포(예를 들어, 미성숙 말초 이행 B 세포)는 $CD38^{hi}$, IgD^{+}, $CD10^{+}$, $CD24^{hi}$, $CD44^{lo}$, $CD23^{lo}$ 및 $CD1^{lo}$ 세포를 포함한다. 따라서, 미성숙 B 세포는 B220(CD45R) 발현 세포를 포함하며, 여기서 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 유전자는 재배열된다. 일 실시 양태에서, 미성숙 B 세포는 CD45R, 클래스 II, IgM, CD19 및 CD40을 발현한다. 미성숙 B 세포는 대용 경쇄 발현을 나타내지 않지만, Ig α β 및 RAG를 발현한다. 미성숙 B 세포는 성숙 B 세포로 발생될 수 있으며, 이는 면역글로불린(예, IgA, IgG 또는 IgM)을 생산한다. 성숙 B 세포는 표면 IgM 및 IgD를 획득하여, 항원에 반응할 수 있으며, CD21 및 CD23($CD23^{hi}CD21^{hi}$ 세포)과 같은 특징적인 마커를 발현한다. IgM에 대한 항체와 IL-4 또는 리포다당류(LPS) 등의 제제로 B 세포를 활성화시킬 수 있다. B 세포 및 B 세포 전구세포의 공통적인 생물학적 공급원은 골수, 말초혈, 비장 및 림프절을 포함한다.

[0052] 처음 항원과 만나는 B 세포는 "나이브(naive)" B 세포로 알려져 있으며; 이 세포는 세포 표면 상에 IgM 및 IgD를 가진다. B 세포 전구세포(예컨대, 면역위임 소형 림프구)는 항원에 의해 자극을 받은 후에, 아세포로 분화하고, 다시 성숙 혈장 세포 또는 기억 B 세포로 분화할 수 있는 미성숙 혈장 세포로 분화한다. 성숙 혈장 세포는 특이적 항원에 반응하여 면역글로불린을 분비한다. 기억 B 세포는 2차 면역 반응(1차 노출 후에 후속되는 항원 노출) 동안 일반적으로 발견되는 체세포 초돌연변이 및 이소타입 스위칭을 진행하는 B 세포이지만 1차 항원 반응 동안에도 검출될 수 있다. 기억 B 세포의 발생은 항원 유도된 림프구가, 아마도 헬퍼 T 세포의 영향 하에, 체세포 초돌연변이 및 친화성 선별을 진행하는 림프 여포의 배심(GC)에서 일어난다. 기억 B 세포는 일반적으로 CD27을 발현한다. 통상적으로, 기억 B 세포는 또한 그 세포 표면 상에 고 친화도 항원 특이적 면역글로불린(B 세포 수용체)을 발현한다. 따라서, 기억 B 세포는 $CD20^{+}CD27^{+}$일 수 있으며, $CD20^{int}/CD21^{+}/CD27^{+}$(휴지기 기억 세포), $CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{+}$(활성화된 기억 세포)를 발현한다. $CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{-}$ 세포는 독특한 "비통상적인 또는 조직 기억" B 세포이다.

[0053] **결합 친화도:** 항원에 대한 항체의 친화도. 일 실시 양태에서, Frankel 등의 문헌[*Mol. Immunol.*, 16:101-106, 1979]에 개시된 Scatchard 방법을 변형시켜 친화도를 계산한다. 또 다른 실시 양태에서, 결합 친화도는 항원/항체 해리율로 측정한다. 또 다른 실시 양태에서, 고 결합 친화도는 경쟁 방사능면역분석으로 측정한다. 몇몇 예에서, 고 결합 친화도는 약 1 x 10^{-8} M 이상이다. 다른 실시 양태에서, 고 결합 친화도는 약 1.5 x 10^{-8} 이상, 약 2.0 x 10^{-8} 이상, 약 2.5 x 10^{-8} 이상, 약 3.0 x 10^{-8} 이상, 약 3.5 x 10^{-8} 이상, 약 4.0 x 10^{-8} 이상, 약 4.5 x 10^{-8} 이상, 또는 약 5.0 x 10^{-8} M 이상이다.

[0054] **결합 또는 안정한 결합 (올리고뉴클레오티드):** 충분한 양의 올리고뉴클레오티드가 염기쌍을 형성하거나 그 표적 핵산에 하이브리드화되는 경우, 올리고뉴클레오티드는 표적 핵산에 결합하거나 안정하게 결합하여, 그 결합의 검출을 허용케 한다. 결합은 표적:올리고뉴클레오티드 복합체의 물리적 또는 기능적 특성에 의해 검출될 수 있다. 표적과 올리고뉴클레오티드 간의 결합은, 기능적 및 물리적 결합 분석 모두를 포함하는 당업자에게 공지된 임의의 절차에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 결합은 그 자체가 생합성 과정 예컨대 유전자의 발현, DNA 보복제, 전사, 번역 등에 주목할 만한 효과를 갖는지의 여부를 측정함으로써 기능적으로 검출될 수 있다.

[0055] DNA 또는 RNA의 상보적 가닥의 결합을 검출하는 물리적 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, DNase I 또는 화학적 족적(chemical footprinting), 겔 이동 및 친화도 분해 분석(gel shift and affinity cleavage assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 점 블롯팅(dot blotting) 및 광흡수도 검출 방법 등을 포함한다. 예를 들어, 간단하고 믿을 수 있어 널리 사용되는 한가지 방법은 온도를 서서히 증가시키면서 220 내지 300 nm의 올리고뉴클레오티드 (또는 유사체) 및 표적 핵산을 함유하는 용액의 광흡수도에 있어서의 변화를 관찰하는 단계를 수반한다. 올리고뉴클레오티드 또는 유사체가 그 표적에 결합된 경우, 올리고뉴클레오티드 (또는 유사체) 및 표적은 서로 해리하거나 또는 용융됨에 따라서 특징적인 온도에 있어서 흡수도가 갑자기 증가한다.

[0056] 올리고머와 그의 표적 핵산 간의 결합은 올리고머의 50%가 그의 표적으로부터 용융되는 온도(T_m)로 흔히 특징 지워진다. 보다 높은 (T_m)은 더 낮은 (T_m)을 갖는 복합체에 비해 더 강하거나 보다 안정적인 복합체인 것을 의미한

다.

[0057] **암 또는 종양:** 분화의 손상, 성장 속도의 증가, 주변 조직에의 병원체의 침입 등의 특징적 퇴화를 겪어 전이가 가능한 악성 신생물. 생식기 암은 자궁, 고환, 난소, 전립선, 나팔관, 또는 음경과 같은 생식기 조직에 일차적인 원인을 갖는 암이다. 예를 들어, 전립선암은 전립선 조직에서 또는 전립선 조직으로부터 발생하는 악성 신생물이고, 자궁암은 자궁 조직에서 또는 자궁 조직으로부터 발생하는 악성 신생물이며, 고환암은 고환에서 발생하는 악성 신생물이다. 잔류암은 갑상선암을 감소시키거나 제거하기 위해 개체에 행해진 임의 형태의 치료 후 개체 내에 잔류하는 암이다. 전이암은 그것이 유래한 원래(일차적인)의 암의 근원 부위 이외에 체내에 하나 이상의 부위에 존재하는 암이다.

[0058] **CD28**(분화 클러스터 28): 동시자극 신호를 제공하는 T 세포 상에서 발현되는 분자 중 하나로서, T 세포 활성화에 필요하다. CD28은 B7.1(CD80) 및 B7.2(CD86)에 대한 수용체이다. Toll 유사 수용체 리간드에 의해 활성화되면, 항원 제시 세포(APC)에서 B7.1 발현이 상향조절된다. 항원 제시 세포 상의 B7.2 발현은 구성성이다. CD28은 나이브 T 세포에서 구성적으로 발현되는 유일한 B7 수용체이다.

[0059] **화학 요법; 화학 요법 제제:** 본원에서는 비정상적인 세포 성장이 특징인 질병의 치료에 있어서 치료적 유용성을 갖는 임의의 화학 제제. 이러한 질병으로는 종양, 신생물 및 암 뿐만 아니라 건선과 같은 과다성장이 특징인 질병도 포함한다. 한 실시 양태에서, 화학 요법 제제는 신생물 예컨대 고형 종양의 치료를 위해 사용하는 제제이다. 한 실시 양태에서, 화학 요법 제제는 방사성 분자이다. 당업자라면 사용할 화학 요법 제제를 쉽게 확인할 수 있을 것이다(예를 들어 문헌 [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., ⓒ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] 참조). 본원에 개시된 면역원성 폴리펩티드는 추가의 화학 요법 제제와 함께 사용될 수 있다.

[0060] **CD28:** 세포 표면 항원은 T 세포에서 발현되는 T90/44 항원, 또는 Tp44로도 알려져 있다. CD28은 T 세포에서 작용하는 동시자극 단백질에 대한 수용체이다. CD28의 천연 리간드는 B7-1 또는 CD80이라고 불리우는 44-54 kDa 당단백질이다. 관련 분자 B7-2가 있다. B7-1은 활성화된 B 세포 및 다른 항원 제시 세포에서 발현된다. 이것은 대식세포, 각질세포, T 세포, B 세포, 말초혈 수지상 및 랑게르한스 세포에 의해서도 발현된다. B7-2는 혈액 수지상 및 랑게르한스 세포, B 세포, 대식세포, 쿠퍼 세포, 활성화된 단핵구 및 각종 천연 킬러 세포 클론에서도 발견된다. T 세포 상에서의 B7의 CD28에의 결합은 T 세포 증식을 촉발하는 동시자극 신호를 전달한다.

[0061] **대조군 수준(면역 파리미터):** 면역 파라미터의 기준선 수준. 일 실시 양태에서, 대조군 수준은 치료제의 부재하에 기억 B 세포 또는 증식성 기억 B 세포 등의 면역계의 성분의 수준이다. 해당 제제로 치료받지 않은 피험체로부터 얻은 샘플, 또는 대조 제제로 치료받은 피험체로부터 얻은 샘플에서 대조군 수준을 측정할 수 있다. 대조군 수준은 또한 경시적으로 여러 샘플의 평균값으로부터 측정한 값과 같은 표준 값일 수 있다. 대조군 수준은 또한 특정 용량의 치료제로 치료한 피험체로부터 얻은 샘플에서 측정할 수 있으며, 이 때 상기 용량은 피험체가 평가 진행 중일 때에는 피험체에게 투여하지 않는다. 대조군은 평가 중인 피험체로부터 얻거나, 또는 상이한 피험체로부터 얻을 수 있다.

[0062] **대조군 수준(폴리펩티드 또는 핵산):** 특정 조건 및/또는 구체적인 유전적 배경 하에 통상적으로 자연 세계에서 발견되는 폴리펩티드 또는 핵산과 같은 분자의 수준. 특정 실시 양태에서, 분자의 대조군 수준은 직접 또는 간접적으로 치료를 행하지 않은 세포 또는 시험편에서 측정될 수 있다. 일부 실시예에서, 대조군 수준은 PD-1 길항제와 같은 제제와 접촉되지 않은 세포에서의 수준일 수 있다. 추가의 실시예에서, 대조군 수준은 PD-1 길항제가 투여되지 않은 개체에서의 수준일 수 있다.

[0063] **DNA(데옥시리보핵산):** DNA는 대부분의 살아있는 유기체의 유전 물질을 포함하는 장쇄 중합체이다(일부 바이러스는 리보핵산 (RNA)을 포함하는 유전자를 가진다). DNA 중합체 내의 반복 단위들은 4개의 서로 다른 뉴클레오티드가며, 각각의 반복 단위는 인산기가 부착된 데옥시리보스 당에 결합된 아데닌, 구아닌, 시토신 및 티민의 4개의 염기 중 하나를 포함한다. 3개의 뉴클레오티드(코돈이라 지칭함)가 폴리펩티드 내에 각 아미노산을 코딩하거나, 또는 정지 신호를 코팅한다. 또한, 코돈이라는 용어는 DNA 서열이 전사되는 mRNA 내에 상응하는(그리고 상보적인) 3개의 뉴클레오티드의 서열에 사용되기도 한다.

[0064] 달리 규정하지 않는 한, DNA 분자에 대한 언급은 그 DNA 분자의 역 보체(reverse complement)를 포함한다. DNA

분자는, 본원의 문맥상 단일 가닥의 의미가 필요한 곳을 예외로 하고, 단일 가닥만을 설명하는 것으로 기술되었더라도 이중-가닥 DNA 분자의 가닥들 모두를 포함한다.

[0065] **검출하는** 또는 **검출(세포 또는 생체분자):** 조사 중인 생체 분자 또는 특정 세포형, 예컨대 기억 B 세포의 존재를 정성적 또는 정량적으로 측정하는 것을 말한다. 예를 들어, 피험체로부터 유래한 샘플 중 기억 B 세포의 존재를 정량적으로 또는 정성적으로 측정하는 것, 또는 증식성 기억 B 세포를 검출하는 것. 일반적으로, 생물학적 분자, 예컨대 단백질, 핵산의 검출, 또는 특정 세포형 또는 세포 증식의 검출은 단순한 관찰이 아니라 생물학적 분석의 실시를 필요로 한다. 예를 들어, 분석은 항체 또는 핵산 프로브(둘다 표지될 수 있음)를 이용하거나, 또는 각각 단백질 또는 세포를 검출하는데 사용될 수 있다. PD-1 길항제를 이용한 치료 효능을 **진단하는** 또는 상기 효능의 **진단**은 세포 또는 생체 분자의 유의적인 변화, 예컨대 기억 B 세포의 증식을 검출하는 것을 포함한다.

[0066] **코딩:** 자연 상태 그대로 또는 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해 조작된 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 코딩하는 것으로 알려져 있으며, 이는 전사 및/또는 번역되어 mRNA 및/또는 폴리펩티드 또는 이의 단편을 생성할 수 있다. 안티센스 가닥은 이러한 핵산의 보체이고, 코팅 서열은 이로부터 추론될 수 있다.

[0067] **발현:** 유전자의 코딩된 정보가 세포 내에서 존재하여 구동되는 구조들 내로 전환되는 과정. 발현된 유전자는 mRNA로 전사된 후 단백질로 번역된 것과 RNA로 전사되지만 단백질로 번역되지 않는 것(예를 들어, siRNA, tRNA 및 rRNA)을 포함한다. 따라서, 표적 서열, 예컨대 유전자 또는 유전자의 프로모터 영역의 발현은 mRNA, 단백질, 또는 이들 모두의 발현을 유도할 수 있다. 표적 서열의 발현은 억제 또는 향상(감소 또는 증가)될 수 있다.

[0068] **발현 조절 서열:** 이종성 핵산 서열에 작동가능하게 연결되어 그 발현을 조절하는 핵산 서열. 발현 조절 서열은 핵산 서열의 전사 그리고, 적절하게는 번역을 제어 및 조절하는 경우에 그 핵산 서열에 작동가능하도록 연결된다. 따라서, 발현 조절 서열은 적절한 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, 단백질 코딩 유전자 앞의 개시 코돈(즉, ATG), 스플라이싱 신호, mRNA의 적절한 번역을 허용하기 위해 그의 유전자의 올바른 리딩 프레임(reading frame)의 유지를 위한 요소들, 그리고 정지 코돈을 포함할 수 있다. "조절 서열"이라는 용어는 최소한 그 존재가 발현에 영향을 줄 수 있는 요소들을 포함하며, 그 존재가 유리한 추가의 요소들, 예를 들어 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수도 있다. 발현 조절 서열은 프로모터를 포함할 수 있다.

[0069] 프로모터는 직접 전사에 충분한 최소의 서열이다. 프로모터 의존적 유전자 발현이 세포 유형 특이적이고, 조직 특이적으로 조절가능하거나, 또는 외부 신호 또는 제제에 의해 유도가 가능하기에 충분한 프로모토 성분들도 포함하며, 이러한 성분들은 유전자의 5' 또는 3' 영역에 위치될 수 있다. 구조적 프로모터 및 유도성 프로모터 모두가 포함된다(예를 들어, 문헌 [Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987] 참조). 예를 들어, 박테리아 계통에서 클로닝하는 경우, 유도성 프로모터 예컨대 박테리오파지 λ(lambda), plac, ptrp, ptac (ptrp-lac 하이브리드 프로모터)의 pL 등이 사용될 수 있다. 한 실시 양태에서, 포유동물 세포 계통에서 클로닝하는 경우, 포유동물 세포의 유전체로부터 유래된 프로모터 (예컨대 메탈로티오닌(metallothionein) 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래한 프로모터 (예컨대 레트로바이러스 장형 반복 말단(long terminal repeat); 아데노바이러스 후발(late) 프로모터; 우두 바이러스 7.5K 프로모터)가 사용될 수 있다. 핵산 서열의 전사를 가능하게 하기 위해 재조합 DNA 또는 합성 기법에 의해 생성된 프로모터도 사용될 수 있다.

[0070] **이종성:** 개별적인 유전적 출처 또는 종으로부터 유래함. 일반적으로 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 이종성 단백질에 특이적으로 결합하지 않을 것이다.

[0071] **숙주 세포:** 벡터가 증식하여 그 DNA가 발현될 수 있는 세포. 세포는 원핵성 또는 진핵성일 수 있다. 세포는 포유동물 세포, 예컨대 인간 세포일 수 있다. 또한,이 용어는 피험체 숙주 세포의 임의의 후손을 포함한다. 모든 후손은 복제시 돌연변이가 발생할 수도 있기 때문에 부모 세포와 동일하지 않을 수 있다. 그러나, 그러한 후손은 "숙주 세포"라는 용어가 사용되는 경우에 포함된다.

[0072] **면역 반응:** 자극에 대한 면역계 세포, 예컨대 B 세포, T 세포, 또는 단핵 세포의 반응. 한 실시 양태에서, 반응은 특정 항원에 대해 특이적이다("항원-특이적 반응"). 한 실시 양태에서, 면역 반응은 T 세포 반응, 예컨대 $CD4^+$ 반응 또는 $CD8^+$ 반응이다. 또다른 실시 양태에서, 반응은 B 세포 반응이며, 특이적 항체의 생산, 또는 기억 B 세포의 증식을 유도한다. B 세포 반응은 기억 B 세포 반응이거나 또는 혈장 B 세포 반응일 수 있다. 혈장 B 세포 반응의 예는 항체 생산이다. 기억 B 세포의 반응의 예는 기억 B 세포의 증식이다.

[0073] 면역 세포와 관련하여 "비반응성(unresponsiveness)"에는 자극, 예를 들어 활성화 수용체 또는 사이토킨을 통한 자극에 대한 면역 세포의 불응성이 포함된다. 비반응성은 예를 들어 면역억제제에 대한 노출 또는 고용량의 항

원에 대한 노출로 인해 나타날 수 있다. 본원에 사용되는 "무반응" 또는 "내성"이라는 용어에는 수용체-매개 자극의 활성화에 대한 불응성이 포함된다. 그러한 불응성은 일반적으로 항원-특이적이고, 내성화 항원(tolerizing antigen)에 대한 노출이 중단된 후에도 지속된다.

[0074] 예를 들어, (비반응성과 반대되는) T 세포 내에서의 무반응은 사이토킨(예컨대 IL-2) 생산의 결여를 의미한다. T 세포 무반응은, T 세포가 항원에 노출되어 2차 신호(보조자극 신호)의 부재 하에 1차 신호(T 세포 수용체 또는 CD-3 매개 신호)를 수용하는 경우에 나타난다. 이러한 조건 하에서, 세포의 동일 항원에 대한 재노출(노출이 보조자극 분자의 존재 하에 일어나는 경우에도)로는 사이토킨이 생산되지 못하고, 이에 따라 증식하지 못한다. 그러나, 무반응 T 세포는 관련이 없는 항원에 대해서 반응할 수 있고, 사이토킨(예를 들어, IL-2)으로 배양 시 증식할 수 있다. 예를 들어, T 세포 무반응은 ELISA나 인디케이터 세포주를 이용한 증식 검정에 의해 측정시, T 림프구에 의해 IL-2 생성이 결여됨을 관찰함으로써 알 수 있다. 대안적으로, 리포터 유전자 구축물이 사용될 수 있다. 예를 들어, 무반응 T 세포는 5' IL-2 유전자 인핸서의 조절 하에 이종성 프로모터에 의해, 또는 인핸서 내에서 발견될 수 있는 API 서열의 다량체에 의해 유도되는 IL-2 유전자 전사를 개시하지 못한다(문헌 [Kang et al., Science 257:1134, 1992]). 무반응 항원 특이적 T 세포는 상응하는 대조군 항원 특이적 T 세포에 비해, 세포독성 활성에 있어서 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 심지어 100% 이상의 감소를 가져올 수 있다.

[0075] **면역원성 펩티드:** 대립유전자-특이적 모티프 또는 기타 서열을 포함하는 펩티드로서, 상기 서열은 펩티드가 MHC 분자와 결합하여 세포독성 T 림프구 ("CTL") 반응을 유도하거나, 또는 면역원성 펩티드가 유래되는 항원에 특이적인 B 세포 반응(예를 들어 항체 생산 또는 기억 B 세포 증식)을 유도하도록 한다.

[0076] 한 실시 양태에서, 면역원성 펩티드는 서열 모티프 또는 당업계에 공지된 신경망(neural net) 또는 다항식(polynomial) 결정법과 같은 기타 방법을 사용하여 동정된다. 일반적으로, 펩티드의 "결합 역치"를 측정해 특정 친화도에서 높은 결합 가능성을 나타내는 스코어를 갖는 면역원성이 있을 것들을 선별하는데 알고리즘을 사용한다. 알고리즘은 특정 위치의 특정 아미노산의 MHC 결합에 대한 영향, 특정 위치의 아미노산의 항체 결합에 대한 영향, 또는 모티프 함유 펩티드 내에서의 특정 치환 부위의 결합에 대한 영향에 기초한다. 면역원성 펩티드의 의미상, "보존된 잔기"는 펩티드 내 특정 위치에서 무작위 분포로 기대할 수 있는 것보다 보다 현저히 많은 빈도수를 나타내는 것을 말한다. 한 실시 양태에서, 보존된 잔기는 MHC 구조가 면역원성 펩티드와의 접점을 제공할 수 있는 곳이다.

[0077] 또한, 면역원성 펩티드는 MHC 단백질의 환경에서 제공되는 경우, 구체적인 MHC 단백질 (예를 들어 HLA-A02.01)에의 이들의 결합 및 CD4 및/또는 CD8을 자극하는 이들의 성능을 측정함으로써 확인될 수 있다.

[0078] **면역원성 조성물:** 면역원성 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드를 발현하는 세포에 대해 측정가능한 CTL 반응을 유도하거나 폴리펩티드에 대해 측정가능한 B 세포 반응(예컨대 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체의 생성, 또는 기억 B 세포의 증식)을 유도하는 면역원성 폴리펩티드를 코팅하는 핵산을 포함하는 조성물. 시험관 내 사용을 위해, 면역원성 조성물은 단리된 핵산, 핵산을 포함하는 벡터 및/또는 면역원성 펩티드를 포함할 수 있다. 생체 내 사용을 위해, 면역원성 조성물은 일반적으로 핵산, 핵산을 포함하는 벡터, 및/또는 면역원성 폴리펩티드, 약학적으로 허용되는 담체, 및/또는 기타 제제를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 선택적으로 아주반트, PD-1 길항제, 보조자극 분자, 또는 보조자극 분자를 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은, 당업계에 공지된 분석법에 의해 CTL을 유도하는 그 성능을 바로 시험할 수 있다.

[0079] **면역학적 반응성 조건(시험관내):** 특정 에피토프에 대해 형성된 항체가 실질적으로 모든 다른 에피토프에의 결합보다 검출가능하게 높은 정도로 및/또는 실질적으로 그러한 결합을 배제하고 해당 에피토프에 결합하도록 하는 "면역 복합체를 형성하기에 충분한 조건"을 포함한다. 면역학적 반응성 조건은 항체 결합 반응 형식에 따라서 달라지며, 통상적으로는 면역분석 프로토콜(예, ELISA 또는 방사선면역분석), FACS에서 사용되는 조건들 또는 생체내에서 직면하는 조건들이다. 면역분석 형식 및 조건의 설명에 대해서는 문헌[Harlow & Lane, Antibodies, *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)] 참조. 본원에 개시된 방법에 사용된 면역학적 반응성 조건은 살아 있는 포유동물 또는 포유동물 세포에서 전형적인 조건(예, 온도, 오스몰농도, pH)을 포함하는 "생리학적 조건"이다. 어떤 장기에 극한의 조건이 적용되지만, 일반적으로 장기내 및 세포내 환경은 대략 pH7(즉, pH 6.0~pH 8.0, 더욱 일반적으로는 pH 6.5~7.5)이고, 주 용매로서 물을 포함하며, 0℃ 이상 50℃ 이하의 온도로 존재한다. 오스몰 농도는 세포 생존 및 증식을 지원하는 범위 내이다.

[0080] **질병의 억제 또는 치료:** 종양 성장 또는 지속성 감염과 같은 질병의 억제는 질병의 완전한 발달을 억제하는 것 또는 질병 진행 과정의 생리학적 효과를 경감시키는 것을 가리킨다. 일부 실시예에서, 질병의 억제 또는 치료는

종양의 증상 또는 병원체의 감염을 경감시키는 것을 지칭한다. 예를 들어, 암 치료는 암을 지닌 것으로 알려진 사람에게서 유사종양 증후군의 발달을 방해할 수 있거나 종양의 조짐이나 증상을 줄일 수 있다. 또다른 실시 양태에서, 감염의 치료는 감염의 발달을 저해시키거나 감염의 징후를 경감시키는 것을 지칭한다. "치료"는 질병 또는 질병과 관련된 병리학적 상태의 조짐 또는 징후를 경감시키는 치료적 개입을 가리킨다. 치료적 백신 접종은 병원체에 이미 감염된 피험체에게 제제를 투여하는 것을 의미한다. 피험체는 증상이 없을 수 있어, 치료는 증상의 발달을 방해한다. 또한, 치료적 백신은 기존의 하나 이상 증상의 중증도를 감소시킬 수 있거나, 병원체 용량을 감소시킬 수 있다.

[0081] **감염성 질병:** 감염원에 의해 발생한 임의의 질병. 감염성 병원체의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만, 바이러스, 박테리아, 미코플라스마 및 진균류를 포함한다. 특정 실시예에서, 하나 이상의 유형의 감염성 병원체에 의해 발생되는 질병이다. 또다른 실시예에서, 둘 이상의 서로 다른 유형의 감염성 병원체에 의해 발생되는 질병이다. 감염성 질병은 급성(단시간에 작용) 또는 만성/지속성(장시간에 작용)으로, 열을 수반하거나 하지않으면서, 어느 연령대에나 발생하고, 상기의 것들이 중첩되어 어느 체내 시스템에도 영향을 줄 수 있다.

[0082] 바이러스성 질병은 수여자에 이미 존재하는 바이러스의 재활성화로 인한 면역억제 후에 흔히 발생한다. 지속성 바이러스 감염은, 이에 제한되지는 않지만, 시토메갈로바이러스 (CMV), 폐렴, 장염 및 망막염; 엡스타인-바 바이러스 (EBV) 림프세포증식성 질병; 수두/대상포진 (바리셀라 조스터 바이러스, VZV에 의해 발생됨); HSV-1 및 HSV-2 점막염; HSV-6 뇌염, BK-바이러스 출혈성 방광염; 바이러스 인플루엔자; 호흡기 합포체 바이러스 (RSV)로 인한 폐렴; AIDS (HIV에 의해 발생함); 및 A형, B형 또는 C형 간염을 포함한다.

[0083] 감염성 바이러스의 추가적인 예로서는 *레트로비리다에(Retroviridae)*; *피코르나비리다에(Picornaviridae)* (예를 들어, 소아마비 바이러스, A형 간염 바이러스; 엔테로바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 코감기바이러스, 에코바이러스); *칼시비리다에(Calciviridae)* (예컨대 위장염을 야기시키는 균주); *토가비리다에(Togaviridae)* (예를 들어, 말 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); *플라비리다에(Flaviridae)* (예를 들어, 뎅기열 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); *코로나비리다에(Coronaviridae)* (예를 들어, 코로나바이러스); *랍도비리다에(Rhabdoviridae)* (예를 들어, 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); *필로비리다에(Filoviridae)* (예를 들어, 에볼라 바이러스); *파라믹소비리다에(Paramyxoviridae)* (예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스, 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스); *오르쏘믹소비리다에(Orthomyxoviridae)* (예를 들어, 인플루엔자 바이러스); *분가비리다에(Bungaviridae)* (예를 들어, 한탄 바이러스, 분가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이로 바이러스); 아레나비리다에(*Arenaviridae*) (출혈열 바이러스); *레오비리다에(Reoviridae)* (예를 들어, 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); *비르나비리다에(Birnaviridae); 헤파드나비리다에(Hepadnaviridae)* (B형 간염 바이러스); *파보비리다에(Parvoviridae,* 파보바이러스); *파포바비리다에(Papovaviridae,* 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); *아데노비리다에(Adenoviridae,* 대부분 아데노바이러스); *헤르페스비리다에(Herpesviridae)* (단순 포진 바이러스 (HSV) 1 및 HSV-2, 수두 대상포진 바이러스, 시토메갈로바이러스 (CMV), 포진 바이러스); *폭스비리다에(Poxviridae)* (바리올라 바이러스, 우두 바이러스, 천연두 바이러스); 및 *이리도비리다에(Iridoviridae)* (예컨대 아프리카 돼지 콜레라 바이러스); 및 분류되지 않은 바이러스 (예를 들어, 해면성 뇌증의 병원, 델타 간염원(B형 간염 바이러스의 불완전한 부수체로 생각됨), 비-A형, 비-B형 간염 (1군=내부 감염; 2군=비경구 감염) (즉, C형 간염); 노워크 바이러스 및 관련 바이러스, 및 애스트로바이러스)를 포함한다.

[0084] 진균성 감염의 예로서는 이에 제한되지는 않지만, 아스페르길루스증; 아구창 (*칸디다 알비칸스(Candida albicans)*에 의해 발생함); 효모균증 (*크립토코커스(Cryptococcus)*에 의해 발생함); 및 히스토플라스마증을 포함한다. 따라서, 감염성 진균류의 예는, 이에 제한되지는 않지만, *크립토코커스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans), 히스토플라즈마 캡슐라텀(Histoplasma capsulatum), 콕시디오이데스 이미티스(Coccidioides immitis), 블라스토마이세스 더마티티디스(Blastomyces dermatitidis), 클라미디아 트라코마티스(Chlamydia trachomatis), 칸디다 알비칸스(Candida albicans)*를 포함한다.

[0085] 감염성 박테리아의 예로서는 *헬리코박터 파일로리(Helicobacter pyloris), 보렐리아 버그도르페리(Borelia burgdorferi), 레지오넬라 뉴모필리아(Legionella pneumophilia), 미코박테리아 종(Mycobacteria sps)* (예컨대, *M. 튜버컬로우시스(tuberculosis), M. 아비움(avium), M. 인트라셀룰라레(intracellulare), M.* 칸사이(*kansaii*), *M. 고르도나에(gordonae)*), *스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 네이스세리아 고노르회아에(Neisseria gonorrhoeae), 네이스세리아 메닌지티디스(Neisseria meningitidis), 리스테리아 모노시토게네스(Listeria monocytogenes), 스트렙토코커스 파이오게네스(Streptococcus pyogenes)* (A그룹 스트렙토코커스), *스트렙토코커스 아갈락티아에(Streptococcus agalactiae)* (B그룹 스트렙토코커스), *스트렙토코커스*

(*비리단스(viridans)* 그룹), 스트렙토코커스 파에칼리스(*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코커스 보비스(*Streptococcus bovis*), 스트렙토코커스 (혐기성 종), 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 병원성 캄파일로박터 종(*Campylobacter sp.*), 엔테로코커스(*Enterococcus sp.*), 하에모필루스(*Haemophilus*) 인플루엔자, 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 코리네박테리움 디프테리아에(*corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 종(*corynebacterium sp.*), 에리시펠로트릭스 루시오파티아에(*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 클로스트리디움 페르프링거스(*Clostridium perfringers*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클렙시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 파스듀렐라 멀토시다(*Pasturella multocida*), 박테로이데스 종(*Bacteroides sp.*), 푸소박테리움 뉴클레아텀(*Fusobacterium nucleatum*), 스트렙토바실러스 모닐리포르미스(*Streptobacillus moniliformis*), 트레포네마 팔리디움(*Treponema pallidium*), 트레포네마 페르테누에(*Treponema pertenue*), 렙토스피라(*Leptospira*) 및 악티노마이세스 이스라엘리(*Actinomyces israelli*)를 포함한다. 다른 감염성 유기체(예컨대 원생 생물)는 *플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum)* 및 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*)를 포함한다.

[0086] "지속성 감염"이란, 면역 반응이 유도된 후에도, 감염원(예를 들어, 바이러스, 미코플라스마, 박테리아, 기생충, 또는 진균)이 감염된 숙주로부터 제거되거나 소거되지 않은 감염을 의미한다. 지속성 감염은 만성 감염, 잠복성 감염 또는 지발성 감염일 수 있다. 잠복성 감염은 재발성 질환의 발병 기간 중 감염성 바이러스가 부족한 것을 특징으로 한다. 만성 감염은 일차 감염 후 감염성 바이러스가 지속적으로 존재하는 것이 특징이며, 만성 또는 재발성 질환을 포함할 수 있다. 지발성 감염은 진행성 질환에 의해 수반되는 지연형 잠복기를 특징으로 한다. 잠복성 감염 및 만성 감염과는 달리, 지발성 감염은 단시간의 바이러스 복제로 시작되지 않을 수 있다. 급성 감염은 비교적 기간이 짧고(수일 내지 수주 지속됨), 면역계에 의해 신체로부터 분해되어 없어지는 반면, 지속성 감염은 수개월, 수년 또는 심지어 평생 지속될 수 있다. 이러한 감염은 세포 사멸 또는 심지어 숙주 세포에 대한 과다한 손상을 입히지 않는 무증상 및 증식성 감염의 단계를 수반하여, 장기간에 걸쳐 빈번하게 재발할 수도 있다. 지속성 감염은 흔히 숙주 세포의 급성 치사 또는 지나친 손상 유발조차 없이 무증상 감염 및 증식성 감염의 단계를 모두 수반한다. 지속성 감염 중에, 바이러스 유전체는 세포성 DNA에 안정하게 삽입될 수 있거나 또는 부체 상태로 존재할 수 있다. 지속성 감염은 인간 T 세포 백혈병 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 시토메갈로바이러스, 포진바이러스, 수두 대상포진 바이러스, 홍역 바이러스, 파포바바이러스, 프리온, 간염 바이러스, 아데노바이러스, 파보바이러스 및 유두종 바이러스와 같은 바이러스로 인해 발생된다.

[0087] 면역 반응이 해체된 후에도, 원인이 되는 감염원은 표준 기법을 이용하여 숙주 세포에서(예를 들어, 감염된 개체의 특정 세포 내) 검출될 수도 있다. 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제6,368,832호, 제6,579,854호 및 제6,808,710호, 및 미국 특허 출원 공보 제20040137577호, 제20030232323호, 제20030166531호, 제20030064380호, 제20030044768호, 제20030039653호, 제20020164600호, 제20020160000호, 제20020110836호, 제20020107363호, 및 제20020106730호(이들은 모두 본원에 참조로서 포함됨)에 기재된 임의의 표준 방법에 따라, 포유동물을 지속성 감염에 걸린 것으로 진단한다.

[0088] "지속성 감염의 증상을 경감시키는 것"이란, 지속성 감염과 관련된 임의의 질환 또는 증상을 완화시키는 것을 의미한다. 대안적으로, 지속성 감염의 증상을 경감시키는 것은 피험체 내의 감염성 미생물(예를 들어, 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충)의 용량을 처리되지 않은 대조군 내의 감염성 미생물의 용량에 비해 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 처리되지 않은 동일한 환경의 대조군과 비교했을 때, 그러한 감소 또는 예방 정도는 임의의 표준 기법에 의해 측정 시 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 이상이다. 바람직하게는, 지속성 감염은 당업계에 공지된 임의의 표준 방법에 의해 검출 시에 완전히 제거되며, 이러한 경우에 지속성 감염은 치료된 것으로 본다. 지속성 감염을 치료하고자 하는 환자는, 전문의가 그러한 질환을 지닌 것으로 진단한 자이다. 진단은 임의의 적절한 방법에 의할 수 있다. 진단 및 검사는 예를 들어, 생물학적 샘플(예를 들어, 조직 생검, 혈액 시험 또는 뇨 시험)에서의 미생물 용량의 수준을 검사하는 것, 생물학적 샘플 내 미생물 감염의 대리 표지자(surrogate marker)의 수준을 검사하는 것, 지속성 감염과 관련된 증상을 검사하는 것, 또는 지속성 감염에 있어서 전형적인 면역 반응과 관련된 면역 세포를 검출하는 것(예를 들어, 무반응성 및/또는 기능적으로 손상된 항원 특이적 T 세포의 검출)을 포함할 수 있다. 지속성 감염의 진전이 방해받는 환자는 지속성 감염 진단을 받았을 수도 있고 받지 않았을 수도 있다. 당업자라면, 이러한 환자들이 상기 기술된 바와 동일한 표준 시험을 받았을 수 있거나, 검사 없이도 하나 이상의 위험 인자(예를 들어, 가족력 또는 감염원에의 노출)의 존재로 인해 높은 위험 상태에 처해 있는 환자로 확인되었을 수 있음을 알 것이다.

[0089] **단리된:** "단리된" 생물학적 성분 (예컨대 핵산 또는 단백질 또는 세포기관)은, 이 성분들이 자연적으로 발생하는 유기체의 세포 내의 다른 생물학적 성분들, 즉 다른 염색체 및 염색체외 DNA 및 RNA, 단백질 및 세포기관으

로부터 실질적으로 별도로 분리되거나 정제된다. "단리된" 핵산과 단백질은 표준 정제법으로 정제된 핵산 및 단백질을 포함한다. 또한, 이 용어는 숙주 세포에서의 재조합 발현에 의해 제조된 핵산과 단백질 뿐만 아니라 화학적으로 합성된 핵산도 포함한다.

[0090] "정제된 항체"란, 자연적으로 결합된 자연 발생 유기 분자 및 단백질이 없는 것이 60 중량% 이상인 항체를 의미한다. 일부 실시예에서, 조제물은 약 75 중량% 이상, 약 80 중량% 이상, 약 90 중량% 이상, 약 95 중량% 이상, 또는 99 중량% 이상의 항체, 예를 들어 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 특이적 항체이다. 정제된 항체는 예를 들어, 재조합으로 생성된 단백질 또는 보존된 모티프 펩티드를 이용하는 친화성 크로마토그래피 및 표준 기법에 의해 수득될 수 있다.

[0091] **표지:** 분자의 검출 촉진을 위하여 분자, 예컨대 항체 또는 단백질에 직접 또는 간접적으로 컨쥬게이트된 검출가능한 화합물 또는 조성물. 구체적인 비제한적 표지의 예로서는 형광 태그, 효소적 결합 및 방사성 동위원소를 포함한다. 일례에서, "표지된 항체"는 항체 내 다른 분자의 도입을 의미한다. 예를 들어, 표지는 검출가능한 마커, 예컨대 표시된 아비딘(예를 들어 광학 또는 비색 방법에 의해 검출될 수 있는, 스트렙타비딘을 포함하는 형광 마커 또는 효소 활성)에 의해 검출될 수 있는 비오티닐 부분의 폴리펩티드에의 결합 또는 방사성 아미노산의 도입이다. 폴리펩티드 및 당단백질을 표지하는 각종 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 이들 방법을 사용할 수 있다. 폴리펩티드 표지의 예는 하기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다: 방사성동위원소 또는 방사성핵종(예컨대 ^{35}S 또는 ^{131}I), 형광 표지(예, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민, 란탄계 인), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 베타-갈락토시다제, 루시퍼라제, 알칼리 포스파타제), 화학발광 마커, 비오티닐기, (루신 지퍼쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그와 같은) 2차 리포터에 의해 인식되는 소정의 폴리펩티드 에피토프, 또는 자성제, 예컨대 가돌리늄 킬레이트. 일부 실시 양태에서, 가능한 입체 장애를 줄이기 위해서 다양한 길이의 스페이서 암에 의해 표지를 부착한다.

[0092] **림프구:** 면역 방어에 관계하는 유형의 백혈구 세포. 주된 유형의 림프구는 B 세포 및 T 세포의 2가지가 있다.

[0093] **주조직적합성 복합체 (MHC):** 인간 백혈구 항원("HLA")을 포함하는, 서로 다른 종에서 기술되는 주조직적합성 항원 시스템을 포함하는 것을 의미하는 일반 명칭.

[0094] **포유동물:** 이 용어는 인간 및 비인간 포유동물 모두를 포함한다. 유사하게, "(실험) 피험체"이라는 용어는 인간 및 동물 피험체 모두를 포함한다.

[0095] 평균 형광 강도(유세포 분석): 유세포 분석은 산란 레이저광이든 또는 형광색소에 의해 방출되는 형광이든 세포 또는 입자의 빛 강도의 측정과 연관이 있다. 빛은 광전자증배관(PMT)에 의해 검출되는데, 이것은 PMT의 전압 및 본래의 형광 강도에 비례하는 전압으로 증폭기를 통해 전환시킨다. 연속 분포인 전압을 형광도에 따라 각 신호를 특정 채널로 배치하는 아날로그 디지털 변환기(ADC)에 의해 불연속 분포로 전환시킨다. ADC의 분리능이 클수록 연속 분포를 더 많이 반영한다.

[0096] 선형 또는 로그 스케일을 이용하여 유세포 분석 데이터를 디스플레이할 수 있다. 로그 스케일의 사용은 대부분의 생물학적 상황에서 분포가 우측으로 비스듬하게 나타난다. 이 경우 그 영향은 분포를 정규화시키는 것이다 - 이를 로그 정규화라고 하고 데이타를 로그 변환한다. 선형 신호는 선형 증폭기를 통해 전달되지만, 로그 변환은 로그 증폭기 또는 LUT(Look Up Tables)에 의해 실현될 수 있다. 분석적 세포분석기에서의 대부분의 ADC는 10 바이트, 즉 데이터를 2e10 또는 1024개 채널로 분할하지만, 데이터의 분리능을 높이기 위해서 12- 또는 14-바이트 ADC를 사용하는 경향이 높아지고 있다.

[0097] 단일 데이터 채널(산란 또는 형광)로부터 얻은 데이터는 x 축을 1024 채널(10 바이트 ADC의 경우)로 나눈 히스토그램으로 디스플레이한다. 데이터가 선형 스케일인 경우, 채널수와 그 채널에 대한 선형값을 쉽게 얻을 수 있다. 로그 스케일에서는, x축을 1024 채널로 나누지만 4-로그 십진법 스케일로 디스플레이한다(일반적으로 4로그 십진법이 사용된다).

[0098] 유세포 분석 데이터를 정량하기 위해서, 군의 분포 측정값을 이용한다. 일반적으로, 중심 경향 척도는 평균 및 중앙값이다. **평균**은 '평균값'이고 산술값 또는 기하값일 수 있다. 산술 평균은 시그마(x)/n으로 산정되고, 기하 평균은 n 제곱근(a1 x a2 x a3....an)으로 산정된다. 일반적으로, 로그 증폭 데이타와 함께 기하 평균이 데이타 분포의 가중치를 고려할 수 있기 때문에 사용되며, 선형 스케일에서 디스플레이된 데이타 또는 선형 데이타에 대해 산술 평균이 사용된다. **중앙값**은 중간값 50번째 백분위수로서, 50% 값이 그 아래 있고 50% 값이 그 위에 있다는 것이다. "고" 발현 및 "저" 발현 세포는 전체군의 형광도에 따라 상대적으로 측정할 수 있으며; 유세포

분석 데이터의 플롯에서 이들 파라미터를 쉽게 확인할 수 있다.

[0099] **신생물:** 양성 및 악성 종양 뿐만 아니라 다른 증식성 장애를 포함하는 비정상적인 세포 증식.

[0100] **중화 항체:** 감염제 상의 특정 항원에 결합하여 감염제의 감염 역가를 감소시키는 항체. 일부 예에서, 감염제는 바이러스, 박테리아 또는 진균이다.

[0101] **올리고뉴클레오티드:** 약 100개 이하의 길이를 갖는 뉴클레오티드 염기의 선형 폴리뉴클레오티드 서열.

[0102] **오픈 리딩 프레임(Open reading frame, ORF):** 임의의 내부 종결 코돈 없이 아미노산을 코팅하는 일련의 뉴클레오티드 3문자 (코돈). 이러한 서열은 일반적으로 펩티드 내로 번역될 수 있다.

[0103] **작동가능하게 연결된:** 첫번째 핵산 서열이 두번째 핵산 서열과 기능적인 관계에 놓이는 경우, 첫번째 핵산 서열은 두번째 핵산 서열과 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터는 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 주는 경우, 프로모터는 코팅 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 인접하며, 여기서 동일한 리딩 프레임 내에서 두 단백질-코딩 영역의 연결이 필요하다.

[0104] **약학적으로 허용되는 담체:** 통상적인 약학적으로 허용되는 담체가 사용된다. 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)]은 본원에 개시된 융합 단백질의 약학적 전달을 위해 적절한 조성물 및 제형을 기술하고 있다.

[0105] 일반적으로, 담체의 성질은 사용되는 특정 투여 경로에 따라 다를 것이다. 예를 들어, 비경구 제형은 통상 비히클로서 물, 생리 식염수, 평형 염액(balanced salt solution), 수성 덱스트로스, 글리세롤 등과 같은 약학적 및 생리학적으로 허용가능한 유체를 포함하는 주사가능한 유체를 포함한다. 고형 조성물의 경우(예컨대 분말, 알약, 정제, 또는 캡슐 형태), 통상적인 무독성 고형상 담체는 예를 들어, 약학 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 스테아린산마그네슘을 포함할 수 있다. 생물학적으로 중성인 담체 이외에, 투여될 약학 조성물은 소량의 무독성 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 보존제 및 pH 완충제 등, 예를 들어 아세트산나트륨 또는 솔비탄모노라우르산을 포함할 수 있다.

[0106] "치료적 유효량"은 치료 중인 피험체에서 목적하는 생물학적 효과를 달성하기 위한 조성물 또는 세포의 양이다. 예를 들어, 이는 면역 반응을 유도하고, 종양 성장을 억제하고, 기억 B 세포 증식을 유도하거나, 또는 종양 또는 지속성 감염의 표면적 증상을 어느 정도 변화시키는데 필요한 PD-1 길항제의 양일 수 있다. 피험체에게 투여시, 투여량은 일반적으로 시험관 내 효과에 도달했다고 보여지는 (예를 들어, 림프구에서) 표적 조직 농도를 달성할 정도로 사용될 것이다.

[0107] 특정 예에서, 치료 유효량은 기억 B 세포의 증식을 유도하는데 효과적인 PD-1 길항제 등의 제제의 양이다. 또 다른 특정 예에서, 치료 유효량은 피험체에서 기억 B 세포 반응 및/또는 T 세포 반응을 증가시켜 개선시킬 수 있는 질병 등의 질병 증상 또는 징후를 변경하는 PD-1 길항제의 양이다.

[0108] PD-1 길항제 등의 제제의 유효량은 치료 기간 동안 1회 용량, 또는 수회 분할 용량으로, 예를 들어 매일 투여될 수 있다. 그러나, PD-1 길항제의 유효량은 치료 피험체, 치료할 병태의 경중 및 유형, 및 투여 방식에 따라 달라진다. 본원에 개시된 방법은 의학 및 수의학 환경에서 동등하게 적용된다. 따라서, 일반적인 용어 "치료할 피험체"는 면역 반응 향상 등의 목적하는 생물학적 효과의 증가가 필요한 모든 유기체(예, 인간, 원숭이, 개, 고양이, 말 및 소)를 포함하는 것으로 이해된다.

[0109] **폴리뉴클레오티드:** 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 서열이라는 용어는 10개 염기의 길이를 갖는 뉴클레오티드의 중합 형태를 일컫는다. 재조합 폴리뉴클레오티드는 유기체의 자연 발생적 유전체 내에서 직접 인접하고 있는(5' 말단 상의 서열과 3' 말단 상의 서열) 코팅 서열 모두와 직접적으로 인접하고 있지 않은 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 따라서, 이 용어는, 예를 들어, 벡터; 자가 복제 플라스미드 또는 바이러스; 원핵 세포 또는 진핵 세포의 유전체 DNA 내로 포함되거나, 또는 다른 서열들과 독립하여 별개의 분자(예컨대, cDNA)로서 존재하는 재조합 DNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 이 두 뉴클레오티드의 변형된 형태일 수 있다. 이 용어는 DNA의 단일 가닥 및 이중 가닥 형태를 포함한다.

[0110] **폴리펩티드:** 길이 또는 번역 후 변화(예를 들어, 당화 또는 인산화)가 고려되지 않은 아미노산의 임의의 사슬. 폴리펩티드는 3개 내지 30개의 아미노산을 갖는 길이일 수 있다. 한 실시 양태에서, 폴리펩티드는 약 7개 내지 약 25개의 아미노산을 갖는 길이이다. 또다른 실시 양태에서, 폴리펩티드는 약 8개 내지 약 10개의 아미노산을 갖는 길이이다. 또다른 실시 양태에서, 펩티드는 약 9개의 아미노산을 갖는 길이이다. 폴리펩티드와 관련하여, "포함하는" 이라는 것은 추가의 아미노산 서열 또는 다른 분자가 분자 내에 포함될 수 있다는 것을 의미하며,

"필수적으로 구성된다"라는 것은 추가의 아미노산 서열들이 분자 내에 포함되지는 않지만, 다른 제제(예컨대 표지 또는 화학 화합물)들이 포함될 수 있다는 것을 말하며, "구성된다"라는 것은 추가의 아미노산 서열 및 추가의 제제가 분자 내에 포함되지 않는다는 것을 의미한다.

[0111] **증식:** 당업계에 공지된 여러 방법으로 측정할 수 있는, 자손을 생산하기 위한 세포의 분열. 이는 세포의 총수를 계수하는 분석, 특정 세포형의 세포수를 계수하는 분석, KI-67 분석, 티미딘 도입 및 브로모데옥시우리딘 분석을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0112] **예정된 사멸 (PD)-1:** PD-L1 또는 PD-L2 단백질과 복합체를 형성하며, T 세포의 보조 자극과 같은 면역 반응에 관련되는 폴리펩티드를 의미한다. 일반적으로, PD-1 단백질은 자연 발생(야생형) PD-1과 실질적으로 동일하다(예를 들어, 문헌 [Ishida et al., EMBO J. 11:3887-3895, 1992]; [Shinohara et al., Genomics 23:704-706, 1994]; 및 미국 특허 제5,698,520호(본원에 참고로 인용됨)을 참고한다). 일부 실시예에서, PD-1 신호 전달은 T 세포 증식, 사이토킨 생성 또는 바이러스 제거를 감소시켜 예컨대 CD8+ T 세포 세포독성을 감소시킬 수 있다. 따라서, PD-1 폴리펩티드는 임의의 표준 방법에 의해 측정 시에 대조군 수준 이하인 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 또는 100% 초과만큼 CD8+ T 세포 세포독성 활성을 감소시킨다.

[0113] 본원에서 사용되는 PD-1 폴리펩티드 또는 단백질과 관련된 "활성"이라는 용어에는 자연 발생 PD-1 단백질에 고유한 임의의 활성, 예컨대 항원 제시 세포 상에 천연 리간드를 개입시킴과 같은 것에 의한 활성화된 면역 세포 내의 억제 신호를 조절하는 능력을 포함한다. 이러한 면역 세포 내의 억제 신호의 조절은 면역 세포의 증식 및/또는 생존의 조절 및/또는 면역 세포에 의한 사이토킨 분비의 조절을 초래한다. 또한, PD-1 단백질은 B7 분자의 결합을 위해 보조자극 수용체와 경쟁함으로써 보조자극 신호를 조절할 수도 있다. 이에 따라, "PD-1 활성"이라는 용어에는 천연 리간드(들)에 결합하는 PD-1 폴리펩티드 또는 단백질의 성능, 면역 세포 보조자극 또는 억제 신호를 조절하는 능력과, 면역 반응을 조절하는 능력이 포함된다.

[0114] "PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 것"이란, PD-1의 수준 또는 생물학적 활성을, 처리되지 않은 피험체 또는 샘플과 같은 대조군에서의 PD-1 단백질의 수준 또는 생물학적 활성에 비해 감소시키는 것을 의미한다. 구체적인 실시예에서, 그러한 수준 또는 활성은 처리되지 않은 대조군과 비교하여, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상 또는 심지어 100% 초과만큼 감소된다. 예를 들어, PD-1 단백질의 생물학적 활성은 PD-1 단백질의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합이 감소되는 경우에 줄어들며, 이로써 PD-1 신호 전달이 주춤하게 되는 결과, $CD8^+$ T 세포 세포독성이 증가되는 현상을 초래하게 된다.

[0115] "PD-1 유전자"란, PD-1 단백질을 코딩하는 핵산을 의미한다. "PD-1 융합 유전자"란 제2 이종성 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 PD-1 코딩 영역을 의미한다. PD-1 융합 유전자는 PD-1 프로모터를 포함할 수 있거나, 또는 이종성 프로모터를 포함할 수 있다. 일부 실시 양태들에서, 제2 이종성 핵산 서열은 리포터 유전자, 즉 발현이 검정될 수 있는 유전자이고; 리포터 유전자에는 글루쿠로니다제(GUS), 루시퍼라제, 클로람페니콜 트랜스아세틸라제(CAT), 녹색 형광성 단백질(GFP), 알칼리성 포스파타제 및 β-갈락토시다제를 코딩하는 유전자들이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0116] **샘플(생물학적 샘플):** 체액, 조직, 세포 및 이의 하위성분, 예컨대 DNA, RNA 및 단백질을 포함하는 생물학적 샘플을 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 있어서 공통 샘플은 골수, 비장, 림프절, 혈액, 예컨대 말초혈을 포함한다(그러나, 또한 B 세포 또는 B 세포 전구세포가 분리될 수 있는 임의의 다른 공급원을 포함할 수 있으며, 예를 들어 소변, 타액, 조직 생검, 수술 시료, 미세침 흡인물, 부검물 등을 포함한다).

[0117] **특이적 결합제:** 실질적으로 정해진 표적에만 결합하는 제제. 따라서, PD-1 특이적 결합제는 실질적으로 PD-1 폴리펩티드에 결합하고 관련이 없는 폴리펩티드에는 결합하지 않는 제제이다. 한 실시 양태에서, 특이적 결합제는 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단일클론 또는 다클론 항체이다.

[0118] "특이적으로 결합한다"는 용어는, PD-1과 같은 항원과 관련하여, 항체 또는 다른 리간드가 전부 혹은 부분적으로 상기 항원이 결여된 세포 또는 조직이 아니라 그 항원을 보유하고 있는 세포 또는 조직과 우선적으로 결합한다는 것을 의미한다. 물론, 어느 정도의 비특이적 상호 작용이 분자와 비표적 세포 또는 조직 사이에서 발생할 수 있음도 인식된다. 그럼에도 불구하고, 특이적 결합은 항원의 특이적 인식을 통해 매개되는 것으로서 차별화될 수 있다. 선택적으로 반응하는 항체가 항원에 결합하지만, 이들은 낮은 친화도로 결합하게 된다. 특이적 결합은 항체(또는 다른 리간드)와 항원이 없는 세포 간의 결합보다, 항체(또는 다른 리간드)와 항원을 보유하는 세포 사이의 결합을 더욱 더 강하게 한다. 일반적으로, 특이적 결합은 PD-1 폴리펩티드가 없는 세포 또는 조직에 비해, PD-1 폴리펩티드를 보유하는 세포 또는 조직에 결합되는 항체 또는 다른 리간드의 양(단위 시간당)에

있어서 2배 초과, 예컨대 5배 초과, 10배 초과 또는 100배 초과의 증가를 유도한다. 이러한 조건 하에 단백질에의 특이적 결합은 특정 단백질에 대한 그 특이성에 대해 선택된 항체를 필요로 한다. 여러가지 면역분석법 포맷이 특정 단백질과 특이적으로 면역반응하는 항체 또는 다른 리간드를 선별하는데 있어서 적합하다. 예를 들어, 고형상 ELISA 면역분석법이 단백질과 특이적으로 면역반응하는 단일클론 항체를 선별하는데 통상 사용된다. 특이적 면역 반응을 측정하는데 사용될 수 있는 면역분석법 포맷과 조건들에 대한 기술에 대해서는 문헌 [Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)]을 참조한다.

[0119] **T 세포:** 면역 반응에 중요한 백혈구 세포. T 세포는, 이에 제한되지는 않지만, $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포를 포함한다. $CD4^+$ T 림프구는 "분화 클러스터 4(cluster of differentiation 4, CD4)"로 알려진 그 표면상의 마커를 운반하는 면역 세포이다. 헬퍼 T 세포로서 알려진 이러한 세포들은 항체 반응 뿐만 아니라 킬러 T 세포 반응을 포함하는 면역 반응을 조정한다. $CD8^+$ T 세포는 "분화 클러스터 8" (CD8) 마커를 운반한다. 한 실시 양태에서, $CD8^+$ T 세포는 세포독성 T 림프구이다. 또다른 실시 양태에서, $CD8^+$ 세포는 억제자 T 세포이다. T 세포는 항원 제시 세포 상에 제공된 해당 구체적인 항원에 반응할 수 있을 때 "활성화"된다.

[0120] **형질도입/형질감염:** 형질도입된 세포는 내부로 분자 생물학 기법으로 핵산 분자가 도입된 세포이다. 본원에서, 형질도입이라는 용어는 핵산 분자가 이러한 세포 내로 도입되도록 하는 모든 기법, 예컨대 바이러스 벡터를 이용한 감염, 플라스미드 벡터를 이용한 형질전환 및 전기 천공법, 리포좀을 이용한 감염법(lipofection)과 유전자총(particle gun acceleration)에 의한 네이키드 DNA의 도입법을 포함한다.

[0121] **벡터**: 숙주 세포에 도입되는 핵산 분자로서, 형질 전환된 숙주 세포를 생성하게 된다. 벡터는 숙주 세포에서 복제를 허용하는 핵산 서열, 예컨대 복제 원점을 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 선별가능한 마커를 코딩하는 하나 이상의 핵산 및 당업계에 공지된 다른 유전적 성분을 포함할 수도 있다. 벡터는 플라스미드 벡터, 예컨대 그람 음성 및 그람 양성 박테리아 세포에서의 발현을 위한 플라스미드를 포함한다. 예시적인 벡터로서는 대장균(E.coli) 및 살모넬라에서 발현을 위한 것들을 포함한다. 또한 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대, 이에 제한되지는 않지만, 레트로바이러스, 진성두창, 조류폭스, 계두, 카프리폭스, 수이폭스, 아데노바이러스, 포진 바이러스, 알파 바이러스, 바큘로바이러스, 신드비스 바이러스, 우두 바이러스 및 소아마비바이러스 벡터를 포함한다.

[0122] 달리 설명하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 개시 내용이 속하는 당업계에 종사하는 사람이 통상 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 단수 용어는 문맥에서 명백히 다르게 지시하지 않는 한 복수의 피험체도 포함한다. 유사하게, "또는"이라는 단어는 문맥에서 명백히 달리 지시하지 않는 한 "및(그리고)"를 포함한다. 추가로, 핵산 또는 폴리펩티드에 대해 주어진 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기 및 모든 분자량 또는 분자 질량값은 근사치이며, 설명을 위해 제공된 것이다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동일한 방법 또는 재료를 본원 발명을 실시 또는 시험하는데 사용할 수는 있지만, 적절한 방법 및 재료가 하기에 기술된다. "포함한다"라는 용어는 "함유하다"라는 의미이다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 그 내용 전체가 본원에 참조로서 포함된다. 다툼이 있을 경우에, 용어들의 설명을 포함하는 본 명세서가 기준이 될 것이다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 예시적인 것일 뿐이며, 이에 제한하려는 것은 아니다.

[0123] *관련 출원*

[0124] 본원은 또한 2007년 12월 26일 제출된 PCT 출원 PCT/US2007/088851호, 2005년 6월 8일 제출된 미국 가명세서 출원 60/688,872호, 2006년 6월 8일 제출된 미국 실용신안 출원 11/449,919호 및 2006년 6월 8일에 제출된 PCT 출원 PCT/US2006/22423호와 관련이 있다. 이 출원은 또한 2006년 12월 27일 제출된 미국 가명세서 출원 60/877,518호와도 관련이 있다. 이들 선행 출원은 그 전문이 참고로 포함된다.

[0125] *PD-1 길항제*

[0126] 본원에 개시된 방법은 PD-1 경로의 억제제 (PD-1 길항제)의 사용을 수반한다. PD-1 분자는 면역글로불린 유전자 상과(superfamily)의 일원이다. 인간 PD-1은 면역글로불린 상과 도메인, 막횡단(transmembrane) 도메인을 포함하는 세포외 영역과, 면역수용체 티로신계 억제성 모티프(ITIM)(문헌 [Ishida et al., EMBO J. 11:3887, 1992]; [Shinohara et al., Genomics 23:704, 1994]; 미국 특허 제5,698,520호)을 함유하는 세포내 영역을 가진다. 이러한 특징들은 면역억제성 수용체라고도 불리는 더 큰 분자 부류를 규정하기도 하는데, 이들은 gp49B, PIR-B 및 킬러 억제성 수용체(killer inhibitory receptor, KIR)도 포함한다(문헌 [Vivier and Daeron (1997) Immunol. Today 18:286]). 이론에 구속됨이 없이, 이러한 수용체들의 티로실 인산화 ITIM 모티프는 포스파타제

를 함유하는 S112-도메인과 상호 작용하여, 억제 신호를 초래한다. 이러한 면역-억제 수용체의 집합은 주조직적 합성 복합체 (MHC) 분자, 예컨대 KIR에 결합하며, CTLA4는 B7-1 및 B7-2에 결합한다.

[0127] 인간에 있어서, PD-1은 활성화-유도된 세포사를 겪고 있는 T 세포주에서 본래 확인되었던 50-55 kDa의 I형 막횡단 수용체이다. PD-1은 T 세포, B 세포 및 대식 세포에서 발현된다. PD-1에 대한 리간드들은 B7과의 일원들인 PD-리간드 1 (PD-L1, B7-H1로도 공지됨) 및 PD-L2 (B7-DC로도 공지됨)이다.

[0128] 생체 내에서, PD-1은 활성화된 T 세포, B 세포 및 단핵 세포에서 발현된다. 실험 데이터는 중추 및 말초 면역 반응의 하향 조절에 있어 PD-1과 그의 리간드의 상호 작용이 관련이 있음을 말해준다. 특히, PD-1 결핍된 T 세포가 아닌 야생형 T 세포의 증식은 PD-L1의 존재로 억제된다. 추가적으로, PD-1 결핍된 마우스는 자가면역 표현형을 나타낸다.

[0129] 인간 PD-1의 대표적인 아미노산 서열을 하기에 기재하였다(문헌 [Ishida et al., EMBO J. 11:3887, 1992]; [Shinohara et al. Genomics 23:704,1994]; 미국 특허 제5,698,520호도 참조):

[0130]
```
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 (서열 번호: 1)
```

[0131]

[0132] 마우스 PD-1의 대표적인 아미노산 서열을 하기에 기재하였다:

[0133]
```
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 lqgprppрhe
dghcswpl (서열 번호: 2)
```

[0134] 추가의 아미노산 서열은 미국 특허 제6,808,710호 및 미국 특허 공보 제2004/0137577호, 제2003/0232323호, 제2003/0166531호, 제2003/0064380호, 제2003/0044768호, 제2003/0039653호, 제2002/0164600호, 제2002/0160000호, 제2002/0110836호, 제2002/0107363호 및 제2002/0106730호에 개시되어 있으며, 이들은 본원에 참조로서 포함된다. PD-1은 세포외 영역에 단일 Ig V-유사 도메인을 포함하는 면역글로불린 (Ig) 상과의 일원이다. PD-1 세포질 도메인은 ITIM(면역-수용체 티로신계 억제성 모티프) 내에 위치한 막에 가장 근접한 티로신(마우스 PD-1에서 VAYEEL (서열번호 2의 아미노산 223-228번 참조)) 2개를 포함한다. PD-1 상의 ITIM의 존재는 이 분자가 세포질 포스파타제를 채용하여 항원 수용체의 신호 전달을 약화시키는 기능을 한다는 것을 의미한다. 인간 및 쥐과의 PD-1 단백질은 4개의 보존된 잠재적인 N-당화 부위 및 Ig-V 도메인을 규정하는 잔기와 약 60%의 아미노산 동일성을 공유한다. 세포질 영역 내의 ITIM과 카복시-말단 티로신 주위의 ITIM-유사 모티프(인간 및 마우스 각각에 있어서 TEYATI (서열번호 2의 아미노산 166-181번 참고))도 인간과 쥐과 상동체 사이에서 보존된다.

[0135] PD-1은 이의 PD-L1에 결합하는 능력에 기초한 분자들의 CD28/CTLA-4과의 일원이다. 생체 내에서, CTLA4와 같이, PD-1은 항-CD3에 반응하여 T 세포의 표면 상에서 신속하게 유도된다(문헌 [Agata et al. Int. Immunol. 8:765, 1996]). 그러나, CTLA4와는 대조적으로, PD-1은 또한 (항-IgM에 반응하여) B-세포의 표면상에서도 유도된다. 또한, PD-1은 흉선세포 및 골수세포의 하위군에서도 발현된다(문헌 [Agata et al. (1996) 상기 참조]; [Nishimura et al. (1996) Int. Immunol. 8:773]).

[0136] T 세포 무반응은 PD-1 발현의 유도를 동시에 수반한다. T 세포를 PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제와 접촉시킴으로써 T 세포 세포독성을 증가시킬 수 있다는 점이 본원에 개시되어 있다. 보다 구체적으로, PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제를 예컨대 바이러스 항원 또는 종양 항원에 대한 면역 반응을 증가시키는데 사용될 수 있음이 본원에 개시되어 있다.

[0137] 이론에 구속됨이 없이, PD-1 발현 또는 활성의 감소는 세포독성 T 세포 활성의 증가를 초래하여, 감염원에 대한 특이적 면역 반응을 증가시키게 된다. T 세포가 외래 단백질에 반응하기 위해서는, 항원-제시 세포(APC)에 의해 2개의 신호가 휴지 T 림프구에게 제공되어야 한다. 면역 반응에 대해 특이성을 부여하는 첫 번째 신호는, 주조직적합성 복합체(MHC)로서 제공되는 외래 항원성 펩티드를 인식한 후, T 세포 수용체(TCR)를 통하여 유도된다.

보조자극으로 칭하는 두 번째 신호는 T 세포가 증식하여 기능성을 갖도록 유도한다. 보조자극은 항원-특이적이지도 MHC-제한적이지도 않으며, APC에 의해 발현되는 하나 이상의 독특한 세포 표면 폴리펩티드에 의해 제공된다. T 세포가 추가의 보조자극 신호를 수용하지 않으면서 단지 T 세포 수용체를 통해서 자극이 되는 경우에는, 이들은 비반응성, 무반응성이 되거나 사멸하여, 면역 반응의 하향 조절이 초래된다.

[0138] APC 상에서 발현되는 CD80(B7-1) 및 CD86(B7-2) 단백질은 중요한 보조자극 폴리펩티드가다. B7-2가 1차 면역 반응시 우세한 역할을 하는 반면에, B7-1은 이후 면역 반응 도중에 상향 조절되어, 1차 T 세포 반응을 연장하거나 또는 2차 T 세포 반응을 보조자극한다. B7 폴리펩티드는 면역 세포에 보조자극 또는 억제 신호를 제공하여, 면역 세포 반응을 촉진 또는 억제할 수 있다. 예를 들어, PD-L1(B7-4)는 보조자극 수용체에 결합시에는, 면역 세포의 보조자극을 유도하거나, 가용성 형태로 제공시에는 면역 세포 보조자극을 억제한다. 억제 수용체에 결합될 때에는, PD-1 분자는 면역 세포에 억제 신호를 전달할 수 있다. 예시적인 B7과의 구성원으로는 B7-1, B7-2, B7-3(항체 BB-1에 의해 인식됨), B7h(PD-L1)와 B7-4, 그리고 이들의 가용성 단편 또는 유도체가 포함된다. B7과의 구성원은 면역 세포 상의 하나 이상의 수용체, 예컨대 CTLA4, CD28, ICOS, PD-1 및/또는 기타 수용체에 결합하며, 수용체에 따라서는 억제 신호 또는 보조자극 신호를 면역 세포에 전달하는 능력을 가지게 된다.

[0139] CD28은 휴지 T 세포 상에서 구조적으로 발현되는 수용체이다. T 세포 수용체를 통한 신호 전달 후, CD28의 라이게이션과 보조자극 신호의 신호 전달은, T 세포가 증식하여 IL-2를 분비하도록 유도한다. CD28와 동종성 수용체인 CTLA4(CD 152)는 휴지 T 세포 상에서는 부재하나, 그 발현은 T 세포 활성화 후에 유도된다. CTLA4는 T 세포 반응의 음성 제어에서 역할이 있다. CD28 및 CTLA4에 관련이 있는 폴리펩티드인 ICOS는 IL-10 생산에 관여한다. 또한, PD-L1 및 PD-L2가 결합하는 수용체인 PD-1은 T-세포의 표면에서 신속하게 유도된다. 또한, PD-1은 (항-IgM에 반응하여) B-세포의 표면 및 흉선세포와 골수세포의 하위군에서 발현된다.

[0140] PD-1의 결속(예를 들어, 가교결합 또는 응집에 의한)으로 면역 세포 내 억제 신호의 전달이 초래되어, 면역 세포 무반응의 증가가 수반되는 면역 반응의 감소라는 결과가 나타난다. PD-1과의 구성원은 항원 제시 세포 상의 PD-L1 및 PD-L2와 같은 하나 이상의 수용체에 결합한다. 인간 PD-1 리간드 폴리펩티드인 PD-L1 및 PD-L2는 모두 B7과의 폴리펩티드 구성원이다(상기 참조). 각각의 PD-1 리간드는 신호 서열, IgV 도메인, IgC 도메인, 막 횡단 도메인 및 세포질 내 짧은 꼬리부를 포함한다. 생체 내에서, 이 리간드들은 태반, 비장, 림프절, 흉선 및 심장에서 발현된다. 또한, PD-L2는 췌장, 폐 및 간에서 발현되는 한편, PD-L1은 태아 간, 활성화된 T-세포 및 내피세포에서 발현된다. 양 PD-1 리간드의 발현은 활성화된 단핵세포 및 수지상 세포에서 상향 조절된다.

[0141] PD-L1에 대한 대표적인 아미노산 서열 (GENBANK® 접근번호 AAG18508, 2000. 10. 4부터 입수가능)을 하기에 기재하였다:

[0142]
```
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
```
(서열 번호: 3)

[0143] 대표적인 PD-L2 전구체 아미노산 서열 (GENBANK® 접근번호 AAK15370, 2002. 4. 8부터 입수가능)을 하기에 기재하였다:

[0144]
```
mifllmlsl 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
```
(서열 번호: 4)

[0145] 대표적인 변형체 PD-L2 전구체 아미노산 서열 (GENBANK® 접근번호 Q9BQ51, 2006. 12. 12부터 입수가능)을 하기에 기재하였다:

[0146] 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 (서열 번호: 46)

[0147] PD-1 길항제는 PD 리간드 1(PD-L1) 또는 PD 리간드 2(PD-L2)의 발현 또는 활성을 감소시키거나, PD-1과 PD-L1 간의 상호작용 또는 PD-1과 PD-L2 간의 상호작용을 감소시키는 제제를 포함한다. 대표적인 화합물로는 항체 (예컨대 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및 항-PD-L2 항체), RNAi 분자 (예컨대 항-PD-1 RNAi 분자, 항-PD-L1 RNAi 및 항-PD-L2 RNAi), 안티센스 분자 (예컨대 항-PD-1 안티센스 RNA, 항-PD-L1 안티센스 RNA 및 항-PD-L2 안티센스 RNA), 우성 음성 단백질 (예컨대 우성 음성 PD-1 단백질, 우성 음성 PD-L1 단백질 및 우성 음성 PD-L2 단백질) 및 소형 분자 억제제가 포함된다.

[0148] PD-1의 길항제는 세포 내에서 PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 능력을 갖는 임의의 제제이다. PD-1 발현 또는 활성은 대조군에서의 이러한 발현 또는 활성에 비해 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 이상까지 감소된다. 예시적인 활성 감소는 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상이거나, 또는 활성이 완전히 검출되지 않을 수도 있다. 한 실시예에서, 대조군은 PD-1 길항제로 처리되지 않은 세포이다. 또다른 실시예에서, 대조군은 표준값, 즉 PD-1 활성에 영향을 주지 않는 것으로 알려진 담체와 같은 제제와 접촉된 세포이다. PD-1 발현 또는 활성은 본원에 기술된 것을 포함하는, 당업계의 임의의 표준 방법에 의해 측정될 수 있다. 선택적으로, PD-1 길항제는 PD-L1, PD-L2, 또는 상기 양자 모두에 대한 PD-1의 결합을 억제하거나 감소시킨다.

[0149] *A. 항체*

[0150] PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 (또는 이의 조합)에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시된 방법에 사용된다. 항체는 단일클론 항체, 인간화 항체, 탈면역화 항체 및 면역글로불린 (Ig) 융합 단백질을 포함한다. 다클론 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 PD-L2 항체는 예컨대 적절한 피험체 (예컨대 동물 피험체)을 PD-1 리간드 또는 PD-1 면역원으로 면역시키는 것과 같은 방법으로 당업자에 의해 제조될 수 있다. 면역화된 피험체에서의 항-PD-1, 항-PD-L1 또는 항-PD-L2 항체 역가는 부동화된 PD-1 리간드 또는 PD-1 폴리펩티드를 이용한 효소결합 면역분석법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)와 같은 표준 기법으로 시간의 경과에 따라 모니터링할 수 있다.

[0151] 한 실시예에서, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 (또는 이들의 조합)에 특이적으로 결합하는 항체 분자는 포유동물로부터(예컨대 항체로부터) 단리되어 당업자에게 공지된 기법에 의해 추가로 정제될 수 있다. 예를 들어, 항체를 단백질 A 크로마토그래피를 이용하여 정제해 IgG 항체를 단리시킬 수 있다.

[0152] 항체-생성 세포를 피험체로부터 수득하여 표준 기법에 의해 단일클론 항체를 제조하는데 사용될 수 있다(문헌 [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]을 참조). 한 실시예에서, 영구 세포주(일반적으로 골수종)를 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2로 면역화된 포유동물의 림프구 (일반적으로 비장 세포)에 융합시켜, 생성된 하이브리도마 세포의 배양 상청액을 스크리닝하여 해당 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마를 동정한다.

[0153] 한 실시 양태에서, 하이브리도마를 생성하기 위해, 영구 세포주 (예컨대 골수종 세포주)를 림프구와 동일한 포유동물 종으로부터 얻는다. 예를 들어, 쥐과의 하이브리도마는 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 펩티드로 면역화된 마우스의 림프구를 영구 마우스 세포주와 융합시켜 제조될 수 있다. 한 실시예에서, 하이포산틴, 아미놉테린 및 티미딘을 함유하는 배양 배지 ("HAT 배지")에 민감한 마우스 골수종 세포주가 이용된다. 예를 들어, P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 또는 Sp2/O-Ag14 골수종 세포주(메릴랜드주 락빌 소재의 미국 미생물보존센터(ATCC)로부터 입수 가능함)를 포함하는 임의의 수의 골수종 세포주를 표준 기법에 따라 융합 파트너로서 사용할 수 있다. HAT-민감성 마우스 골수종 세포는 폴리에틸렌 글리콜 ("PEG")을 이용하여 마우스 비장 세포로 융합될 수 있다. 융합으로 생성된 하이브리도마 세포는 이후 융합되지 않은(그리고 비생산적으로 융합된) 골수종 세포를 사멸시키는 HAT 배지를 이용하여 선별된다. 해당 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포는 예를 들어 면역학적 분석법(예컨대 효소결합 면역분석법 (ELISA) 또는 방사면역분석법 (RIA))을 이용해 PD-1, PD-L1 또는

PD-L2 분자에 결합하는 항체의 생성에 대하여 하이브리도마 배양 상청액을 스크리닝함으로써 검출될 수 있다.

[0154] 단일클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하는 대안으로서, 재조합체 조합 면역글로불린 라이브러리 (예컨대 항체를 발현하는 파지 라이브러리)를 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2로 스크리닝하여 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 라이브러리 구성원을 단리시킴으로서, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 동정하여 단리시킬 수 있다. 파지를 발현하는 라이브러리 생성 및 스크리닝을 위한 키트는 시판된다(예컨대, 이에 제한되지는 않지만, 파마시아(Pharmacia) 및 스트라타진(Stratagene)). 항체를 발현하는 라이브러리 생성 및 스크리닝용으로 특히 처리될 수 있는 방법 및 시약의 예는 예를 들어, 미국 특허 제5,223,409호; PCT 공개공보 WO 90/02809; PCT 공개공보 WO 91/17271; PCT 공개공보 WO 92/18619; PCT 공개공보 WO 92/20791; PCT 공개공보 WO 92/15679; PCT 공개공보 WO 92/01047; PCT 공개공보 WO 93/01288; PCT 공개공보 WO 92/09690; 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978 7982, 1991]; [Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 19:4133 4137, 1991]에서 찾을 수 있다.

[0155] PD-1에 결합하는 항체의 아미노산 서열은, 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공보 제2006/0210567호에 개시되어 있다. 또한, PD-1에 결합하는 항체는 본원에 참조로서 포함되는 미국 특허 출원 공보 제2006/0034826호에 개시되어 있다. 일부 실시예에서, 항체는 10^7 M^{-1} 이상, 예컨대 10^8 M^{-1} 이상, 5×10^8 M^{-1} 이상 또는 10^9 M^{-1} 이상의 친화도 상수로 PD-1 또는 PD-L1 또는 PD-L2 리간드와 특이적으로 결합한다.

[0156] 한 실시예에서, 각 CDR의 특이성 결정 영역의 서열이 결정된다. CDR 바깥의 잔기들(리간드와 접촉하지 않는 부위)은 치환된다. 예를 들어, 상기 표에서와 같이 CDR 서열 중의 임의의 서열은 기껏해야 1개, 2개 또는 3개의 아미노산이 치환될 수 있다. 하나의 항체에서 기본골격 영역과 또다른 항체에서 CDR을 포함하는 키메라 항체의 생성은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 통상적인 방법으로 제조될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2와 결합하는 공여자 단일클론 항체의 상보성 결정 영역(CDR)과, 인간 수용체 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 기본골격의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변부 기본골격을 갖는 인간화 면역글로불린일 수 있다. 일반적으로, 인간화 면역글로불린은 10^7 M^{-1} 이상, 예컨대 10^8 M^{-1} 이상, 5×10^8 M^{-1} 이상 또는 10^9 M^{-1} 이상의 친화도 상수로 PD-1 또는 PD-L1 또는 PD-L2 리간드와 특이적으로 결합한다.

[0157] 인간화 단일클론 항체는, 공여체 마우스 면역글로불린(예컨대, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2)의 중쇄 및 경쇄 가변 사슬의 공여자 상보성 결정 영역(CDR)을 인간 가변 도메인으로 이동시킨 후, 친화도를 보유하는 것이 요구될 때에 기본골격 영역 내의 인간 잔기를 치환함으로써 제조될 수 있다. 인간화 단일클론 항체로부터 유래된 항체 성분을 사용하면 공여자 항체의 불변부의 면역원성과 관련된 잠재적인 문제들을 해결할 수 있다. 인간화 단일클론 항체를 생산하는 기법은, 예를 들어, 문헌 [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]; 및 [Singer *et al.*, *J. Immunol.*150:2844, 1993]에 기술되어 있다. 항체는 임의의 이소타입일 수 있으나, 일부 실시 양태에서, 항체는 이에 제한되지는 않지만, IgG_1, IgG_2, IgG_3 및 IgG_4를 포함하는 IgG이다.

[0158] 한 실시 양태에서, 인간화 면역글로불린 중쇄 가변부 기본골격의 서열은 공여자 면역글로불린 중쇄 가변부 기본골격의 서열과 약 65% 이상 동일할 수 있다. 따라서, 인간화 면역글로불린 중쇄 가변부 기본골격의 서열은 공여자 면역글로불린 중쇄 가변부 기본골격의 서열과 약 75% 이상, 약 85% 이상, 약 99% 이상 또는 약 95% 이상 동일할 수 있다. 인간 기본골격 영역과, 인간화 항체 기본골격 영역에서 만들어질 수 있는 돌연변이는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호 참조, 본 특허는 본원에 참조로서 포함됨).

[0159] 대표적인 인간 항체는 LEN 및 21/28 CL이다. 중쇄 및 경쇄 기본골격의 서열은 당업계에 공지되어 있다. 인간 MAb LEN의 대표적인 경쇄 기본골격은 하기 서열을 가진다:

FR1: DIVMTQS PDSLAVSLGERATINC (서열 번호: 5)

FR2: WYQQKPGQPPLLIY (서열 번호: 6)

FR3: GVPDRPFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (서열 번호: 7)

[0160] FR4: FGQGQTKLEIK (서열 번호: 8)

[0161] 인간 MAb 21/28'CL의 대표적인 중쇄 기본골격은 하기 서열을 가진다:

FR1: QVQLVQSGAEVKKPQASVKVSCKASQYTFT (서열 번호: 9)

FR2: WVRQAPGQRLEWMG (서열 번호: 10)

FR3: RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (서열 번호: 11)

[0162] FR4: WGQGTLVTVSS (서열 번호: 12)

[0163] 항체, 예컨대 쥐과 단일클론 항체, 키메라 항체 및 인간화 항체는 전장 분자 뿐만 아니라 이의 단편, 예컨대 Fab, $F(ab')_2$ 및 Fv(중쇄 및 경쇄 가변부를 포함하며 특이적인 에피토프 결정기와 결합할 수 있음)를 포함한다. 이러한 항체 단편은 그의 항원 또는 수용체와 선택적으로 결합하는 소정의 능력을 보유한다. 이러한 단편들은 하기를 포함한다:

[0164] (1) Fab (항체 분자의 1가 항원 결합 단편을 포함하는 단편으로서, 파파인 효소로 전항체(whole antibody)를 처리하여 온전한 경쇄 및 하나의 중쇄의 일부를 수득함으로써 제조할 수 있음);

[0165] (2) Fab' (펩신으로 전항체를 처리한 후 환원시켜 온전한 경쇄 및 하나의 중쇄의 일부를 수득할 수 있는 항체 분자의 단편으로서, 항체 분자 하나당 2개의 Fab' 단편이 수득됨);

[0166] (3) $(Fab')_2$ (후속 환원 단계 없이 효소인 펩신으로 전항체를 처리하여 수득할 수 있는 항체의 단편으로, $F(ab')_2$는 2개의 Fab' 단편을 2개의 이황화 결합으로 결착시킨 것임);

[0167] (4) Fv (두 사슬로 발현된 경쇄의 가변부 및 중쇄의 가변부를 포함하는 유전학적으로 가공된 단편); 및

[0168] (5) 단쇄 항체 (예컨대 scFv, 경쇄의 가변부, 중쇄의 가변부를 포함하며, 유전학적으로 융합된 단쇄 분자로서 적절한 폴리펩티드 링커에 의해 연결된 유전학적으로 가공된 분자로 정의됨).

[0169] 이러한 단편들을 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988] 참조). 일부 실시예에서, 가변부는 개별 폴리펩티드로서 발현된 경쇄의 가변부 및 중쇄의 가변부를 포함한다. Fv 항체는 일반적으로 약 25 kDa이며, 각 중쇄 및 각 경쇄 당 3개의 CDR을 갖는 완전한 항원-결합 부위를 포함한다. 이러한 항체를 생성하기 위해, V_H 및 V_L은 숙주 세포 내에서 2개의 개별 핵산 구축물로부터 발현될 수 있다. V_H 및 V_L은 비인접하여 발현되며, Fv 항체의 사슬은 일반적으로 비공유 결합에 의해 연결되어 있다. 그러나, 이러한 사슬들은 희석시 풀어지는 경향이 있어서, 글루타르알데하이드, 분자간 이황화물, 또는 펩티드 링커를 통해 사슬들을 가교시키고자 하는 방법이 개발되었다. 따라서, 한 실시예에서, Fv는 이황화물 안정화된 Fv (dsFv)일 수 있으며, 상기 중쇄 가변부 및 경쇄 가변부는 이황화 결합에 의해 화학 결합되어 있다.

[0170] 추가의 실시예에서, Fv 단편은 펩티드 링커에 의해 연결된 V_H 및 V_L 사슬을 포함한다. 이러한 단쇄 항원 결합 단백질 (scFv)은 올리고뉴클레오티드에 의해 연결된 V_H 및 V_L 도메인을 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 구조적 유전자를 구축함으로써 제조된다. 구조적 유전자는 발현 벡터에 삽입되어, 이어서 숙주 세포 예컨대 *E. coli* 내로 도입된다. 재조합 숙주 세포는 2개의 V 도메인을 가교시키는 링커 펩티드로 단일 폴리펩티드 사슬을 합성한다. scFv를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(문헌 [Whitlow *et al.*, *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, page 97, 1991]; [Bird *et al.*, *Science* 242:423, 1988]; 미국 특허 제4,946,778호; [Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11:1271, 1993]; 및 [Sandhu, 상기 참조]를 참조한다).

[0171] 항체 단편은 항체의 단백질 가수분해에 의해 또는 그 단편을 코딩하는 DNA의 *E. coli*에서의 발현에 의해 제조될 수 있다. 항체 단편은 통상적인 방법으로 전항체를 펩신 또는 파파인 처리함으로써 수득될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 펩신을 이용한 항체의 효소적 분해에 의해 생성되어 5S 단편을 표시하는 $F(ab')_2$를 제공할 수 있다. 이 단편은 티올 환원제, 및 선택적으로는 이황화 결합의 분해로 생성된 황화수소기에 대한 막음 원자단(blocking group)을 이용하여 추가로 분해되어 3.5S Fab' 1가 단편을 생성시킬 수 있다. 대안으로, 펩신을 이용한 효소적 분해로 2개의 1가 Fab' 단편 및 Fc 단편을 직접 생산할 수 있다(미국 특허 제4,036,945호 및 미국 특허 제4,331,647호와 이 특허들에 포함된 참고문헌; [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]; 및 [Coligan *et al.* at sections 2.8.1-2.8.10 및 2.10.1-2.10.4]을 참조한다).

[0172] 온전한 항체에 의해 인식되는 항원에 단편이 결합하기만 하면, 항체를 분해하는 다른 방법들, 예컨대 1가의 경

쇄-중쇄 단편을 형성하기 위한 중쇄의 분리, 단편의 추가의 분해, 또는 기타의 효소적, 화학적, 또는 유전학적 기법들도 사용될 수 있다.

[0173] 당업자라면 항체의 보존적 변이체가 생성될 수 있음을 인식할 것이다. 이러한 항체 단편, 예컨대 dsFv 단편 또는 scFv 단편에서 사용되는 보존적 변이체는, V_H와 V_L 영역 간에 올바른 접힘 및 안정화를 위해 필요한 중요 아미노산 잔기를 보유할 것이며, 분자의 낮은 pI 및 낮은 독성을 유지하기 위한 잔기의 하전 특성을 보유할 것이다. 아미노산 치환 (예컨대 최대 1개, 최대 2개, 최대 3개, 최대 4개, 또는 최대 5개의 아미노산 치환)이 수율을 증가시키기 위해 V_H 및 V_L 영역에서 행해질 수 있다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 아미노산 치환 표는 당업자에게는 잘 알려져 있다. 하기의 6개의 그룹은 서로에 대한 보존적 치환으로 간주되는 아미노산들의 예이다:

[0174] 1) 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T);

[0175] 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);

[0176] 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);

[0177] 4) 아르기닌 (R), 리신 (K);

[0178] 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 및

[0179] 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W).

[0180] 따라서, 당업자라면 해당 항체의 아미노산 서열을 바로 검토하여, 하나 이상의 아미노산을 상기 개략적인 표에 대응시키고 보존적 치환을 확인하여, 잘 알려진 분자적 기법을 이용하여 보존적 변이체를 만들 수 있다.

[0181] 효과기(effector) 분자, 예컨대 치료, 진단, 또는 검출 성분은 당업자에게 공지된 여러 방법을 이용하여 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2와 특이적으로 결합하는 항체에 결합시킬 수 있다. 공유 및 비공유 결합 방법 모두가 사용될 수 있다. 항체에 효과기 분자를 부착하는 절차는 효과기의 화학적 구조에 따라 다르다. 폴리펩티드는 보통 다양한 작용기; 예컨대 카르복시산기 (COOH), 자유 아민기 ($-NH_2$) 또는 황화수소기 (-SH)를 포함하는데, 이들은 항체 상에서 적절한 작용기와 반응하여 효과기 분자의 결합을 유도하는데 유용하다. 대안으로, 항체는 추가의 반응성 작용기에 노출 또는 부착되도록 유도된다. 이러한 유도화는 임의 다수의 링커 분자, 예컨대 일리노이주 락포드 소재의 피어스 케미컬 컴퍼니(Pierce Chemical Company)로부터 입수가능한 링커 분자들을 부착하는 단계를 수반한다. 링커는 효과기 분자에 항체를 결합하는데 사용되는 임의의 분자일 수 있다. 링커는 항체 및 효과기 분자 모두에 대해 공유 결합을 형성할 수 있다. 적절한 링커는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 이에 제한되지는 않지만, 직쇄 또는 분지쇄 탄소 링커, 헤테로 고리 탄소 링커, 또는 펩티드 링커를 포함한다. 항체 및 효과기 분자가 폴리펩티드인 곳에서는, 링커가 그의 곁사슬기를 통해(예컨대 시스테인에 대한 이황화 결합을 통해) 구성 아미노산에 결합될 수 있거나, 또는 말단 아미노산의 알파 탄소 아미노기 및 카르복시기에 결합될 수 있다.

[0182] 항체를 코딩하는 핵산 서열은 예를 들어, 적절한 서열의 클로닝을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해, 또는 예컨대 문헌 [Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979]의 포스포트리에스테르 방법; 문헌 [Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:109-151, 1979]의 포스포디에스테르 방법; 문헌 [Beaucage *et al.*, *Tetra. Lett.* 22:1859-1862, 1981]의 디에틸포스포라미다이트 방법; 예를 들어, 문헌 [Needham-VanDevanter *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 12:6159-6168, 1984]에 기술된 바와 같은 자동화 합성기를 이용하여 문헌 [Beaucage & Caruthers, *Tetra. Letts.* 22(20):1859-1862, 1981]에 기술된 고형상 포스포라미다이트 트리에스테르 방법; 및 미국 특허 제4,458,066호의 고형 지지체 방법에 의한 직접적인 화학 합성에 의해 제조될 수 있다. 화학적인 합성은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 생성한다. 이는 상보적 서열을 이용한 하이브리드화에 의해, 또는 주형으로서 단일 가닥을 이용한 DNA 중합효소를 이용한 중합에 의해 이중 가닥 DNA로 변환될 수 있다. 당업자라면 DNA의 화학적 합성은 일반적으로 약 100개의 염기 서열로 제한되나, 짧은 서열들의 라이게이션을 통해 더 긴 서열이 수득될 수 있다는 것을 알고 있을 것이다.

[0183] PD-1, PD-L1 또는 PD-L2과 특이적으로 결합하는 항체를 코딩하는 서열을 코딩하는 대표적인 핵산은 클로닝 기법에 의해 제조될 수 있다. 적절한 클로닝과 시퀀싱 기법의 예시 및 많은 클로닝 연습을 통해 당업자를 지도하기에 충분한 사용 설명에 관해서는 문헌 [Sambrook *et al.*, 상기 참조], [Berger and Kimmel (eds.), 상기 참조] 및 [Ausubel, 상기 참조]에서 찾아볼 수 있다. 생체 시약 및 실험 장비에 대한 제조업자의 제품 정보도 유용한 정보를 제공한다. 이러한 제조업자에는 시그마 케미컬 컴퍼니(SIGMA Chemical Company, 미국 미주리주 세인트

루이스 소재), R&D 시스템즈(R&D Systems, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재), 파마시아 아머샘(Pharmacia Amersham, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재), 클론테크 레버러토리즈 인코포레이티드(CLONTECH Laboratories, Inc., 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재), 켐 진스 코포레이션(Chem Genes Corp.), 알드리치 케미칼 컴퍼니(Aldrich Chemical Company, 미국 위스콘신주 밀워키 소재), 글렌 리서치 인코포레이티드(Glen Research, Inc.), 깁코 BRL 라이프 테크놀로지스 인코포레이티드(GIBCO BRL Life Technologies, Inc., 미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재), 플루카 케미카-바이오케미카 어낼리티카(Fluka Chemica-Biochemika Analytika, 스위스 부흐 소재의 플루카 헤미 아게(Fluka Chemie AG)), 인비트로겐(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재) 및 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems, 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)가 포함되며, 이뿐만 아니라 당업자에게 알려진 기타의 많은 상업적 공급원도 포함한다.

[0184] 또한, 핵산은 증폭 방법에 의해서도 제조될 수 있다. 증폭 방법으로는 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 리가아제 연쇄 반응 (LCR), 전사-기초 증폭 시스템(transcription-based amplification system, TAS), 자립-구동 서열 복제 시스템(self-sustained sequence replication system, 3SR)을 포함한다. 광범위하게 다양한 클로닝 방법, 숙주 세포 및 생체 내 증폭 방법론에 관해서는 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0185] 한 실시예에서, 사용되는 항체는 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2와 특이적으로 결합하는 항체의 가변부를 코딩하는 cDNA를 효과기 분자(EM)를 코딩하는 cDNA를 포함하는 벡터 내로 삽입함으로써 제조된다. 이 삽입은 가변부와 EMdl 한 프레임에서 판독되도록 하여 하나의 연속하는 폴리펩티드가 생성되게 한다. 따라서, 코딩된 폴리펩티드는 기능성 Fv 영역 및 기능용성 EM 영역을 포함한다. 한 실시 양태에서, 검출가능한 마커(예컨대 효소)를 코딩하는 cDNA는 scFv에 라이게이션되어 마커가 scFv의 카르복실 말단에 위치되도록 한다. 또다른 실시예에서, 검출가능한 마커는 scFv의 아미노 말단에 위치된다. 추가의 실시예에서, 검출가능한 마커를 코딩하는 cDNA는 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2와 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변부에 라이게이션 되어, 마커가 중쇄 가변부의 카르복실 말단에 위치하도록 한다. 이어서, 중쇄-가변부는 이황화 결합을 이용해 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2와 특이적으로 결합하는 항체의 경쇄 가변부에 라이게이션된다. 또다른 실시예에서, 마커를 코딩하는 cDNA는 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2와 결합하는 항체의 경쇄 가변부에 라이게이션되어, 마커가 경쇄 가변부의 카르복실 말단에 위치하도록 한다. 이어서, 경쇄 가변부는 이황화 결합을 이용해 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2와 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변부에 라이게이션된다.

[0186] 일단 항체 또는 이의 기능적 단편을 코딩하는 핵산이 단리되어 클로닝되면, 단백질은 재조합 가공된 세포 예컨대 박테리아, 식물, 효모, 곤충 및 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 항체 또는 이의 기능적 단편을 코딩하는 하나 이상의 DNA 서열은 적절한 숙주 세포로 DNA를 이동시킴으로써 시험관 내에서 발현될 수 있다. 세포는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 또한, 이 용어는 피험체 숙주 세포의 임의의 후손을 포함한다. 복제시 돌연변이가 발생할 수 있으므로 모든 후손들이 그들의 부모 세포와 동일한 것은 아니다. 외래 DNA가 숙주 세포에서 연속적으로 유지되는 것을 의미하는 안정한 전달 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0187] 항체 또는 이의 기능적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 발현 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 발현 조절 서열과 양립가능한 조건하에 발현되도록 라이게이션 된다. 발현 조절 서열은, 이에 제한되지는 않지만 적절한 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, 단백질-코딩 유전자 전방의 개시 코돈 (즉, ATG), 인트론 스플라이싱 신호, mRNA의 적절한 번역을 가능하게 하는 유전자의 올바른 리딩 프레임의 유지 및 정지 코돈을 포함한다.

[0188] 항체 또는 이의 기능적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 플라스미드, 바이러스 또는 서열의 삽입 또는 혼입의 허용되도록 조작될 수 있고 원핵세포 또는 진핵세포에서 발현될 수 있는 기타 다른 비히클을 포함하는 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 숙주는 미생물, 효모, 곤충 및 포유동물 유기체를 포함할 수 있다. 원핵세포에서 진핵세포 또는 바이러스 서열을 갖는 DNA 서열을 발현하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 숙주에서 발현 및 복제가 가능한 생물학적 기능성을 갖는 바이러스 및 플라스미드 DNA 벡터는 당업계에 공지되어 있다.

[0189] 재조합 DNA를 이용한 숙주 세포의 형질 전환은 당업자에게 잘 알려진 통상적인 기법에 의해 수행될 수 있다. 숙주 세포가 원핵세포, 예컨대 *E.coli*인 경우, DNA를 받아들일 수 있는 능력 세포(competent cell)는 급격히 증식하는 시기에 수확한 후에 당업계에 잘 알려진 절차를 이용한 $CaCl_2$ 방법에 의해 처리된 세포로부터 제조될 수 있다. 대안으로, $MgCl_2$ 또는 RbCl이 사용될 수 있다. 형질 전환은 필요하다면 숙주 세포의 원형질체를 형성한 후에, 또는 전기 천공법에 의해 수행될 수도 있다.

[0190] 숙주가 진핵세포인 경우, 인산칼슘을 같이 침전시키는 것과 같은 DNA를 형질도입하는 이러한 방법에서는 통상적인 기구 조작 절차, 예컨대 미량주사법, 전기 천공법, 리포좀에 담은 플라스미드를 삽입하는 방법 또는 바이러스 벡터를 삽입하는 방법 등이 사용될 수 있다. 또한, 진핵 세포는 항체 또는 이의 기능적 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와, 선택가능한 표현형을 코딩하는 제2 외래 DNA 분자, 예컨대 단순 포진 티미딘 키나제 유전자를 이용하여 공동 형질 전환될 수도 있다. 또다른 방법은 진핵성 바이러스 벡터, 예컨대 유인원 바이러스 40(SV40) 또는 소 유두종 바이러스를 사용하여, 진핵 세포를 일시적으로 감염 또는 형질 전환시켜 단백질을 발현시키는 것이다(예를 들어, 문헌 [*Eukaryotic Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982] 참조). 당업자라면 예컨대 COS, CHO, HeLa 및 골수종 세포주와 같은 고등 진핵세포를 포함하는 세포에서 단백질을 생산하는데 사용되는 플라스미드 및 벡터와 같은 발현 시스템을 용이하게 사용할 수 있다.

[0191] 재조합 발현된 폴리펩티드의 단리 및 정제는 분취 크로마토그래피 및 면역학적 분리법을 포함하는 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있다. 재조합 항체는 일단 발현이 되면, 황산암모늄 침전법, 친화성 크로마토그래피, 칼럼 크로마토그래피 등을 포함하는 당업계의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다(일반적으로, 문헌 [R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982] 참조). 적어도 약 90% 내지 95%의 균질도의 실질적으로 순수한 조성물이 본원에 개시되어 있으며, 98% 내지 99% 이상의 균질도가 약학적 목적을 위해 사용될 수 있다. 필요에 따라 일단 부분적으로 또는 균질성 있게 정제가 되면, 치료적 목적으로 사용되는 경우에는 폴리펩티드는 내독소가 실질적으로 없어야 한다.

[0192] *E. coli*와 같은 박테리아로부터, 단쇄 항체를 발현하는 방법 및/또는 단쇄 항체를 포함하는 적절한 활성형으로 되접힘(refolding)하는 방법은 당업계에 공지된 것으로 기술되어 있으며 본원에 개시된 항체에 적용할 수 있다. 문헌 [Buchner *et al.*, *Anal. Biochem.* 205:263-270, 1992]; [Pluckthun, *Biotechnology* 9:545, 1991]; [Huse *et al.*, *Science* 246:1275, 1989] 및 [Ward *et al.*, *Nature* 341:544, 1989]을 참조하며, 이들은 본원에 참조로서 포함된다.

[0193] 흔히, *E. coli* 또는 다른 박테리아에 있어서 기능성을 갖는 이종성 단백질은 봉입체로부터 단리되며, 강한 변성제를 사용하는 가용화 과정과 후속적으로 되접힘 과정이 필요하다. 가용화 단계 중에는, 당업계에도 잘 알려진 바와 같이, 이황화 결합을 분리시키기 위해서 환원제가 존재해야 한다. 환원제를 갖는 대표적인 완충제는 0.1M Tris, pH 8, 6M 구아니딘, 2mM EDTA, 0.3M DTE (디티오에리트리톨)이다. 본원에 참조로서 포함되는 문헌 [Saxena *et al.*, *Biochemistry* 9: 5015-5021, 1970] 및 특히 문헌 [Buchner *et al.*, 상기 참조]에 기술된 바와 같이, 환원형 및 산화형의 저분자량 티올 시약의 존재 하에 이황화 결합의 재산화가 일어날 수 있다.

[0194] 재생은 일반적으로 변성 및 환원된 단백질을 되접힘 완충제에 희석(예를 들어, 100배)함으로써 이루어진다. 대표적인 완충제로서는 0.1M Tris, pH 8.0, 0.5M L-아르기닌, 8mM 산화 글루타티오닌 (GSSG) 및 2 mM EDTA가 있다.

[0195] 2개의 사슬 항체 정제 프로토콜에 대한 변형으로서, 중쇄 및 경쇄 영역을 따로 용해 및 환원시킨 후, 되접힘 용액에 혼합한다. 이 두 단백질에 있어, 한 단백질이 다른 단백질에 대해 5배 초과의 몰비로 혼합되지 않는 경우에 훌륭한 수율을 얻게 된다. 산화환원 뒤섞기(shuffling)가 완료된 후, 되접힘 용액에 초과량의 산화 글루타티온 또는 기타의 저분자량 산화 화합물을 첨가하는 것이 바람직하다.

[0196] 재조합 방법 이외에, 본원에 개시된 항체 및 이의 기능적 단편은 표준 펩티드 합성법을 이용하여 전체적으로 또는 부분적으로 구축될 수도 있다. 약 50개 이하의 아미노산 길이를 갖는 폴리펩티드의 고형상 합성은 서열의 C-말단 아미노산을 불용성 지지체에 결합시킨 후 서열 내에 잔류 아미노산을 순차적으로 첨가함으로써 달성될 수 있다. 고형상 합성을 위한 기법은 문헌 [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] 및 [Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed.*, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984]에 기술되어 있다. 길이가 더 긴 단백질은 짧은 단편들의 아미노 및 카르복시 말단의 축합에 의해 합성될 수 있다. 카르복시 말단의 활성화에 의해 펩티드 결합을 형성하는 방법(예컨대 커플링 시약인 N, N'-디시클로헥실카르보디이미드의 사용에 의해)은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0197] *B. 억제성 핵산*

[0198] PD-1, PD-L1 또는 PD-L2의 발현 및/또는 활성을 감소시키는 억제성 핵산도 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 한 실시 양태는 표적 유전자의 발현을 방해 또는 억제하기 위한 소형 억제성 RNA (siRNA)이다. PD-1, PD-L1 및 PD-L2를 코딩하는 핵산 서열은 GENBANK® 접근번호 NM_005018, AF344424, NP_079515 및 NP_054862에 개시되

어 있다.

[0199] 일반적으로, siRNA는 다이서(Dicer) 또는 DCL 효소에 의해 상대적으로 긴 이중 가닥 RNA 분자가 분해됨으로써 생성된다(문헌 [Zamore, *Science*, 296:1265-1269, 2002]; [Bernstein *et al., Nature,* 409:363-366, 2001]). 동물 및 식물에 있어서, siRNA는 RISC 내로 어셈블링 되어서 RISC의 서열 특이적인 리보스핵분해(ribonucleolytic) 활성을 유도하여, 세포질 내에 mRNA 또는 다른 RNA 표적 분자의 분해를 초래한다. 핵에서는, siRNA는 또한 헤테로크로마틴 관련 히스톤 및 DNA 메틸화를 유도하여 개별 유전자 또는 거대 크로마틴 도메인의 전사 비활성화를 야기한다. PD-1 siRNA는 예컨대 산타 크루즈 바이오테크놀로지 인코포레이티드(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로부터 시판된다.

[0200] 본 발명은 표적 유전자 발현을 방해 또는 억제하는데 적절한 RNA를 제공하는데, 이 RNA는 약 15개 내지 약 40개의 뉴클레오티드의 이중 가닥 RNA를 포함하며, 여기서 상기 RNA의 각 가닥에 0개 내지 5개의 뉴클레오티드 3' 및/또는 5' 돌출부(overhang)를 함유한다. RNA의 서열은 발현의 방해 또는 억제가 필요한 표적 유전자, 예컨대 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2의 mRNA 또는 전사체의 일부와 실질적으로 동일하다. 본원의 목적을 위해서, 발현의 방해 또는 억제가 요구되는 표적 유전자의 mRNA 또는 전사체의 특정 일부와 "실질적으로 동일한" RNA 서열은 표적 유전자의 mRNA 또는 전사체의 특정 일부와 약 30% 미만으로 차이가 있으며, 일부 실시 양태에서는 약 10% 미만으로 차이가 있다. 특정 실시 양태에서, RNA의 서열은 표적 유전자의 mRNA 또는 전사체의 특정 일부와 정확하게 동일하다.

[0201] 따라서, 본원에 개시된 siRNA는 약 15개 내지 약 40개의 뉴클레오티드 길이의 이중 가닥 RNA를 포함하는데, 각 가닥 상에는 0개 내지 5개의 뉴클레오티드의 길이를 갖는 3' 또는 5' 돌출부를 포함하며, 여기서 상기 이중 가닥 RNA의 서열은 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2를 코딩하는 핵산의 mRNA 또는 전사체의 일부와 실질적으로 동일하다(상기 참조). 특정 실시예에서, 이중 가닥 RNA는 약 19개 내지 약 25개의 뉴클레오티드, 예를 들어 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2를 코딩하는 핵산에 실질적으로 동일한 뉴클레오티드를 20개, 21개, 또는 22개 포함한다. 추가의 실시예에서, 이중 가닥 RNA는 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2를 코딩하는 핵산과 100% 동일한 뉴클레오티드를 약 19개 내지 약 25개 포함한다. "약"이라는 것은 문맥상 정수인 양만을 의미한다는 것을 주지하여야 한다. 한 실시예에서, "약" 20개의 뉴클레오티드는 19개 내지 21개의 뉴클레오티드 길이의 뉴클레오티드를 지칭한다.

[0202] 이중 가닥 RNA 상의 돌출부와 관련하여, 돌출부의 길이는 하나의 돌출부의 길이가 다른 가닥의 돌출부의 길이에 의존하지 않는다는 점에서, 두 가닥 사이에서는 독립적이다. 구체적인 실시예에서, 3' 또는 5' 돌출부의 길이는 하나 이상의 가닥 상에서 0-뉴클레오티드가며, 일부의 경우 양 가닥 모두에서 0-뉴클레오티드 길이를 갖는다(따라서, 블런트 dsRNA). 다른 실시예에서, 3' 또는 5' 돌출부의 길이는 하나 이상의 가닥 상에서 1-뉴클레오티드 내지 5-뉴클레오티드가다. 보다 구체적으로, 일부 실시예에서, 3' 또는 5' 돌출부의 길이는 하나 이상의 가닥 상에서 2-뉴클레오티드, 또는 양 가닥 상에서 2-뉴클레오티드가다. 특정 실시예에서, dsRNA 분자는 양 가닥 상에 2-뉴클레오티드 돌출부를 갖는다.

[0203] 따라서, 한 특정한 RNA의 실시 양태에서, 이중 가닥 RNA는 20개, 21개, 또는 22개의 뉴클레오티드를 포함하며, 3' 돌출부의 길이는 양 가닥 상에서 2-뉴클레오티드가다. 본원에 제공된 RNA의 실시 양태에서, 이중 가닥 RNA는 약 40-60% 아데닌+우라실 (AU) 및 약 60-40% 구아닌+시토신 (GC)을 포함한다. 보다 구체적으로, 특정 실시예에서, 이중 가닥 RNA는 약 50% AU 및 약 50% GC를 포함한다.

[0204] 또한, 본원에는 예를 들어 이중 가닥 RNA의 센스 가닥에 하나 이상의 변형된 리보뉴클레오티드를 추가로 포함하는 RNA도 기술되어 있다. 특정 실시예에서, 변형된 리보뉴클레오티드는 하나 이상의 가닥의 3' 돌출부 내에, 보다 구체적으로는 센스 가닥의 3' 돌출부에 존재한다. 변형된 리보뉴클레오티드의 예로서는 검출가능한 표지(예를 들어, 형광단, 예컨대 로다민 또는 FITC), 티오포스페이트 뉴클레오티드 유사체, 데옥시뉴클레오티드 (염기 분자가 리보핵산이기 때문에 변형된 것으로 간주함), 2'-플루오로우라실, 2'-아미노우라실, 2'-아미노시티딘, 4-티오우라실, 5-브로모우라실, 5-요오도우라실, 5-(3-아미노알릴)-우라실, 이노신, 또는 2'O-Me-뉴클레오티드 유사체를 함유하는 뉴클레오티드를 포함하는 것이 특히 고려된다.

[0205] PD-1, PD-L1 및 PD-L2를 위한 안티센스 및 리보자임 분자도 본원에 개시된 방법에서 사용된다. 안티센스 핵산은 특정 mRNA 분자의 적어도 일부와는 상보적인 DNA 또는 RNA 분자이다(문헌 [Weintraub, *Scientific American* 262:40, 1990]). 세포에서, 안티센스 핵산은 상응하는 mRNA에 하이브리드되어, 이중 가닥 분자를 형성한다. 세포는 이중 가닥인 mRNA는 변역하지 않으려 하기 때문에, 안티센스 핵산은 mRNA의 번역을 방해하는 것이다. 약 15개의 뉴클레오티드의 안티센스 올리고머가 바람직한데, 그 이유는 이들이 쉽게 합성되고, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2를 생성하는 표적 세포 내로 도입시 더 큰 분자보다 문제를 야기할 가능성이 적기 때문이다. 유전자의 시

험관 내 번역을 억제하기 위한 안티센스 사용 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌 [Marcus-Sakura, *Anal. Biochem.* 172:289, 1988] 참조).

[0206] 안티센스 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어, 약 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개 또는 50개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 안티센스 핵산은 당업계에 공지된 절차를 이용한 화학적 합성 및 효소적 라이게이션 반응으로 구축될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 핵산 분자는 자연 발생적인 뉴클레오티드 또는 분자의 생물학적 안정성을 증가시키기 위해, 또는 안티센스 핵산과 센스 핵산 사이에 형성된 중복 부위의 물리적 안정성을 증가시키기 위해 고안된 다양하게 변형된 뉴클레오티드를 이용해 화학적으로 합성될 수 있고, 여기서 변형된 뉴클레오티드로는 포스포로티오에이트 유도체 및 아크리딘 치환된 뉴클레오티드 같은 것들이 사용될 수 있다. 안티센스 핵산을 생성하는데 사용될 수 있는 변형된 뉴클레오티드의 예로서는 특히 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 하이포산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시하이드록시메틸) 우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디하이드로우라실, β-D-갈락토실쿠에오신, 이노신을 포함한다.

[0207] 전사를 정지시키기 위한 올리고뉴클레오티드의 사용은 트리플렉스(triplex) 전략으로 알려져 있는데, 그 이유는 블루머(bloomer)가 이중 나선 DNA 주위를 감아 3가닥의 나선을 형성하기 때문이다. 따라서, 이 3중 화합물은 선택된 유전자 상의 특유한 부위를 인식하도록 고안될 수 있다(문헌 [Maher, *et al.*, *Antisense Res. and Dev.* 1(3):227, 1991]; [Helene, C., *Anticancer Drug Design* 6(6):569, 1991]). 이러한 유형의 억제성 올리고뉴클레오티드도 본원에 개시된 방법에서 사용된다.

[0208] DNA 제한효소와 유사한 방식으로 다른 단일 가닥 RNA를 특이적으로 분해하는 능력을 보유하는 RNA 분자인 리보자임도 사용된다. 이러한 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 변형을 통해, RNA 분자 내에서 특정 뉴클레오티드 서열을 인지하여 그것을 절단하는 분자를 만들어 내는 것이 가능하다(문헌 [Cech, *J. Amer. Med. Assn.* 260:3030, 1988]). 이들이 서열-특이적이고, 특정 서열을 갖는 mRNA만을 불활성화시키기 때문에, 이러한 접근법의 주된 이점이 여기에 있다.

[0209] 리보자임에는 2개의 기본적인 유형, 즉 *테트라히메나(tetrahymena)*형 (문헌 [Hasselhoff, *Nature* 334:585, 1988])과 "해머헤드(hammerhead)"형이 있다. *테트라히메나*형 리보자임은 4개의 염기 길이 서열을 인식하는 반면, 해머헤드형 리보자임은 11개-18개의 염기 길이의 서열을 인식한다. 인식 서열이 길면 길수록, 그 서열이 오로지 표적 mRNA 종에서만 나타날 가능성이 더 크다. 결과적으로, 해머헤드형 리보자임이 특정 mRNA 종을 불활성화시키기 때문에 *테트라히메나*형에 비해 바람직하며, 18개의 염기 인식 서열이 짧은 인식 서열에 비해 바람직하다.

[0210] 다양한 전달 시스템이 공지되어 있으며, 치료법으로서 siRNA 및 다른 억제성 핵산 분자를 투여하는데 사용될 수 있다. 이러한 시스템은, 예를 들어, 리포좀, 미세입자, 미세캡슐, 나노입자, 치료 분자를 발현하는 재조합 세포(예를 들어, 문헌 [Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262, 4429, 1987] 참조), 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서 치료 핵산의 구축 등의 캡슐화를 포함한다.

[0211] *C. 소형 분자 억제제*

[0212] PD-1 길항제는 천연 산물 또는 합성(반합성) 추출물의 거대 라이브러리 또는 화학적 라이브러리로부터 당업계에 공지된 방법에 따라 동정되는 분자를 포함한다. PD-1 활성의 감소를 검출할 수 있는(예컨대 세포 사멸을 검출) 스크리닝 방법은 활성에 대한 다양한 출처원으로부터 화합물을 동정하는데 유용하다. 초기의 스크리닝은 여러가지 화합물들의 라이브러리, 다양한 다른 화합물들 및 화합물 라이브러리들을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2와 결합하는 분자, PD-1, PD-L1 및/또는 PD-L2의 발현을 억제하는 분자, 및 PD-1, PD-L1 및/또는 PD-L2의 활성을 억제하는 분자가 동정될 수 있다. 이러한 소형 분자들은 조합 라이브러리, 천연 산물 라이브러리, 또는 기타 다른 소형 분자 라이브러리로부터 동정될 수 있다. 또한, PD-1 길항제는 상업적 공급원의 화합물로서 뿐만 아니라 동정된 억제제의 시판되는 유사체로서 동정될 수 있다.

[0213] 시험 추출물 또는 화합물의 정확한 출처는 PD-1 길항제의 동정에 있어 중요한 것은 아니다. 따라서, PD-1 길항제는 사실상 임의 다수의 화학적 추출물 또는 화합물로부터 동정될 수 있다. PD-1 길항제가 될 수 있는 이러한 추출물 또는 화합물의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만, 식물계-, 진균계-, 원핵생물계- 또는 동물계 추출물, 발효 배양물 및 합성 화합물 뿐만 아니라 기존의 화합물의 변형물을 포함한다. 또한, 이에 제한되지는 않지만, 당류계-, 지질계-, 펩티드계- 및 핵산계 화합물을 포함하는 임의 다수의 화학적 화합물의 무작위 또는 직접 합성(예를 들어, 반합성 또는 전합성) 생산을 위한 수많은 방법들도 이용가능하다. 합성 화합물 라이브러리는 브

랜던 어소시에이트(Brandon Associates, 미국 뉴햄프셔주 메리맥 소재) 및 알드리치 케미컬(미국 위스콘신주 밀워키 소재)로부터 시판된다. PD-1 길항제는 메이브리지 케미컬 컴퍼니(Maybridge Chemical Co., 영국 콘월 트레빌레 소재), 콤지넥스(Comgenex, 미국 뉴저지주 프린스턴 소재), 브랜던 어소시에이트(미국 뉴햄프셔주 메리맥 소재) 및 마이크로소스(Microsource, 미국 코네티컷주 뉴 밀포드 소재)를 포함하는 다수의 회사들로부터 시판되는 합성 화합물 라이브러리로부터 동정될 수 있다. PD-1 길항제는 보기 드문 화학적 라이브러리, 예컨대 알드리치(미국 위스콘신주 밀워키 소재)로부터 입수가능한 라이브러리로부터 동정될 수 있다. PD-1 길항제는 바이오틱스(Biotics, 영국 서섹스 소재), 제노바(Xenova, 영국 슬라우 소재), 하버 브랜치 오션그래픽스 인스티튜트(Harbor Branch Oceangraphics Institute, 미국 플로리다주 포트 피어스 소재) 및 파마마 유.에스.에이(PharmaMar, U.S.A., 미국 매사추세츠주 캠브리지 소재)를 포함하는 다수의 공급원들로부터 시판되는 박테리아, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리에서 동정될 수 있다. 천연 및 합성적으로 생산된 라이브러리 및 화합물은 통상적인 화학적, 물리적 및 생화학적 방법을 통해 용이하게 변형된다.

[0214] 다양한 화합물 종류가 일반적으로는 작은 유기 화합물을 포함하는 유기 화합물이지만, 이들 중에서 유용한 화합물을 찾을 수 있다. 작은 유기 화합물은 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 50 달톤 이상 약 2,500 달톤 이하, 예컨대 약 750 달톤 또는 약 350 달톤 이하의 분자량을 가진다. 대표적인 종류로는 헤테로고리, 펩티드, 당류, 스테로이드 등을 포함한다. 화합물은 효능, 안정성, 약학적 적합성 등을 향상시키기 위해 변형될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 사용되는 화합물은 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2에 대하여 1nM 이하, 10nm 이하, 1μM 이하, 10μM 이하, 또는 1mM 이하의 Kd를 가진다.

[0215] *D. 길항제로서의 PD-1 펩티드 변형체*

[0216] 한 실시 양태에서, 길항제로서 작용하는 PD-1 단백질의 변형체는 길항제 활성을 갖는 단백질을 확인하기 위해 PD-1 단백질의 점 돌연변이 또는 절단 돌연변이와 같은 돌연변이들의 조합 라이브러리를 스크리닝함으로써 동정될 수 있다. 한 실시예에서, 길항제는 가용성 PD-1 단백질이다.

[0217] 따라서, PD-1 변형체의 라이브러리는 핵산 수준에서 조합적인 돌연변이 유발에 의해 생성될 수 있으며, 다양한 유전자 라이브러리에 의해 코딩된다. PD-1 변형체의 라이브러리는, 예를 들어, 합성 올리고뉴클레오티드의 혼합물을 유전자 서열 내로 라이게이션하여 변성된 한 세트의 잠재적인 PD-1 서열이 개별 폴리펩티드로서, 또는 다르게는 PD-1 서열의 세트를 포함하는 (예컨대 파지 발현을 위한) 한 세트의 거대 융합 단백질로서 발현이 가능하도록 함으로써 생성될 수 있다.

[0218] 변성된 올리고뉴클레오티드로부터 잠재적인 PD-1 변형체의 라이브러리를 생성하는데 사용될 수 있는 다양한 방법이 있다. 변성 유전자 서열의 화학적 합성은 자동화된 DNA 합성기에서 수행될 수 있으며, 이후 합성된 유전자는 적절한 발현 벡터에 라이게이션된다. 변성된 유전자 세트를 사용하면, 한 혼합물 내에 원하는 세트의 잠재적인 PD-1 길항제 서열을 코딩하는 모든 서열을 제공할 수가 있다. 변성된 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Narang, et al., Tetrahedron 39:3, 1983]; [Itakura et al. Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984]; [Itakura et al. Science 198:1056, 1984] 참조).

[0219] 추가로, PD-1 단백질 코딩 서열 단편의 라이브러리는 PD-1 길항제의 변형체를 스크리닝하고 후속적으로 선별하기 위한 PD-1 단편 군집을 생성하는데 사용될 수 있다. 한 실시 양태에서, 코딩 서열 단편의 라이브러리는, PD-1 코딩 서열의 이중 가닥 PCR 단편을 절단(nicking)이 분자당 약 1회만 발생하는 조건하에 뉴클레아제로 처리하는 단계, 상기 이중 가닥 DNA를 변성시킨 후 재생시켜 서로 다른 절단된 산물의 센스/안티센스 쌍을 포함할 수 있는 이중 가닥 DNA를 형성하는 단계, 다시 형성된 중복 부위의 단일 가닥 부분을 S1 뉴클레아제로 처리하여 제거하는 단계, 및 상기 생성된 단편 라이브러리를 발현 벡터로 라이게이션하는 단계를 수행함으로써 생성될 수 있다. 상기 방법에 의해, 다양한 크기를 갖는 PD-1의 N-말단, C-말단 및 내부 단편을 코딩하는 발현 라이브러리가 유도될 수 있다.

[0220] 점 돌연변이 또는 절단 돌연변이에 의해 제조된 조합 라이브러리의 유전자 산물을 스크리닝하는 여러 가지 기법들, 또는 선별된 특성을 보유하는 유전자 산물을 위한 cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 여러 가지 기법들이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 기법들은 PD-1 단백질의 조합적인 돌연변이 유발로 생성된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝에 적용가능하다. 초고속 분석에 적용가능한 거대 유전자 라이브러리의 스크리닝을 위해 매우 널리 사용되는 기법은 일반적으로 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계, 상기 생성된 벡터의 라이브러리로 적절한 세포를 형질 전환하는 단계 및 상기 조합된 유전자를 원하는 활성의 검출이 그 산물이 이미 검출된 유전자를 코딩하는 벡터의 단리를 촉진하는 조건 하에 발현시키는 단계를 포함한다. PD-1 길항제를 동정하기 위해 순환적 조화 돌연변이 유발법(Recursive ensemble mutagenesis, REM)을 스크리닝 분석

법과 함께 사용할 수 있다(문헌 [Arkin and Youvan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811 7815, 1992]; [Delagrave et al., Protein Eng. 6(3):327 331, 1993]).

[0221] 한 실시 양태에서, 세포에 기초한 분석이 PD-1 변형체의 라이브러리를 분석하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터의 라이브러리는 통상적으로 PD-1을 합성하여 분비하는 세포주 내로 형질 도입될 수 있다. 이후, 상기 형질 도입된 세포는 PD-1 및 특정 PD-1 변형체가 분비되도록 배양된다. 세포 상청액 내 PD-1 활성에 대한 돌연변이의 발현 효과는 임의의 기능성 분석법에 의해 검출될 수 있다. 이후, 플라스미드 DNA는 내인성 PD-1 활성이 억제된 세포 및 추가로 특성화된 개별 클론들로부터 회수될 수 있다.

[0222] 펩티드 모방체(Peptidomimetic)도 PD-1 길항제로서 사용될 수 있다. 펩티드 유사체는 주형 펩티드와 유사한 특성을 갖는 비펩티드성 약물로서 약학업계에서 흔히 사용된다. 이러한 유형의 비펩티드성 화합물은 일반적으로 컴퓨터 분자 모델링을 이용하여 개발된다. 치료적으로 유용한 펩티드와 구조적으로 유사한 펩티드 모방체가 균등한 치료적 효과 또는 예방학적 효과를 나타내기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 펩티드 모방체는 전형적 폴리펩티드(예를 들어, PD-1 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드)와 구조적으로는 유사하나, --CH_2NH--, --CH_2S--, --CH_2--CH_2--, --CH.=.CH-- (시스 및 트랜스), --$COCH_2$--, --$CH(OH)CH_2$--, 및 --CH_2SO-- 결합에 의해 선택적으로 치환된 하나 이상의 펩티드 결합을 가진다. 이러한 펩티드 결합은 당업계에 공지된 방법에 의해 치환될 수 있다(예를 들어, 문헌 [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] 참조). 펩티드 모방체는 경제적이고, 안정적으로 얻어질 수 있으며, 증가된 반감기 또는 흡수도를 가질 수 있다. 펩티드 모방체의 표지는 통상 하나 이상의 표지를 직접, 또는 스페이서를 통해(예컨대 아미드기에 의해) 정량적 구조 활성 데이터 및/또는 분자 모델링에 의해 예측된 펩티드 모방체 상의 비간섭 위치에 공유 결합시키는 단계를 수반한다. 이러한 비간섭 위치는 일반적으로 펩티드 모방체가 치료적 효과의 생성을 위해 결합하게 되는 거대 분자와의 직접적인 접촉을 형성하지 않는 위치이다. 펩티드 모방체의 유도는 펩티드 모방체의 목적하는 생물학적 또는 약리학적 활성을 실질적으로 저해하지 않아야 한다.

[0223] PD-1의 생물학적 활성을 방해(즉 PD-1의 PD-L1, PD-L2에의 결합, 또는 양자 모두에 결합)하는 우성 음성 단백질 또는 우성 음성 단백질을 코딩하는 핵산도 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 우성 음성 단백질은 그것이 상응하는 야생형 단백질의 10개, 20개, 35개, 50개, 100개 이상 또는 150개 이상의 아미노산과 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상, 또는 심지어 99% 이상 서열 동일성을 갖는 서열을 보유하는 임의의 아미노산 분자이다. 예를 들어, 우성 음성 PD-L1은 천연(야생형) PD-1보다 더 밀착하여 PD-1과 결합하도록 하지만, PD-1을 통해 세포 신호 전달은 어느 것도 활성화시키지 않는 돌연변이를 가진다.

[0224] 우성 음성 단백질은 발현 벡터로서 투여될 수 있다. 상기 발현 벡터는 비바이러스성 벡터 또는 바이러스 벡터일 수 있다(예를 들어, 레트로바이러스, 재조합 아데노-연관 바이러스, 또는 재조합 아데노바이러스 벡터). 대안으로, 우성 음성 단백질은 재조합 단백질로서 직접 전신에 투여될 수 있거나 또는 예를 들어, 미세주사 기법을 이용하여 감염된 부위에 투여될 수 있다.

[0225] 폴리펩티드 길항제는 흔히 거대 폴리펩티드(예컨대 ras 또는 효소와의 융합 단백질)의 일부로서 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 의해 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 제조될 수 있다. 대안으로, 이러한 펩티드는 화학적 방법에 의해 합성될 수 있다. 재조합 숙주에서 이종성 단백질의 발현, 폴리펩티드의 화학적 합성 및 시험관 내 번역에 대한 방법은 당업계에 공지되어 있다(문헌 [Maniatis et 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] 참조).

[0226] 펩티드는 예컨대 직접적 화학 합성에 의해 제조될 수 있으며, 리간드와 상호작용하는 PD-1의 길항제로서 사용될 수도 있다. 펩티드는 N-말단 및/또는 C-말단에 공유 결합에 의해 결합된 비펩티드 부분을 갖는 변형된 펩티드로서 제조될 수 있다. 특정의 바람직한 실시 양태에서, 카르복시-말단 또는 아미노-말단, 또는 양자 모두는 화학적으로 변형된다. 말단 아미노기 및 카르복시기의 아주 흔한 변형 방법은 각각 아세틸화와 아미드화이다. 아미노-말단 변형 예컨대 아실화 (예를 들어, 아세틸화) 또는 알킬화 (예를 들어, 메틸화) 및 카르복시-말단 변형 예컨대 아미드화 뿐만 아니라 고리화를 포함하는 기타의 말단 변형 방법이 다양한 실시 양태에 포함될 수 있다. 특정 아미노-말단 및/또는 카르복시 말단 변형 및/또는 핵심 서열로의 펩티드 신장은 유리한 물리적, 화학적, 생화학적 및 약리학적 특성, 예컨대 향상된 안정성, 증가된 효능 및/또는 성능, 혈청 프로테아제에 대한

저항성, 바람직한 약동학적 특성 및 기타 특성들을 제공할 수 있다.

[0227] **치료 방법: PD-1 길항제의 치료 피험체에의 투여**

[0228] 다양한 감염 및 암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법에서는, 피험체에게 치료적 유효량의 PD-1 길항제를 투여함으로써 감염 또는 암이 치료 또는 예방되거나 증상이 완화된다. 피험체는 임의의 포유동물, 예컨대 인간, 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 소, 말 및 돼지이다. 일부 실시예에서, 피험체는 인간과 같은 영장류이다. 추가의 실시예에서, 피험체는 마우스와 같은 쥐과의 피험체가다. 일부 실시 양태에서, 이 방법은 피험체로부터 유래한 샘플에서 기억 B 세포 증식을 측정하는 것을 포함한다(하기 참조). 일부 예에서, 이 방법은 또한 피험체로부터 유래한 샘플 중에서 나이브 B 세포를 측정하는 것을 포함한다. 추가의 예에서, 이 방법은 CD28(CD28+) 세포를 발현하는 T 세포를 측정하는 것을 포함한다.

[0229] 일부 실시 양태에서, 피험체는 감염이 발병할 위험에 처해 있다. 감염이 발병할 위험에 처해 있는 피험체는 아직 감염되지 않고 있으나 피험체 감염원에 의해 감염될 수 있는 피험체가다. 추가의 실시예에서, 피험체는 지속성 감염, 예를 들어 만성 감염 등에 감염된다. 만성 감염과 같은 지속성 감염을 앓고 있는 피험체는 당업자, 예컨대 의사가 적절한 표준 방법으로 확인할 수 있다.

[0230] 일부 실시예에서, 피험체는 박테리아, 바이러스, 진균, 또는 기생충에 의한 지속성 감염을 앓고 있다. 일반적으로, 지속성 감염은 급성 감염과 대조적으로, 숙주 면역 반응의 유도에 의해 효과적으로 제거되지 않는다. 감염원과 면역 반응은 평형 상태에 도달하게 되어, 감염된 피험체는 반드시 증상을 나타내지 않더라도 장기간 동안에 걸쳐 감염된 상태로 유지된다. 지속성 감염에는 예를 들어, 잠복성, 만성 및 지발성 감염이 포함된다. 지속성 감염은 인간 T 세포 백혈병 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 시토메갈로바이러스, 포진바이러스, 수두 대상포진 바이러스, 홍역 바이러스, 파포바바이러스, 프리온, 간염 바이러스, 아데노바이러스, XMRV, 폴리오마 JC 바이러스, 파보바이러스 및 유두종 바이러스와 같은 바이러스로 인해 발병된다.

[0231] 만성 감염에서, 감염원은 신체 내에서 언제나 검출될 수 있다. 그러나, 질병의 징후 및 증상은 연장된 시간 동안 존재하거나 부재할 수 있다. 만성 감염의 예에는 B형 간염(HBV에 의해 유발됨) 및 C형 간염(HCV에 의해 유발됨) 아데노바이러스, 시토메갈로바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 단순 포진 바이러스 1, 단순 포진 바이러스 2, 인간 포진바이러스 6, 바리셀라-조스터 바이러스, B형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, 유두종 바이러스, 파보바이러스 B19, 폴리오마바이러스 K, 폴리오마바이러스 JC, XMRV, 홍역 바이러스, 루벨라 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T 세포 백혈병 바이러스 I 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 II가 포함된다. 기생충 지속성 감염은 라이쉬마니아(Leishmania), 톡소플라즈마(Toxoplasma), 트리파노소마(Trypanosoma), 플라소모디움(Plasmodium), 쉬스토소마(Schistosoma) 및 엔세팔리토준(Encephalitozoon)에 의한 감염의 결과로서 발생될 수 있다.

[0232] 잠복성 감염에서, 감염원(예를 들어, 바이러스)는 외관상 불활성이고 유휴상태(dormant)이어서, 피험체가 항상 징후나 증상을 나타내는 것은 아니다. 잠복성 바이러스 감염에서, 바이러스는 증상이 다시 나타나기 전까지는 장기간 동안 숙주와 평형 상태로 유지되나; 실제 바이러스는 질병의 재활성화가 일어난 후에나 검출될 수 있다. 잠복성 감염의 예에는 HSV-1(열성 포진), HSV-2(음부 포진) 및 바리셀라 조스터 바이러스(VZV, 수두-대상포진)에 의해 유발되는 감염들이 포함된다.

[0233] 지발성 감염에서, 감염원은 매우 긴 시간에 걸쳐 그 수가 점차 증가하며, 그 동안에 중요한 징후나 증상은 관찰이 관찰되지 않는다. 지발성 감염의 예로서는 AIDS(HIV-1 및 HIV-2에 의해 유발됨), 동물에게서 종양을 유발하는 렌티바이러스 및 프리온이 포함된다.

[0234] 또한, 지속성 감염은 급성 감염의 후기 합병증으로 흔히 발병한다. 예를 들어, 아급성 경화성 범뇌염(SSPE)은 급성 홍역 감염 후에 일어날 수 있거나, 혹은 퇴행성 뇌염은 루벨라 감염의 결과로서 발병할 수 있다.

[0235] 한 비제한적인 실시예에서, 피험체는 PCR 분석을 이용하여 이 개체의 생물학적 샘플에서 클라미디아 종의 검출 후 지속성 클라미디아 감염을 앓는 것으로 진단될 수 있다. 포유동물은 본원 개시에 따라 치료하고자 하는 지속성 감염을 앓는 것으로 진단되었을 필요는 없다. 지속성 감염을 발병시킬 수 있는 미생물 감염원으로는 바이러스 (예컨대 유두종 바이러스, 간염 바이러스, 인간 면역 결핍 바이러스, 및 포진 바이러스), 박테리아 (예컨대 대장균 및 클라미디아 종), 기생충 (예컨대 라이쉬마니아 종, 쉬스토소마 종, 트리파노소마 종, 톡소플라즈마 종) 및 진균을 포함한다.

[0236] PD-1 발현 또는 활성을 감소시키는 화합물 이외에, 치료할 피험체에 백신을 투여할 수도 있다. 한 실시예에서, 백신은 아주반트를 포함할 수 있다. 또다른 실시예에서, 백신은 프라임 부스터 면역화(prime booster

immunization)를 포함할 수 있다. 백신은 열-사멸 백신(heat-killed vaccine), 약독화 백신, 또는 서브유닛 백신을 포함할 수 있다. 병원체로 이미 감염된 피험체는 치료 백신, 예컨대 PD-1 길항제 및 항원으로 치료될 수 있다. 피험체는 무증상일 수 있어, 치료는 증상의 발달을 예방하게 된다. 또한, 치료 백신은 하나 이상의 기존 증상의 중증도를 감소시키거나, 또는 병원체의 용량을 감소시킬 수 있다.

[0237] 치료 방법의 일부 실시예에서, 피험체에게는 바이러스 항원과 함께 치료적 유효량의 PD-1 길항제가 투여된다. 적절한 바이러스 항원의 비제한적인 예로서는 특히 인플루엔자 HA, NA, M, NP 및 NS 항원; HIV p24, pol, gp41 및 gp120; 메타뉴모바이러스 (hMNV) F 및 G 단백질; C형 간염 바이러스 (HCV) E1, E2 및 코어 단백질; 뎅기열 바이러스 (DEN1-4) E1, E2 및 코어 단백질; 인간 유두종 바이러스 L1 단백질; 엡스타인 바 바이러스 gp220/350 및 EBNA-3A 펩티드; 시토메갈로바이러스 (CMV) gB 당단백질, gH 당단백질, pp65, IE1 (엑손 4) 및 pp150; 바리셀라 조스터 바이러스 (VZV) IE62 펩티드 및 당단백질 E 에피토프; 단순 포진 바이러스 당단백질 D 에피토프, 폴리오마 JC 바이러스 폴리펩티드, XMRV 폴리펩티드를 포함한다. 상기 항원성 폴리펩티드는 자연 발생적인 동물 또는 인간 바이러스 단리물에 상응할 수 있거나, 또는 천연 (병원성 또는 비병원성) 단리물에 대해 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 가공될 수 있다. 대표적인 항원을 하기에 열거하였다:

표 1

[0238]

대표적인 해당 항원(표적 항원)		
바이러스 항원	**해당 항원의 대표적인 항원 서열**	**서열번호:**
BK	TLYKKMEQDVKVAHQ	13
	GNLPLMRKAYLRKCK	14
	TFSRMKYNICMGKCI	15
JC	SITEVECFL	16
엡스타인-바(EBV)	QPRAPIRPI	17
시토메갈로바이러스(CMV)	NLVPMVATV	18
HPV	YMLDLQPET(T)	19
인플루엔자 A	GILGFVFTL	20
진균 항원		
블라스토마이세스 더마티티디스	CELDNSHEDYNWNLWFKWCSGHGR	47
	TGHGKHFYDCDWDPSHGDYSWYLW	48
	DPSHGDYSWYLWDYLCGNGHHPYD	49
	DYLCGNGHHPYDCELDNSHEDYSW	50
	DPYNCDWDPYHEKYDWDLWNKWCN	51
	KYDWDLWNKWCNKDPYNCDWDPYH	52

[0239] 추가의 실시 양태에서, 피험체는 종양을 가진다. 상기 방법은 치료적 유효량의 PD-1 길항제를 피험체에게 투여함으로써 종양을 치료하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 치료적 유효량의 종양 항원, 또는 상기 종양 항원을 코딩하는 뉴클레오티드도 피험체에게 투여된다. PD-1 길항제 및 종양 항원, 또는 상기 종양 항원을 코딩하는 뉴클레오티드는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0240] PD-1 길항제를 투여하면 피험체에 있어서 종양의 크기, 우세 정도, 또는 잠재적 전이의 감소를 유도할 수 있다. 암의 평가는 표준 임상학적 프로토콜을 이용하여 행한다. 효능은 특정 종양을 진단 또는 치료하는 임의의 공지된 방법과 관련하여 측정된다.

[0241] 종양("암"으로도 불림)은 고형 종양 및 백혈병을 포함한다. 대표적인 종양으로서는 표 2에 열거된 것들(이러한 함과 관련있는 공지된 종양 항원과 함께)을 포함한다.

표 2

[0242]

대표적인 종양 및 이의 종양 항원	
종양	**종양 항원**
급성 골수성 백혈병	윌름즈 종양 1 (WT1), 우세하게 발현되는 흑색종 항원 (preferentially expressed antigen of melanoma, PRAME), PR1, 프로테이나아제 3, 엘라스타아제, 카텝신 G
만성 골수성 백혈병	WT1, PRAME, PR1, 프로테이나아제 3, 엘라스타아제, 카텝신 G

골수이형성증	WT1, PRAME, PR1, 프로테이나아제 3, 엘라스타아제, 카텝신 G
급성 림프아구성 백혈병	PRAME
만성 림프구성 백혈병	서바이빈
비호지킨 림프종	서바이빈
다발성 골수종	뉴욕 이소파거스(New York esophageous) 1 (NY-Eso1)
악성 흑색종	MAGE, MART, 티로시나아제, PRAME, GP100
유방암	WT1, 허셉틴
폐암	WT1
전립선 암	전립선 특이 항원 (PSA)
결장암	암태아 항원 (CEA)
신세포암 (RCC)	섬유아세포 성장 인자 5 (FGF-5)

[0243] 대표적인 해당 종양 항원은 하기 표 3에 열거된 것들을 포함한다:

표 3

[0244]

종양 항원 및 이들의 유도체 펩티드		
PRAME	LYVDSLFFL	21
WT1	RMFPNAPYL	22
서바이빈	ELTLGEFLKL	23
AFP	GVALQTMKQ	24
ELF2M	ETVSEQSNV	25
프로테이나아제 3 및 그의 펩티드 PR1	VLQELNVTV	26
호중구 엘라스타제	VLQELNVTV	27
MAGE	EADPTGHSY	28
MART	AAGIGILTV	29
티로시나아제	RHRPLQEVYPEANAPIGHNRE	30
GP100	WNRQLYPEWTEAQRLD	31
NY-Eso-1	VLLKEFTVSG	32
허셉틴	KIFGSLAFL	33
암태아 항원 (CEA)	HLFGYSWYK	34
PSA	FLTPKKLQCV	35

[0245] 비제한적인 구체예로서 혈관면역아세포성 림프종 또는 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종이 있다. 혈관면역아세포성 림프종(AIL)은 확대된 림프절 및 고감마글로불린혈증(혈액 내 증가된 항체)이 특징인 T-세포 비호지킨 림프종의 공격형(급속도로 발달하는 형태)이다. 기타 증상에는 피부 발진, 고열, 체중 감퇴, 양성을 나타내는 쿰 검사(Coomb's test) 또는 야간 발한이 포함될 수 있다. 이러한 악성은 통상 성인에게서 일어난다. 환자는 통상 연령이 40세 내지 90세(평균 약 65세)이고, 남성이 더욱 빈번하다. AIL이 진행함에 따라, 간비종대, 용혈성 빈혈 및 다클론성 고감마글로불린혈증이 발병할 수 있다. 대략 환자의 40% 내지 50%에서 피부가 관련된다.

[0246] 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종은 돌연변이화된 비기능적 면역글로불린 유전자를 갖는 배중심 B 세포로부터 유래되는 것으로 보이는 B 세포 신생물이다. 혈관면역아세포성 림프종과 유사하게, 신생물성 세포는 여포성 수지상 세포의 그물망 구조와 관련이 있다. PD-1 발현은 CD57+ T 세포에 대해 보여지는 패턴과 유사한 패턴으로, 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종 내 신생물성 CD20+ 세포와 밀접하게 관련된 T 세포에서 나타난다. CD57은 CXCR5와 함께, 배중심-관련 T 세포의 또 다른 마커로서 확인되었고, 이러한 발견은 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종 내 신생물성 세포가 배중심-관련 T 세포와 밀접한 연관이 있다는 결론을 뒷받침한다.

[0247] 해당 종양 항원의 발현은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 단백질 또는 핵산 수준에서 결정된다. 예를 들어, 이러한 서열들 중 하나 이상을 특이적으로 인식하는 프로브를 이용하는 노던 혼성화 분석이 유전자 발현을 측정하는 데 사용될 수 있다. 대안으로, 발현은 역전사를 이용하는 PCR 검정을 이용하여, 예를 들어 유전자의 차별적 발현 서열에 대해 특이적인 프라이머를 이용하여 측정된다. 또한, 발현은 예컨대 본원에 기술된 유전자 산물에 의해 코딩되는 펩티드의 수준 또는 그 펩티드의 활성을 측정함으로써 단백질 수준에서 결정된다. 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 대한 항체에 기초한 면역분석법을 포함한다. 임의의 생물학적 물질은 단백질 또는 그 단백질의 활성의 검출/정량화를 위해 사용될 수 있

다.

[0248] 한 실시예에서, 피험체는 암에 걸린 것으로 이미 진단되었다. 추가의 실시예에서, 피험체는 암에 대한 사전 치료를 받았다. 그러나, 일부 실시예에서, 피험체는 암에 걸린 것으로 미리 진단되지 않았다. 고형 종양의 진단은 검사시 질량의 확인을 통해 행해지지만, 이는 또한 방사선학적 진단 또는 초음파와 같은 다른 방법을 통해서도 행해질 수 있다. 암의 치료는 외과 수술을 포함할 수 있거나, 또는 화학요법제, 예컨대 도세탁셀, 비노렐빈, 젬시타빈, 카페시타빈, 또는 시클로포스파미드, 메토트렉세이트 및 플루오로우라실의 조합물; 시클로포스파미드, 독소루비신 및 플루오로우라실의 조합물; 독소루비신 및 시클로포스파미드의 조합물; 독소루비신 및 시클로포스파미드와 파클리탁셀의 조합물; 독소루비신 처리후 CMF(시클로포스파미드, 에피루비신 및 플루오로우라실)의 사용을 포함할 수 있다. 또한, 치료는 방사선의 사용을 포함할 수 있다.

[0249] 일부 실시예에서, 치료적 유효량의 PD-1 길항제가 피험체에게 투여된다. 치료적 유효량의 종양 항원, 또는 치료적 유효량의 상기 항원을 코딩하는 핵산도 피험체에게 투여된다. 투여는 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다.

[0250] 지속성 감염(예, 만성 감염) 또는 종양을 갖는 피험체의 치료에 있어서, 치료적 유효량의 PD-1 길항제가 해당 피험체에게 투여된다. 한 실시예에서, PD-1 길항제의 치료적 유효량은 CD8+ T 세포 세포독성 활성의 증가를 유도하여, 감염원에 대해 특이적인 면역 반응을 증가시키는 생물학적으로 활성인 용량이다. 바람직하게는, PD-1 길항제는 항원 특이적 면역 세포(예를 들어, CD8+ T 세포와 같은 T 세포) 내 PD-1의 발현 또는 활성을 처리되지 않은 대조군 수준 이하인 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 또는 100% 초과까지 감소시키는 능력을 가진다. 면역 세포 내 PD-1의 수준 또는 활성은, 예를 들어 웨스턴 블롯(Western blot) 분석, 면역조직화학 분석법, ELISA 및 노던 블롯(Northern Blot) 분석을 비롯하여 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 측정된다. 대안으로, PD-1의 생물학적 활성은 PD-1의 PD-L1, PD-L2 또는 양자 모두에 대한 결합을 평가함으로써 측정된다. PD-1의 생물학적 활성은, 예를 들어 사이토킨 생산, 감염원의 제거 및 항원 특이적 CD8+ T 세포의 증식을 포함하는, $CD8^+$ T 세포 세포독성을 증가시키는 능력에 따라 결정된다. 바람직하게는, PD-1의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제는 감염원 또는 종양에 대한 특이적인 면역 반응을 처리되지 않은 대조군 수준 이상인 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 또는 100% 초과까지 증가시킬 수 있다. 따라서, 상기 제제는 이러한 활성들 중 하나 이상을 가지는 임의의 제제이다. 상기 제제가 바람직하게는 $CD8^+$ T 세포에서 발현되지만, 지속성 감염에 대한 면역 반응에 영향을 줄 수 있는 임의의 세포도 본 발명의 방법에 적용가능하다는 것은 명백한 것이며, 이러한 것으로서 예를 들어 B 세포가 포함된다.

[0251] 선택적으로, 피험체에게 하나 이상의 부가적 치료제를 투여한다. 부가적 치료제에는 예를 들어 항바이러스성 화합물(예를 들어, 비다라빈, 아시클로비르, 간시클로비르, 발간시클로비르, 뉴클레오시드-유사체 역전사효소 억제제(NRTI)(예를 들어, AZT(지도부딘), ddI(디다노신), ddC(잘시타빈), d4T(스타부딘) 또는 3TC(라미부딘)), 비뉴클레오시드 역전사효소 억제제(NNRTI)(예를 들어, (네비라핀 또는 델라비르딘), 프로테아제 억제제(사퀴나비르, 리토나비르, 인디나비르 또는 넬피나비르), 리바비린 또는 인터페론), 항박테리아성 화합물, 항진균성 화합물, 항기생충성 화합물, 항염증성 화합물, 항신생물성 제제(화학요법제) 또는 진통제가 포함된다.

[0252] 부가적 치료제는 PD-1 길항제를 투여하기 전, 투여하는 동시에 또는 투여한 후에 투여된다. 예를 들어, PD-1 길항제 및 부가적 제제는 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18시간 이상 또는 24시간 초과의 간격을 두어 별도의 제형으로 투여된다. 선택적으로, 부가적 제제는 PD-1 길항제와 함께 조제된다. 부가적 제제가 서로 다른 조성물 내에 존재하는 경우, 다른 투여 경로가 사용될 수 있다. 제제는 그러한 제제가 감염의 치료, 감소 또는 예방을 위해 효과적인 것으로 알려진 용량으로 투여된다.

[0253] PD-1 길항제 및 부가적 제제의 농도는 투여 방법, 표적 부위, 포유동물의 생리학적 상태 및 기타 투여되는 의약을 포함하는 서로 다른 요인들에 따라 다르다. 따라서, 치료 투약량은 안정성 및 효능을 최적화하기 위해 적정화될 수 있으며, 이는 당업자의 역량 내의 일이다. 특정 상황에 따른 적절한 투약량 및 투여 방식의 결정은 당업자의 역량 내의 일이다.

[0254] 선택적으로, 피험체에게 지속성 감염을 유발하는 감염원에 대한 보호 면역 반응을 유도하는 백신을 추가 투여한다. 예를 들어, 피험체는 특히 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 결핵, 인플루엔자, XMRV, 폴리오마 JC 바이러스 또는 C형 간염에 대한 면역 반응을 유도하는 백신을 투여받는다. 대표적인 백신은 예를 들어 문헌 [Berzofsky et al.(J. Clin. Invest. 114:456-462, 2004)]에 기재되어 있다. 필요하다면, 백신은 프라임 부스터 샷 또는 아주반트와 함께 투여된다. 또한 백신은 치료적 유효량의 종양 항원과 같은 종양 백신일 수 있다. 일부 실시 양

태에서, 바이러스 또는 종양 항원과 같은 치료적 유효량의 항원성 폴리펩티드를 피험체에게 투여한다.

[0255] 치료적 유효량의 종양 항원, 또는 상기 종양 항원을 코팅하는 핵산을 피험체에게 투여할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 벡터, 또는 자가 복제 플라스미드 또는 바이러스, 또는 원핵 세포 또는 진핵 세포의 유전체 DNA 내로 포함되거나, 또는 다른 서열들과 독립하여 별개의 분자(예컨대, cDNA)로서 존재하는 재조합 DNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 이 두 뉴클레오티드의 변형된 형태일 수 있다. 이 용어는 DNA의 단일 가닥 및 이중 가닥 형태를 포함한다.

[0256] 다수의 바이러스 벡터가 구축되었는데, 예로서 폴리오마, 즉, SV40 (문헌 [Madzak et al., 1992, J. Gen. Virol., 73:1533-1536]), 아데노바이러스 (문헌 [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]), 우두 바이러스 (문헌 [Mackett et al., 1992, Biotechnology, 24:495-499]), 아데노-연관 바이러스 (문헌 [Muzyczka, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:91-123]; [On et al., 1990, Gene, 89:279-282]), HSV 및 EBV를 포함하는 포진 바이러스 (문헌 [Margolskee, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:67-90]; [Johnson et al., 1992, J. Virol., 66:2952-2965]; [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]), 신드비스 바이러스 (문헌 [H. Herweijer et al., 1995, Human Gene Therapy 6:1161-1167]; 미국 특허 제5,091,309호 및 제5,2217,879호), 알파바이러스 (문헌 [S. Schlesinger, 1993, Trends Biotechnol. 11:18-22]; [I. Frolov et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11371-11377]) 및 조류 기원의 레트로바이러스 (문헌 [Brandyopadhyay et al., 1984, Mol. Cell Biol., 4:749-754]; [Petropouplos et al., 1992, J. Virol., 66:3391-3397]), 쥐과 기원의 레트로바이러스 (문헌 [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]) 및 인간 기원의 레트로바이러스 (문헌 [Page et al., 1990, J. Virol., 64:5370-5276]; [Buchschalcher et al., 1992, J. Virol., 66:2731-2739])를 포함한다. 바큘로바이러스 (Autographa californica multinuclear polyhedrosis virus; AcMNPV) 벡터도 당업계에 공지되어 있으며, 이는 상업적 공급원들(예컨대 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 파민젠(PharMingen); 미국 코네티컷주 메리덴 소재의 프로테인 사이언스 코포레이션(Protein Sciences Corp.); 미국 캘리포니아주 라호야 소재의 스트라타진(Stratagene))로부터 수득될 수 있다.

[0257] 한 실시 양태에서, 종양 항원 또는 바이러스 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 바이러스 벡터 내에 포함된다. 적절한 벡터로서는 레트로바이러스 벡터, 진성두창 벡터, 조류폭스 벡터, 계두 벡터, 카프리폭스 벡터, 수이폭스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 포진 바이러스 벡터, 알파 바이러스 벡터, 바큘로바이러스 벡터, 신드비스 바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터 및 소아마비바이러스 벡터를 포함한다. 특히 대표적인 벡터로서는 수두바이러스 벡터 예컨대 우두 바이러스, 계두 바이러스 및 고약독화된 우두 바이러스 (MVA), 아데노바이러스, 바큘로바이러스 등을 들 수 있다.

[0258] 사용되는 천연두 바이러스로는 진성두창, 수이폭스, 조류폭스 및 카프리폭스 바이러스를 포함한다. 진성두창은 우두, 서두 및 미국너구리 천연두를 포함한다. 사용되는 진성두창의 한 예는 우두이다. 조류폭스는 계두, 카나리아두 및 구두를 포함한다. 카프리폭스는 산양두 및 양두를 포함한다. 한 실시예에서, 수이폭스는 돈두이다. 발현을 위한 천연두 바이러스 벡터의 예가 예를 들어, 미국 특허 제6,165,460호(본원에 참조로서 포함됨)에 기술되어 있다. 사용될 수 있는 기타 다른 바이러스 벡터는 기타의 DNA 바이러스, 예컨대 포진 바이러스 및 아데노바이러스와 RNA 바이러스, 예컨대 레트로바이러스 및 소아마비 바이러스를 포함한다.

[0259] 여러 실시 양태에서, PD-1 길항제는 T 세포, 예컨대 CD8+T 세포의 세포독성을 증가시키기에 충분한 양으로 투여된다. T 세포 세포독성의 증가는 면역 반응의 증가 및 지속성 감염의 감소, 또는 종양의 징후나 증상의 감소를 유도한다. 증가된 면역 반응은, 예를 들어, 면역 세포 증식에 있어서의 증가, 예컨대 T 세포 또는 B 세포의 증식, 사이토킨 생성의 증가 및 감염원의 증가된 제거율 또는 종양의 존재량 감소에 의해 측정될 수 있다. 따라서, 이러한 방법은 지속성 감염 또는 종양과 관련된 하나 이상의 증상들의 완화를 유도할 수 있다. 이에 따라, PD-1 길항제의 투여는 처리되지 않은 피험체과 비교하여, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 또는 100% 이상까지 지속성 감염을 감소시키고, 종양의 성장/크기를 억제하거나, 또는 지속성 감염과 관련된 하나 이상의 증상들을 경감시킨다.

[0260] 치료는 피험체 내 감염원의 용량 감소 또는 종양의 존재량 감소와 같은 임상적 이익을 이끌어내는 것이라면 효능이 있는 것이다. 치료가 예방학적으로 적용될 때, "효능이 있는"이란 치료가 감염이 형성되는 것을, 예컨대 6개월, 1년, 2년, 3년 또는 그 이상 동안 지연시키거나 예방함을 의미한다. 효능은 특정 감염을 진단 또는 치료하기 위해 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0261] 따라서, 이러한 방법은 치료적 유효량의 PD-1 길항제를 포함하는 약학 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함한다. 치료 화합물, 예컨대 항체의 유효량은 예를 들어 약 0.1 mg/kg 내지 약 150 mg/kg일 수 있다. 유효 투여량은, 당업자가 인식하는 바와 같이, 투여 경로, 부형제 사용 및 특정 감염 또는 암의 증상을 치료, 예방 또는 경감시키기 위한 기타 항감염제 또는 치료제의 사용을 포함하는 기타의 치료적 처치와 함께 수반되는 공동 투여에 따라 다양할 수 있다. 치료적 처방은 표준 방법을 이용하여 감염 또는 암을 앓고 있는 (또는 그러한 질병이 발병할 위험에 처해 있는) 인간 환자에 대해 행해진다.

[0262] PD-1 길항제는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 이러한 개체에 투여된다. 본원에 개시된 것과 같은 임의의 PD-1 길항제가 이용될 수 있다. 또한, 하나 이상의 PD-1 길항제가 사용될 수 있다. PA-1 길항제는 국소적으로 또는 전신에 투여될 수 있다. 예를 들어, PD-1 길항제는 경구, 직장, 비측, 국소, 비경구, 피하, 복강내, 근육내 및 정맥내 투여된다. PD-1 길항제는 예방적으로, 또는 감염이 검출된 후에 투여될 수 있다. PD-1 길항제는 선택적으로 감염을 치료하기 위한 치료 약물의 내복약 성분으로 제형화된다. 비경구 투여에 적당한 제형물의 예로서는 등장성 식염수 용액, 5% 포도당 용액, 또는 또 다른 약학적으로 허용되는 표준 부형제 내에 활성제를 담은 수용액을 포함한다. 표준 가용화제, 예컨대 PVP 또는 시클로덱스트린도 치료 화합물의 전달을 위한 약학적 부형제로서 이용된다.

[0263] 본원에 기재된 치료 화합물은 통상적인 방법을 이용하여 다른 투여 경로를 위한 조성물로 제형화된다. 예를 들어, PD-1 길항제는 경구 투여를 위한 캡슐 또는 정제로 제형화된다. 캡슐은 약학적으로 허용되는 임의의 표준 물질, 예컨대 젤라틴 또는 셀룰로스를 함유할 수 있다. 정제는 치료 화합물과 고체 담체 및 윤활제의 혼합물을 압착함으로써 통상적 절차에 따라 제형화될 수 있다. 고체 담체의 예에는 전분 및 슈거 벤토나이트가 포함된다. PD-1 길항제는 경질 쉘 정제, 또는 락토스 또는 만니톨과 같은 결합제를 함유하는 캡슐, 통상적 필러 및 정제화 제제의 형태로 투여될 수 있다. 기타 제형물에는 연고, 좌약제, 페이스트, 스프레이, 패치, 크림, 젤, 재흡수성 스폰지 또는 폼(foam)이 포함된다. 이러한 제형물은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 생산된다.

[0264] 추가로, PD-1 길항제는 피험체의 인접한 주위 조직 내로 화합물을 서서히 방출하는 고체 또는 재흡수성 매트릭스를 (기관(예를 들어, 장 또는 간) 내로 직접, 혹은 피하에) 이식함으로써 투여될 수 있다. 예를 들어, 위장관 감염의 치료에 있어서, 화합물을 전신(예를 들어, 정맥내, 직장내 또는 경구), 또는 국소(예를 들어, 위 조직에 직접) 투여할 수 있다. 대안으로, PD-1 길항제-함침 웨이퍼 또는 재흡수성 스폰지를 위 조직에 직접 접촉하도록 둔다. PD-1 길항제는 웨이퍼로부터의 약물의 확산 및 중합체 매트릭스의 침식으로 인해 생체내 서행 방출된다. 또 다른 예로서, 간의 감염(즉, 간염)은 PD-1 길항제를 함유하는 용액을 간 혈관에 주입함으로써 치료된다.

[0265] 치료 화합물이 PD-1 길항제를 코딩하는 핵산인 경우, 그 핵산은 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 그를 구축하여 핵산이 세포 내에 존재하도록 (예를 들어, 레트로바이러스 벡터의 사용, 직접적 주사, 미세입자 포격(bombardment)의 사용, 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 형질 도입 제제를 이용한 코팅, 또는 핵에 들어가는 것으로 알려져 있는 호메오박스-유사 펩티드에 대한 연결에의 투여 등에 의해) 생체 내 투여되어 코딩된 단백질의 발현을 촉진할 수 있게 된다(예를 들어, 문헌 [Joliot, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1864-1868, 1991)]을 참고한다). 대안으로, 핵산 치료제는 발현을 위하여 동종성 재조합에 의해 세포 내로 도입되거나 숙주 세포 DNA 내에 (동종성 재조합에 의해) 혼입되거나, 부체 상태로 남는다.

[0266] DNA의 국소 투여를 위해, 표준 유전자 치료 벡터가 사용된다. 이러한 벡터에는 복제-결함 간염 바이러스(예를 들어, HBV 및 HCV), 레트로바이러스(예를 들어, WO 89/07136; 문헌 [Rosenberg et al., N. Eng. J. Med. 323(9):570-578, 1990] 참고), 아데노바이러스(예를 들어, 문헌 [Morsey et al., J. Cell. Biochem., Supp. 17E, 1993] 참고), 아데노-연관 바이러스(문헌 [Kotin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2211-2215, 1990]), 복제 결함 단순 포진 바이러스(문헌 [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])로부터 유래된 바이러스 벡터들 및 이 벡터들의 임의의 변형된 형태들이 포함된다. 핵산을 진핵생물 세포 내로 생체내 전달하는 것을 이룰 수 있는 임의의 다른 전달 시스템을 이용할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 리포좀, 예컨대 양이온성 리포좀(리포펙틴(Lipofectin)), 수용체-매개 전달 시스템, 비바이러스성 핵산-기재 벡터, 적혈구 고스트 또는 미소구체(예를 들어, 마이크로입자; 예를 들어, 미국 특허 제4,789,734호; 미국 특허 제4,925,673호; 미국

특허 제3,625,214호 참고) 내로 팩키징될 수 있다. 네이키드 DNA도 투여될 수 있다.

[0267] 핵산 억제제와 관련하여, 치료적 유효량은 약제학적으로 바람직한 결과, 예를 들어 피험 동물 내 PD-1 유전자 산물의 감소를 발생시킬 수 있는 양이다. 이러한 양은 당업계의 통상적인 숙련자에 의해 결정될 수 있다. 임의의 치료 피험체 환자를 위한 투여량은, 환자의 크기, 신체 표면적, 연령, 투여되는 특정 화합물, 성별, 투여 시간과 투여 경로, 건강 상태 및 동시 투여되는 다른 약물을 비롯한 다양한 인자들에 따라 다르다. 투여량은 다양할 수 있으나, DNA의 정맥내 투여를 위해 바람직한 투약량은 복제된 DNA 분자수로 약 10^6 내지 10^{22}개이다.

[0268] 전형적으로, 플라스미드는 약 1 나노그램 내지 약 5000 마이크로그램의 DNA의 양으로 포유동물에 투여된다. 바람직하게는, 조성물은 약 5 나노그램 내지 1000 마이크로그램의 DNA, 10 나노그램 내지 800 마이크로그램의 DNA, 0.1 마이크로그램 내지 500 마이크로그램의 DNA, 1 마이크로그램 내지 350 마이크로그램의 DNA, 25 마이크로그램 내지 250 마이크로그램의 DNA, 또는 100 마이크로그램 내지 200 마이크로그램의 DNA를 함유한다. 대안으로, PD-1 길항제를 코딩하는 재조합 아데노바이러스 벡터는 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10} 이상 또는 10^{11} 이상의 플라크 형성 단위(pfu)의 농도로 포유동물에 투여될 수 있다.

[0269] 일부 실시 양태에서, 신경학적 감염의 치료를 위해, PD-1 길항제를 정맥내 또는 척수강내(즉, 뇌척수액으로의 직접 주입에 의해) 투여할 수 있다. 국소 투여를 위해, 화합물-함침 웨이퍼 또는 재흡수성 스폰지를 중추신경계(CNS) 조직과 직접 접촉하도록 둔다. 화합물, 또는 화합물들의 혼합물은 웨이퍼로부터의 약물의 확산 및 중합체 매트릭스의 침식으로 인해 생체 내에서 서서히 방출된다. 대안으로, 화합물은 표준 방법을 이용하여 뇌 또는 뇌척수액으로 주입된다. 예를 들어, 주사 포트로 사용하기 위한 카테터가 있는 천두공(burr hole) 고리를 두개골에 뚫린 천두공에 두개골을 결속하도록 위치시킨다. 카테터에 연결된 유체 저장소(reservoir)는 천두공 고리의 상부 위에 위치한 격벽을 통해 삽입된 니들 또는 탐침(stylet)으로 접근할 수 있다. 카테터 어셈블리(예를 들어 미국 특허 제5,954,687호에 기재됨)는 일정 시간 동안 약물이 투여되도록, 뇌, 뇌 부근 또는 뇌 안에 있는 선택된 위치로 또는 그 위치로부터 유체를 전달하기에 적당한 유체 흐름 경로를 제공한다.

[0270] 추가의 실시 양태에서, 심장 감염에 있어서, PD-1 길항제를 예를 들어, 흉벽을 통한 직접적 관상내 주입에 의해, 또는 형광 투시 지침에 따른 표준 경피 카테터 이용 방법에 의해 심장 조직(즉, 심근, 심낭 또는 심내막)에 전달할 수 있다. 따라서, PD-1 길항제는 조직에 직접 주사되거나, 체내 루멘에 삽입되는 스텐트 또는 카테터로부터 주입될 수 있다. 임의의 다양한 관상 카테터 또는 관류 카테터를 사용하여 화합물을 투여할 수 있다. 대안으로, 화합물은 관상 혈관 내에 놓인 스텐트 상에 코팅 또는 함침된다.

[0271] 폐 감염은 예를 들어 PD-1 길항제를 흡입에 의해 투여함으로써 치료될 수 있다. 화합물은 예를 들어 이산화탄소와 같은 적절한 추진제를 포함하는 가압 용기 또는 디스펜서, 또는 분무기로부터 에어로졸 분무 형태로 전달된다.

[0272] 당업자라면 치료되는 환자가 지속성 감염 피험체를 진단하기 위해 동일한 시험을 받았을 수 있거나, 혹은 검사 없이 하나 이상의 위험 인자(예를 들어, 감염원에 대한 노출, 감염된 피험체에 대한 노출, 유전적 소인 또는 2차 감염의 병리학적 질환의 소인을 가짐)의 존재로 인해 높은 위험에 처해 있는 것으로 확인되었을 수 있음을 알 수 있다. 또한, 지속성 감염 증상 또는 손상의 감소는 이에 제한되지는 않지만, 증상의 경감, 질병 정도의 감쇠, 질병의 안정화된(즉, 악화되지 않은) 상태, 질병 진전의 지연 또는 서행 및 질병 상태의 경감 또는 완화를 포함할 수 있다. 치료는 건강 관리 부양자에 의해 세심한 감독으로 가정에서 행해질 수 있거나, 건강 관리 시설에서 행해질 수 있다.

[0273] 본원에 개시된 치료 후의 면역 반응을 측정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. T 세포의 활성은, 예를 들어 사이토킨 생산을 검출하는 분석법, T 세포 증식을 측정하는 분석법, 미생물 감염원의 제거율을 측정하는 분석법 및 $CD8^+$ T 세포 세포독성을 측정하는 분석법에 의해 평가될 수 있다. 이러한 분석법들은 예를 들어, 본원에 참고로 인용되는 미국 특허 제6,808,710호 및 미국 특허 출원 공보 제20040137577호, 제20030232323호, 제20030166531호, 제20030064380호, 제20030044768호, 제20030039653호, 제20020164600호, 제20020160000호, 제20020110836호, 제20020107363호, 및 제20020106730호에 기재되어 있다. B 세포 반응, 예컨대 기억 B 세포 반응의 측정이 하기에 개시되어 있다.

[0274] 선택적으로, $CD8^+$ T 세포 세포독성을 증가시키는 PD-1 길항제의 능력은 $CD8^+$ T 세포의 증식을 측정하는 분석법(예를 들어, 티미딘 도입, BrdU 분석 및 세포 주기 마커(예를 들어, Ki67 및 CFSE)를 이용한 염색(예를 들어, 문헌 [Dong et al., Nature 5:1365-1369, 1999)]에 기재됨))에 의해 평가된다. 한 실시예에서, T-세포 증식은

PD-1을 발현하는 정제된 T-세포를 PD-1 길항제, 상기 기재된 바와 같은 1차 활성화 신호 및 ^{3}H-티미딘과 함께 배양함으로써 모니터링된다. T-세포 증식의 수준은 티미딘 도입을 측정함으로써 결정된다.

[0275] $CD8^{+}$ T 세포 세포독성은 또한 세포용해 분석법(예를 들어, ^{51}Cr 유리 시험법, 또는 퍼포린 또는 그랜자임의 방출을 검출하는 분석법), 카스파제 활성화를 검출하는 분석법, 또는 감염된 피험체로부터 미생물 감염원의 제거율을 측정하는 분석법에 의해서도 평가될 수 있다. 예를 들어, 감염된 피험체의 생물학적 샘플(예를 들어, 혈청, 비장, 간, 폐 또는 바이러스가 존재하는 조직) 내의 바이러스 양은 치료 전과 후에 측정될 수 있다.

[0276] 또한, 사이토킨, 예컨대 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2의 생성도 측정될 수 있다. 예를 들어, 정제된 T-세포는 PD-1 단백질 길항제 및 1차 활성화 신호의 존재 하에 배양된다. 상청액 내 각종 사이토킨의 수준은, 샌드위치 효소 결합 면역 분석법, 또는 예를 들어 문헌 [Dong et al., Nature 5:1365-1369, 1999)]에 기재되어 있는 기타 통상적인 분석법에 의해 결정될 수 있다.

[0277] 필요하다면, PD-1 길항제의 효능은 T 세포의 보조자극을 유도하는 그 능력에 의해 평가된다. 예를 들어, 시험관 내 T-세포 보조자극을 위한 방법은, PD-1을 발현하는 정제된 T-세포에, 항-CD3 단일클론 항체 또는 포르볼 에스테르 혹은 II류의 MHC와 관련된 항원에 의한 첫 번째 또는 1차 활성화 신호를 제공하는 단계를 포함한다. PD-1 발현 또는 활성을 감소시키고, 이에 따라 면역 기능을 조절하는데 필요한 2차 또는 보조자극 신호를 이들 T-세포에 제공하는 후보 화합물의 능력은, 당업계에 잘 알려진 수개의 통상적 분석법들 중 임의의 한 가지 방법에 의해 검정될 수 있다.

[0278] PD-1 길항제에 대한 B 세포 반응은 LCMV 특이적 ELISA, 혈장 세포 ELISPOT, 기억 B-세포 검정, B 세포의 표현형 결정 및 면역조직화학법에 의한 배중심 분석법에 의해 평가될 수 있다.

[0279] **치료 방법: 입양 면역요법(Adoptive Immunotherapy)**

[0280] 지속성 바이러스 감염(예, 만성 감염) 또는 종양을 앓고 있는 피험체과 같은 해당 피험체의 치료를 위한 방법이 본원에 개시된다. 상기 방법은 바이러스 항원 또는 종양 항원과 같은 해당 항원에 특이적인 치료적 유효량의 세포독성 T 세포 및 치료적 유효량의 PD-1 길항제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이 방법은 또한 피험체로부터 유래한 샘플에서 기억 B 세포 증식을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 추가의 실시 양태에서, 이 방법은 피험체로부터 유래한 샘플에서 나이브 B 세포를 측정하는 것을 포함한다. 추가의 실시 양태에서, 이 방법은 CD28을 발현하는 T 세포를 측정하는 것을 또한 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이 방법은 중화 항체를 측정하는 것을 포함한다. 따라서, 개시된 방법은 중화 항체, 기억 B 세포 증식, 나이브 B 세포, 및 CD28을 발현하는 T 세포 중 하나 이상을 측정하는 것을 포함한다. 본원에 개시된 방법을 이용하여 이들 파라미터중 2개, 3개 또는 전부를 측정할 수 있다.

[0281] 피험체의 면역계를 향상시키는 것과 같은 면역 반응을 증강시키는 방법이 본원에 개시된다. 본원에 개시된 바와 같이, 정제된 항원 특이적 T 세포 및 PD-1의 투여는, 병원체(예컨대 바이러스 또는 진균) 또는 신생물에 대한 면역 반응을 표적화시킴으로써, 감염성 질병 또는 종양과 같은 병리학적 질환을 극복하는 피험체의 능력을 증진시키게 된다. 따라서, 피험체로부터 선별된 항원 특이적 T 세포의 정제된 군집을 정제 및 생산한 후, 이러한 세포들의 치료적 유효량을 도입함으로써, 수여 피험체의 면역 반응이 향상된다. 또한, 치료적 유효량의 PD-1 길항제를 투여하면 수여 피험체의 면역 반응이 향상된다.

[0282] 수여 피험체에서 해당 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법이 본원에 제공된다. 수여자는 바이러스 감염 또는 진균 감염과 같은 만성 감염을 앓는 피험체, 또는 종양을 앓는 피험체를 포함하는 임의의 해당 피험체일 수 있다. 이러한 감염에 대해서는 상기 기술되어 있다.

[0283] 면역 결핍된 사람의 감염은 동종이식 줄기 세포 수여자 및 영구 면역억제된 장기 이식 수여자에 있어서도 공통적인 문제점이다. 이러한 피험체들에 있어서 생성된 T 세포 면역 결핍 감염은 일반적으로 수여자 내에 이미 존재하는 바이러스의 재활성화로부터 발생한다. 예를 들어, 대부분의 포진 바이러스 군(예컨대 CMV, EBV, VZV, HSV)은 일단 몸에 들어오면 휴지 상태이고 T 세포에 의해 억제된다. 그러나, 환자가 조건에 맞는 처방 계획에 의해 면역 억제되는 경우, 휴지 상태의 바이러스는 재활성화될 수 있다. 예를 들어, CMV 재활성화, B 세포 내에서 종양(EBV 림프증식성 질병)을 발생시키는 엡스타인 바 바이러스 (EBV) 재활성화 및 출혈성 방광염을 야기하는 BK 바이러스 재활성화가 면역 억제 후 일어날 수 있다. 또한, HIV 감염 및 선천적인 면역 결핍은 T 세포 면역 결핍의 다른 예이다. 이러한 바이러스 감염 및 재활성화는 면역 억제된 피험체에 있어서 논점이 될 수 있다.

[0284] 일부 실시 양태에서, 골수 이식한 수여자에게 종양에 대한 면역 반응이 제공된다. 항-종양 면역성은 종양 항원

을 인식하는 항원-특이적 T 세포의 투여에 의해 피험체에게 제공될 수 있다. 수여자에 대한 이러한 투여는 해당 종양 항원에 표적화되어 이를 인식하여 그와 면역반응하는 T 세포를 제공함으로써 종양에 대한 수여자의 면역반응을 증강시킬 수 있게 된다.

[0285] 한 실시예에서, 상기 방법은 공여자로부터 T 세포 (예컨대 말초 혈액 단핵세포)를 포함하는 공여자 세포 군집을 단리하는 단계 및 T 세포를 포함하는 공여자 세포 군집을, 선택적으로 PD-1의 존재 하에, 해당 항원을 제공하고 있는 공여자의 항원 제시 세포(APC) 군집과 접촉하는 단계를 포함함으로써, 해당 항원을 인식하는 동종반응성 T 세포가 결핍된 활성화된 공여자 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포를 포함하는 공여자 세포 군집을 생성시키는 단계를 포함한다. 치료적 유효량으로 활성화된 공여자 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포 군집을 수여자에게 투여함으로써, 수여자 내에 해당 항원에 대한 면역 반응을 유발하게 된다. 정제된 항원-특이적 T 세포의 투여는, 병원체(예컨대 바이러스 또는 진균) 또는 신생물에 대해 면역 반응을 표적화시킴으로써, 감염성 질병 또는 종양과 같은 병리학적 질환을 극복하는 피험체의 능력을 증진시키게 된다. 따라서, 해당 항원에 대한 수여자의 면역 반응이 유발된다.

[0286] 여러 실시 양태에서, 상기 방법은 피험체에게 치료적 유효량의 PD-1 길항제를 투여하는 단계도 포함한다. PD-1 길항제의 투여는 상기에 상세히 기술되어 있다.

[0287] 해당 항원의 임의의 항원성 펩티드 (예컨대 면역원성 단편)는 그 해당 항원에 대해 특이적인 T 세포 군집을 생성하는데 사용될 수 있다. 이러한 항원성 펩티드는 바이러스 및 종양 항원(예를 들어, 표 1-3 참조)과 같은 다양한 것들이 공지되어 있다. 본원의 개시는 구체적인 항원 펩티드를 사용하는 것에 제한되는 것은 아니다. 해당 항원의 항원성 펩티드의 구체적인 예로서는, 이에 제한되지는 않지만, 표 1-3에 나타난 것과 같은 바이러스, 진균 및 종양 항원의 것들이 포함된다. 추가적인 항원성 펩티드는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Novellino *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 54(3):187-207, 2005] 및 [Chen *et al.*, Cytotherapy, 4:41-8, 2002], 상기 양 문헌 모두 본원에 참조로서 포함된다).

[0288] 표 1 및 3에서 해당 전장 항원의 특정 단편을 개시하고는 있으나, 당업자라면 다른 단편들 또는 전장 단백질도 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 한 실시예에서, 해당 항원은 전장 항원 서열의 "면역원성 단편"이다. "면역원성 단편"은 MHC의 분자로서 세포에 의해 제공될 때, T 세포 활성화 분석에서 단백질을 발현하는 세포에 대해 T 세포를 활성화시킬 수 있는 단백질의 일부를 가리킨다. 전형적으로, MHC I류 분자에 결합하는 이러한 단편들은 전장 항원의 8개 내지 12개의 인접한 아미노산이나, 더 긴 단편들도 물론 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 면역원성 단편은 에피토프 서열의 추가적인 가공없이, APC의 표면에서 MHC 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 단편이다. 특정 실시예에서, 면역원성 단편은 전장 항원 서열의 8-50개의 인접 아미노산, 예컨대 전장 항원 서열의 8-20개의 아미노산, 8-15개의 아미노산, 8-12개의 아미노산, 8-10개의 아미노산, 또는 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 20개의 인접 아미노산이다. 일부 실시예에서, APC는 세포 내 가공의 필요없이 APC 표면에서 면역원성 단편이 MHC 분자와 특이적으로 결합하기에 충분한 조건 하에 면역원성 단편과 함께 배양된다.

[0289] 한 실시예에서, 항원은 피험체의 HLA 분자에 대한 결합 모티프를 함유하는 아미노산 서열을 가진 해당 항원의 펩티드를 포함한다. 이러한 모티프들은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, HLA-A2는 인간 집단에서 흔한 대립유전자이다. 이 분자에 대한 결합 모티프로서는 2번째 위치에 류신이나 메티오닌 및 마지막 위치에 발린이나 류신을 갖는(상기 예들을 참조) 9개 또는 10개의 아미노산을 지닌 펩티드를 포함한다. 이러한 모티프들을 포함하는 펩티드는 당업계에 공지된 임의의 방법(예컨대 재조합법, 화학적 방법 등)에 의해 제조될 수 있다. 해당 항원의 아미노산 서열을 알고 있다면, MHC에 결합할 것으로 예측된 면역원성 단편 서열은 공중이 이용가능한 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 인터넷 상의 HLA 결합 모티프 프로그램(생물정보학 및 분자 분석 섹션-BIMAS)가 통상적인 방법을 이용하여 임의의 종양-, 바이러스-, 또는 진균-연관 항원의 에피토프를 예측하는데 사용될 수 있다. 이후, 해당 항원(전장 단백질 또는 이의 면역원성 단편)은 표준 기법을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 예를 들어, 해당 에피토프 또는 전장 항원은 표준 방법에 의해 재조합 방법으로 제조되거나 화학적으로 합성될 수 있다. 실질적으로 순수한 펩티드의 제조는 비환원성 폴리아크릴아미드 겔 상에 큰 단일 밴드를 만들어 낼 것이다. 다른 실시예에서, 해당 항원은 미정제 바이러스 용해물을 포함한다.

[0290] 한 실시예에서, 해당 항원은 종양 연관 항원이며 HLA 결합 모티프를 함유하는 아미노산 서열은 부차적으로 우세한, 즉 그 동안 면역기관에 노출되지 않았던(cryptic) 에피토프를 코딩하는 것들이다. 이들 에피토프는 분자 내의 다른 에피토프에 비해 또는 HLA 분자에 결합하는 다른 분자들과 비교하여 HLA 분자에 대한 비교적 더 낮은 결합 친화도를 갖는 것으로 확인될 수 있다.

[0291] 단일 아미노산 치환된 항원 유사체의 연구 및 내생적으로 결합된, 자연 가공된 펩티드의 시퀀싱을 통해, HLA 항원 분자에 대한 특이적 결합에 필요한 모티프에 해당하는 중요한 잔기들이 확인되었다 (예를 들어, 문헌 [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] 참조). 추가로, HLA-펩티드 복합체의 x-선 결정학 분석은 펩티드 리간드에 의해 생성된 잔기를 대립유전자-특이적 형태로 수용하는, HLA 분자들의 펩티드 결합 틈 내에 존재하는 함요부(pocket)에 대해서 밝혀냈다; 결국 이들 잔기들은 자신들이 존재하고 있는 펩티드의 HLA 결합 용적을 결정한다(예를 들어, 문헌 [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] 참조)

[0292] 해당 항원은 치료될 피험체를 기초로 선택된다. 예를 들어, 피험체가 증가된 항바이러스성 또는 항진균성 면역을 필요로 하는 경우, 하나 이상의 표적 바이러스 또는 진균 연관 항원이 선택된다. 바이러스의 대표적인 해당 항원은 특히 엡스타인 바 바이러스 (EBV), C형 간염 바이러스 (HCV), 시토메갈로바이러스 (CMV), 단순 포진 바이러스 (HSV), BK 바이러스, JC 바이러스 및 인간 면역결핍 바이러스 (HIV)를 포함한다. 진균류의 대표적인 해당 항원은 *칸디다 알비칸스*, *크립토코커스*, *블라스토마이세스* 및 *히스토플라스마* 또는 다른 감염원의 항원을 포함한다. 또다른 실시예에서, 피험체는 증가된 항-종양 면역성을 필요로 한다. 종양의 대표적인 해당 항원은 WT1, PSA, PRAME을 포함한다. 감염제에 대한 예시적인 해당 항원은 표 1에 열거되어 있다. 일부 실시예에서, 해당 항원은 바이러스 항원과 종양 항원 양자 모두를, 진균 항원과 종양 항원 양자 모두를, 또는 바이러스 항원, 진균 항원 및 종양 항원을 포함한다.

[0293] 종양을 앓고 있는 피험체의 치료에 있어서, 해당 종양 항원은 수여자의 종양에 의한 단백질의 발현을 기초로 선택된다. 예를 들어, 수여자가 유방 종양을 가지고 있는 경우, 유방 종양 항원이 선택되고, 수여자가 전립선 종양을 가지고 있는 경우, 전립선 종양 항원이 선택되는 등이다. 표 2 또는 3은 특정 종양을 갖는 피험체에게 투여될 수 있는 정제된 항원-특이적 T 세포를 생성하는데 이용가능한 대표적인 종양 및 각각의 종양 관련 항원을 예시하고 있다. 그러나, 당업자라면 동일한 다른 종양도 추가의 종양 항원을 이용하여 치료될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0294] 한 실시예에서, 종양 항원을 인식하는 항원-특이적 T 세포는 줄기 세포 동종이식 혹은 자가이식을 받았거나 받을 피험체, 또는 종양 항원으로 백신 접종된 피험체에게 치료적 유효량으로 투여된다. 예를 들어, 하나 이상의 종양 관련 항원, 예를 들어 표 2-3에 열거된 하나 이상의 해당 항원을 인식하는 치료량의 항원-특이적 T 세포가 투여될 수 있다.

[0295] 수여자가 종양을 앓고 있어, 줄기 세포 동종이식을 받았거나 받을 경우인 특정 실시예에서, 공여자 종양 항원-특이적 T 세포 및 치료적 유효량의 PD-1 길항제는, 줄기 세포 동종이식 후에 종양의 재발을 예방, 감소, 또는 지연시키거나, 또는 악성 재발을 치료하기 위한 치료적 유효량으로 투여된다. 정제된 항원-특이적 T 세포는 제거 후 피험체에게 다시 도입될 수 있다. 또다른 실시예에서, 수여자는 자신으로부터 정제된 후 재주입된 정제된 항원-특이적 T 세포인 해당 종양 항원을 이용하여, 종양에 대한 수여자의 면역계를 증대시키기 위한 치료적 유효량의 PD-1 길항제와 함께 백신 접종된다.

[0296] 치료적 유효량의 종양 항원-특이적 T 세포와 치료적 유효량의 PD-1 길항제의 투여는 예방학적으로 사용되어 수여자의 종양 재발을 예방하거나, 또는 종양의 재발을 치료할 수 있다. 이러한 항원-특이적 T 세포는 종양 관련 항원을 포함하는 세포를 사멸시키거나 다른 면역 세포를 도와줄 수 있다.

[0297] 특정 실시예에서, 수여자는 종양을 앓고 있어, 면역성을 재구축하기 위해 줄기 세포 동종이식을 받았거나 받을 것이다. 골수에 방사선 조사 또는 제거되지 않으면 골수 기능을 무력화시킨 세포독성 약물의 투여 후에, 2종 이상의 공여자 항원-특이적 T 세포가 치료적 유효량으로 투여된다; 바이러스-연관 항원(또는 진균-연관 항원)을 특이적으로 인식하는 항원-특이적 T 세포 및 종양 관련 항원을 특이적으로 인식하는 항원-특이적 T 세포. 또한, 치료적 유효량의 PD-1 길항제가 피험체에게 투여된다. 이러한 투여는 항-종양 효과 및 항-바이러스 효과(예컨대 항-바이러스 효과)를 유도하는데 사용될 수 있다.

[0298] 해당 피험체에게 투여하기 위한 항원-특이적 T 세포 군집을 제조하기 위해, T 세포를 포함하는 세포 군집을 수지상 세포 또는 T-APC와 같은 항원 제시 세포(APC)와 접촉시켜 해당 항원을 제공할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 반응기 T 세포(예컨대 림프구 또는 PBMC)는 PD-1 길항제로 처리되고 하나 이상의 해당 항원을 제공하는 APC에 첨가된 후, 항원을 제시하는 APC와 T 세포 간의 상호작용이 일어나기에 충분한 조건 하에 배양되어 항원-특

이적 세포를 생성하게 된다. PD-1 길항제를 이용한 반응기 T 세포의 처리는 APC와의 접촉과 동시에 행해질 수 있다. PD-1 길항제를 이용한 반응기 T 세포의 처리는 또한 APC와 접촉하기 직전에 행해질 수 있다.

[0299] 따라서, 항원-특이적 T 세포의 풍부한 군집을 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 일반적으로, T-APC는 T 세포에 항원을 제공하여 I류 ($CD8^+$ T 세포) 및 II류 ($CD4^+$ T 세포) 제한 방식의 MHC-제한적 반응을 유도한다. 전형적인 T 세포 반응은 활성화와 증식이다. 따라서, 해당 항원을 특이적으로 인식하는 T 세포를 포함하는 군집이 생성된다. 따라서, 치료적 유효량의 상기 세포 군집은 피험체, 예컨대 만성 감염 또는 종양을 앓고 있는 피험체에게 투여되어 면역 반응을 생성시킬 수 있다.

[0300] 일반적으로, APC와 T 세포는 자기 조직 유래의 것이다. 비제한적인 구체적 실시예에서, APC와 반응기 T 세포는 동일한 개체로부터 유래한다. 그러나, APC와 반응기 T 세포는 동일계일 수 있다. APC는 자기 조직 유래 T 세포 군집에 임의의 항원을 제공하는데 사용될 수 있다. 당업자라면 MHC I류 및 II류 분자에 결합하는 항원 펩티드가 생체외에서 생성되어(예를 들어 세포 내에서 전장 단백질로부터 가공되는 대신), 세포 표면에서 MHC I 및 II 분자와의 상호작용(예컨대 결합)을 가능하게 할 수 있다. 일반적으로, APC는 MHC I류 및 II류 양자 모두의 항원을 제공한다.

[0301] 한 실시예에서, APC와 함께 배양된 해당 항원은 해당 항원의 아미노산 서열 (예컨대 해당 항원의 8-50개의 인접 아미노산, 예를 들어 8-15개 또는 8-12개의 인접 아미노산)을 포함하는 융합 단백질이다. 따라서, 일련의 MHC 결합 에피토프는 단일 항원성 폴리펩티드 내에 포함될 수 있거나, 또는 단일 삼량체 가 이용될 수 있는데, 여기서 각 삼량체는 MHC I류 분자, b2 마이크로글로불린 및 해당 항원성 펩티드를 가진다(문헌 [Nature 2005; vol. 436, page 578] 참고). 일부 실시예에서, 단일 항원만이 사용되지만, 다른 실시 양태에서는 하나 이상의 항원, 예컨대 2개 이상의 서로 다른 항원, 3개 이상의 서로 다른 항원, 4개 이상의 서로 다른 항원, 5개 이상의 서로 다른 항원, 10개 이상의 서로 다른 항원, 15개 이상의 서로 다른 항원, 20개 이상의 서로 다른 항원, 또는 50개 이상의 서로 다른 항원이 사용된다.

[0302] 또다른 실시예에서, 해당 항원은 전장 항원 아미노산 서열 (예컨대 전장 진균 항원, 종양 항원, 또는 바이러스 항원, 예를 들어 바이러스 용해물 또는 전장 카텝신 G)이다. 추가의 실시예에서, 임의의 감염원의 하나 이상의 항원이 이용될 수 있다. 일부 실시예에서, 전장 해당 항원은 APC에 의해 발현된다.

[0303] APC는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 생성될 수 있다(문헌 [Melenhorst et al, Cytotherapy 7, supp. 1, 2005]; [Melenhorst et al., Blood 106: 671a, 2005]; [Gagliardi et al., Int. Immunol. 7: 1741-52, 1995]을 참조하며, 이들은 본원에 참조로서 포함됨). 한 실시예에서, T-APC를 생산하기 위해, 공여자 말초 혈액 단핵 세포는 IL-2 및 CD3과 특이적으로 결합하는 항체 (예컨대 OKT3)를 이용하여 약 3일 이상, 예컨대 약 1주 내지 2주 이상, 예컨대 약 7일 내지 10일 동안 활성화된다.

[0304] 제공되는 항원의 존재 하에, 그 항원을 인식하는 T 세포는 그 항원에 대해 특이적이지 않은(이에 따라 항원-특이적 방식으로 결합하지 않는) T 세포보다 해당 항원을 제공하는 항원 제시 세포(APC)에 보다 강력하게 결합한다. 특정 실시예에서, 항원-특이적 T 세포는 원하는 T 세포가 PD-1 길항제의 존재하에 표적화되도록 APC를 표적 펩티드 항원 (예컨대 표적 바이러스 또는 종양 관련 항원)에 노출시켜, APC가 주조직적합성 복합체 (MHC) I류 및/또는 II류와 관련된 항원을 제공하도록 한다. 예를 들어, APC는 그 표면 상의 MHC 분자를 충분히 점유하기 위해 (예를 들어, 1% 이상, 예컨대 5% 이상, 7.5% 이상 또는 10% 이상의 MHC 분자가 점유되도록) 충분량의 해당 항원에 노출되어, PD-1 길항제의 존재 하에 해당 항원을 제공하는 APC에 대한 표적 T 세포의 (해당 항원을 제공하지 않는 APC에 비해) 우세한 결합을 자극할 수 있다. 이후, T 세포 군집, 예컨대 해당 항원을 위해 준비된 T 세포 군집을, 세포를 우선적으로 활성화시키기 위하여 임의로는 PD-1과 특이적으로 결합하는 항체와 같은 PD-1 길항제의 존재 하에, APC와 함께 배양함으로써 해당 항원을 인식하는 원하는 T 세포가 풍부한 세포 군집을 생성한다.

[0305] T 세포, 예컨대 일군의 PBMC 또는 림프구에 존재하는 T 세포는, 선택적으로는 PD-1 길항제의 존재 하에, 하나 이상의 해당 항원과 배양하여 하나 이상의 해당 항원을 대해 초회(初回) 항원자극되는 T 세포 군집을 생산할 수 있다. T 세포는 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 초회 항원자극될 수 있다. 특정 실시예에서, PBMC 또는 림프구는 정제된 표적 펩티드 항원의 존재 하에, 선택적으로 PD-1 길항제의 존재 하에 배양된다. 일부 실시예에서, 해당 항원은 감염제의 항원, 또는 종양 항원, 예컨대, 이에 제한되지는 않지만, 상기 표에 열거된 하나 이상의 해당 항원이다. 해당 항원은 정제된 형태, 예컨대 화학적으로 합성된 펩티드일 수 있다. 다른 실시예에서, 해당 항원은 정제되지 않은 형태, 예컨대 미정제 용해물, 예를 들어 바이러스 용해물로 존재한다.

[0306] T 세포를 초회 항원자극시키는데 사용되는 항원의 양은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 항원이 정제된 형태로 사용되는 경우에는 약 1-10 ㎍/㎖의 펩티드가 사용된다. 바이러스 용해물이 사용되는 경우, 약 0.1-100 ㎕, 예컨대 약 75 ㎕의 용해물이 사용될 수 있다. T-APC가 사용되는 경우, 해당 항원을 제공하는 약 4-6 백만 개의 T-APC가 각 4-6 천만 개의 T 세포(또는 림프구 또는 PBMC)에 대해 사용된다.

[0307] 구체적인 실시예에서, 림프구는 T 세포의 초회 항원자극을 허용하는 조건 하에 가용성 항원 또는 바이러스 용해물을 이용하여 5-7일 동안 배양함으로써 시험관 내에서 초회 항원자극될 수 있다. 살아있는 T 세포는 예를 들어 피콜-하이페크(Ficoll-Hypaque) 원심분리로 회수되어 초회 항원자극된 T 세포를 생성하게 된다. 필요하다면, 살아있는 초회 항원자극된 T 세포는 예를 들어 첫번째 초회 항원자극에 사용된 것과 동일한 조건 하에, 다시 5-7일간 항원으로 배양하여 1회 이상 다시 초회 항원자극되어, 이에 따라 살아있는 T 세포를 회수할 수 있게 된다.

[0308] 또다른 실시예에서, 림프구는 예를 들어 백신 형태의 항원으로 피험체를 접종함으로써 체내에서 초회 항원자극될 수 있다. 이러한 예에서, 면역화 이후 피험체로부터 수득한 T 세포는 이미 초회 항원자극된 상태이다. 예를 들어, 피험체로부터 수득한 림프구 또는 PBMC는 이후 추가의 초회 항원자극 필요없이 본원에 기술된 바와 같이 PD-1 길항제의 존재 하에 APC로 배양된다.

[0309] 상기 방법은 해당 항원을 제공하는 APC를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, APC는 그 표면 상에 표적 펩티드가 제공되기에 충분한 조건 하에, 충분량의 하나 이상의 서로 다른 펩티드 항원으로 배양될 수 있다. 이러한 방법으로 APC 표면의 MHC 분자 상에 해당 항원을 제공하는 일군의 APC를 생성하게 된다. 상기 개시된 방법은 APC의 표면에 해당 항원을 제공하는 특정 방법들로 제한되지는 않는다.

[0310] 또한, 항원은 자연적으로 또는 표적 단백질(항원)을 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 유전자의 삽입으로 인해 발현될 수 있다. 해당 항원을 코딩하는 핵산은 제공될 표적은 전령 RNA로서, 또는 예컨대 포유동물 발현 벡터, 또는 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스, 수두바이러스, 또는 레트로바이러스 벡터)를 이용하여 T 세포 내로 도입될 수 있다. 해당 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 자가 복제 플라스미드 또는 바이러스인 재조합 DNA, 또는 진핵세포의 유전체 DNA 내로 혼입된 재조합 DNA, 또는 다른 서열과 독립적인 별개의 분자로서 존재하는 재조합 DNA를 포함한다. 또한, 해당 항원을 코딩하는 핵산은 전기 천공법, 리포펙션, 또는 인산칼슘계 형질감염을 이용하여 도입될 수 있다.

[0311] 수많은 바이러스 벡터가 구축되었는데, 여기에는 폴리오마, 즉, SV40 (문헌 [Madzak et al., 1992, J. Gen. Virol., 73:1533-1536]), 아데노바이러스 (문헌 [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]), 우두 바이러스 (문헌 [Mackett et al., 1992, Biotechnology, 24:495-499]), 아데노-연관 바이러스 (문헌 [Muzyczka, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:91-123]; [On et al., 1990, Gene, 89:279-282]), HSV, CMV 및 EBV를 포함하는 포진 바이러스 (문헌 [Margolskee, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158:67-90]; [Johnson et al., 1992, J. Virol., 66:2952-2965]; [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]), 신드비스 바이러스 (문헌 [H. Herweijer et al., 1995, Human Gene Therapy 6:1161-1167]; 미국 특허 제5,091,309호 및 제5,2217,879호), 알파바이러스 (문헌 [S. Schlesinger, 1993, Trends Biotechnol. 11:18-22]; [I. Frolov et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11371-11377]) 및 조류 기원의 레트로바이러스 (문헌 [Brandyopadhyay et al., 1984, Mol. Cell Biol., 4:749-754]; [Petropouplos et al., 1992, J. Virol., 66:3391-3397]), 쥐과 기원의 레트로바이러스 (문헌 [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]) 및 인간 기원의 레트로바이러스 ([Page et al., 1990, J. Virol., 64:5370-5276]; [Buchschalcher et al., 1992, J. Virol., 66:2731-2739])가 포함된다. 바큘로바이러스(AcMNPV) 벡터도 당업계에 공지되어 있으며, 이는 상업적 공급원들(예컨대 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 파민젠; 미국 코네티컷주 메리덴 소재의 프로테인 사이언스 코포레이션; 미국 캘리포니아주 라호야 소재의 스트라타진)로부터 수득될 수 있다.

[0312] 한 실시 양태에서, 해당 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 APC로의 전달을 위한 바이러스 벡터 내에 포함된

다. 적절한 벡터로서는 레트로바이러스 벡터, 진성두창 벡터, 조류폭스 벡터, 계두 벡터, 카프리폭스 벡터, 수이폭스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 포진 바이러스 벡터, 알파 바이러스 벡터, 바큘로바이러스 벡터, 신드비스 바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터 및 소아마비바이러스 벡터를 포함한다. 특히 대표적인 벡터로서는 수두바이러스 벡터 예컨대 우두 바이러스, 계두 바이러스 및 고약독화된 우두 바이러스 (MVA), 아데노바이러스, 바큘로바이러스 등을 들 수 있다.

[0313] 사용되는 천연두 바이러스로는 진성두창, 수이폭스, 조류폭스 및 카프리폭스 바이러스를 포함한다. 진성두창은 우두, 서두 및 미국너구리 천연두를 포함한다. 사용되는 진성두창의 한 예는 우두이다. 조류폭스는 계두, 카나리아두 및 구두를 포함한다. 카프리폭스는 산양두 및 양두를 포함한다. 한 실시예에서, 수이폭스는 돈두이다. 발현을 위한 천연두 바이러스 벡터의 예가 예를 들어, 미국 특허 제6,165,460호(본원에 참조로서 포함됨)에 기술되어 있다. 사용될 수 있는 기타 다른 바이러스 벡터는 기타의 DNA 바이러스, 예컨대 포진 바이러스 및 아데노바이러스와 RNA 바이러스, 예컨대 레트로바이러스 및 소아마비 바이러스를 포함한다.

[0314] 적절한 벡터는 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제6,998,252호 개시되어 있다. 한 실시예에서, 재조합 수두바이러스, 예컨대 재조합 우두 바이러스는 우두 조절 서열 또는 해당 항원을 코딩하는 플랭킹 (flanking) 우두 조절 DNA 서열과 자연적으로 인접하지 않는 기능적으로 동등한 플랭킹 DNA 서열을 포함하는 키메라 유전자의 삽입에 의해 합성적으로 변형된다. 이러한 키메라 유전자를 포함하는 재조합 바이러스는 항원을 발현시키는데 있어서 유효하다. 한 실시예에서, 백신 바이러스 벡터는 (A) (i) 항원을 코딩하는 제1 DNA 서열 및 (ii) 수두바이러스 프로모터를 포함하는 세그먼트, (B) 수두바이러스 유전체의 필수적이지 않은 영역의 DNA를 포함하며, 상기 수두바이러스 프로모터는 항원 폴리펩티드 및 상기 플랭킹 세그먼트를 코딩하는 DNA 서열에 인접하여 이에 대하여 전사적 조절을 행한다. 바이러스 벡터는 선택적 마커를 코딩할 수 있다. 한 실시예에서, 수두바이러스는 예를 들어, 티미딘 키나아제 유전자 (본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,998,252호를 참조)를 포함한다.

[0315] 충분한 밀도의 항원을 제공하는 APC 군집은 항원을 제공하는 APC와 그 항원 (항원-특이적 T 세포)과 특이적으로 면역반응할 수 있는 T 세포 간의 결합을 허용하기에 충분한 조건 하에, 임의로는 유효량의 PD-1 길항제의 존재하에, T 세포 (예컨대 림프구 또는 PBMC)를 이용하여 배양된다. APC에 표적 T 세포의 결합 향상을 자극하기 위해, 충분한 밀도의 항원을 발현하는 충분한 수의 APC를 MHC와 함께 사용한다. 특정 실시예에서, 20% 이상의 APC, 예컨대 30% 이상의 APC, 40% 이상의 APC, 50% 이상의 APC, 또는 60% 이상의 APC가 APC 표면에 MHC 분자상에 원하는 항원을 제공한다. 첨가된 T 세포의 최적량은 사용되는 APC의 양에 따라 달라질 수 있다. 일부 실시예에서, T 세포 : APC 비율은 6:1 이상의 비율, 예컨대 8:1 이상, 10:1 이상, 12:1 이상, 15:1 이상, 16:1 이상, 20:1, 또는 심지어 50:1 이상으로 사용된다.

[0316] 항원-특이적 T 세포의 수를 증가시키기 위해, 예를 들어 IL-2, IL-7, IL-12 및 IL-15와 같은 사이토킨의 존재하의 배양에 의해 세포의 증식을 자극할 수 있다. 첨가되는 사이토킨의 양은 T 세포의 생성과 증식을 자극하기에 충분하며, 통상적인 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 일부 실시예에서, 첨가되는 IL-2, IL-7, IL-12, 또는 IL-15의 양은 약 0.1-100 IU/mL, 예컨대 1 IU/mL 이상, 10 IU/mL 이상, 또는 20 IU/mL 이상이다.

[0317] APC로 항원 특이적 T 세포가 충분량으로 결합한 후, 해당 항원을 특이적으로 인식하는 T 세포가 생성된다. 이는 해당 항원에 특이적인 풍부한(예컨대 정제된) 항원-특이적 T 세포의 군집을 생성시킨다. 일부 실시예에서, 해당 항원에 특이적인 상기 생성된 일군의 T 세포는 30% 이상의 순도, 예컨대 40% 이상의 순도, 또는 심지어 50% 이상의 순도를 가진다. 항원 특이적 T 세포 군집의 순도는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

[0318] 한 실시예에서, 항원-특이적 T 세포의 증식을 자극하는 동안에, 세포는 세포수를 결정하기 위해 계수될 수 있다. 세포의 수가 원하는 만큼 도달된 경우, 순도를 측정한다. 순도는 예를 들어, 항원-특이적 T 세포의 표면에 제공된 마커를 이용함과 동시에 항원 인식 시에 예컨대 인터페론 (IFN)γ, 종양 괴사 인자 (TNF)α, 인터루킨 (IL)-2, IL-10, 형질전환 성장 인자 (TGF)β1, 또는 IL-4와 같은 사이토킨의 생성을 평가하여 측정될 수 있다. 일반적으로, 항원-특이적 T 세포는 CD4 또는 CD8 마커와 함께 CD3 마커 및 (활성화된 T 세포에 대해 특이적인) IFN-γ에 대해서 양성이다. 예를 들어, 형광 활성화된 세포 분류기(FACS)를 사용해 서로 다르게 착색된 항-CD3, 항-CD4, 항-CD8 및 항-IFN-γ를 이용함으로써, CD3, CD4 또는 CD8, 및 IFN-γ에 대해 양성인 일군의 세포를 동정(그리고 필요하다면 분류)하는데 사용될 수 있다. 간략하면, 자극된 T 항원-특이적 세포는 항-CD3, 항-CD4, 항-CD8 및 항-IFN-γ(각각은 서로 다른 형광단이 부착됨)의 존재 하에, 항체가 세포에 결합하기에 충분한 시간 동안 배양된다. 결합되지 않은 항체를 제거한 후에, 세포를 통상적인 방법을 이용한 FACS에 의해 분석한다. 항원-특이적 T 세포는 INF-γ 양성이고, CD8 양성 또는 CD4 양성이다. 구체적인 실시예에서, 생성된

일군의 항원성 세포는 CD4+ 또는 CD8+ 세포의 전체 군집에 대하여 약 30% 이상의 순도, 예컨대 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 또는 심지어 70% 이상의 순도를 가진다.

[0319] 또다른 실시예에서, 상기 방법은 항원-특이적 T 세포의 세포독성을 측정하는 방법을 추가로 포함한다. 세포독성을 측정하는 방법은 예를 들어 a ^{51}Cr-유리 시험법 (예를 들어 문헌 [Walker *et al*. *Nature* 328:345-8, 1987]; [Qin *et al*. *Acta Pharmacol. Sin.* 23(6):534-8, 2002]을 참조하며, 이들 모두는 본원에 참고로 포함된다)과 같이 당업계에 공지되어 있다.

[0320] 항원-특이적 T 세포는 1회 이상의 선별 과정을 거쳐 항원-특이적 T 세포의 순도를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 생성된 정제형 항원-특이적 T 세포는, APC와 정제형 항원-특이적 T 세포 간의 결합을 허용하기에 충분한 조건 하에, PD-1 길항제의 존재 하에 해당 항원을 제공하는 APC를 이용하여 재배양될 수 있다. 생성된 항원-특이적 T 세포는 예를 들어 IL-2를 이용하여 증식하도록 자극될 수 있다. 일반적으로, 상기 생성된 해당 항원과 특이적으로 면역반응하는 항원-특이적 T 세포는 1회만의 선별을 거친 것보다 APC를 이용한 연속적인 자극 후에 보다 더 순도가 높다. 한 실시예에서, 생성된 일군의 정제형 항원-특이적 T 세포는 존재하는 모든 CD3+ 세포에 대하여, 90% 이상의 순도, 95% 이상의 순도, 98% 이상의 순도를 가진다. 특정 실시예에서, 생성된 일군의 정제형 항원-특이적 T 세포는 존재하는 모든 CD4+ 세포에 대하여, 95% 이상의 순도, 예컨대 98% 이상의 순도를 가진다. 또다른 실시예에서, 생성된 일군의 정제형 항원-특이적 T 세포는 존재하는 모든 CD3+ 세포에 대하여, 90% 이상의 순도, 예컨대 93% 이상의 순도를 가진다.

[0321] 또한, 본원은 풍부한(예컨대 정제된) 항원-특이적 T 세포 및 PD-1 길항제를 포함하는 치료 조성물을 제공한다. 특정 실시예에서, 생성된 풍부한 항원-특이적 T 세포 군집(해당 항원에 대해 특이적)는 이를 필요로 하는 피험체에게 투여를 위한 치료적 투여형으로 제공된다. PD-1 길항제도 치료가 필요한 피험체에게 투여를 위한 치료적 투여형으로 제공된다.

[0322] 한 실시예에서, 생성된 일군의 정제된 항원-특이적 T 세포는 존재하는 모든 CD3$^+$ 세포에 대하여, 약 30% 이상의 순도, 예컨대 40% 이상, 50% 이상, 80% 이상, 또는 심지어 90% 이상의 순도를 가진다. 특정 실시예에서, 생성된 일군의 정제형 항원-특이적 T 세포는 존재하는 모든 CD3$^+$ 세포에 대하여, 약 30% 이상의 순도, 예컨대 40% 이상, 50% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 심지어 98% 이상의 순도를 가진다. 또다른 실시예에서, 생성된 일군의 정제형 항원-특이적 T 세포는 존재하는 모든 CD3$^+$ 세포에 대하여, 약 50% 이상의 순도, 예컨대 60% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 심지어 93% 이상의 순도를 가진다. 확대 선별된 항원-특이적 T 세포는 미코플라스마, 무균성, 내독소 및 냉동보존 또는 수여자로의 주입 전 기능과 순도에 대해 조절된 품질에 대해 시험할 수 있다.

[0323] 치료적 유효량의 항원-특이적 T 세포는 피험체에게 투여된다. 치료적 유효량의 정제된 항원-특이적 T 세포의 비제한적인 구체적 예는 **피험체**의 킬로그램당 투여량으로서, 약 1×10^5 개의 세포/kg 내지 약 1×10^9 개의 세포/kg, 예컨대 약 1×10^6 개의 세포/kg 내지 약 1×10^8 개의 세포/kg, 예컨대 약 5×10^6 개의 세포/kg 내지 약 75×10^6 개의 세포/kg, 예컨대 약 25×10^6 개의 세포/kg, 또는 약 50×10^6 개의 세포/kg의 용량으로 투여된다.

[0324] 정제된 항원-특이적 T 세포는 임상학자에 의해 결정된 바와 같이 단일 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 세포는 목적하는 반응 및 수득된 반응에 따라 약 2주의 간격으로 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 일단 목적하는 반응이 달성되면, 항원-특이적 T 세포는 추가로 투여되지 않는다. 그러나, 수여자가 감염 또는 종양의 존재 혹은 성장과 관련된 증상을 나타내는 경우에는, 치료적 유효량의 항원-특이적 T 세포를 그 시기에 투여할 수 있다. 투여는 국소적으로 또는 전신에 할 수 있다.

[0325] 본원에 개시된 정제된 항원-특이적 T 세포는 약학적으로 허용되는 담체, 예컨대 식염수와 함께 투여될 수 있다. 또한, PD-1 길항제는 상기 기술된 바와 같이 약학적으로 허용되는 담체로 제형화될 수 있다. 일부 실시예에서, 다른 치료제가 항원-특이적 T 세포 및 PD-1 길항제와 함께 투여된다. 다른 치료제가 목적하는 효과에 따라 항원-특이적 T 세포의 투여 전, 투여 시, 또는 투여 후에 투여된다. 대표적인 치료제로서는, 이에 제한되지는 않지만, 항미생물제, 면역 자극제 예컨대 인터페론-알파, 화학요법제 또는 생체 내 T 세포를 자극하는데 사용되는 동일한 항원의 펩티드 백신을 포함한다. 특정 실시예에서, 정제된 항원-특이적 T 세포를 포함하는 조성물은 하나 이상의 치료제도 포함한다.

[0326] **치료 및 평가 방법**

[0327] 치료 유효량의 PD-1 길항제의 투여는, 예컨대 기억 B 세포의 증식을 증가시켜 B 세포에 영향을 주는 것으로 본원에 개시되어 있다. 상기 개시된 바와 같이, 피험체에 PD-1 길항제의 투여를 포함하는 치료 방법이 본원에 제공된다. 이들 방법은 B 세포를 측정하는 것을 포함하며, 예를 들어 비제한적인 예로서 피험체에서 기억 B 세포의 증식을 측정하는 것을 포함한다. 일부 예에서, 이 방법은 피험체로부터 유래한 샘플에서 나이브 B 세포를 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이 방법은 해당 항원에 대한 중화 항체의 측정 및/또는 CD28 T 세포의 측정을 포함한다. 따라서, 이 방법은 기억 B 세포 증식, 나이브 B 세포, CD28 T 세포 및 중화 항체 중 하나 이상을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0328] 각종 감염 및 암에서 치료하고 PD-1 길항제의 효능을 측정하는 방법이 또한 제공된다. 치료 방법이 임의의 해당 피험체에서 효과적인지를 결정하는 방법도 본원에 포함된다. 이들 방법에서, 지속성 감염 또는 암에 걸린 피험체와 같은 해당 피험체를 선택한다. 이 피험체에게 PD-1 길항제의 치료 유효량을 투여한다. 일부 예에서, 기억 B 세포 증식을 평가하여 치료법이 효과적인지를 결정하고/하거나, PD-1 길항제의 용량이 변경되어야 하는지를 결정한다. 추가의 예에서, 이 방법은 나이브 B 세포를 측정하는 것을 포함한다. 추가의 예에서, 이 방법은 해당 항원에 대한 중화 항체를 측정하고/하거나 CD28 T 세포를 측정하는 것을 포함한다. 따라서, 이 방법은 기억 B 세포 증식, 나이브 B 세포, CD28 T 세포 및 중화 항체 중 하나 이상을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0329] 피험체는 임의의 포유동물, 예컨대 인간, 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 소, 말 및 돼지일 수 있다. 몇몇 예에서, 피험체는 영장류, 예컨대 인간이다. 추가의 예에서, 피험체는 쥐 피험체, 예컨대 마우스이다. 몇몇 실시 양태에서, 피험체는 상기 논의한 감염의 발병 위험이 있다. 감염 발병 위험의 피험체는 아직 감염되지는 않았으나, 해당 감염제에 의해 감염될 수 있는 피험체이다. 추가의 예에서, 피험체는 지속성 감염과 같은 감염을 나타내는 치료를 위해 선택된다. 다른 실시 양태에서, 피험체는 상기 개시된 바와 같이 암 발병 위험이 있거나, 또는 암이 있다. 이들 피험체는 당업자, 예컨대 의사가 적절한 표준 방법으로 확인할 수 있다. 상기 개시된 바와 같이, 기술된 방법은 해당 피험체를 선택하는 단계, 및 PD-1 길항제를 투여하는 단계를 포함한다. 그 다음 기억 B 세포 증식을 평가한다. 일부 예에서, 나이브 B 세포의 수를 또한 평가한다.

[0330] 일부 구체예에서, 피험체는 상기 개시한 바와 같이 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충에 의한 지속성 감염을 가진다. 치료 유효량의 PD-1 길항제를 투여하여 피험체를 치료한다. 이어서, 기억 B 세포 증식을 평가하여 치료 방법이 효과적인지를 결정하고/하거나, PD-1 길항제의 용량을 변경해야 하는지를 결정한다. 일반적으로, 급성 감염과 대조적으로, 지속성 감염은 숙주 면역 반응 유도에 의해 효과적으로 제거되지 않는다. 감염제 및 면역 반응이 평형에 도달하여 감염된 피험체가 반드시 증상을 발현하지 않으면서 장기간 동안 감염성일 수 있다. 지속성 감염은, 예를 들어, 잠복성, 만성 및 지발성 감염을 포함한다. 지속성 감염은 바이러스, 예컨대 인간 T-세포 백혈병 바이러스, XMRV, 폴리오마 JC 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 시토메갈로바이러스, 포진 바이러스, 수두 대상포진 바이러스, 홍역 바이러스, 파포바바이러스, 프리온, 간염 바이러스, 아데노바이러스, 파보바이러스 및 유두종 바이러스에 의해 발생한다. 추가의 지속성 감염은 상기 개시되어 있다. 이들 방법은 나이브 B 세포, CD28 T 세포 및/또는 중화 항체를 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0331] 추가의 구체예에서, 피험체는 종양을 가진다. 상기 개시된 바와 같이, 치료 유효량의 PD-1 길항제를 피험체에 투여하여 종양을 치료한다. 이어서, 기억 B 세포 증식을 평가하여 치료 방법이 효과적인지를 결정하고/하거나, PD-1 길항제의 용량을 변경해야 하는지를 결정한다. 몇몇 예에서, 치료 유효량의 종양 항원 또는 종양 항원을 코딩하는 뉴클레오티드를 또한 피험체에 투여한다. PD-1 길항제 및 종양 항원, 또는 종양 항원을 코딩하는 뉴클레오티드를 동시에 또는 순차 투여할 수 있다. 이들 방법은 나이브 B 세포, CD28 세포 및/또는 중화 항체를 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0332] 추가의 구체예에서, 피험체에게 해당 항원, 예컨대 바이러스 항원 또는 종양 항원에 특이적인 세포독성 T 세포의 치료 유효량과, PD-1 길항제의 치료 유효량을 투여한다. 본원에 개시된 바와 같은 정제된 항원 특이적 T 세포 및 PD-1의 투여는 병원체(예, 바이러스 또는 진균류) 또는 신생물에 대한 면역 반응을 표적으로 하여, 감염성 질환 또는 종양과 같은 병리학적 상태를 극복하는 피험체의 능력을 증가시킨다. 따라서, 생체외에서 피험체로부터 선택된 항원 특이적 T 세포의 정제군을 정제 및 형성하고 이들 세포의 치료량을 도입하여, 수용 피험체의 면역 반응을 증강시킨다. 치료 유효량의 PD-1 길항제의 투여는 또한 수여자의 면역 반응을 증강시킨다. 이어서, 기억 B 세포 증식을 평가하여 치료 방법이 효과적인지를 결정하고/하거나, PD-1 길항제 및/또는 세포독성 T 세포의 용량을 변경해야 하는지를 결정한다. 이들 방법은 나이브 B 세포, CD28 발현 (CD28+) T 세포 및/또는 중화 세포를 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0333] 따라서, PD-1 길항제가 효과적인지를 결정하거나, 또는 PD-1 길항제의 용량이 효과적인지를 결정하기 위한 본원

에 개시된 방법을, 상기 개시된 임의의 치료 방법과 함께 (및 임의의 피험체에서) 사용할 수 있다.

[0334] 일부 실시 양태에서, 기억 B 세포를 측정한다. 대조군과 비교하여 생물학적 샘플로부터의 기억 B 세포의 증식 증가는 PD-1 길항제의 용량이 피험체를 치료하는데 유용함을 나타내며, 대조군과 비교하여 기억 B 세포 증식의 유의적인 변경의 부재는 PD-1 길항제의 용량이 피험체를 치료하는데 유용하지 않음을 나타낸다.

[0335] 추가의 실시 양태에서, 이 방법은 피험체로부터의 생물학적 샘플 중 중화 항체를 검출하는 것을 포함하며, 여기서 대조군과 비교하여 중화 항체의 증가는 PD-1 길항제의 용량이 피험체를 치료하는데 유용함을 나타내고, 대조군과 비교하여 중화 항체의 유의적인 변경 부재는 PD-1 길항제의 용량이 피험체를 치료하는데 유용하지 않음을 나타낸다. 추가의 실시 양태에서, 이 방법은 피험체로부터 유래한 생물학적 샘플 중 CD28 발현(CD28+) T 세포를 검출하는 것을 포함하며, 대조군과 비교하여 CD28+ T 세포의 증가는 PD-1 길항제의 용량이 피험체를 치료하는데 유용함을 나타내고, 대조군과 비교하여 CD28+ T 세포의 유의적인 변경 부재는 PD-1 길항제의 용량이 피험체를 치료하는데 유용하지 않음을 나타낸다. 이들 측정은 기억 B 세포의 측정과 함께 실시하지만, 기억 B 세포의 측정 없이 실시할 수도 있다.

[0336] 특정 PD-1 길항제, 또는 특정 용량의 PD-1 길항제가 피험체를 치료하는데 효과적인지를 결정하는 추가의 방법이 본원에 개시되어 있다. 이들 방법은 피험체로부터의 샘플에서와 같이, 기억 B 세포의 증식을 측정하는 것을 포함한다. 이들 방법은 피험체로부터의 샘플에서 나이브 B 세포를 측정하는 것을 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, CD27, CD20 및 CD21의 발현을 평가할 수 있다(하기 참조). 일부 실시예에서, 기억 B 세포 및/또는 나이브 B 세포의 측정은 피험체에서 PD-1 길항제가 PD-1 활성을 감소시키기에 충분한 기간 후에 실시한다.

[0337] 또한, 이 방법을 이용하여 피험체에게 치료적으로 효과적인 PD-1 길항제의 용량을 평가할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 방법을 이용하여 해당 피험체에게 투여된 용량을 낮출 수 있는지 그리고 여전히 효과적인지를 결정할 수 있다. 또한 본원에 개시된 방법을 이용하여 피험체에게 투여된 용량이 너무 낮은지, 그래서 치료적으로 효과적이 되도록 올려야 하는지를 결정할 수 있다.

[0338] 일부 실시 양태에서, PD-1 길항제의 제1 용량을 피험체에게 투여한다. 대조군과 비교하여 증식성 기억 B 세포의 증가는 이 용량이 효과적임을 나타낸다. 일부 예에서, 부작용의 감소와 같이, 피험체에게 투여되는 제제의 양을 감소시키는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 제1 용량이 기억 B 세포의 증식을 증가시키는 경우, 더 낮은 제2 용량의 PD-1 길항제를 피험체에게 투여할 수 있으며, B 세포를 포함하는 제2 샘플을 얻을 수 있다. 대조군과 비교하여 제2 샘플로부터 유래한 기억 B 세포의 증식 증가는 제2 용량의 PD-1 길항제가 피험체를 치료하는데 유용하며, 따라서 더 낮은 용량이 피험체를 치료하는데 치료 효과일 것이라고 결정한다. 대조군과 비교하여 제2 샘플에서 기억 B 세포 증식의 유의적인 변경이 없다면 제2 용량의 PD-1 길항제가 피험체를 치료하는데 치료 효과가 없다는 것을 나타낸다. 이 방법을 반복하여 해당 피험체를 위한 최저 치료 유효량을 결정할 수 있다.

[0339] 추가의 구체예에서, 제1 용량의 PD-1 길항제를 피험체에게 투여한다. 대조군과 비교하여 기억 B 세포의 증식 증가가 없는 것은, 이 용량이 피험체 치료를 위해 치료 효과가 없음을 나타낸다. 제1 용량이 기억 B 세포의 증식을 증가시키지 않은 경우에는, 더 높은 제2 용량을 피험체에게 투여하고, B 세포를 포함하는 제2 샘플을 얻을 수 있다. 대조군과 비교하여 제2 샘플로부터 유래한 기억 B 세포의 증식 증가는 더 높은 제2 용량의 PD-1 길항제가 피험체 치료에 효과적임을 나타내며, 따라서 더 높은 용량이 피험체 치료를 위해 치료 효과가 있음을 결정한다. 대조군과 비교하여 제2 샘플에서 기억 B 세포의 증식에 있어서 유의적인 변경이 없는 것은, 제2 용량의 PD-1 길항제가 피험체 치료에 치료 효과가 없음을 나타내며, 따라서 더 높은 제3의 용량이 필요하다. 따라서, 이 방법을 반복하여 해당 피험체에 대한 치료 유효량을 결정할 수 있다.

[0340] 개시된 방법을 또한 사용하여 특정 PD-1 길항제가 피험체의 치료에 치료 효과가 있어서 계속 치료해야 하는지, 또는 특정 PD-1 길항제가 피험체 치료에 효과가 없어서 다른 PD-1 길항제를 사용하여 피험체를 치료해야 하는지를 결정할 수 있다. 이들 방법은 피험체에게 특정 PD-1 길항제를 투여하는 단계, 및 피험체로부터의 샘플에서 기억 B 세포의 증식을 평가하는 단계를 포함한다. 대조군과 비교하여 샘플에서 기억 B 세포의 증식 증가는 특정 PD-1 길항제가 피험체의 치료에 유용하다는 것을 나타낸다. 대조군과 비교하여 샘플에서 기억 B 세포 증식의 유의적인 변화가 없다는 것은 특정 PD-1 길항제가 피험체 치료에 치료 효과가 없으며, 상이한 PD-1 길항제 또는 다른 치료제를 피험체에게 투여해야 한다는 것을 나타낸다.

[0341] 따라서, 본원에 개시된 방법을 이용하여 특정 PD-1 길항제의 효능을 모니터링하거나, 또는 PD-1 길항제의 유효량을 결정할 수 있다. 일반적으로, 대조군과 비교하여 PD-1 길항제를 투여한 피험체로부터 얻은 샘플에서 기억 B 세포의 증식 증가는, PD-1 길항제가 피험체에 대해 치료 효과적임을 나타내고/내거나, 그 용량이 피험체를 치

료하는데 충분함을 나타낸다.

[0342] 일반적으로, 기억 B 세포의 증식을 측정하는 것은 피험체로부터의 B 세포를 포함하는 샘플을 얻는 것과, 샘플에서 증식하는 기억 B 세포의 존재 또는 수를 결정하는 것을 포함한다. 일부 예에서, 샘플은 생검 샘플, 혈액 샘플, 또는 말초혈 단핵 세포 샘플이다. 샘플을 정제하여, 예를 들어 기억 B 세포 및/또는 나이브 B 세포 등의 B 세포를 분리할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이 방법은 해당 PD-1 길항제를 투여한 피험체로부터 유래한 샘플에서 증식성 기억 B 세포의 양 및/또는 나이브 B 세포의 양을 측정하는 단계를 포함한다. 일부 예에서, 증식성 기억 B 세포의 양 및/또는 나이브 B 세포의 양을 대조군과 비교한다. 증식성 기억 B 세포에 대해서, 대조군은 미리 결정된 표준 값이거나, 또는 PD-1 길항제를 투여하지 않은 피험체로부터의 증식성 기억 B 세포의 양이거나, 또는 대조 물질, 예컨대 비히클만 투여한 피험체로부터의 증식성 기억 B 세포의 양일 수 있다. 유사하게, 나이브 B 세포와 관련하여, 대조군은 각각 미리 측정된 표준값이거나, 또는 PD-1 길항제를 투여하지 않은 피험체로부터의 나이브 B 세포의 양이거나, 또는 대조 물질, 예컨대 비히클만 투여한 피험체로부터의 나이브 B 세포의 양이거나, 피험체의 나이브 B 세포의 양일 수 있다.

[0343] 일부 예에서, CD20 및 CD21을 발현하지만 CD27을 발현하지 않는($CD20^{+}CD27^{-}CD21^{+}$) 나이브 B 세포와 비교하여 CD27를 발현하는 기억 B 세포, 예컨대 CD20 및 CD27을 발현하지만 CD21을 발현하지 않는($CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$) 세포가 동정된다. 기억 B 세포 및 나이브 B 세포를, CD20, CD21 및 CD27에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 단리 및/또는 검출할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 기억 B 세포는 CD27을 발현한다($CD27^{+}$). 일부 예에서, 기억 B 세포는 $CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{+}$(활성화된 기억 세포) 등의 $CD27^{+}CD21^{-}$ B 세포로 확인되었다.

[0344] B 세포를 단리 및 검출하는 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 예시적인 프로토콜이 본원에 제시되어 있다. 기억 B 세포의 증식 측정 및/또는 나이브 B 세포의 측정을 위한 방법도 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로 이들 방법은 단순한 육안 관찰이 아니라, 분자 및/또는 생화학적 기법의 사용을 포함한다. 일부 예에서, 형광 활성화된 세포 분류법(FACS)이 이용된다. FACS를 사용하여 미성숙 B 세포 또는 분화된 혈장 세포 또는 기억 세포 등의 세포를, 상기 세포를 적절히 표지된 항체와 접촉시켜, 분류(단리)할 수 있다. 일 실시 양태에서, 몇몇 항체(예, CD27, CD20, CD21, CD45R, CD40, CD19, 및/또는 IgM에 결합하는 항체) 및 FACS 분류법을 사용하여 실질적으로 정제된 미성숙 B 세포, 혈장 세포 및 기억 B 세포의 세포군을 생성할 수 있다.

[0345] 피험체로부터 유래한 샘플에서 CD28 T 세포를 측정하는 방법도 알려져 있다. 이들 방법은 일반적으로 단순한 육안 관찰이 아니라, 분자 및/또는 생화학적 기법의 사용을 포함한다. 일부 예에서, 형광 활성화된 세포 분류법(FACS)이 이용된다. FACS를 사용하여 미성숙 B 세포 또는 분화된 혈장 세포 또는 기억 세포 등의 세포를, 상기 세포를 적절히 표지된 항체와 접촉시켜, 분류(단리)할 수 있다. 일 실시 양태에서, 몇몇 항체(예, CD3, CD4, CD8 및 CD28에 결합하는 항체) 및 FACS 분류법을 사용하여 실질적으로 정제된 CD28+ T 세포군을 생성할 수 있다. 중화 항체를 검출하는 방법도 당업계에 공지되어 있다. 이들 분석은 생물학적 샘플을 얻고 해당 항원에의 항체의 결합을 검출하는 것과, 예를 들어 바이러스, 예컨대 HIV에 대한 특이적 중화 분석을 포함한다.

[0346] FACS는 세포를 분리 또는 분류하기 위해서 더욱 정교한 검출 수준 중에서 다수의 색상 채널, 예각 및 둔각 광산란 검출 채널, 및 임피던스 채널을 사용한다. 목적하는 세포의 생존력에 유해하지 않는 한 어떠한 FACS 기법도 사용할 수 있다. (예시적인 FACS 방법에 대해서는 미국 특허 5, 061,620호 참조).

[0347] 그러나, 효능이 다른 기타 기법을 이용하여 목적하는 세포군을 정제 및 분리할 수 있다. 사용된 분리 기법은 수집하고자 하는 세포 분획의 생존력 유지를 최대화해야 한다. 사용된 특정 기법은 물론 분리 효율, 방법의 세포 독성, 정제의 용이성 및 신속성, 및 어떤 장비 및/또는 기술이 필요한지에 따라 달라진다.

[0348] 분리 절차는 항체-코팅된 자기 비드를 사용한 자기 분리, 친화도 크로마토그래피, 모노클로날 항체에 결합되거나 또는 보체와 함께 사용되는 세포독성제, 및 고체 매트릭스에 결합된 모노클로날 항체를 이용하는 "패닝" 또는 다른 편리한 기법을 포함한다. 자기 비드 및 다른 고체 매트릭스, 아가로스 비드, 폴리스티렌 비드, 중공 섬유막 및 플라스틱 페트리 접시에 부착된 항체가 직접 분리를 위해 허용된다. 세포 현탁액으로부터 고체 담체를 단순히 물리적으로 분리하여 세포 현탁액으로부터 항체가 결합된 세포를 제거할 수 있다. 고상 결합된 항체와 세포의 항온배양의 정확한 조건 및 기간은 사용된 시스템에 특이적인 몇몇 인자에 따라 달라진다. 그러나, 적절한 조건의 선택은 당업계의 기술 내에 있다.

[0349] 그 다음, 해당 마커(예, CD45R 또는 CD27)를 발현하는 세포가 고상 결합된 항체에 결합하기에 충분한 시간이 경과한 후에 미결합 세포를 생리학적 완충액으로 용리시키거나 또는 세척할 수 있다. 그 다음, 주로 사용된 항체

및 고상의 성질에 따라서, 임의의 적절한 방법에 의해서 고상으로부터 결합된 세포를 분리한다.

[0350] 이후 항체를 담체에 결합된 아비딘 또는 스트렙타비딘과 함께 제거할 수 있는 비오틴, 또는 형광 활성화된 세포 분류기(FACS)와 함께 사용될 수 있는 형광단에 접합시켜 세포 분리할 수 있다.

[0351] 예를 들어, CD45R 및/또는 CD27을 발현하는 세포는 CD45R 또는 CD27의 세포 표면 발현에 의해 다른 세포로부터 초기에 분리된다. 하나의 비제한적인 특정 예에서, $CD45R^+$ 또는 CD27+ 세포를 자기 비드 분리로 양성 선별하고, 이 때 자기 비드는 CD45 또는 CD27 반응성 모노클로날 항체로 코팅한다. 그 다음 $CD45R^+$ 또는 $CD27^+$ 세포를 자기 비드로부터 제거한다.

[0352] 자기 비드로부터의 $CD45R^+$ 세포 또는 $CD27^+$ 세포의 방출은 배양 방출법 또는 다른 방법으로 실시할 수 있다. 그 다음 단리된 $CD45R^+$ 세포 또는 $CD27^+$ 세포의 순도를, 필요하다면, 예컨대 FASCAN® 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA)로 조사한다. 일 실시 양태에서, 자기 비드로부터 방출된 세포군의 FACS 분류와 같은 추가의 정제 단계를 실시한다. 일 실시예에서, 이러한 분류를 실시하여 MHC 클래스 II, IgM, CD19, 및 CD40의 발현을 검출하여 미성숙 B 세포를 검출 또는 단리할 수 있다. 또 다른 예에서, MHC 클래스 II, IgM, CD14, 및 CD40 외에, IgD 및/또는 CD21의 발현을 기초로 성숙 B 세포를 분리 및/또는 검출할 수 있다.

[0353] 기억 B 세포의 증식 평가와 같이, B 세포 증식의 분석 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 형광 염료로 해당 세포의 생체외 화학적 표지를 포함하는 막 염료 희석법을 이용할 수 있다. 삼중수소의 뉴클레오시드 유사체(보통 ^{3}H-티미딘 데옥시리보뉴클레오시드, ^{3}H-TdR) 또는 브로모데옥시우리딘(BrdU)에 의한 표지를 이용할 수 있다. BrdU 도입 측정을 위해 FACS 분석을 이용할 수 있다. DNA 함량 및 세포 주기 관련 단백질과 같은 대안의 증식 마커를 또한 사용할 수 있다.

[0354] 일 실시예에서, Ki67 또는 PCNA의 측정을 이용할 수 있다. Ki67 항원은 활성 세포 주기의 모든 기(G1, S, G2 및 M 기)에서 증식 세포에 의해 발현되는 원형 세포 주기 관련 핵 단백질이다. 이것은 휴지기(G0) 세포에는 없다. Ki67 항체는 증식 확립에 유용하다. Ki67 항체를 사용하여 증식 세포 및 휴지기 세포를 정량할 수 있다(Ki67 인덱스). Ki67은 세포 주기 및 증식의 마커로서 일반적으로 사용되며; Ki67에 대한 항체, 예를 들어 ABCAM®가 시판되며, 면역조직화학 및 FACS 분석에 이들 항체를 사용하는데 이 방법을 이용할 수 있다.

[0355] 샘플링시에 활성 세포 주기에 있는 세포를 검출하기 위해 다른 방법을 이용할 수 있다. 림프구, 예컨대 기억 B 세포의 증식을 또한, 세포를 포함하는 생물학적 샘플에서 DNA를 표지하기 위해 안정한 동위원소를 이용하는 방법을 사용하여 측정할 수 있다. DNA는 신규 합성 경로를 통해 균일하게 고도로 표지된다. 사용되는 안정한 동위원소 표지, 예컨대 ^{2}H-글루코스 또는 중수(^2H_2O 또는 $H_2{}^{18}O$)는 동물 및 인간에게 비독성이며, 일반적으로 미국 식품의약국(FDA)에서 안전한 것으로 간주된다(예컨대 미국 특허 출원 2009/0155179호 참조). 림프구 DNA로의 안정한 동위원소 표지 도입의 측정 방법은 다음 단계를 포함한다: (i) 추가의 분리 없이 크로마틴으로부터의 DNA의 추출 및 방출, DNA의 데옥시리보뉴클레오티드로의 가수분해, (ii) 푸린 데옥시리보뉴클레오티드로부터의 데옥시리보스의 선택적 방출, (iii) 기체 크로마토그래피/질량 분광분석(GC/MS)에 의한 분석에 적당한 푸린 데옥시리보스의 휘발성 유도체(예컨대, 펜탄 테트라아세테이트, 펜타플루오로벤질 테트라아세틸 유도체, 또는 또 다른 안정한 유도체)로의 유도체화, (iv) 상기 유도체의 GC/MS 분석, (v) 상기 유도체의 질량 동위원소이성질체 풍부성 패턴 분석, 및 (vi) 안정한 동위원소 도입의 척도인 상기 과도한 농축값 패턴으로부터의 계산. 이들 각 방법의 특정 실시 양태가 교시되어 있다(미국 특허 5,910,40호 참조).

[0356] ***시험관내 분석***

[0357] PD-1 길항제를 선택하는 방법이 본원에 개시되어 있다. 이들 방법은 해당 제제가 PD-1 길항제인지를 결정하는 것을 포함한다. 따라서, 이 방법은 PD-1 길항제로 기능하는지를 결정하기 위해 다수의 제제를 스크리닝하는 것을 포함한다. 이것은 화합물, 소형 분자 또는 항체의 라이브러리일 수 있으며, 이 분석을 고처리량 형식으로 실시할 수 있다.

[0358] 또한, 상기 방법은 해당하는 특정 개체를 치료하기 위해 특정 PD-1 길항제가 유용한지를 결정하는 것을 포함한다. 따라서, 개시된 방법들을 세포군이 해당 특정 개체로부터 유래하고, 특정 개체를 치료하는데 가장 적합한 PD-1 길항제를 결정하기 위해 다수의 유효 PD-1 길항제를 시험하는 "개인맞춤형 의약"을 위해 사용할 수 있다.

[0359] 이 방법은 기억 B 세포를 포함하는 단리된 세포군과 제제를 시험관 내에서 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 세포군은 말초혈 단핵 세포 또는 정제된 기억 B 세포, 예컨대 활성화된 또는 휴지기 기억 B 세포이다. 일례에서, 세포군은 기억 B 세포주이다.

[0360] 이 방법은 기억 B 세포의 증식을 검출하고/하거나 항체 분비 세포로의 기억 B 세포의 분화를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 실시 양태에서, 상기 방법은 IgM, IgG 및 항체 생산 B 세포를 검출하는 분석을 포함한다. 이 분석은 ELISPOT 분석일 수 있다. ELISPOT 분석은 샌드위치 효소 결합 면역흡착(ELISA) 기법과 매우 유사한 방법을 사용한다. 모노클로날 또는 다클로날 포획 항체를 PDVF(폴리비닐리덴 플루오라이드) 이면의 마이크로플레이트 상에 무균적으로 코팅한다. 해당 피분석물에 대한 특이성으로 항체를 선택한다. 일반적으로 분석에서 임의의 항체와 비반응성인 혈청 단백질로, 플레이트를 차단한다. 이 후, 항원 또는 유사분열인자와 함께, 다양한 밀도로 해당 세포를 평판배양한 다음, 특정 기간 동안 37℃, CO_2 항온기에서 가습하에 두었다.

[0361] 활성화된 세포에 의해 분비되는 사이토킨(또는 다른 해당 세포 산물, 예컨대 IgM 또는 IgG 항체)은, 고 표면적 PVDF 막 상에 코팅된 항체에 의해 국부적으로 포획된다. 웰을 세척하여 세포, 파편 및 배지 성분을 제거한 후에, 선택된 피분석물에 특이적인 비오티닐화된 다클로날 항체를 웰에 부가한다. 이 항체는 특징적인 표적 에피토프와 반응성이며, 따라서 해당 포획 산물을 검출하는데 사용된다. 임의의 미결합된 비오티닐화 항체를 제거하기 위한 세척 후에, 검출된 산물을, 예컨대 아비딘-효소, 및 효소에 대한 침전 기질을 사용하여 가시화한다. 착색된 최종 산물(일반적으로 착색된 스폿)은 통상적으로 각 산물 생성 세포를 나타낸다. 이들 스폿을 수동(예컨대 해부 현미경)으로, 또는 자동 판독기를 사용하여 계수하여 마이크로웰 이미지를 포착하고 스폿 수와 크기를 분석할 수 있다.

[0362] 기억 B 세포의 증식을 또한 평가할 수 있다. 적절한 분석법은 본원에 개시되어 있다(상기 참조). 기억 B 세포의 증식 평가와 같은 B 세포 증식의 분석 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 막 염료 희석법(보통 ^{3}H-티미딘 데옥시리보뉴클레오시드, ^{3}H-TdR) 또는 브로모데옥시우리딘(BrdU)을 이용할 수 있다. BrdU 도입 측정을 위해 FACS 분석이 이용가능하다. DNA 함량 및 세포 주기 관련 단백질과 같은 대안의 증식 마커를 또한 사용할 수 있다. 일 실시예에서, Ki67 또는 PCNA 측정을 이용할 수 있다. 샘플링시에 활성 세포 주기에 있는 세포를 검출하기 위해 다른 방법을 이용할 수 있다. 세포를 포함하는 생물학적 샘플 중의 DNA를 표지하기 위해 안정한 동위원소를 이용하는 방법을 사용하여 림프구, 예컨대 기억 B 세포의 증식을 측정할 수도 있다. 사용하기 위한 비제한적인 예시적인 분석 프로토콜이 하기 실시예 부분에 제시된다.

[0363] 일반적으로, 기억 B 세포 증식의 증가 및/또는 기억 B 세포의 항체 분비 세포로의 분화 증가 및/또는 항체 생산 증가는 그 제제가 PD-1 길항제임을 나타낸다. 기억 B 세포의 증가 및/또는 기억 B 세포의 항체 분비 세포로의 분화 증가 및/또는 항체 생산 증가는 특정 PD-1 길항제가 피험체 치료에 유용할 것임을 나타낼 수 있다.

[0364] 본원을 하기의 비제한적인 실시예로 설명한다.

[0365] **실시예 1: 항-PD-L1 항체를 이용한, 만성 감염된 마우스에서의 PD-1 경로의 억제**

[0366] 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV)의 각종 균주들로 감염된 마우스를 사용하여, $CD8^{+}$ T 세포 기능에 대한 만성 바이러스 감염의 영향을 연구하였다. LCMV 암스트롱 균주는 고도의 기능적인 휴지 기억 $CD8^{+}$ T 세포의 장수명 군집을 남기면서 8일 이내에 제거되는 급성 감염을 유발한다. 이와는 대조적으로, LCMV C1-13 균주는 3개월까지 지속되는 바이러스혈증을 그 특징으로 하는 숙주 내 지속성 감염을 확립한다. 바이러스는 일부 조직에 무기한으로 남아서, 항원 특이적 $CD8^{+}$ T 세포가 기능적으로 손상되게 한다. D^{b}NP396-404 $CD8^{+}$ T 세포는 물리적으로 제거되는 반면, D^{b}GP33-41 및 D^{b}GP276-286 $CD8^{+}$ T 세포는 지속되나, 항-바이러스 사이토킨, 예컨대 IFN-γ 및 TNF-α를 증식하거나 분비하는 능력을 소실한다.

[0367] C57BL/6 마우스를 미 국립 암 연구소(미국 매릴랜드주 프레더릭 소재)로부터 구매하였다. 마우스에 2×10^{6} pfu의 LCMV-C1-13을 정맥 내로 감염시켰다. 감염 당일과 감염 다음 날에 PBS 내 500 ㎍의 GK1.5를 주사함으로써 CD4 결핍 유발을 행하였다. 2×10^{5} pfu의 LCMV 암스트롱을 마우스에 복강내 감염시킴으로써, LCMV 면역 마우스를 발생시킨다.

[0368] FACS로 정제된 나이브 D^{b}GP33-41 특이적 P14 형질전환 $CD8^{+}$ T 세포, LCMV 암스트롱 면역 마우스로부터 유래된

$D^bGP33-41$ 특이적 기억 $CD8^+$ T 세포 및 $CD4^+$ 결핍 LCMV C1-13 감염 마우스로부터 유래된 $D^bGP33-41$ 특이적 또는 $D^bGP276-286$ 특이적 $CD8^+$ T 세포에 대하여 유전자 어레이 분석을 수행하였다. RNA 단리 및 유전자 어레이 분석을 문헌 [Kaech et al., (Cell 111:837-51, 2002)]에 기재된 바와 같이 수행하였다. PD-1 mRNA는 기억 $CD8^+$ T 세포에 비해, 소진된 $CD8^+$ T 세포에서 잘 발현되었다(도 1A). 또한, PD-1은 LCMV C1-13 감염 마우스 내의 $CD8^+$ T 세포의 표면에서 발현되었으나, LCMV 암스트롱의 제거 후에 $CD8^+$ T 세포의 표면에는 존재하지 않았다(도 1B). 또한, 만성 감염된 마우스는 비감염 마우스에 비해, PD-1, PD-L1의 리간드 중 하나를 대부분의 림프구 및 APC에서 더 높은 수준으로 발현하였다. 이에 따라, 바이러스 항원 지속성과 $CD8^+$ T 세포의 소진은 PD-1 발현의 유도와 동시에 일어난다.

[0369] PD-1/PD-L1 경로의 차단이 T 세포 기능을 복원하고 만성 LCMV 감염 동안에 바이러스 조절을 증진할 수 있다는 가설을 검증하기 위해서, 만성 LCMV 감염 중에 αPD-L1 차단 항체를 이용하여 PD-1/PD-L1 보조 억제 경로를 붕괴시켰다. LCMV C1-13(200 ㎍의 래트 항-마우스 PD-L1 IgG2b 단일클론 항체(클론 10F.5C5 또는 10F.9G2))로 감염된 마우스에게 PD-L1에 대한 차단성 단일클론 항체를 감염후 23일 내지 37일에 3일 간격으로 복강내 투여하였다. 37일째에, 처리된 마우스에서는 처리되지 않은 대조군에 비하여 대략 2.5 배 더 많은 $D^bNP396-404$ 특이적 $CD8^+$ T 세포 및 3배 더 많은 $D^bGP33-41$ 특이적 $CD8^+$ T 세포들이 존재하였다(도 2A). 비장 내 $CD4^+$ T 세포의 수는 처리된 마우스와 처리되지 않은 마우스 양 경우에 있어 대략 동일하였으므로(~6×10^4개의 $CD4^+$ T 세포의 $IA^bGP61-80$/비장), 증식 유도는 $CD8^+$ T 세포에 대해 특이적이었다.

[0370] $CD8^+$ T 세포 증식이 증대되는 것 이외에, PD-1 신호 전달의 억제도 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포 내에서 항-바이러스 사이토킨의 생산의 증대를 야기하였다. 8가지 서로 다른 CTL 에피토프에 대해, $CD8^+$ T 세포에 의한 IFN-γ와 TNF-α의 생산을 측정하였다. 조합된 반응은 처리되지 않은 마우스에 비해 처리된 마우스에서 2.3배 더 높았다(도 2B 및 2C). 또한, TNF-α 생성 세포의 빈도에 있어서 2배가 증가했음도 처리 후 관찰되었다(도 2D). 또한, 바이러스의 제거는 처리된 마우스의 혈청, 비장 및 간에서 바이러스가 제거됨에 따라 가속화되었다. 바이러스 역가의 감소도 처리된 마우스에서 감염 후 37일까지(처리 시작 후 14일째에) 폐와 신장(~10배)에서 관찰되었다. 그러나, 처리되지 않은 마우스는 이 모든 조직들에서 상당한 수준의 바이러스를 나타냈다(도 2E). 혈청 및 조직 균질액(homogenate) 내의 바이러스 역가를, 문헌 [Ahmed et al.(J. Virol. 51:34-41, 1984)]에 기재된 바와 같이, 베로 세포(Vero cell)를 이용하여 측정하였다. PD-1 길항제가 $CD8^+$ T 세포 증식 및 바이러스 제거를 증대시키는 것을 보여주는 이러한 결과는, PD-1 신호 전달의 억제가 $CD8^+$ T 세포 기능을 복원시킴을 의미한다. 또한, PD-1 신호 전달의 억제는 비장 내 LCMV 특이적 항체 분비 세포의 수도 처리 후에 증가됨(> 10배)에 따라, B 세포 반응도 증진시켰다.

[0371] $CD4^+$ T 세포는 $CD8^+$ T 세포 반응의 발생 및 유지에 있어 핵심적 역할을 한다. 이와 관련하여, $CD4^+$ T 세포의 부재 하에서 초회 항원자극된 $CD8^+$ T 세포(소위 "무력한(helpless)" $CD8^+$ T 세포)는 정상적 면역 반응을 전개할 수 없다. 또한, 만성 LCMV 감염은 $CD4^+$ T 세포의 부재 하에 더욱 심해진다. 따라서, LCMV-C1-13 감염 중 생성된 무력한 T 세포는 $CD4^+$ T 세포의 존재 하에 생성된 T 세포보다 더욱 더 심한 기능적 손상을 나타낸다. $D^bNP396-404$ 특이적 $CD8^+$ T 세포는 검출될 수 없을 정도로 제거되며, $D^bGP33-41$ 및 $D^bGP276-286$ $CD8^+$ T 세포는 IFN-γ와 TNF-α를 분비하는 능력을 완전히 소실한다.

[0372] $CD4^+$ T 세포는 LCMV-C1-13 감염 시에 결핍되어, 마우스를 감염후 46 내지 60일에 항-PD-L1 항체 처리법으로 처리하였다. LCMV-특이적 $CD4^+$ T 세포는 처리 전 또는 처리 후에 세포내 IFN-α 염색에 의해 검출될 수 없었다. 처리 후에, 처리된 마우스는 처리되지 않은 대조군 마우스보다 비장 내에 대략 7배 더 많은 $D^bGP276-286$ $CD8^+$ T 세포 및 4배 더 많은 $D^bGP33-41$ $CD8^+$ T 세포를 보유하였다(도 3A). 비장 내의 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 수도 증가하였다(도 3B). 처리된 마우스에서의 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 이러한 증가는, BrdU 도입에 의해 검출되는 바와 같이, 증식이 증가했음에 연유하였다. 처리되지 않은 마우스에서는 43%의 $D^bGP276-286$ $CD8^+$ T 세

포가 중간 수준의 BrdU을 도입하였고, 2%가 높은 수준의 BrdU을 도입하였던 반면에, 처리된 마우스에서는 D^bGP276-286 $CD8^+$ T 세포의 50%가 중간 수준의 BrdU를 도입하였고, 37%가 높은 수준의 BrdU를 도입하였다. 처리하는 동안에 마시는 물에 1 mg/㎖의 BrdU을 도입하여 BrdU 분석을 수행하였고, 제조업체(BD 바이오사이언시스(BD Biosciences), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)의 프로토콜에 따라 염색을 수행하였다. 또한, 처리된 마우스는 세포 주기-관련 단백질 Ki67을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 보다 높은 백분율로 함유하였다(처리되지 않은 마우스 경우에는 19%인 것에 비해 60%임, 도 3C). PBMC 내 $CD8^+$ T 세포의 처리에 대한 반응은 높은 수준의 $CD8^+$ T 세포 확대를 나타내는 마우스에 국한되었다.

[0373] 또한, PD-1 억제는 무력하여 소진되어버린 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포에서 항-바이러스 사이토킨 생산도 증가시켰다. 처리 후, IFN-γ를 생산하는 D^bGP33-41 및 D^bGP276-286 $CD8^+$ T 세포의 수가 현저히 증가하였으나(도 4A), 보다 많은 수의 D^bNP396-404, K^bNP205-212, D^bNP166-175 및 D^bGP92-101 특이적 $CD8^+$ T 세포도 처리된 마우스에서 검출되었다(도 4A). 처리된 마우스의 D^bGP276-286 특이적 $CD8^+$ T 세포의 50%가 IFN-γ를 생산할 수 있는 데 비해, 대조군의 처리되지 않은 마우스는 D^bGP276-286 특이적 $CD8^+$ T 세포의 20%가 IFN-γ를 생산할 수 있다(도 4B). 그러나, 처리된 마우스에서 D^bGP276-286 특이적 $CD8^+$ T 세포에 의해 생산되는 IFN-γ 및 TNF-α의 수준은 온전하게 작용하는 D^bGP276-286 특이적 기억 세포보다 낮았다(도 4C).

[0374] 또한, PD-1 억제는 무력하여 소진되어버린 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 세포용해 활성을 증가시켰다. 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 생체외 세포용해 활성을 처리 후에 ^{51}Cr 유리 시험법을 이용하여 검출하였다(문헌[Wherry et al., 2003. J. Virol. 77:4911-27]). 바이러스 역가는, 처리되지 않은 마우스에 비해, 처리 2주 후에 비장에서는 약 3배, 간에서는 약 4배, 폐에서는 약 2배, 그리고 혈청에서는 약 2배만큼 감소하였다(도 4E).

[0375] 따라서, 이러한 결과들은 PD-1 경로를 차단하는 것이 만성 바이러스 감염에 대한 CTL 말초 내성을 파괴한다는 것과, $CD4^+$ T 세포가 결핍된 소진된 $CD8^+$ T 세포가 비가역적으로 불활성화되지 않는다는 것을 입증한다.

[0376] **실시예 2: 항-바이러스 백신 및 PD-1 길항제의 투여**

[0377] 지속성 감염 중 T 세포 반응을 증강시키는 한 방법으로 치료적 백신 접종이 있다. 이 접근 방법을 사용하는 이론적 근거는, 내인성 항원이 만성 바이러스 감염 동안에 최적 또는 면역원성 방식으로 제공되지 않을 수 있다는 것과, 백신 형태의 항원을 제공하는 것이 바이러스-특이적 T 및 B 세포에 보다 효과적인 자극원을 제공할 수 있다는 점이다. 만성 LCMV 모델을 이용하여, 마우스에 치료 백신(VVGP33)으로서 LCMV GP33 에피토프를 발현하는 재조합 우두 바이러스를 투여하였더니, 일부 만성 감염된 마우스에서 $CD8^+$ T 세포 반응에 있어서 적절한 향상을 유도하였다. 치료 백신을 처방받은 9마리의 만성 감염된 마우스 중 4마리가 양성 반응을 나타내었던 반면에, 대조군 마우스에서는 그 어느 것도 GP33에 대한 면역 반응에 있어서 유의적인 증가율을 나타내지 않았다. 이 치료 백신 접종을 PD-L1 억제제와 조합한 경우, LCMV 특이적 T 세포 반응은 어느 하나로 단독 처리한 것에 비해 더 큰 수준으로 증강되었으며, 조합 처리의 효과는 부가적인 것 그 이상이었다.

[0378] **실시예 3: PD-1 RNAi를 이용한, 만성 감염된 마우스 내에서의 PD-1 경로의 억제**

[0379] RNA 간섭(RNAi)은 포유동물 세포에서 유전자 발현을 사일런싱할 수 있다. 긴 이중 가닥의 RNA(dsRNA)가 세포 내로 도입되고, 그 후 특이적 mRNA 분자 또는 소그룹의 mRNA를 표적으로 하는 보다 작은 사일런싱 RNA(siRNA)로 가공된다. 이 기술은 항체가 기능적이지 않은 상황에 특히 유용하다. 예를 들어, RNAi는 독특한 스플라이스 변이체가 가용성 형태의 PD-1 및 CTLA-4를 생산하는 때에도 이용될 수 있다.

[0380] PD-1 사일런서 RNA는 시판되는 siRNA 발현 벡터, 예컨대 pSilencer™ 발현 벡터 또는 아데노바이러스 벡터(앰비온(Ambion), 미국 텍사스주 오스틴 소재)에 삽입된다. 이어서, 이들 벡터를 체내 또는 생체외에서 소진된 표적 T 세포와 접촉시킨다(하기 실시예 4 참고).

[0381] **실시예 4: 소진된 T 세포의 생체외 재생**

[0382] 소진된 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포를, 자기 비드 또는 밀도 원심분리를 이용하여 LCMV-Cl-13 만성 감염된 마

우스로부터 단리한다. 형질 감염된 $CD8^+$ T 세포를 PD-L1, PD-L2 또는 PD-1을 표적으로 하는 단일클론 항체와 접촉시킨다. 실시예 1에 기재된 바와 같이, PD-1 경로의 억제는 $CD8^+$ T 세포의 재생을 유도한다. 따라서, 예를 들어 $CD8^+$ T 세포 증식 및 사이토킨 생산에 있어서 증가되는 것이 관찰된다. 이러한 재생된 $CD8^+$ T 세포를 감염된 마우스에 재도입하고, 바이러스 양을 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정한다.

[0383] **실시예 5: 신규한 $CD8^+$ T 세포 재생제 화합물의 시험관 내 스크리닝**

[0384] PD-1 경로를 조절하는 화합물은, 만성 바이러스 감염으로부터 비롯되는 $CD8^+$ T 세포의 소진을 역전시키는 그 능력에 기초한 체내 및 생체외 스크리닝 분석법으로 확인될 수 있다.

[0385] 소진된 $CD8^+$ T 세포는 LCMV-Cl-13으로 만성 감염된 마우스로부터 유래하며, 이어서 시험 화합물과 접촉된다. 접촉된 T 세포로부터 방출된 항-바이러스 사이토킨(예를 들어, IFN-γ 또는 TNF-α)의 양을, 예를 들어, ELISA 또는 기타 정량 방법에 의해 측정하고, 시험 화합물과 접촉하지 않은 소진된 T 세포로부터 방출된 항-바이러스 사이토킨이 있다면 그것의 양과 비교한다. 처리되지 않은 세포에 비해서, 처리된 세포에 의해 방출된 항-바이러스 사이토킨의 양의 증가는 화합물이 T 세포 활성을 조절하는데 유용한 PD-1 길항제인 것으로 확인시켜준다.

[0386] **실시예 6: 신규 $CD8^+$ T 세포 재생제 화합물의 생체 내 스크리닝**

[0387] 소진된 $CD8^+$ T 세포는 LCMV-Cl-13으로 만성 감염된 마우스로부터 유래된다. 시험 화합물을 감염된 마우스에 정맥 내 투여한다. 처리된 마우스 및 처리되지 않은 마우스의 혈청 내로 유리된 항-바이러스 사이토킨(예를 들어, IFN-γ 또는 TNF-α)의 양을, 예를 들어, ELISA 또는 기타 정량 방법에 의해 측정하여 서로 비교한다. 처리되지 않은 마우스 내 혈청에서 발견되는 항-바이러스 사이토킨의 양과 대비하여, 처리된 마우스 내 혈청에서 발견되는 항-바이러스 사이토킨의 양의 증가는, 시험 화합물이 PD-1 길항제인 것으로 확인시켜 준다. 대안으로, 바이러스 역가(예를 들어, 혈청 바이러스 역가)를 시험 화합물의 처리 전과 처리 직후에 측정할 수 있다.

[0388] **실시예 7: 지속성 HCV 감염의 면역요법에 대한 모델로서의 침팬지**

[0389] 침팬지를 인간에 있어서 HCV 지속성의 모델로 제공한다. 장수명의 바이러스 지속성을 초래하는 T 세포 면역원성에 있어서의 결함에는 HCV-특이적 $CD4^+$ T 헬퍼 세포의 결함과, 손상 또는 변경된 CD8+ T 효과기 세포 활성 양자가 다 포함된다. 지속적으로 감염된 침팬지를 CTLA-4, PD-1 또는 양자의 조합에 대한 항체로 처리한다. 구조적 및 비구조적 재조합 HCV 단백질을 이용한 백신 접종과 조합된 억제 경로 차단의 효능과, 그러한 전략이 바이러스-특이적 기억 T 세포의 빈도 및 수명을 증진시킬 수 있는지의 여부를 측정한다. T 세포 면역원성의 결함은 지속적으로 감염된 인간 및 침팬지에서만 HCV-특이적이다. 감염된 침팬지의 혈액과 간을 CTLA-4, PD-1, BTLA 및 이들의 리간드의 발현과, Treg 세포의 존재에 대해 조사한다. 이어서, 항바이러스 활성은, 이러한 분자들을 통해 신호 전달을 차단하는 인간화 단일클론 항체를 침팬지에게 전달함으로써 복원될 수 있다.

[0390] 지속적으로 감염된 침팬지를 인간화 αCTLA-4 항체(MDX-010, 메다렉스(Medarex)) 또는 αPD-1 항체로 처리한다. MDX-010의 초기 용량은 0.3 mg/kg이고, 2주 후 1.0 mg/kg이며, 이어서 3주 간격으로 3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg이다. 항체를 이용하여 보조 억제 분자를 처리한 후, 체액성 및 세포성 면역 반응뿐만 아니라 HCV RNA 용량이 결정될 것이다. 샘플을 1주, 2주, 3주, 5주 및 8주에 수집한 후, 월 간격으로 수집한다. 샘플은 1) 트랜스아미나제, 자기항체, HCV에 대한 중화 항체 및 사이토킨 반응의 분석을 위한 혈청, 2) 바이러스 양 및 유전체 발달을 위한 혈장, 3) 면역원성, 보조자극/억제성 수용체 발현 및 기능의 시험관 내 측정을 위한 PBMC, 4) 간내 림프구 및 RNA의 단리를 위한 신선한(비고정) 간 및 5) 조직학 및 면역조직화학 분석을 위한 고정화된 (포르말린/파라핀 매립된) 간을 포함한다. 또한, 국소 림프절을 2회 또는 3회 시점에 수집하여, 면역조직화학 및 분자적 기법에 의해 보조 억제 분자와 스플라이스 변이체의 발현을 평가한다.

[0391] HCV 항원을 이용한 백신 접종이 PD-1에 대한 항체의 치료적 효과를 증강시키는지의 여부를 결정하기 위해, 침팬지를 하기와 같이 처리한다: 1) 0주, 4주 및 24주에서 재조합 엔벨로프 당단백질 E1 및 E2(MF59 아주반트 내) 및 기타 단백질(코어 + ISCOMS와 함께 제형화된 NS 3, 4 및 5)을 이용한 근육내 면역화; 2) 1)에 사용된 백신과 함께, αCTLA-4 항체(백신의 경우, 각각 30 mg/Kg(체중), 0주, 4주 및 24주에 정맥 내 투여)를 동시 투여하는 근육내 면역화; 3) αPD-1(또는 BTLA) 항체로 CTLA-4 항체를 대체한 것을 제외하고는 2)와 동일한 처리; 4) 백신 이외에, CTLA-4와 PD-1 (또는 BTLA) 항체를 조합하여 사용한 것을 제외하고는 2그룹 및 3그룹과 동일한

처리. HCV-특이적 T 및 B 세포 반응을 1년간의 기간 동안 면역화한 후에 월 단위 간격으로 모니터링한다.

[0392] 이 분석에서의 HCV-사량체$^{+}$ 및 T 세포 전부에 대해 조사된 마커에는 차별화 마커(예를 들어 CD45RA/RO, CD62L, CCR7 및 CD27), 활성화 마커(예를 들어 CD25, CD69, CD38 및 HLA-DR), 생존/증식 마커(예를 들어 bcl-2 및 Ki67), 잠재적 세포독성 마커(예를 들어 그랜자임 및 퍼포린) 및 사이토킨 수용체 마커(CD122 및 CD127)가 포함된다. 케모카인 IP-10의 예비처리 수준과 PEG IFN-γ/리바비린에 대한 반응 간에는 흥미로운 상관관계가 있다. IP-10 수준을 측정하여, 음성 조절 경로 또는 HCV-특이적 T 세포 반응과 IP-10 수준 간의 잠재적 상관관계를 조사한다. PBMC에서 억제성 수용체 및 리간드의 발현을 유세포 분석에 의해 수행한다.

[0393] **실시예 8: 반응성 림프계 조직에서의 PD-1 면역염색**

[0394] 케이스 재료를 브리엄 앤드 워먼즈 호스피털(Brigham & Women's Hospital)(미국 메사추세츠주 보스톤 소재)로부터 제도적 정책에 따라 입수하였다. 모든 진단은 세계 보건 기구 림프종 분류계(Jaffe ES et al., 2001)에 기재된 조직학적 및 면역표현형 특성에 기초하였고, 모든 경우들에서 진단 물질을 혈액병리학자에 의해 검토하였다.

[0395] 전술된 항-인간 PD-1 단일클론 항체(2H7; 5)를 이용하여 10 mM 시트르산염 완충액(pH 6.0)에서 마이크로파 항원 회복을 행한 후, 포르말린으로 고정된 파라핀 매립 조직 섹션에 대해서, 문헌 ([Jones D et al., 1999]; [Dorfman DM 등, 2003])에 전술된 바와 같은 표준 아비딘-비오틴 호스래디쉬 퍼옥시다제 간접방법 및 디아미노벤지딘 발색법을 이용하여, PD-1에 대한 면역염색을 수행하였다. 신생물성 세포의 25% 이상이 양성 염색을 나타낸 경우, 그 경우를 PD-1에 대해 면역 반응성이 있는 것으로 간주하였다. 연구한 모든 경우들에 대하여 동일한 단백질 농도로 희석된 마우스 IgG 이소타입 대조군 항체의 PD-1 염색을 비교하여, 염색 특이성을 확인하였다.

[0396] 반응성 림프계 조직, 흉선 및 B 세포와 T 세포 림프증식성 장애의 일정한 경우들에서 포르말린-고정된, 파라핀-매립된 시편을 염색하는데 PD-1에 대한 단일클론 항체 2H7을 사용하였다. 여포성 과증식을 포함하는 반응성 변화를 나타내는 편도선의 시편에서, 배중심에서 두드러지게 작은 림프구의 하위군이 PD-1에 대한 세포질 염색을 나타냈고, 여포간 T 세포 구역 내에 흔하지 않은 PD-1 양성 세포가 나타났다. 배중심에서의 PD-1 염색 패턴은 범(pan)-T 세포 마커인 CD3에 대한 항체에서 보여지는 패턴과 사실상 동일하였던 반면에, 범-B 세포 마커인 CD20에 대한 항체는 거의 대부분의 배중심 B 세포를 염색시켰다. 반응성 림프절 및 비장의 조직학적 조각에서도 유사한 결과가 나타났다. 성인의 흉선에서는 PD-1 염색이 관찰되지 않았다.

[0397] **실시예 9: B 세포 및 T 세포 림프증식성 장애의 파라핀 매립된 조직 조각에서의 PD-1 면역염색**

[0398] PD-1 발현에 대해 일정한 범위의 B 세포 및 T 세포 림프증식성 장애들을 연구하였고; 그 결과를 표 4에 개괄하였다. 6가지 경우의 여포성 림프종 및 7가지 경우의 버킷(Burkitt) 림프종을 비롯하여 여포성 기원의 수많은 B 세포 비호지킨 림프종을 비롯하여, 성숙한 B 세포의 일정한 범위의 림프증식성 장애뿐만 아니라, B 전구체 림프모구성 백혈병/림프모구성 림프종의 대표적 경우를 비롯한 42가지 경우의 B 세포 림프증식성 장애에 있어서의 PD-1 발현에 대해 시험하였다. B 세포 림프증식성 장애들은 그 어느 것도 PD-1에 대한 염색 패턴을 나타내지 않았다. 일부 경우들에서, 비신생물성인 반응성 림프계 조직이 존재하였고, 편도선 및 상기 언급된 기타 반응성 림프계 조직에서 보여지는 바와 같은 PD-1 염색 패턴을 나타냈다.

[0399] 유사하게, 종래의 호지킨 림프종 11가지 경우 및 림프구 우세형 호지킨 림프종 14가지 경우를 포함한 호지킨 림프종 25가지의 경우에서, 신생물성 세포는 PD-1에 대한 염색 패턴을 나타내지 않았다. 흥미롭게도, 림프구 우세형 호지킨 림프종의 14가지 경우 모두에 있어서, 신생물성 CD20-양성 L&H 세포 주위의 T 세포는 림프구 우세형 호지킨 림프종 내 CD57+ T 세포에 대해 나타난 염색 패턴과 유사하게 PD-1에 대해 면역반응성이었다. 이러한 PD-1-양성 세포는 존재하는 $CD3^{+}$ T 세포 집단 전부의 하위군이었다.

[0400] 일정 범위의 T 세포 림프증식성 장애를 PD-1의 발현에 대해 연구하였고; 그 결과를 표 1에 개괄하였다. T 전구세포 림프모구성 백혈병/림프모구성 림프종, 미성숙 T 세포의 신생물의 경우는, T 세포 전림프구성 백혈병, 말초 T 세포 림프종, 비특정화 퇴행성 대세포 림프종 및 성인 T 세포 백혈병/림프종의 경우들을 포함하는 말초 후흉선 T 세포의 신생물에서와 같이 PD-1에 대해 음성이었다. 이와는 대조적으로, 혈관면역아세포성 림프종의 19가지의 경우 모두는 범-T 세포 마커, 예컨대 CD3에 대해서도 면역반응성인 PD-1-양성 세포의 병소를 포함하였다. PD-1-양성 세포는 혈관면역아세포성 림프종의 한 독특한 특성인 확장된 $CD21^{+}$ 여포성 수지상 세포(FDC) 망상조직의 병소에서 일관되게 발견되었다.

표 4

[0401]

림프증식성 장애에서의 PD-1 면역염색	
	PD-1 면역염색
B 세포 LPD	0/42*
B-LL/LL	0/3
CLL	0/4
MCL	0/4
FL	0/6
MZL	0/3
HCL	0/3
DLBCL	0/6
BL	0/7
LPL	0/3
MM	0/3
호지킨 림프종	0/25
종래의 호지킨 림프종	0/11
결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종	0/14**
T 세포 LPD	18/55
T-LL/LL	0/5
T-PLL	0/3
AIL	19/19
PTCL, 비특정됨	0/14
ATCL	0/12
ATLL	0/3

[0402] 약어: B-LL/LL - B 전구세포 림프모구성 림프종/림프모구성 백혈병; CLL - 만성 림프구성 백혈병; MCL - 외투세포 림프종; FL - 여포성 림프종; MZL - 변연부 림프종; HCL - 유모(hairy) 세포 백혈병; DLBCL - 미만성 대세포의 B 세포 림프종; BL - 버킷 림프종; LPL - 림포형질세포성 림프종; MM - 다발성 골수종; T-LL/L - T 전구림프모구성 백혈병/림프모구성 림프종; T-PLL - T 세포 전림프구 백혈병; AIL - 혈관면역아세포성 림프종; PTCL - 비특정화된 말초 T 세포 림프종; ALCL - 퇴행성 대세포 림프종; ATLL - 성인 T 세포 백혈병/림프종.

[0403] * 면역 반응성 경우의 수/경우들의 총수

[0404] ** PD-1-양성 세포는 14가지 경우 모두에서 신생물성 L&H 세포 주위에 국좌(rosette)를 형성함.

[0405] **실시예 10: HIV-특이적 인간 $CD8^+$ T 세포에서의 PD-1 발현 연구를 위한 일반적인 방법**

[0406] 실시예 11 내지 14에 상술되는 실험을 수행하기 위해 하기의 방법들을 이용하였다.

[0407] *실험 피험체*: 만성 클레이드 C HIV-1 감염을 앓는 연구 참여자를 맥코드 병원(McCord Hospital)(남아프리카 더번 소재)과 세인트 매리 병원(St. Mary's Hospital)(남아프리카 마리안힐 소재)에 있는 외래 환자 클리닉에서 모집하였다. 말초혈을 이 코호트에서의 65명 피험체로부터 입수하였고, 이들 모두는 분석 시에 항레트로바이러스 요법에 나이브한 자들이었다. 10개의 구축된 I류 사량체에 부합하는 자체 발현된 HLA 대립유전자에 기초하여 포함시킬 피험체들을 선별하였다(하기 참조). 코호트의 바이러스 양의 중간값은 42,800 HIV-1 RNA 복제수/혈장 ㎖ (범위: 163 내지 750,000)였고, 절대 CD4 계수의 중간값은 362(범위: 129 내지 1179)이었다. 감염 기간에 관한 정보는 입수가능하지 않았다. 모든 피험체들은 연구 동의서를 제출하였고, 이는 지방 임상시험심사위원회에 의해 승인되었다.

[0408] *PD-1 및 PD-L1 항체의 구축*: 인간 PD-L1에 대한 단일클론 항체(29E.2A3, 마우스 IgG2b) 및 PD-1에 대한 단일클론 항체(EH12, 마우스 IgG1)를 전술된 바와 같이 제조하였고, 이는 PD-1:PD-L1 상호작용을 차단하는 것으로 나타났다.

[0409] *MHC I류 사량체*: 전술된 바와 같이(문헌 [Altman JD et al., 1996]) 합성된 10개의 HIV MHC I류 사량체를 본 연구를 위해 사용하였다: A*0205 GL9(p24, GAFDLSFFL; 서열 번호 1), A*3002 KIY9(인테그라아제, KIQNFRVYY; 서열 번호 2), B*0801 DI8(p24, DIYKRWII; 서열 번호 3), B*0801 FL8(Nef, FLKEKGGL; 서열 번호 4), B*4201 RM9(Nef, RPQVPLRPM; 서열 번호 5), B*4201 TL9(p24, TPQDLNTML; 서열 번호 6), B*4201 TL10(Nef, TPGPGVRYPL; 서열 번호 7), B*4201 YL9(RT, YPGIKVKQL; 서열 번호 8), B*8101 TL9(p24, TPQDLNTML; 서열 번호 9) 및 Cw0304 YL9(p24, YVDRFFKTL; 서열 번호 10).

[0410] *HLA I류 사량체 염색 및 표현형 분석*: 새로 단리된 말초혈 단핵 세포(PBMC, 50만개)를 사량체로 20분 동안 37℃에서 염색하였다. 이어서, 세포를 인산염 완충 식염수(PBS)로 1회 세정하였고, 펠렛화하였으며, 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC)-접합 항-CD8(벡톤 딕킨슨(Becton Dickinson)), 파이코에리트린-접합 항-PD-1(클론 EH12) 및 바이어프로브(ViaProbe)(벡톤 딕킨슨)로 직접 염색하였다. 세포를 실온에서 20분 동안 배양하고, PBS로 1회 세정하고, 1% 파라포름알데히드가 있는 200 ㎕의 PBS에 재현탁시켜, 형광-활성화된 세포 분류기(FACSCalibur™, 벡톤 딕킨슨)에서 수득하였다. 최소 100,000 발생건이 FACSCalibur™ 상에서 수득되었다.

[0411] *CFSE 증식 검정*: 백만개의 새로 단리된 PBMC를 PBS로 2회 세정하고, 펠렛화하며, 1 ㎖의 0.5 μM 카르복시-플루오레신 디아세테이트, 숙신이미딜 에스테르(CFSE, 몰레큘러 프로브즈(Molecular Probes))에 37℃에서 7분 동안 재현탁시켰다. 세포를 PBS로 2회 세정하고, 1 ㎖의 R10 배지(글루티아티온, 페니실린, 스트렙토마이신 및 10% 우태아 혈청[FCS]로 보충된 RPMI 1640)에 재현탁시키며, 24-웰 플레이트의 한 웰에 도말하였다. 초기 연구에 의해, 최종 농도가 0.2 ㎍/㎖인 펩티드가 최적의 증식성 반응을 이끌어 내고, 이에 따라 이것이 각 분석에 잘 사용되는 최종 펩티드 농도임이 밝혀졌다. 음성 대조군 웰은 배지 내의 단독 PBMC, 또는 정제된 항-PD-L1(10 ㎍/㎖)를 갖는 배지 내의 PBMC로 구성되었고, 양성 대조군 웰은 10 ㎍/㎖의 파이토헤마글루티닌(PHA)으로 자극되었다. 37℃ 인큐베이터에서 6일간 배양한 후, 세포를 2 ㎖의 PBS로 세정하고, PE-접합 MHC I류 사량체, 바이어프로브(벡톤 딕킨슨) 및 항-CD8-APC 항체로 염색하였다. 세포를 FACSCalibur 상에서 수득하여, 셀퀘스트(CellQuest)® 소프트웨어(벡터 딕킨슨)에 의해 분석하였다. 세포를 바이어프로브-$CD8^+$ 림프구에 게이팅하였다. $사량체^+$ 세포의 증가 배수를, 펩티드의 존재 하에서의 $CD8^+$ $사량체^+$ 세포의 백분율을 펩티드 자극의 부재 하에서의 $CD8^+$ $사량체^+$ 세포의 백분율로 나눔으로써 산출하였다.

[0412] *통계학적 분석*: 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 버전 4.0a를 이용하여, 스피어만(Spearman) 상관관계, 만-위트니(Mann-Whitney) 시험 및 대응표본 t-시험 분석을 수행하였다. 모든 시험들은 양측 검정(2-tail)이었고, $p<0.05$의 p 값은 유의적인 것으로 간주되었다.

[0413] **실시예 11: HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포에서의 PD-1 발현**

[0414] 우성적 HIV-1 클레이드 C 바이러스 $CD8^+$ T 세포 에피토프에 대해 특이적인 10개의 MHC I류 사량체의 패널을, 이들 세포에서의 표면 PD-1 발현의 직접적인 시각화를 허용하는 우세형 HLA 대립유전자와 Gag, Nef, 인테그라아제 및 RT에서의 빈번하게 표적화되는 에피토프에 기초하여 합성하였다. 고해상도 HLA 감식을 전 코호트에서 수행하였고, 65명의 항레트로바이러스 요법에 대해 나이브인 자들의 하위군을 관련 HLA 대립유전자의 발현에 기초하여 연구를 위해 선별하였다. 총 120개의 개별 에피토프를 조사하였고, HIV $사량체^+$ 세포에서의 PD-1의 대표적 생체외 염색이 도 5A에 나타나 있다. PD-1 발현은 이 $사량체^+$ 세포에서 즉시 나타났으며, 동일 개체의 $CD8^+$ T 세포 집단에서보다 유의적으로 더 높게 나타났으며($p<0.0001$); 결과적으로 $사량체^+$ $CD8^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포 총 집단 양자 모두에서의 PD-1 발현은 HIV-혈청음성 대조군에서보다 유의적으로 더 높게 나타났다(도 5B). 시험한 10개 사량체 중 8개에 있어, 항원-특이적 $CD8^+$ 세포에서의 발현 수준이 100%인 사람은 한 명 이상으로 확인되었다(도 5C). 3명 내지 25명 개체의 PBMC를 각 HIV 사량체 반응에 대해 염색하였고, PD-1 발현 수준의 중간값은 $사량체^+$ 세포의 68% 내지 94% 범위 내였다(도 5C). 이러한 결과는 $사량체^+$ 세포와 $CD8^+$ T 세포 총 집단 모두에서 PD-1의 평균 형광 강도(MFI)의 분석에 의해 추가로 확인되었다(도 5B 및 5C).

[0415] 다음으로, 다수 검출가능한 반응들을 갖는 자들의 PD-1 발현 수준의 측면에 있어 에피토프-특이적 차이에 대한 증거들이 있는지의 여부를 결정하였다. 조사한 65명의 사람들 중, 16명 개체는 각기 3번 내지 5번의 사량체 양성 반응을 나타냈다. PD-1 발현이 거의 동일하여, 16명 피험체 중 3명에 대해 분석된 각 반응에 있어 100%에 도달하였으나; 다른 13명 개체는 에피토프에 따라 상이한 패턴의 PD-1 발현을 나타냈다(도 5D). 이러한 데이터는

PD-1 발현이 한 사람으로부터의 동시적인 에피토프-특이적 CD8 T 세포에서 차별적으로 발현될 수 있고, 이는 항바이러스 효능의 에피토프-특이적 차이를 보여주는 최근 데이터와 일치하는 것이다(문헌 [Tsomides TJ et al., 1994]; [Yang O et al., 1996]; [Loffredo JT et al., 2005]).

[0416] **실시예 12: PD-1 발현과 HIV 질환 진행 간의 관계**

[0417] HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포에서의 PD-1 발현과, 혈장 바이러스 양 및 $CD4^+$ 세포 계수(양자 모두 HIV 질환 진전의 예보자임) 간의 관계를 결정하였다. 이전 연구들과 일관되게, 사량체 양성 세포의 수와 바이러스 양 또는 $CD4^+$ 세포 계수 간의 관계는 어떠한 유의적인 상관관계도 나타내지 못했다(도 6A 및 6B). 이와는 대조적으로, 바이러스 양과 HIV 사량체 양성 세포에서의 PD-1 발현의 백분율 및 MFI 양자 모두 간에 유의적인 양의 상관관계가 있었다(각각 $p=0.0013$ 및 $p<0.0001$; 도 6A). 또한, $CD4^+$ 계수와 HIV 사량체 양성 세포에서의 PD-1의 백분율 및 MFI 양자 모두 간에 역의 상관관계가 있었다(각각 $p=0.0046$ 및 $p=0.0150$; 도 6B). 시험한 사량체가 이들 피험체 중 HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포 집단의 단지 한 분획만을 대표하기 때문에, 모든 $CD8^+$ 세포에서의 PD-1 발현과 이 매개변수들 간의 관계도 조사하였다. 바이러스 양과 $CD8^+$ T 세포 총 집단에서의 PD-1 발현의 백분율 및 MFI 양자 모두 간에 유의적인 양의 상관관계가 있었고(각각 $p=0.0021$ 및 $p<0.0001$; 도 6C), $CD4^+$ 세포 계수와 $CD8^+$ T 세포 총 집단에서의 PD-1 발현의 백분율 및 MFI 양자 모두 간에 역의 상관관계도 관찰되었다(각각 $p=0.0049$ 및 $p=0.0006$; 도 6D). 이 동일한 군에서, CMV-특이적 $CD8^+$ T 세포에서의 PD-1 발현을 5 개체의 실험 피험체에서 시험하였고, HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포에 비해 유의적으로 더 적은 PD-1가 이들 세포에서 발현되었으며(중간값 23% CMV 사량체$^+$ PD-1^+, $p=0.0036$, 데이터가 나와 있지 않음), 이 동일 개체에게 있어 벌크 $CD8^+$ T 세포와 상이하지 않은 바, 이는 높은 PD-1 발현이 모든 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포에 있어서 동일한 특징이 아님을 가리킨다. 이러한 데이터는 만성 HIV 감염에 있어 항원의 양이 증가함에 따라, $CD8^+$ T 세포에서의 PD-1의 발현이 증가하고, 이는 만성 LCMV 감염에 있어 쥐과의 데이터와 일치하며, 여기에서 PD-1 발현은 $CD8^+$ T 세포의 기능적 소진과 관련된다는 점을 시사한다(문헌 [Barber DL et al., 2005]). 또한, 이들은 다수의 에피토프의 분석을 포함한 포괄적인 연구에 있어, HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포와, 바이러스 양 또는 $CD4^+$ 계수 간의 우선적으로 명백한 관련성을 제공한다.

[0418] **실시예 13: PD-1 발현과 $CD8^+$ T 세포 기억 상태(status) 및 기능 간의 관계**

[0419] 다음으로, CD27, CD28, CD45RA, CD57, CD62L, CD127, CCR7, 퍼포린, 그랜자임 B 및 Ki67을 포함하는 $CD8^+$ T 세포 기억 상태 및 기능과 관련된 수많은 추가적인 표현형 마커들 관련 영역에서 PD-1 발현을 분석하였다(도 7). 한 개체로부터의 B*4201 TL9 사량체$^+$ 세포에서의 이들 마커들의 대표적인 염색이 도 7A에 나와 있고, 13 개체의 실험 피험체에 대한 집산 데이터가 도 7B에 나와 있다. 이러한 연구들은, 4가지 이상의 색의 다중매개변수 유세포 분석이 [KwaZulu Natal]에서는 이용가능하지 않기 때문에, 95% 이상의 PD-1 양성인 사량체 반응에 국한되었다. HIV 사량체$^+$ PD-1^+ 세포는 높은 수준의 CD27 및 그랜자임 B, 매우 낮은 수준의 CD28, CCR7 및 세포내 Ki67, 낮은 수준의 CD45RA 및 퍼포린, 그리고 중간 수준의 CD57 및 CD62L을 발현하였다(도 7B). 이들 데이터는 HIV-특이적 PD-1^+ T 세포가 효과기/효과기 기억 표현형을 나타내고, HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포가 비정상적으로 성숙된다는 이전의 보고와 일치되었다. 또한, 바이러스 시퀀싱을 수행하여, 이 세포가 면역 도피를 추진하는지의 여부를 결정하였다. 평가된 이들 사량체-양성 반응들 중 45개의 반응에서, 단지 5개 반응에서의 바이러스 에피토프만이 남아프리카 클레이드 C 공통 염기배열 서열(consensus sequence)과 상이하였는데, 이는 이들 세포들이 생체 내 선택에 있어서 적은 강제력을 발휘함을 의미한다.

[0420] LCMV 모델을 이용한 마우스에서의 이전의 실험들은, 항-PD-L1 차단 항체 주입에 의한 PD-1/PD-L1 상호작용의 생체 내 차단이 사이토킨 생산, 사멸 성능, 증식 성능, 및 가장 두드러지게는 바이러스 양의 감소에 대한 측정시, LCMV-특이적 $CD8^+$ T 세포의 기능 증진을 유도시켰음을 보여주었다. 15 개체의 HIV+ 시실험 피험체로부터 새로 단리된 PBMC를 1 ㎍/㎖의 정제된 항-PD-L1 항체의 존재 또는 부재 하에 단기간(12시간)의 시험관 내 항원-특이적 자극을 주었지만 IFN-γ, TNF-α 또는 IL-2 생산을 증대시키는 데에는 실패하였다.

[0421] **실시예 14: HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포의 증식에 대한 PD-1/PD-L1 경로 차단의 효과**

[0422] HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포가 손상된 증식 성능도 나타내기 때문에(2004), PD-1/PD-L1의 차단이 시험관 내에서 이러한 기능을 증진시킬 수 있는지의 여부를 결정되었다. B*4201-양성 개체의 대표적인 데이터가 도 8A에 나와 있다. 새로 단리된 CFSE-표지된 PBMC를 배지 단독, 또는 항-PD-L1 항체가 있는 배지로 배양함으로써, 배양물에서 6일 후 $CFSE^{hi}$로 유지된 B*4201-TL9-특이적 $CD8^+$ T 세포의 집단($CD8^+$ T 세포의 1.2%)을 유지하였다. CFSE-표지된 PBMC를 6일간 TL9 펩티드 단독으로 자극함으로써, $CFSE^{lo}$ B*4201 TL9 사량체$^+$ 세포가 4.8배 확장되었던 반면에, 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에 CFSE-표지된 PBMC를 TL9 펩티드로 자극함으로써, TL9-특이적 세포의 증식을 더욱 증진시켰으며, 이에 따라 사량체$^+$ 세포가 10.3배 증가하게 되었다. 정제된 항-인간 PD-L1 차단 항체의 존재 및 부재 하에 28개의 샘플에 대해 CFSE 증식 분석을 수행하였다. 펩티드 단독으로 자극한 후의 증식량과 대비하여, HIV-특이적 $CD8^+$ T 세포의 증식에 있어서의 현저한 증가가 펩티드 + 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에 관찰되었다(도 8B; $p=0.0006$, 대응표본 t-시험). 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에서의 사량체$^+$ 세포의 증가 배수는 개체 및 그 주어진 개체 내의 에피토프에 따라 변화하였고(도 8C), 이 역시도 이러한 반응들의 기능적 소진 정도에 있어서 에피토프-특이적 차이를 시사한다.

[0423] **실시예 15: PD-1 억제 경로 차단과 조합된 치료 백신 접종은 만성 바이러스 감염의 면역 조절을 상승적으로 개선한다: 조합적 치료 백신의 발상 연구**

[0424] 사이토킨 증식, 세포 용해 및 항원-특이적 T 세포의 증식을 포함하는 T 세포의 기능적 손상은 다양한 만성 감염의 특징을 규정하고 있다. 비활성화된 T 세포 면역 반응은 인간에 있어서 HIV, HBV, HCV 및 TB를 비롯한 다양한 서로 다른 지속성 병원체에 감염되었을 동안에 관찰된다. 만성 감염 중의 T 세포 비활성화는 항원 용량의 정도와 지속성과 상관관계가 있을 수 있으며, 인접한 T 세포 수용체의 신호 방해, 억제성 단백질의 상향조절 또는 보조억제 단백질의 하향조절 및 보조 신호와 사이토킨 신호에 있어서 흠결에 연유할 수 있다. 소진된 T 세포의 흠결은 숙주가 지속성 병원체를 제거하지 못하는 무능에 대한 일차적인 이유이다. 만성 감염 중, 소진된 바이러스 특이적 $CD8^+$ T 세포는 PD-1 및 CTLA-4라는 2개의 중요한 억제성 단백질을 상향조절한다. PD-1의 생체 내 차단은 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 수와 기능을 증진시키고 바이러스 양의 감소를 유도한다.

[0425] 만성 바이러스 감염에 대한 현재의 백신 접종 전략에는 몇가지 흠결이 있다. 구체적으로, 항바이러스 $CD8^+$ T 세포 반응의 효과적인 증강은 치료 백신 접종 후에 관찰되지 않았다. 또한, 만성 감염 중의 높은 바이러스 양과 응답성 T 세포의 낮은 증식성 잠재력은 치료 백신 접종의 효능을 제한할 것이다. 따라서, 숙주의 내인성 T 세포 반응을 효과적으로 증강시키는 치료 백신 전략을 개발하여 만성 감염을 조절하는 것이 중요하다.

[0426] LCMV 클론-13 감염에 의해 유도된 잘 알려진 만성 감염 모델을 치료 백신과 조합된 PD-1 길항제를 이용하는 것의 효능을 측정하는데 사용하였다. LCMV의 GP33 에피토프를 발현하는 우두 바이러스를 치료 백신으로 사용하여 에피토프-특이적 $CD8^+$ T 세포 면역 반응을 모니터링하였다. 치료 백신은 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포의 증식과 지속성 바이러스의 분해와 관련한 상승적 효과를 조사하기 위해 억제 경로의 차단을 위한 항-PD-L1와 조합하였다.

[0427] 하기 방법들을 이들 실험에 사용하였다:

[0428] *마우스 및 감염*: C57BL/6 마우스 (4주령 내지 6주령의 암컷)는 잭슨 래버러토리(미국 메인주 바 하버 소재)로부터 입수하였다. 마우스는 NIH 동물 관리 지침에 따라 병원체가 없는 동식물 사육장에서 사육하였다. 만성 감염의 개시를 위해, 마우스를 이전에 기술된 바와 같은 2×10^6 PFU의 LCMV 클론-13 (CL-13)으로 감염시켰다. 바이러스 역가 측정을 위한 바이러스 성장 및 플라크 분석은 상기 기술되었다.

[0429] *생체 내 항체 차단 및 치료 백신 접종*: 200 ㎍의 랫트 항-마우스 PD-L1 (10F:9G2)을 CL-13으로 감염시킨 후 4주가 되는 시점부터 3일 간격으로 복강 내 투여하였다. 항-PD-L1을 이용한 첫 번째 치료 시점에, 대조군 백신인 치료 백신 또는 야생형 우두 바이러스 (VV/WT)으로서 GP33-41 에피토프를 발현하는 재조합 우두 바이러스 2×10^6 PFU를 복강내 투여하였다.

[0430] *림프구 단리*: 상기 기술된 바와 같이 조직과 혈액으로부터 림프구를 단리시켰다. 림프구 단리 전 또는 단리 후에 얼음처럼 차가운 PBS로 간과 폐를 관류시켰다.

[0431] *유세포 분석*: MHC I류 펩티드 사량체를 상기 기술된 바와 같이 생성시켜 사용하였다. 그랜자임 B (칼태그(Caltag)), Bcl-2 (알앤디 시스템즈(R&D Systems)), 및 CD127 (이바이오사이언스(eBioscience))을 제외한 모든 항체들은 BD 파민젠으로부터 수득하였다. 모든 표면 및 세포내 사이토킨 염색은 문헌(Barber et al., Nature 439:682, 2006)에 기술된 바와 같이 수행하였다. 탈과립화를 검출하기 위해, 비장 세포를 브레펠딘, 모넨신, 항-CD107a-FITC 및 항-CD107b-FITC의 존재 하에 5시간 동안 자극시켰다.

[0432] *공초점 현미경분석*: 비장을 마우스로부터 제거하여 OCT(티슈텍(TissueTek) 내에서 냉동하였다. 이들 덩어리로부터, 10-20 mm의 저온유지된 조각들을 절단하여 얼음처럼 차가운 아세톤으로 10분간 고정시켰다. 면역형광분석법을 위해, 하기의 항체들로 상기 조각들을 염색하였다: 망상 세포를 검출하기 위한 ER-TR7 (바이오제네시스(Biogenesis), 미국 뉴햄프셔주 킹스턴 소재) 및 다클론 항-LCMV 기니아 피그 혈청. 염색을 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)-488 염소 항-랫트 및 알렉사 플루오르-568 염소 항-기니아 피그 Ig (몰레큘라 프로브스(Molecular Probes))를 이용하여 시각화하고 공초점 현미경(레이카 마이크로시스템즈 아게(Leica Microsystems AG, 독일 소재)으로 분석하였다. 이미지제이(ImageJ, 미국 국립보건원) 및 포토샵(아도브 시스템즈 인코포레이티드(Adobe Systems Inc.)으로 이미지를 작성하였다.

[0433] 실험 결과들은 치료 백신과 항-PD-L1 항체의 조합이 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포의 증식과 지속성 바이러스의 분해에 대해 상승적 효과를 나타낸다는 것을 입증하였다. 치료 백신은 PD-1/PD-L1 억제 경로를 차단함으로써 기능적으로 복원된 $CD8^+$ T 세포 집단을 효과적으로 증가시킬 수 있었다. 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포 증식의 향상 및 바이러스 조절의 가속화는 조합적 치료 백신 접종에 의해 전반적으로 달성되었다(도 9A-9D 및 도 10A-10D). 조합적 치료 백신은 기능적으로 활성인 $CD8^+$ T 세포의 급격한 증가를 유도하였다 (도 11A-D). 또한, PD-1/PD-L1 경로의 차단 중에 특이적 에피토프를 발현하는 벡터를 이용하는 치료 백신은 벡터 내에 코딩된 에피토프에 특이적인 $CD8^+$ T 세포의 증식을 향상시킨다(도 9 및 11). 조합 백신으로 처리된 그룹의 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포에서 나타난 CD127의 증가된 발현 수준이 장기 기억 T 세포 반응의 생성을 나타내는 것인 한편, PD-1 및 그랜자임 B의 감소된 발현 수준은 지속성 바이러스의 분해와 상관관계가 있다(도 12A-12B).

[0434] 무력하여 소진되어버린 $CD8^+$ T 세포에서의 기능 복원에 대한 PD-L1의 차단법과 조합된 치료 백신의 상승적 효과가 관찰되었다(도 13A-13E 참조). 마우스를 $CD4^+$ T 세포를 결핍시킨 후 LCMV 클론-13으로 감염시켰다. 일부 마우스를 야생형 우두 바이러스 (VV/WT) 또는 LCMV GP33-41 에피토프 발현형 우두 바이러스 (VV/GP33)로 감염 후 7주째에 백신 접종하였다. 동시에, 상기 마우스를 αPD-L1 또는 그의 이소타입을 이용하여 3일 간격으로 5회 처리하였다. 항체의 개시 처리 후 2주가 지난뒤, 분석을 위해 마우스를 희생시켰다. 그 결과를 도 13A에 나타내었다. GP33 특이적 $CD8^+$ T 세포의 빈도도 조사하였다(도 13B). 비장 세포를 αCD107a/b 항체의 존재 하에 GP33 펩티드로 자극시킨 후 IFN-γ에 대해 공동 염색하였다. 나타난 플롯을 CD8-T 세포에 대해 게이팅하였다 (도 13C). Db-제한된 GP33-41 사량체에 대해 양성인 세포마다 GP33 펩티드로 자극한 후 IFN-γ^+ 세포의 백분율도 측정하였고(도 13D), 바이러스 역가에 대해서도 그렇게 하였다(도 13E). 이 결과들은 PD-1 차단과 조합된 백신의 상승적 효과를 입증한다.

[0435] 이러한 결과들은 만성 감염 중에 음성 조절 경로를 차단하는 것과 $CD8^+$ T 세포를 증강시키는 것을 조합한 방법이 만성 감염 또는 악성종양을 앓는 환자들에 있어 T 세포 반응을 향상시키기 위한 치료 백신의 개발에 사용될 수 있음을 보여주는 것이다. T 세포 반응을 증강시키고 바이러스 양을 저하시키는 PD-1 길항제의 사용과 같은 치료적 개입은 무병 생존을 증가시키고 바이러스의 전달을 감소시킬 수 있다. 만성 바이러스 감염 및 지속성 박테리아, 기생충 감염에 대해 효과적인 치료 백신 접종이 사용될 수 있다. 이러한 전략은 악성 종양의 치료를 위해서도 사용된다.

[0436] **실시예 16: PD-1/PD-L1 경로 차단을 통한 T 세포 면역요법의 개선**

[0437] 인간 면역결핍 바이러스 및 C형 간염과 같은 만성 바이러스 감염을 치료하여 제거하는 방법을 개발하는 것은 중요하다. CDC는 백만이 넘는 미국인이 HIV에 감염된 채 살아가고 있다는 것을 최근 보고한 바 있는데, 이는 보다 효과적인 치료법에 대한 필요를 반증하는 것이다. 림프구에 대한 억제성 신호 전달을 통해 숙주 면역 반응을 계속적으로 피할 수 있는 병원체의 능력에 어떻게 영향을 줄 수 있을지를 결정하는 것이 중요하다.

[0438] 억제성 면역수용체 또는 PD-1 (B7/CD28과의 보조자극 수용체의 일원) 및 이의 리간드 (PD-L1)가 림프구성 맥락

수막염 바이러스 (LCMV)로의 만성 감염 상태 동안 급격히 상향조절된 것으로 나타났다. LCMV 모델을 이용한 추가의 연구는, $CD8^+$ T 세포가 소진된 경우 PD-1/PD-L1 경로의 차단이 만성 감염의 말기 동안 내인성 항바이러스 $CD8^+$ T 세포 반응을 현저히 증가시킨다는 것을 입증하였다. 소진된 T 세포는 기능적으로 면역 반응이 제대로 발휘되지 못하며 항원을 맞닥드렸을 때 효과적인 면역 반응을 작동시키지 못한다. 그러나, PD-1/PD-L1 경로의 차단은 소진상태를 역전시켜 그들의 기능적 역량을 복원시키는 것으로 보인다. 데이터는 이러한 효과가 항-PD-L1 처리한 그 시점 이후로 계속 잘 지속되고 있다는 점을 시사하고 있다.

[0439] (1) 선천적으로 감염된 (담체) 마우스 내로 면역 (기억) 비장 세포의 입양 전달시 항바이러스 $CD8^+$ T 세포의 증식 및 생존을 향상시키는 항-PD-L1의 능력을 평가하기 위해, (2) PD-1/PD-L1 차단 하에 확대된 바이러스-특이적인, 기억 $CD8^+$ T 세포의 기능을 평가하기 위해, 그리고 (3) PD-1/PD-L1 차단 하에 확대된 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포에 있어서의 다양한 마커들의 차별화 발현을 측정하기 위하여, 하기의 실험들을 수행하였다.

[0440] 잘 개발된 만성 바이러스 감염을 위한 세포면역 요법 모델에서 PD-1 경로의 역할을 평가하였다. 본원에 기술된 모델은 이러한 요법들의 이용성을 제한하는 면역학적 장벽(예컨대 손상 또는 억제된 T 세포/항-종양 반응)에 관한 종양을 위한 T 세포 세포면역 요법의 모델과 그 맥을 같이하고 있다. LCMV로 신생 또는 태내 감염된 마우스는 내인성 LCMV-특이적 면역 반응을 작동하지 못하여 일생 동안 혈액과 모든 조직에 있어 높은 수준의 감염성 LCMV를 보유하게 된다. 이러한 동물들은 선천적인 담체이며 병원체에 대해 본래 내성이 있다. LCMV 면역마우스의 비장 세포가 선천적인 담체 내로 입양 전달되는 경우, 상기 전달된 면역 기억 세포는 신속하게 확장되어 바이러스에 대해 강력한 면역 반응을 확립한다. 입양 세포면역 요법을 받은 동물의 약 2/3가 고용량의 비장 세포가 전달되는 경우 감염을 완전하게 제거한다.

[0441] 이러한 실험들에 있어서 하기의 재료 및 방법을 사용하였다:

[0442] *마우스 및 감염*: 4-6주령의 암컷 B57BL/6 마우스를 잭슨 래버러토리(미국 메인주 바 하버 소재)로부터 구입하였다. 2×10^5 PFU의 LCMV 암스트롱을 복강내 주입하여 급성 감염을 개시하였다. 선천적인 담체 마우스는 신생 감염된 마우스로부터 유래한 콜로니(10^4 PFU LCMV 클론-13, 뇌내 감염)로부터 에모리 유니버시티 (미국 조지아 주 애틀란타 소재)에서 사육되었다.

[0443] *입양 면역요법 및 생체 내 항체 차단*: 40×10^6의 LCMV 면역 마우스(감염 후 30-90일)의 비장 전세포를 단리하여 6-12주령의 LCMV 담체 마우스 내로 정맥 내 전달하였다. 200㎍의 랫트 항-마우스 PD-L1 (10F:9G2)을 입양 면역요법 후 15일간 3일 간격으로 투여하였다.

[0444] *유세포 분석 및 사량체 염색*: LCMV GP_{33-41}과 착체화된 H-2Db의 MHC I류 사량체를 상기 기술된 바와 같이 생성하였다. 모든 항체들은 BD/파민젠(미국 캘리포니아 주 샌디에고 소재)으로부터 구입하였다. 말초 혈액 단핵 세포 및 비장 세포를 단리하여 상기 기술된 바와 같이 염색하였다. FACSCalibur™유세포 분석기(BD)를 이용하여 데이터를 수득하고 플로우조우 소프트웨어(FlowJoe software, 트리 스타 인코포레이티드(Tree Star Inc.), 미국 오레곤주 애쉬랜드 소재)를 이용하여 분석하였다.

[0445] *세포 내 사이토킨 염색*: 세포 내 사이토킨 염색을 위해, 10^6 의 비장 세포를 정해진 펩티드(2㎍/㎖) 및 브레펠딘 A의 존재 또는 부재 하에 37℃에서 5-6시간 동안 배양하였다. 표면 마커 염색 후, 세포들을 투과시키고 사이토픽스/사이토퍾(Cytofix/Cytoperm) 표본 (BD/파민젠)을 이용하여 세포 내 사이토킨에 대한 염색을 행하였다.

[0446] 하기의 결과들을 수득하였다:

[0447] *항-PD-L1 요법은 바이러스 특이적 $CD8^+$ T 세포의 수를 증가시켰다:* 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 7일, 11일, 15일, 22일 및 35일째에 처리 또는 미처리된 동물로부터 단리하였다. D^b GP33 에피토프에 대해 특이적인 세포를 사량체 염색에 의해 평가하였다. 두 독립적인 실험에서, 입양 전달 후 첫 15일 동안 항-PD-L1 요법으로 처리된 동물은 백만 개의 PBMC 당 D^b GP33 양성 세포의 수로 표준화했을 경우 현저하게 많은 수의 LCMV 특이적 $CD8^+$ T 세포를 발달시켰음이 밝혀졌다 (도 14). 이러한 데이터는 정상적인 기억 T 세포에 있어서 어느 정도의 증식 억제를 부여하는 PD-1/PD-L1 경로의 역할을 뒷받침하는 것이다. 또한, 이러한 결과들은 상기 경로의 치료적 억제가 높은 항원 용량을 갖는 만성 감염의 환경에 대한 입양 전달 후 2차 면역 반응의 발달과 지속을 증강시킨다는

점도 시사하고 있다.

[0448] *PD-1/PD-L1 차단은 항원 특이적 CD8^{+} T 세포의 기능성을 향상시킨다:* 비장 세포를 입양 전달 후 17일째 처리 및 미처리된 동물로부터 단리하고 염증성 사이토킨(IFN-γ 및 TNF-α) 또는 CD107ab (라이소좀 연관 막단백질, LAMP)의 발현에 대해 분석하였다. 정의된 CD8 에피토프에 걸쳐, IFN-γ 발현은 미처리된 동물들에 비해 항-PD-L1 차단을 받은 동물들에 있어서 증강되었음이 밝혀졌다(도 15A). 추가적으로, IFN-γ와 TNF 알파 및 CD107ab의 공동 발현도 항-PD-L1 요법 후 증가되었다(도 15B-15E). 이러한 발견은 PD-L1 차단 하에 증식하고 있는 입양 전달된 기억 비장 세포가, 미처리된 동물의 비장 세포와 비교했을 때 염증성 사이토킨 생성 및 세포 용해 과립의 방출의 측면에서 기능적으로 월등하다는 것을 의미한다.

[0449] **실시예 17: PD-1 차단 중의 쥐과의 B 세포 반응**

[0450] PD-1 차단이 만성 LCMV 감염 동안 B 세포 반응을 증강시키는지를 측정하기 위해 하기의 실험들을 수행하였다. B 세포와 T 세포 양자 모두 만성 LCMV 감염을 조절하는데 중요하기 때문에, 이에 따라 만성 LCMV 감염 동안에 B 세포 반응을 향상시키는 것은 바이러스 양을 저하시키고 T 세포 기능을 향상시키는데 도움이 될 수 있다.

[0451] 이들 실험에서는 하기의 재료 및 방법을 사용하였다:

[0452] *마우스 및 바이러스:* 4-6주령의 암컷 C57Bl/6 마우스를 잭슨 래버러토리(미국 메인주 바 하버 소재)로부터 구입하였다. 감염 전에, 만성 LCMV 마우스를 gk1.5 항체를 투여하여 CD4 세포를 결핍시켰다. 이전의 데이터는 바이러스 면역 반응을 일으키기 1.5일-2일 전 및 0일에 500㎍의 gk1.5를 투여하면 비장과 림프절에서 CD4 T 세포의 수가 95-99% 감소되는 결과를 가져오는 것을 입증하며, 이러한 CD4 T 세포 수는 2-4주에 걸쳐 서서히 회복된다는 것을 입증하고 있다. 0일째 LCMV의 클론-13 균주를 $2x\times10^{6}$ PFU로 정맥 내 투여받은 마우스는 만성 감염이 개시되었다. 바이러스의 역가를 베로 세포에 대한 6일간의 플라크 분석에 의해 측정하였다.

[0453] *ELISPOT에 의한 ASC의 검출*: 비장 및 골수 단일 세포 현탁액을 0.84% NH_4Cl 처리로 적혈구를 결핍시키고 5% FCS로 보충된 RPMI에 재현탁시켰다. 니트로셀룰로스-바닥의 96-웰 멀티스크린(Multiscreen) HA 여과 플레이트(밀리포어(Millipore)) 상에 세포를 도말하여 항체 분비 세포를 검출하였다. 플레이트는 5ug/㎖의 염소 항-마우스 IgG+IgM+IgA (칼테그/인비트로겐) 100㎕로 4℃에서 밤새 미리 코팅시켰다. 다음으로, 플레이트를 PBS/0.2% tween으로 3회 세정한 후, PBS로 1회 세정하고 비특이적 결합을 방지하기 위해 RPMI + 10% FCS를 이용하여 2시간 동안 차단시켰다. 차단 배지를 100㎕의 RPMI 5% FCS로 대체하고 50㎕의 1×10^{7} 세포/㎖를 플레이트 상에 3배의 연속식 희석으로 도말하였다. 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 6시간 동안 배양하였다. 세포를 제거하고 플레이트를 PBS로 3회 세정하고 PBS/0.2% tween으로 3회 세정하였다. 다음으로, 웰을 PBS/0.2% tween/1% FCS 중에서 1/1000 희석된 바이오티닐화 염소 항-마우스 IgG (칼테그/인비트로겐)로 코팅하고 4℃에서 밤새 배양하였다. 2차 항체를 제거하고 플레이트를 PBS/0.2% tween로 3회 세정하였다. PBS/0.2% tween/1% FCS 중에서 1/1000 희석된 Avidin-D HRP (벡터)를 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 PBS/0.2% tween으로 3회 세정한 후, PBS로 3회 세정하고 100 ㎖의 호스래디쉬 퍼옥시다아제-H_2O_2 크로마겐 기질을 첨가하여 검출을 수행하였다. 상기 기질은 150 ㎖의 갓 제조된 AEC 용액 (디메틸포름아미드 중에 ㎖당 10 mg의 3-아미노-9-에틸카바졸 (ICN)이 용해된 것(시그마, Sigma))을 10 ㎖의 0.1 M 아세트산 나트륨 완충액(pH 4.8)에 첨가하고, 이를 0.2㎜의 공극 크기의 막을 통과시켜 여과함으로써 제조되며, 사용 직전에 150 ㎖의 3% H_2O_2를 첨가한다. 과립상의 붉은 반점이 3분 내지 5분 후에 나타났고, 반응을 수돗물로 헹궈 반응을 종결시켰다. 반점들을 수직형 백열구가 장착된 입체 현미경으로 그 개수를 셈하였다.

[0454] *총 골수 세포의 측정*: 골수에서의 ASC 총 반응을 산출하기 위해, 반응을 7.9의 계수로 두 대퇴골의 골수 세포에 의해 증강시켰는데, 이는 ^{59}Fe 분포 연구로 총 마우스 골수의 12.6%가 두 대퇴골이 만나는 곳에 위치한다는 것이 밝혀졌기 때문이다. 대퇴골, 경골, 상박골, 늑골 또는 흉골에서 골수 세포의 ASC 활성들 사이에서는 아무런 차이점이 검출되지 않았다. 보통, 성인의 두 대퇴골은 총2.0×10^{7} 내지 2.5×10^{7} 개의 골수 세포를 생성한다.

[0455] *유세포 분석*: 직접 접합된 항체는 파민젠(항-B220, 항-CD4, 항-CD138 항-CD95, 항-Ki67, 항-IgD 바이오티닐화), 또는 벡터 랩스(Vector labs)(PNA)으로부터 구입하였다. 스트렙아비딘-APC는 몰레큘라 프로브스로부터 구입하였다. 모든 염색은 1% FCS 및 0.1% 아지드화 나트륨으로 보충된 PBS 중에서 4℃로 수행하였다. 다음으로, 세포를 2% 포름알데하이드 (PBS 중) 중에서 고정하고 셀퀘스트 소프트웨어(BD 바이오사이언스)를 이용한 FACS

Calibur 상에서 분석하였다.

[0456] *통계학적 분석*: 프리즘(Prism) 4.0 (그래프패드(GraphPad), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)을 이용하여 시험을 수행하였다. 통계는 양측 검정, 대응표본 t 시험(95% 신뢰 범위)을 이용하여 수행하였다.

[0457] *비장에서 항체 분비 세포의 총 수는 생체 내 PD-1 차단 후 증가된다*: LCMV 클론-13으로 감염된 마우스를 감염 후 약 60일째에 항-αPD-L1로 처리하였다. 마우스에게 200㎍의 αPD-L1을 2주간 3일 간격으로 투여하였다. αPD-L1 처리 14일째, 마우스를 희생시키고 비장 내의 항체 분비 세포의 수를 ELISPOT 및 유세포 분석 염색에 의해 측정하였다. 3개의 별도의 실험에서, αPD-L1로 처리된 마우스는 미처리된 마우스와 비교하여 항체 분비 세포(ASC)가 현저히 증가된 수준(p=0.011)을 나타내었다(도 16A). ASC는 B 세포 마커 B220의 하향조절과 CD138(신데캄-1)의 발현에 의해 비장 내의 B 세포로부터 분화될 수 있다. ELISPOT 결과와 일관되게, αPD-L1로 처리된 감염 마우스에서 $B220^{low/int}$ $CD138^{+}$ 세포 수의 증가가 관찰되었다(도 16B).

[0458] *PD-L1을 이용한 만성 LCMV 감염 마우스의 처리는 골수 ASC의 수준을 증가시키지 않는다:* 골수 내의 항체 분비 세포도 αPD-L1로 처리하는 동안 증가되었는지를 판단하였다. 대다수의 장수명 혈장 세포는 골수 내에 체류하며, 이러한 혈장 세포는 혈청 항체 수준을 장시간 유지하는데 중요하다. 만성 LCMV 감염된 마우스를 감염 후 약 60일째에 αPD-L1로 처리하였다. αPD-L1 처리 14일째, 비장 및 골수 ASC 수준을 ELISPOT로 측정하였다. 처리 2주 후에 비장에서 그 수가 증가되었으나, 같은 시점에 골수에서의 수에는 변화가 없었다(도 17).

[0459] *αPD-L1 및 ^{130}αCTLA-4로 만성 LCMV 감염된 마우스를 동시 처리하면 비장 ASC 수준을 상승적으로 증가시킬 수 있다*: 또다른 음성 조절 분자인 CTLA-4를 이용한 신호 전달의 차단이 PD-1 차단 동안 나타난 효과를 증진시킬 수 있는지를 추가로 조사하였다. B7에 CTLA-4가 결합하면 양성 보조 억제 분자인 CD28과 경쟁하고/하거나 길항적 TCR 신호를 직접 제공할 수 있는 것으로 보인다. LCMV 클론-13으로 감염된 마우스를 αPD-L1, αTLA-4, 양자 모두로 처리하거나 미처리하고, 처리 2주 후 항체 분비 세포의 수준을 ELISPOT에 의해 측정하였다. αTLA-4를 이용한 처리는 ASC 수준에 아무런 영향을 나타내지 않지만, αPD-L1과 αTLA-4의 동시 처리는 αPD-L1 단독 처리에서 보여진 것 이상의 상승적 효과를 유도하였다(도 18).

[0460] *αPD-L1 처리된 마우스에서 증강된 B 세포 및 CD4 T 세포 증식과 배중심 활성*: αPD-L1로 처리된 만성 감염 마우스에서 비장 군집의 유세포 분석은 CD4 T 세포 및 B 세포 양자 모두에서 증가된 Ki-67 염색을 보여 증식의 향상된 수준을 나타내었다. 배중심 반응에서 B 세포는 높은 수준의 PNA 및 FAS 염색에 의하여 비장에서 확인될 수 있다. αPD-L1 처리 후, 미처리된 대조군과 비교하여 PNA+FAS+ B 세포의 빈도에서 큰 증가가 있었다(도 19A-19B).

[0461] **실시예 17: 인간 T 세포에서의 PD-1 발현**

[0462] $CD8^{+}$ T 세포는 여러 종류의 만성 감염에서는 필수적이다. 본원에 개시된 바와 같이, 이러한 $CD8^{+}$ T 세포는 만성 항원성 자극 후 소진되며, 이는 과증식성 상태의 유발 및 항바이러스 사이토킨을 생성하는 능력의 상실로 특징지을 수 있다. 소진된 T 세포는 예정된 사멸-1 (PD-1)의 발현이 높게 나타나며, 또한 PD-1은 T 세포 활성화에 의해 상향조절되며, PD-1 리간드인, PD-L1 및 PD-L2에 의해 시발될 수 있다. PD-1 억제 경로가 마우스에서 만성 바이러스 감염 동안 $CD8^{+}$ T 세포 소진의 중요한 매개자라는 것은 본원에 개시되어 있다. 바이러스 특이적 $CD8^{+}$ T 세포는 성공적으로 제거된 감염에 반응하지 않고 만성 감염에 반응하여 PD-1 발현을 높은 수준으로 유지하였다. PD-1/PD-L1 상호작용의 차단은 증강된 $CD8^{+}$ T 세포 증식, 항바이러스 사이토킨의 생성 및 바이러스 양의 감소라는 결과를 유도하였다.

[0463] 인간의 만성 감염에 대해 특이적인 $CD8^{+}$ T 세포가 PD-1을 발현하는지와, PD-1 차단이 CD8 T 세포 반응을 증가시키는지를 평가하였다. 이 연구는 (1) 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC): CD4, CD8, B 세포, NK, 단핵 세포, DC의 하위군에 대한 PD-1의 발현 패턴; (2) PD-1을 발현하는 CD4 및 $CD8^{+}$ T 세포의 표현형; (3) 만성의 지속성 항원 [(엡스타인-바 바이러스 (EBV) 및 시토메갈로바이러스 (CMV)] 및 급성 분해형 항원 (인플루엔자 및 우두)-특이적 세포에 대한 PD-1 발현; 및 (4) 항원-특이적 세포의 증식에 대한 PD-1/PD-L1 상호작용 차단의 효과를 측정하였다.

[0464] 이들 연구에서 하기의 재료 및 방법을 사용하였다:

[0465] *혈액 샘플*: 말초 혈액 샘플을 EBV, CMV, 인플루엔자 또는 우두 바이러스에 대해 혈청 양성 반응인 건강한 36개

체로부터 수득하였다. 이들 피험체들은 EBV, CMV, 인플루엔자 또는 우두 바이러스 단백질에 대해 특이적인 HLA I류 사량체와 부합하는 그들의 HLA 대립유전자 발현에 기반하여 선별하였다. PBMC를 림프구-분리 매질(셀그로(Cellgro), 미국 버지니아주 헌돈 소재)로 혈액 샘플로부터 단리하였다.

[0466] *항체, 펩티드 및 사량체*: 피코에리트린-접합 항-인간 PD-1 (EH12, 마우스 IgG1) 및 비접합 인간 PD-L1 (29E.2A3, 마우스 IgG2b)를 수득하였다. 직접 접합 항체를 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 벡맨 코울터(Beckman Coulter)(항-CD3, CD11a, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD57, CD62L 및 그랜자임-B), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 BD 파민젠(CD8, CD95, CD195, HLA-DR, Ki-67 및 퍼포린) 및 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템(CCR7)로부터 입수하였다. 펩티드를 미국 조지아 주 애틀란타 소재의 에모리 유니버시티의 펩티드 합성 연구실에서 제조하였다. HLA-A2, -B7 및 -B8를 발현하는 플라스미드 구축물은 미국 조지아 주 애틀란타 소재의 NIH 테트라머 코어 퍼실러티(Tetramer Core Facility) 및 EBV (HLA-A2-GLCTLVAML (서열번호: 36), HLA-B8-RAKFKQLL (서열번호: 37) 및 FLRGRAYGL (서열번호: 38)), CMV(HLA-A2-NLVPMVATV (서열번호: 39), HLA-B7-TPRVTGGGAM (서열번호: 40)), 인플루엔자 (HLA-A2-GILGFVFTL (서열번호: 41)) 및 우두 (HLA-A2-CLTEYILWV (서열번호: 42) 및 KVDDTFYYV (서열번호: 43))의 CTL 에피토프를 수반하는 APC-표지된 MHC I류/펩티드 사량체로부터 제공되었다.

[0467] *면역형태학적 검사 및 CFSE 증식*: 헤파린화 인간 전혈 샘플 (200㎕)을 항체 또는 사량체로 염색한 후 셀퀘스트 소프트웨어를 이용한 FACS Calibur 상에서 또는 FACSDiva 소프트웨어를 이용한 LSRII 유세포 분석기(BD 이뮤노사이토메트리 시스템즈(Immunocytometry Systems)) 상에서 분석하였다(문헌 [Ibegbu et al., *J Immunol.*174: 6088-6094, 2005]). CFSE 분석을 위해, PBMC (2×10^6/㎖)를 완전히 세척하고 3mM의 카르복시-플루오레세인 디아세테이트, 숙신이미딜 에스테르(CFSE, 몰레큘라 프로브스)로 실온의 암중에서 5분간 표지시켰다(예를 들어, 문헌 [Weston and Parish, *J Immunol Methods* 133:87-97, 1990] 참조). 상기 CFSE 표지된 PBMC를 펩티드 단독(1mg/㎖) 또는 펩티드와 항-PD-L1 항체 (10mg/㎖)로 자극시켰다. 대조군 항체는 PBMC 단독, PBMC와 항-PD-L1 항체 또는 PBMC와 이소타입의 대조군 항체(IgG2b; 10mg/㎖)로 구성되었다. 37℃에서 6일간 배양 후, 세포를 세척하고 항-CD3 및 항-CD8 항체와 함께 사량체를 이용하여 세포 외 염색하였다.

[0468] 하기의 결과들이 수득되었다:

[0469] *PBMC 하위군에 대한 PD-1의 발현 패턴*: 건강한 개체에서 PBMC 하위군에 대해 PD-1 발현을 조사하였다. $CD8^+$ T 세포, $CD4^+$ T 세포 및 단핵 세포 ($CD14^+$)가 PD-1을 높은 수준으로 발현하고, B 세포 ($CD20^+$)는 PD-1을 낮은 수준으로 발현하며, NK 세포 ($CD56^+$)와 DC ($CD11c^+$)는 PD-1을 발현하지 않는 것으로 관찰되었다.

[0470] *PD-1은 효과기 기억 CD8 및 CD4 T 세포 중에서 우선적으로 발현된다*:

[0471] 보통의 건강한 개체의 $CD8^+$ T 세포에 있어서, 분화 상태 및 기능과 관련된 다양한 표현형 마커들과 함께 PD-1의 공동 발현에 대하여 조사하였다 (도 20A). 요약하면, 나이브 및 중추 기억 표현형 $CD8^+$ T 세포만이 낮은 수준의 PD-1을 발현하는 한편, 효과기/효과기 기억/또는 소진된 표현형과 연관된 다양한 마커를 발현하는 $CD8^+$ T 세포는 높은 수준의 PD-1을 발현한다 (도 20B). 이러한 데이터는 PD-1이 효과기 기억 $CD8^+$ T 세포들 중에서 우선적으로 발현된다는 것을 시사한다. CD4 T 세포를 조사한 경우에도 유사한 경향을 발견할 수 있었다(도 20C).

[0472] *PD-1은 지속성 항원-특이적 기억 $CD8^+$ T 세포에서 상향조절된다:* 인간의 만성 감염에 특이적인 $CD8^+$ T 세포가 PD-1의 증가된 발현을 나타내는지에 대해 평가하기 위해, 만성의 지속성 바이러스 (EBV 및 CMV)에 특이적인 기억 $CD8^+$ T 세포에 대한 PD-1 발현을 EBV-, CMV-, 인플루엔자- 및 우두 바이러스-특이적 사량체를 이용한 염색을 이용하여 건강한 36 개체에서의 급성 바이러스 특이적 T 세포(인플루엔자 및 우두)와 비교하였다(도 21A-21B). 도 21A는 EBV, CMV, 인플루엔자 및 우두 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 대표적인 PD-1 GMFI를 나타낸다. PD-1 발현은 인플루엔자 ($p=0.0335$) 및 우두 ($p=0.0036$) 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 경우보다 EBV-특이적 $CD8^+$ T 세포의 경우에서 증가되었음이 밝혀졌다 (도 21A-21B). 유사하게, CMV-특이적 $CD8^+$ T 세포는 인플루엔자 ($p=0.0431$) 및 우두 ($p=0.019$)의 경우보다 보다 빈번하게 PD-1을 발현하였다(도 21A-21B). 이러한 결과들은 PD-1 발현과 항원 경험 사이의 상관관계를 시사한다.

[0473] *항-PD-L1 차단은 만성의 지속성 바이러스-특이적 CD8$^+$ T 세포의 증식을 증가시킨다*: PD-1 차단이 마우스에서 관찰된 결과와 유사한 지속성 항원-특이적 CD8$^+$ T 세포 반응을 증진시키는지를 평가하였다. CFSE 표지된 세포를 항-PD-L1 항체의 존재 또는 부재 하에 EBV, CMV, 인플루엔자 또는 우두 바이러스-특이적 펩티드로 자극시켰다. 6일 후, 펩티드 단독으로 자극시킨 배양물과 펩티드에 이어서 항-PD-L1으로 차단시킨 배양물 간에 사량체$^+$ CFSE^{lo} 세포 및 CD8$^+$ CFSE^{lo} 세포의 백분율을 비교하였다. CMV 및 EBV-특이적 CD8$^+$ T 세포의 증식을 이용한 대표적인 유세포 분석 플롯이 도 22A에 나타나 있다. CMV (n=5), EBV (n=6), 인플루엔자 (n=2) 및 우두 (n=2) 혈청 양성인 개체들의 집산 데이터가 도 22B에 나타나 있다. 항-PD-L1 항체를 이용한 PD-1/PD-L1 상호작용의 차단이 EBV 및 CMV-특이적 CD8$^+$ T 세포의 증가된 증식을 유도하는 반면에, 인플루엔자 및 우두 바이러스-특이적 CD8$^+$ T 세포는 항-PD-L1으로 차단한 후에 증식을 나타내지 않았다. 이러한 결과들은 펩티드 단독으로 자극했을 때와 비교하여 펩티드 + 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에, EBV 또는 CMV-특이적 CD8$^+$ T 세포의 빈도는 3.5배까지 증가하는 것을 보여준다. 항-PD-L1 항체차단 후 항원-특이적 CD8$^+$ T 세포의 증식이 이러한 세포에 의한 PD-1 발현에 관련이 있는지를 평가하였다. 데이터는 PD-1 발현과 항원-특이적 CD8$^+$ T 세포의 증식 간에 양의 상관관계가 있음을 나타낸다 (p=0.0083) (도 22C).

[0474] **실시예 18: 만성 인간 HCV 감염에서 간 침투성 림프구는 높은 PD-1 발현 및 낮은 CD127 발현을 나타내는 소진된 표현형을 나타낸다**

[0475] 하기에 기술된 실험들은 만성 HCV 감염, 말초 HCV-특이적 T 세포가 높은 수준의 PD-1을 발현한다는 것과, PD-1/PD-L1 상호작용의 차단이 향상된 증식 성능을 유도한다는 것을 입증한다. 중요하게는, 간내 HCV-특이적 T 세포는 높은 수준의 PD-1을 발현할 뿐 아니라, HCV 항원 특이적이며 간에 바이러스 복제 부위로 구획된 소진된 표현형인 IL-7 수용체 α (CD127)를 감소시켰다.

[0476] 현재, HCV 감염을 예방하기 위한 백신은 존재하지 않으며, 알파 인터페론 (IFNα)을 단독으로 또는 뉴클레오시드 유사체인 리바비린과 조합하는 유일한 인가된 요법은 고가이며, 이는 기껏해야 대부분의 우세한 유전자형(유전자형 1)에 대해 50%의 제거율 만이 나타나며 현저한 부작용으로 합병증이 유발된다. 유효한 항-HCV 치료선택권의 결여로 인해, HCV 감염의 불리한 결과를 예방할 수 있는 자연적 면역 반응을 단독으로 또는 항바이러스 약물 요법과 병용하여 증강 또는 보충하는데 초점을 맞춘 효과적인 개입에 대한 요구가 조명되고 있다.

[0477] 현재, 만성 HCV 감염, 특히 활성 감염 부위인 간에서의 PD-1의 발현 및 T 세포 소진에 있어서 그 역할에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 본 연구는 만성 HCV 감염을 앓고 있는 환자의 간과 말초 혈액 모두의 경우에서 항원-특이적 CD8$^+$ T 세포에 대한 PD-1의 발현을 측정함으로써, HCV 감염에서의 T 세포 표현형을 보다 잘 이해하기 위해 수행되었다.

[0478] 이들 연구에서 하기의 재료와 방법을 사용하였다:

[0479] 피험체: 만성 HCV 감염을 앓고 있고(HCV 항체 및 HCV PCR 양성) 항체 스트리닝에 의해 HIV에 대해 음성인 17명의 환자를 명부에 등록하였다. 모든 환자는 등록 전 HCV 항바이러스 요법에 대해 나이브인 사람들이었다. 15명의 환자들 중에서 7명이 FACS 분석에 의해 HLA-A2에 대해 양성을 나타냈다. 환자들의 특성을 하기 표 1에 요약하였다.

표 5

[0480]

코호트 환자의 인구통계학적 및 임상적 데이터						
환자 신원	성별	나이	HLA-A2	HCV 유전자형	최저 바이러스 양 (IU/㎖)	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

[0481] *HCV 항체 시험, 바이러스 양 측정 및 유전자형 분석*: 제조업자의 지시(애보트 다이어그노스틱스(Abbott Diagnostics), 미국 일리노이주 애보트 파크 소재; 바이오-래드 래버러토리즈(Bio-Rad Laboratories), 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재)에 따라 키트를 이용하여 ELISA에 의한 HCV 항체 시험을 수행하였다. HCV 바이러스 양 정량 분석을 실시간 RT-PCR 분석법(로쉐 몰레큘라 시스템즈(Roche Molecular Systems), 미국 캘리포니아주 알라메다 소재)을 이용하여 수행하였다. HCV 유전자형 분석을 실시간 RT-PCR 분석법(애보트 다이어그노스틱스, 미국 일리노이주 애보트 파크 소재) 및 라인 프로브 분석법(LIPA) (바이엘 다이어그노스틱스(Bayer Diagnostics), 미국 노스캐롤라이나주 리서치 트라이앵글 파크 소재))을 이용하여 수행하였다.

[0482] *말초 혈액 단핵 세포*: EDTA 및 헤라핀 항응고 혈액 (50-70 ㎖)을 각 환자로부터 수집하여, FACS 염색을 위해 또는 PBMC 단리를 위해 직접 사용하였다. PBMC는 피콜-패크(Ficoll-Paque) PLUS 농도 구배 (아머샘(Amersham), 노르웨이 오슬로 소재)를 이용하여 단리하고, PBS 중에서 2회 세척하여, 직접 분석하거나 또는 90% 우태아 혈청 (하이클론(Hyclone)) 및 10% 디메틸 설폭사이드 (시그마 알드리치(Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세이트 루이스 소재)를 포함하는 배지에 냉동 보존하였다.

[0483] *간 생검*: 간 조직을 초음파-유도 바늘 생검에 의해 또는 경정맥 형광 투시 기법을 통해 수득한 직후, 면역학적 분석을 위해 10% 우태아 혈청 (하이클론, 미국 유타주 로간 소재)을 포함하는 RPMI-1640 배지 (깁코(Gibco))에 넣었다. 다른 단편은 조직학적 검사를 위해 포르말린에 고정시켰다.

[0484] *간내 T 세포 단리*: 10% 우태아 혈청 (하이클론, 미국 유타주 로간 소재)을 포함하는 RPMI-1640 배지 (깁코, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)에서 수득된 간 생검 샘플을 동일한 매질로 3회 세정하여 세포 잔해 및 RBC를 제거하였다. 자동화된 기계적 분해 시스템(메디머쉰(Medimachine), 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson), 미국 캘리포니아주 산호세 소재)를 이용하여 간 침투성 림프구의 단리를 수행하였다. 샘플을 50 ㎛의 메디콘(Medicon)에 삽입하고 메디머쉰에 삽입하여 15분간 구동시켰다. 분해된 세포들을 주사기 포트 내에 주사기를 이용하여 제거하였다. 메디콘을 10% 우태아 혈청 (하이클론, 미국 유타주 로간 소재)을 포함하는 RPMI-1640 배지 (깁코, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)로 2회 세정하여 최대 세포 회수를 확인하였다. 세포들을 FACS 염색을 위해 직접 사용하였다.

[0485] *항체, HLA-A2 사량체 및 유세포 분석*: 세포를 제조업자의 지침에 따라 FITC, PE, PerCP 및 APC 표지된 단일클론 항체 또는 사량체로 염색하고 FACS Calibur(벡톤 디킨슨, 미국 캘리포니아주 산호세 소재)를 이용하여 유세포 분석을 수행하였다. FACS 데이터를 플로우조(FlowJo) 소프트웨어(트리스타, Treestar)를 이용하여 분석하였다. BD 파민젠(BD 바이오사이언스, 미국 캘리포니아주 산호세 소재)의 하기 단일클론 항체를 사용하였다: 항-CD8 PerCP 및 항-CD45RA APC. 항-CD62L FITC, CD3 FITC 및 CD127 PE를 벡맨 코울터(미국 캘리포니아주 풀러톤 소재)로부터 입수하였다. 항-PD-1 PE 접합 항체 (클론 EH12)를 문헌 [Dorfman et al., Am. J. Surg. Pathol. 30:802-810, 2006]에 기술된 대로 제조하였다. HLA-A2 사량체는 하기 $CD8^+$ T 세포 에피토프에 특이적이었다: HCV 1073: CINGVCWTV (서열번호: 44); HCV-1406: KLVALGINAV (서열번호: 45). 유세포 분석 회수를 FACSCaliber™(BD 바이오사이언스, 미국 캘리포니아주 산호세 소재)에서 시행하고 플로우조 소프트웨어(v8.1.1)를 이용하여 분석을 수행하였다.

[0486] *CFSE 표지 및 항체 차단*: 10×10^6의 PBMC를 PBS로 세정하고 3μM의 CFSE (몰레큘라 프로브즈)로 표지하였다. 세포를 1×10^6개의 세포/㎖로 조정하고 및 2㎍/㎖의 A2-HCV 1073 (CINGVCWTV, 서열번호: 44) 펩티드의 존재 하에 배양하였다. 10U/㎖의 IL-2를 자극 후 3일째에 첨가하였다. 비자극된 대조군을 각 분석에 포함시켰다. 자극과 동시에 특이적 차단 항체(항-PD-L1; 클론 # 29E 및 항-PD-1; 클론 # EH12 (문헌[Dofman et al., 상기 참조])를 10㎍/㎖의 농도로 세포 배양물에 첨가하였다. 세포를 6시간 동안 배양하고 수확하여 표면 항체 및 사량체로 염

색하고 유세포 분석에 의해 분석하였다.

[0487] *통계학적 분석*: 결과들을 그래프패드 프리즘(v4)을 이용하여 그래프를 그려 분석하였다. 대응표본 t 시험을 이용하여 동일한 환자 내에서 비교 분석을 수행하였다. 대응표본 t 시험을 이용하여 환자들 간의 비교 분석을 수행하였다.

[0488] 하기의 결과들이 수득되었다:

[0489] *HCV 항원 특이적 CD8$^+$ T 세포에 대한 PD-1 발현*: HCV 감염을 앓고 있는 17명의 환자(모두 HIV 음성)를 연구하였다(표 1). 15명의 환자들은 유세포 분석에 의한 유전자형 분석을 위해 혈액 및 간 샘플링을 수행하였고, 모든 환자들은 연구를 위한 등록 전에 약리학적 항바이러스 요법으로 처리하지 않았다. 코호트의 7명의 환자는 HLA-A2 양성이었고, 이는 HLA 사량체 염색에 의해 말초 내에서 HCV 특이적 CD8$^+$ T 세포의 집단임이 입증되었다 (표 1). 이러한 HCV 특이적 CD8$^+$ T 세포들을 PD-1 발현에 대해 평가하였다 (도 23A). 건강한 공여자의 말초 혈액 내에 총 CD8$^+$ T 세포에 대한 PD-1 발현 수준은 HCV 감염된 환자들의 말초 CD8$^+$ T 세포의 총 군집의 PD-1 발현 수준과 크게 다르지 않았다 (도 23B). 이와는 대조적으로, 말초 혈액으로부터 샘플링된 대다수의 HCV-특이적 사량체 양성 CD8$^+$ T 세포는 CD8$^+$ T 세포 총 군집에서보다 현저히 높은 수준($p<0.0001$) (도 23B)의 발현을 나타내는 PD-1 양성이었다(평균 85%, SEM 3.6) (도 23A). 분화, 보조억제, 소통(trafficking) 및 효과기 작용 분자의 항원 특이적 CD8$^+$ T 세포에 대한 발현도 조사하였다. HCV-특이적 사량체 양성 세포는 기억 표현형 (높은 수준의 CD11a, 낮은 수준의 CD45RA), 조기 분화 마커 (높은 수준의 CD27, 높은 수준의 CD28, 중간 정도 발현하는 CCR7 및 CD62L) 및 낮은 수준의 효과기 기능의 매개자인 그랜자임 B 및 퍼포린을 나타낸다. 흥미롭게도, 이러한 말초 혈액 내의 HCV 사량체 양성 T 세포는 낮은 수준에서 발현되는 경우 손상된 기억 T 세포 분화를 확인하는 표현형 마커인 CD127 (IL-7 수용체 α 사슬)을 높은 수준으로 발현한다.

[0490] CD8$^+$ T 세포의 표현형이 만성이 아닌 감염의 상황에서는 달라지는지를 알아보기 위해, HCV로 감염되지 않은 5명의 건강한 HLA-A2$^+$ 공여자에서 Flu-특이적 T 세포를 조사하였다. PD-1을 발현하는 말초 Flu 사량체$^+$ CD8$^+$ T 세포는 49%였다 (SEM 14.1) (도 23C). 7명의 HLA-A2 양성인 만성 HCV 환자들 중 5명도 사량체 분석을 통해 Flu 특이적 CD8$^+$ T 세포를 갖는 것으로 확인되었다. 이러한 만성적으로 감염된 HCV 환자들에서 PD-1을 발현하는 Flu-특이적 T 세포의 백분율은 건강한 공여자의 동일한 집단과 크게 다르지는 않았다 (도 23C). 중요한 것은, 7명의 HLA-A2$^+$ HCV 환자들 중 5명도 검출가능한 Flu 특이적 CD8$^+$ T 세포를 가지기 때문에, 각 환자 안에서 비-만성 (Flu) 및 만성 (HCV) 감염에 특이적인 T 세포에 대한 PD-1에 관해서 비교가 이루어질 수 있다는 것이다. PD-1 발현에 있어서 Flu-특이적 및 HCV-특이적 T 세포 간의 차이는 현저하였다 (도 23C). PD-1을 발현하는 HCV 특이적 CD8$^+$ T 세포의 백분율(mean 83%, SEM 6.4)은 PD-1+ Flu 특이적 CD8$^+$ T 세포의 백분율(49%, SEM 12.3) ($p=0.048$)보다 높았다 (도 23C).

[0491] *인간 말초 혈액 및 간 침투성 림프구에서의 PD-1 발현*: HCV로 만성적으로 감염된 15명의 환자에서의 말초 혈액 및 간 생검을 분석하여 PD-1 발현에 대하여 조사하였다. 5명의 환자에 대한 대표적인 유세포 분석은 도 24A에 나타나 있다. 말초 혈액에서 27% (SEM 3.4)의 CD8$^+$ T 세포가 PD-1$^+$이었던 반면, 간에서는 이러한 세포의 빈도수는 2배 이상 증가하였다 (57%, SEM 3.6) (도 24B). 결과적으로, 간은 높은 수준의 PD-1을 발현하는 세포가 풍부한 것이다. 나이브 세포는 CD62L과 CD45RA 모두 높은 수준으로 발현해야 하는 한편, 간에서 대부분의 CD8$^+$ T 세포는 기억 표현형과 일치하는 CD62L^{low}/CD45RA^{low} 이다 (도 24C). 간과 말초 양자 모두에서 이러한 기억 군집에 대해 보다 엄밀히 분석하면, PD-1 발현이 말초에서의 경우에 비해 간에서 증강되었음을 알 수 있다 (도 24C). 이러한 데이터는 간내 T 세포에서 PD-1을 발현하는 세포의 백분율 증가가 단지 그 구획에서 나이브한 군집의 부재에 기인하는 것이 아니라는 것을 시사하는 것이다. 오히려, PD-1$^+$ CD8$^+$ T 효과기 기억 (CD62L^{low}/CD45RA^{low}) 세포의 풍부한 정도는 말초 혈액보다는 간에서 더 우위에 있다 (도 23C).

[0492] *인간 말초 혈액 및 간 침투성 림프구에서의 CD127 발현*: IL-7은 기억 CD8$^+$ T 세포의 유지를 위해 필요하며(문헌 [Kaech et al., Nat Immunol **4**:1191-8, 2003]), 그 수용체의 알파 사슬인 CD127은 지속성 LCMV 및 γ포진바이러스 감염에서 항원 특이적 T 세포에 대해 하향조절된다(예를 들어, 문헌 [Fuller et al., J Immunol

174:5926-30, 2005] 참조). 만성 감염 중 이러한 CD127의 손실은 손상된 사이토킨 생성 기전, 세포사멸에 대한 증가된 감수성 및 숙주에서 살아남기 위한 기억 바이러스-특이적 $CD8^+$ T 세포의 능력 감소와 상관관계가 있다. 따라서, 급성 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염의 해결은 CD127 발현의 상향조절과 이에 수반되는 PD-1 발현의 부수적 손실과 상관관계가 있다 (문헌 [Boettler et al., J Virol 80:3532-40, 2006]). 흥미롭게도, 만성 HCV 환자에서 총 말초 $CD8^+$ T 세포의 20% (SEM 4.8)만이 CD127 음성이었지만, 간 $CD8^+$ T 세포 침윤 병소에 있어서는 이러한 백분율이 58%까지 현저히 증가하였다 (SEM 4.4) (도 24D). 결과적으로, 간은 높은 수준의 PD-1 및 낮은 수준의 CD127 세포가 우세한 소진된 표현을 발현하는 세포가 풍부하다. 이러한 데이터로부터 만성 HCV 환자에서 간 침투성 $CD8^+$ T 세포는 말초 CD8+ T 세포 집단의 표현형을 반영하지는 않는다라는 점을 시사받을 수 있다. 바이러스가 말초 혈액 내의 T 세포와 단핵 세포를 감염시키는 HIV 환경에서는, 낮은 수준의 CD127은 기능 또는 기억 T 세포의 흠결과 관련이 있다 (문헌 [Boutboul et al., Aids 19:1981-6, 2005]). 이 연구에서는, 이러한 소진된 표현형을 나타내는 세포의 간에서의 구분은 그 표현형이 지속성 바이러스 복제 부위에 친밀하게 부착된다는 것을 시사하는 것이다.

[0493] *간에서 HCV 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포에 대한 PD-1 및 CD127 발현*: 코호트의 HLA-A2 환자들 중 2명도 간에서 사량체 염색에 의해 확인가능한 HCV 특이적 군집을 보유하였다 (도 25). 이러한 개체들의 말초:간에서 HCV 특이적 사량체 양성 $CD8^+$ T 세포에 대한 PD-1 및 CD127의 발현을 직접 비교하였다. 말초에서 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포는 대부분 PD-1 양성(평균 85%, SEM 3.6) 및 CD127 양성 (평균 84%, SEM 4.0)이었던 반면에, 간의 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포는 대부분 PD-1 양성(평균 92%)이었지만 소수만이 CD127 양성(평균 13%)이었다 (도 25). 바이러스 복제 부위에서, 높은 수준의 PD-1을 발현하는 CD127 음성 세포의 확장이 있었던 것으로 보인다. 간내 구획과 비교하여 CD127를 차별적으로 발현하는 그러한 말초 항원 특이적 $CD8^+$ T 세포는 CD127의 하향조절을 유도하는데 필요한 항원 노출의 수준 또는 시기 조절과 관련이 있을 수 있다. 마우스의 LCMV 감염에서, 만성 감염의 지속성 항원 용량에 대한 노출시켰더니, CD127은 지속적으로 하향조절되는 반면에, GP33을 이용한 LCMV 항원에의 단시간의 노출은 CD127 발현을 일시적으로만 억제하고 T 세포 소진을 유도하는데에는 실패하였다 (문헌 [Lang et al., Eur J Immunol 35:738-45, 2005]). 항원의 유효성 및 노출 시간에의 의존은 CD62L 및 CD127의 발현에도 영향을 주는 것으로 관찰되었던 반면에, 지속성 항원은 CD62L 및 CD127 양자 모두의 지속적인 하향조절을 야기하였다 (문헌 [Bachmann et al., J Immunol 175:4686-96, 2005]). 이론에 구속됨이 없이, 만성 HCV 감염에서, 말초에서 검출된 소수의 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포는 낮은 CD127 수준을 유지하기에 충분한 항원에 연속적으로 노출되지 않을 수 있다. 따라서, T 세포는 바이러스가 제거되었다고 "믿을 수" 있다.

[0494] *PD-1/PD-L1의 차단은 HCV 특이적 사량체 양성 $CD8^+$ T 세포의 증가된 확장을 초래한다*: 환자 집단의 증거는 PD-1/PD-L1과 항-PD-L1 또는 항-PD-1 항체의 차단이 HCV-특이적 T 세포의 증식 성능을 증진시킨다는 것을 시사한다 (도 26). 동종 펩티드로 6일간 자극한 후 카르복시플루오레신 숙신이미딜 에스테르 $(CFSE)^{low}$ 사량체 표지된 $CD8^+$ T 세포의 빈도를 모니터링함으로써 입증된 바와 같이, IL-2 및 HCV-특이적 펩티드의 존재 하에 차단 항체를 첨가하였더니 HCV-특이적 T 세포의 확장에 있어서 4배의 증대를 유도되었다.

[0495] 이 결과들은 감염 부위인 간에서 PD-1을 발현하는 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포의 빈도가 높다는 것을 보여준다. 둘째, 만성 HCV 감염을 앓는 환자들의 말초 혈액에서 HCV 특이적 $CD8^+$ T 세포 대부분은 높은 수준의 CD127를 발현한다. 만성 HCV 감염에서 T 세포의 표현형은 손상된 효과기 기능 및 T 세포 소진과 관련된 PD-1 분자의 발현을 연구함으로써 특징 지울 수 있다. 상기 결과들은 간내 구획에서 대다수의 HCV 특이적 T 세포가 PD-1을 발현하지만 T 세포 소진과 일관되는 표현형인 CD127을 결핍하고 있음을 보여준다. 따라서, PD-1 길항제는 HCV 감염의 치료를 위한 치료제로서 사용된다.

[0496] **실시예 19: PD-1 차단은 시험관 내 SIV-특이적 CD8 세포의 확장을 유도한다**

[0497] 항-바이러스 CD8 T 세포는 HIV/SIV 감염의 조절에 있어서 중요한 역할을 한다. SIV-감염된 짧은꼬리원숭이에서 생체 내 일시적으로 결핍되는 동안 바이러스가 재출현함으로써 CD8 T 세포에 있어서의 중추적 역할은 입증되었다. 이와 일관되게, 항바이러스 CD8 T 세포의 높은 빈도를 유도하도록 고안된 현재 백신 전략은 짧은꼬리원숭이에서의 병원성 SHIV 및 SIV 면역 반응 유도 전략을 포함하였다 (예를 들어 문헌 [Barouch et al., *Science* 290, 486-92 (2000)]; [Casimiro et al., *J Virol* 79, 15547-55 (2005)] 참고).

[0498] 항바이러스 CD8 T 세포의 기능 및 빈도 양자 모두는 만성 바이러스 감염 예컨대 HIV (문헌 [Migueles et al. *Nat Immunol* **3**, 1061-8, 2002]) 및 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV)의 조절에 있어서 중요하다. 유효한 항바이러스 CD8 T 세포는 서로 다른 사이토킨을 생산하는 능력, 세포독성 잠재력 및 높은 증식성 잠재력과 낮은 세포사멸을 포함하는 다수의 기능적 특성을 보유한다. 만성 바이러스 감염에서, 바이러스-특이적 CD8 T 세포는 이들 기능들 중에서 다수를 상실하는 것과 관련되는 소진을 경험하게 된다(문헌 [Zajac et al., *J Exp Med* **188**, 2205-13, 1998]). 유사하게, 질병이 진행하고 있는 개체에서 HIV-특이적 CD8 T 세포는 그 기능을 손상받는 것으로 나타났다. 이러한 CD8 T 세포는 사이토킨, 예컨대 IFN-γ을 생성할 수 있으나, IL-2(T 세포 증식 및 생존; 세포 붕괴 기능에 중요한 분자인 퍼포린의 발현 (문헌 [Appay et al., *J Exp Med* **192**, 63-75, 2000]); 및 HIV (예를 들어, 문헌 [Harari et al., *Blood* **103**, 966-72, 2004)] 참조)와 SIV의 조절에 중요한 관련 특성인 증식성능에 있어서 중요한 사이토킨)의 생성에 있어서 손상을 받는다. HIV-특이적 T 세포는 높은 수준의 PD-1을 발현하며 이 발현은 바이러스 감염의 수준에 정비례한다. 시험관 내 PD-1과 PD-L1 간의 상호작용을 일시적으로 차단시키면 HIV-특이적 T 세포 기능이 복원된다.

[0499] 짧은꼬리원숭이에서 병원성 SIV 239로 감염시킨 후 SIV-특이적 CD8 T 세포에 있어서 PD-1의 발현을 조사하였다. 이 결과 SIV-특이적 CD8 T 세포는 높은 수준의 PD-1을 발현한다는 것과 시험관 내 PD-1:PDL-1 경로의 차단은 이러한 세포의 증대된 확장을 유도하는 것이 입증되었다. 하기 결과들이 수득되었다:

[0500] *SIV239 감염 후 SIV-특이적 CD8 T 세포에 있어서 상승된 PD-1 발현*: PD-1 발현의 역할과 SIV-감염의 조절과의 그 상관관계를 이해하기 위해, 정상인 건강한 짧은꼬리원숭이 및 SIV-감염된 짧은꼬리원숭이의 CD8 T 세포에 대한 PD-1 발현 수준을 조사하였다. 정상적인 건강한 짧은꼬리원숭이의 총 CD8 T 세포들 중 상당한 비율(40-50%)이 PD-1을 발현하였다 (도 27A). PD-1 발현은 기억 세포에 우선적으로 국한되었으며 나이브한 CD8 T 세포에서는 부재하였다. SIVmac239-감염된 짧은꼬리원숭이의 총 CD8 T 세포에 대해서도 유사한 PD-1 발현 패턴이 관찰되었다 (도 27B 및 C). 그러나, 대다수 (>95%)의 SIV Gag CM9-특이적 CD8 T 세포는 PD-1 발현에 대해 양성이었으며 이들 세포들 중 상당한 비율은 총 CD8 T 세포(MFI 200)에 비해 PD-1 발현을 추가로 상향조절하였다(MFI 580) (도 27D). 종합하면, 이러한 결과들은 정상적인 짧은꼬리원숭이 및 SIV-감염된 짧은꼬리원숭이의 CD8 T 세포의 상당한 비율이 PD-1을 발현하며 이 PD-1 발현의 수준은 SIV-특이적 CD8 T 세포에서 추가적으로 상승된다는 것을 입증한다.

[0501] *시험관 내 PD-1의 차단은 SIV-특이적 CD8 T 세포의 증진된 확장을 유도한다:* SIV-특이적 CD8 T 세포의 기능에 대한 PD-1 차단의 효과를 연구하기 위해, 짧은꼬리원숭이 PD-1에 대해 교차 반응성인 인간 PD-1 분자에 대한 차단 항체의 존재 및 부재 하에 증식 분석을 수행하였다. 병원성 유인원 및 인간 면역결핍 바이러스 89.6P (SHIV 89.6P)로 감염된 Mamu A*01 양성 붉은털 원숭이의 PBMC를 항-PD-1 차단 Ab의 존재 및 부재 하에 P11C 펩티드 (Gag-CM9 에피토프)로 6일 동안 자극시켰다. Gag CM-9 사량체 양성 세포의 빈도를 자극의 후기 시점에 평가하였다. 자극시키지 않은 세포는 음성 대조군으로서 역할을 하였다. 도 28A-28B에서 볼 수 있는 바와 같이, P11C 펩티드를 이용한 자극은 사량체 양성 세포의 빈도에 있어서 약 4-80배 증가를 가져왔다. 또한, 시험된 6마리의 짧은꼬리원숭이 중 4마리에서, 항-PD-1 차단 Ab의 존재 하에서의 P11C 펩티드를 이용한 자극은 차단 항체의 부재 하에서의 P11C 펩티드를 이용한 자극에 비해서 사량체 양성 세포의 빈도에 있어서 약 2-4배의 추가적인 향상을 가져왔다.

[0502] 이러한 결과들은 PD-1 차단이 SIV-감염된 짧은꼬리원숭이에서의 SIV-특이적 CD8 T 세포의 증식 성능을 증대시킨다는 것을 입증한다.

[0503] **실시예 20: PD-L2의 역할**

[0504] 2개의 PD-1 리간드들은 그 발현 패턴에 있어서 차이가 있다: PD-L1은 구조적으로 발현되며 조혈 및 비조혈 세포 양자 모두에서 더 많은 양으로 상향조절되는 반면, PD-L2는 수지상 세포 (DC) 및 대식 세포에서 오직 유도 발현만 된다. PD-L2가 T 세포 활성화에서의 역할을 평가하는 일부 연구에서 PD-L2에 대한 억제 기능을 입증하였지만, 다른 연구들에서는 PD-L2가 T 세포 증식 및 사이토킨 생성을 자극한다고 보고한 바 있다. T 세포 면역 반응에 대한 PD-L2의 역할을 기술하기 위해, LCMV 암스트롱 감염 후 서로 다른 세포 유형에 대한 생체외 PD-L2 발현의 역동적 변화를 조사하였다 (도 29). PD-L1 발현과는 대조적으로, PD-L2 발현은 아주 단시간 동안 (감염 후 1-4일)에 DC에서 제한적으로 발현되었다. 이 결과는 PD-L2 발현이 DC 조절과 밀접하게 관련이 있어 T 세포 활성화의 조절을 유도한다는 것을 시사한다.

[0505] **실시예 21: PD-1은 건강한 인간의 혈액에서 대다수의 효과기 기억 CD8 T 세포에 의해 발현된다**

[0506] 건강한 성인 혈액의 $CD3^+/CD8^+$ T 세포에서의 PD-1 발현을 조사하였다. 인간 혈액에서 $CD8^+$ T 세포의 20-60%는 PD-1을 발현한다. T 세포 분화 상태와 PD-1 발현 간의 관계를 조사하였다. $CD3^+/CD8^+$ T 세포는 CD45RA 및 CCR7 발현 패턴에 기초하여 나이브하고, 중추 기억 (T_{CM}), 효과기 기억 (T_{EM}) 및 말기 분화된 효과기 (T_{EMRA}) 하위군으로 기술되었다. PD-1은 나이브 T 세포 및 약 1/3의 T_{CM} 및 T_{EMRA}에 의해서는 발현되지 않았다. 이와는 대조적으로, 60%의 T_{EM}은 PD-1를 발현하였다. 이들 데이터는 건강한 성인의 혈액으로부터 단리된 대다수의 T_{EM}이 PD-1을 발현한다는 것을 입증한다.

[0507] 이들 분석에 기초하여, T 세포를 CD45RA 및 CCR7 발현을 기준으로 다수의 군집으로 다시 나누었다. CD45RA 발현과 PD-1 발현 간에 추가적인 관계를 밝혀냈다. 구체적으로, 가장 낮은 CD45RA 발현을 나타내는 CCR7-/CD8+ T 세포는 가장 높은 비율의 PD-1+ 세포를 포함하였다. 결론적으로, PD-1은 T_{EM}에 의해 우세하게 발현되며, T_{EMRA} 및 T_{CM}에 의해서는 좀 덜한 정도로 발현되고 나이브한 $CD8^+$ T 세포 사이에서는 발현되지 않았다. 이들 데이터는 건강한 성인에 있어서 큰 비율의 T_{EM} $CD8^+$ T 세포가 PD-1을 발현한다는 것을 설명한다.

[0508] $PD\text{-}1^+$ CD8 T 세포의 특성을 추가적으로 부여하기 위해, PD-1과 일부 T 세포 분화 마커의 공동 발현을 조사하였다. 대다수의 $PD\text{-}1^+$ CD8 T 세포는 항원 경험 및 효과기/효과기 기억 분화와 관련된 마커를 지녔다. 예를 들어, CD11a+/CCR7-/CD62L-/CD45RA-/KLRG1+/그랜자임 B+/퍼포린+ CD8 T 세포는 PD-1 발현에서 풍부하였다. 이와는 대조적으로, 나이브 표현형 (CD11a-/CCR7+/CD62L+/CD45RA+/KLRG1-) CD8 T 세포는 낮은 수준의 PD-1을 발현하였다. 따라서, PD-1은 효과기/효과기 기억 특성을 갖는 항원 경험된 CD8 T 세포에서 우세하게 발현된다.

[0509] **실시예 22: PD-1은 건강한 인간의 혈액에서 대다수의 효과기 기억 CD4 T 세포에 의해 발현된다**

[0510] 다음으로 $CD3^+$ $CD4^+$ T 세포들 중의 PD-1 발현을 조사하였다. 건강한 성인의 혈액에서 34%의 CD4 T 세포가 PD-1을 발현하였다. $CD8^+$ T 세포와 유사하게, 나이브한 CD4 T 세포는 PD-1을 거의 발현하지 않았다. 소수의 T_{CM} CD4 T 세포가 PD-1을 발현하는 한편, PD-1 발현은 T_{EM} CD4 T 세포 중에서 우세하게 풍부하였다 (50%).

[0511] PD-1을 발현하는 CD4 T 세포의 특성을 추가로 부여하기 위해, 건강한 개체들의 혈액으로부터 $CD4^+/CD3^+$ T 세포를 PD-1과 일부 T 세포 분화 마커의 공동 발현에 대해 분석하였다. $CD8^+$ T 세포와 유사하게, PD-1 발현은 CD62L-, CD95+, CD45RA-, CCR7- 및 CCR5+ 세포를 비롯하여 효과기/효과기 표현형을 나타내는 CD4 T 세포에서 풍부하였다.

[0512] **실시예 23: PD-1은 인간의 EBV 및 CMV 감염에 특이적인 CD8 T 세포에서 보다 높게 발현된다**

[0513] PD-1 발현이 바이러스 항원 지속성과 상관관계가 있는지를 시험하기 위해, PD-1 발현을 EBV, CMV, 인플루엔자 및 우두 바이러스 특이적 CD8 T 세포에서 비교하였다. EBV 및 CMV-특이적 CD8 T 세포는 높은 수준의 PD-1을 발현하였다. 이와는 대조적으로, 인플루엔자 바이러스 특이적 기억 CD8 T 세포는 중간 수준의 PD-1을 발현하였고 우두 바이러스 특이적 CD8 T 세포는 낮은 수준의 PD-1을 발현하였다. 따라서, 만성 감염 (EBV 및 CMV)에 특이적인 기억 CD8 T 세포는 급성 (인플루엔자 및 우두) 감염에서 더 높은 수준의 PD-1을 발현하였다. 이들 결과는 만성 감염 (EBV 및 CMV)에 특이적인 CD8 T 세포가 급성 감염 (인플루엔자 및 우두 바이러스)에서 보다 더 높은 수준의 PD-1을 발현하였다는 사실을 나타낸다. 아주 흔한 만성 감염에 특이적인 CD8 T 세포는 높은 수준의 PD-1을 발현할 수 있다.

[0514] **실시예 24: 항-PD-L1 차단은 인간의 EBV 및 CMV 감염에 특이적인 CD8 T 세포의 증식을 증가시킨다**

[0515] PD-1 억제 경로의 차단은 시험관 내 자극시 HIV-특이적 CD8 T 세포의 증진된 클론 증식을 유도한다. 흔한 만성 감염에 특이적인 CD8 T 세포도 PD-1을 발현하기 때문에, PD-1/PD-L1 경로 차단이 EBV, CMV, 그리고 또한 우두 바이러스 (PD-1 기억 CD8 T 세포를 유발하는 급성 감염)에 특이적인 CD8 T 세포의 증식을 증진시킬 수 있는지를 시험하였다. CMV, EBV, 또는 VV에 특이적인 CD8 T 세포를 포함하는 개체들의 혈액으로부터 림프구를 단리하고 CFSE로 표지하여 다양한 조건 하에 6일간 배양하였다. 기대했던 대로, 갓 단리된 말초 혈액 단핵세포 (PBMC)를 배지 단독으로 배양하거나, 또는 항-PD-L1 항체를 갖는 배지로 배양했으나, 바이러스-특이적 CD8 T 세포의 증식을 유발하지 않았다. PBMC를 바이러스 유래의 펩티드로 6일간 자극하였더니 사량체$^+$ CD8 T 세포의 분할이 유발

되었다. 그러나, 항-PD-L1 차단 항체의 존재 하에서 PBMC의 펩티드 자극은 EBV 및 CMV-특이적 CD8 T 세포의 분할을 추가로 증진시켜, 펩티드 단독일 때보다 더 큰 배수의 증식을 유도하였다. 항-PD-L1 차단 항체에 의해 유도된 증가된 분할은 개체들 간에 그리고 심지어는 주어진 개체 내의 서로 다른 에피토프 간에도 다르다. 또한, PD-1 차단은 우두 또는 인플루엔자 특이적 CD8 T 세포의 증대된 증식을 유발하지는 않는다. 배양물에서 차단 PD-L1에 이해 유도된 증대된 분할 정도는 자극 이전에 항원 특이적 CD8 T 세포에 의해 발현된 PD-1의 양에 관련이 있을 수 있다. 이러한 데이터는 만성 감염에 특이적인 CD8 T 세포에서의 PD-1 발현이 항원성 자극을 받을 때 그들의 증식 성능을 억제한다는 것을 시사하고 있다.

[0516] **실시예 25: 지속된 PD-L1 차단은 만성 감염에 특이적인 CD8 T 세포의 증식을 증진시킨다**

[0517] 생체 내 자극시, PD-L1 차단 항체의 첨가는 EBV 및 CMV에 특이적인 CD8 T 세포들 사이에서 증가된 분할을 유발하였다. 항-PD-L1 mAb를 한번 첨가하고 (0일째), 6일간의 배양 기간 후기에 증식을 평가하였다. 마우스에서 생체 내 항-PD-L1 처리는 차단 항체를 여러번 주입하는 단계를 포함한다. 또한, 이러한 쥐과의 연구에서, 생체 내 PD-L1 차단은 만성 바이러스 항원에 특이적인 CD8 T 세포에서 PD-1 발현의 신속한 상향조절을 유발시켰다. 이러한 이유때문에, 자극된 T 세포 배양물의 항-PD-L1의 반복 첨가가 증식을 추가로 증진시킬 수 있는지를 시험하였다. 배양 0일째, 2일째 및 4일째에 α-PD-L1 mAb의 첨가는 0일째에 mAb의 단일 첨가시의 경우에 비해 EBV 특이적 CD8 T 세포의 더 큰 축적을 가져왔다. 유사한 데이터가 CMV 특이적 CD8 T 세포에 대해서도 관찰되었다. 이러한 데이터는 PD-1 신호 전달의 연속된 차단이 만성 항원에 특이적인 CD8 T 세포의 수를 증가시키는 능력을 최적화할 수 있음을 시사하고 있다.

[0518] **실시예 26: 실시예 27에 개시된 연구를 위한 추가의 방법**

[0519] *연구 그룹:* SIV로 감염시킨 14 마리의 인디안 붉은털 원숭이(*Macaca mulatta*)를 연구하였다. 8 마리의 원숭이를 초기 만성 감염을 위해 이용하였으며, SIV251의 200 TCID50로 정맥내 감염시켰다. 6 마리의 원숭이를 후기 만성 감염을 위해 이용하였으며, 3 마리는 SIV251 직장내 감염시키고, 3 마리는 SIV239로 정맥내 감염시켰다. RDb11을 제외한 모든 원숭이는 Mamu B08 및 Mamu B17 대립유전자에 대해 음성이었다. RDb11은 Mamu B17 대립유전자에 대해 양성이었다.

[0520] *생체내 항체 치료:* 원숭이에게 부분 인간화된 마우스 항-인간 PD-1 항체(클론 EH12-1540)(Dofrman et al., *Am J Surg Pathol* 30, 802-810 (2006)) 또는 대조군 항체(SYNAGIS)를 주입하였다. 항-PD-1 항체는 (FcR 및 보체 결합을 줄이기 위해 돌연변이된) 인간 IgG1에 결합된 마우스 가변 중쇄 도메인(Xu et al., *Cell Immunol* 200, 16-26 (2000)) 및 인간 κ에 결합된 마우스 가변 경쇄 도메인을 가진다. 클론 EH12는 원숭이 PD-1에 결합하여 PD-1과 그 리간드 간의 상호작용을 시험관 내에서 차단한다(Velu et al., *J Virol* 81, 5819-5828 (2007). SYNAGIS는 호흡기 세포 융합 바이러스(Medimmune)의 F 단백질에 특이적인 인간화된 마우스 모노클로날 항체 (IgG1κ)이다. 0일, 3일, 7일 및 10일에 체중 1 kg당 3 mg으로 항체를 정맥내 투여하였다.

[0521] *면역 반응:* 직장 핀치 생검으로부터 림프구 및 혈액 유래 말초혈 단핵 세포를 전술한 바와 같이 분리하였다 (Velu et al., *J Virol* 81, 5819-5828 (2007). 사량체 염색(Amara et al., *Science* 292, 69-74 (2001)), 세포내 사이토킨 생성(Kannanganat *et al., J Virol* 81, 8468-8476 (2007)) 및 항-SIV Env 결합 항체의 측정(Lai et al., *Virology* 369, 153-167 (2007))을 전술한 바와 같이 실시하였다.

[0522] *B 세포 반응:* 혈액 총 100 ㎕를, 각각 상이한 형광색소에 접합시킨 CD3(클론 SP34-2, BD Biosciences), CD20(2H7, e-Biosciences), CD21(B-ly4, Becton Dickson) CD27(M-T2712, Becton Dickson) 및 PD-1(클론 EH-12)에 대한 항체로 염색하였다. 세포를 용해시키고 FACS 용해액으로 고정하고, 제조자의 지시에 따라서 FACS perm(BD Biosciences)을 사용하여 투과시켰다. 그 다음 피코에리트린(PE)에 접합된 항-Ki37(클론 B56, Becton Dickson)을 사용하여 세포내 Ki67에 대해 세포를 염색하였다. 염색 후에, LSRII(BD Biosciences)를 사용하여 세포를 세척하여 얻고 FLOWJO™ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0523] *항-PD-1 항체의 역가 및 혈청중 항-PD-1 항체에 대한 원숭이 항체 반응:* 항-PD-1 항체 수준을 측정하기 위해서, 플레이트를 염소 항-마우스 면역글로불린(인간 면역글로불린으로 사전흡수됨, Southern Biotech)으로 코팅하고, 상이한 혈청 희석액으로 차단 및 항온처리하여 차단성 항체를 포집하였다. HRP(인간 면역글로불린에 사전흡수됨, Southern Biotech)에 접합된 항-마우스 IgG를 사용하여 결합된 항체를 검출하였다. 동일한 방식으로 포집된 차단성 항체 기지량을 이용하여 표준 곡선을 형성하였다. 항-PD-1 항체에 대한 원숭이 항체 반응의 수준을 측정하기 위해서, 플레이트를 항-PD-1 항체(5 $\mu g\ ml^{-1}$)로 코팅하고, 상이한 혈청 희석액으로 차단 및 항온처리하여 항-차단성 항체를 포집하였다. HRP(Southern Biotech)에 접합된 항-인간 λ-사슬 특이적 항체를 사

용하여 결합 항체를 검출하였다. 이 검출 항체는 차단성 항체에 결합하지 않는데, 그 이유는 중쇄 및 경쇄 불변부만이 인간화되고 경쇄의 불변부는 κ이기 때문이다. 항-원숭이 면역글로불린을 사용하여 포집된 정제된 원숭이 면역글로불린 기지량으로 이루어진 표준 곡선을 사용하여 포집된 원숭이 면역글로불린의 양을 추정하였다.

[0524] *SIV 카피수의 정량:* SIV 카피수는, 앞서 개시한 바와 같은 정량적 실시간 PCR을 이용하여 측정하였다(Amara et al., *Science* **292**, 69-74 (2001)). 모든 표본을 추출하고 이중으로 증폭시켰으며, 평균 결과를 보고하였다.

[0525] *Tat TL8 에피토프의 증폭 및 서열결정:* Tat TL8 에피토프를 포함하는 350-뉴클레오티드 단편은 제한 희석 RT-PCR로 증폭시켰다. QIAAMP™ Viral RNA 미니 키트(Qiagen)를 사용하여 혈장으로부터 바이러스 RNA를 추출하였다. 제조자의 프로토콜을 이용하여 vRNA를 SIVmac239-특이적 프라이머 Tat-RT3(5'-TGGGGATAATTTTACACAAGGC-3') 및 Superscript III(Invitrogen)로 역전사시켰다. 생성된 cDNA를 희석하고, 네스티드 PCR 프로토콜에서 실험적으로 카피수를 측정하였다. 제한 희석, 네스티드 PCR은, 하기 프라이머와 함께 Expand HiFi PCR 키트(Roche Applied Sciences)를 사용하여 반응당 ~0.2 카피로 실시하였다:

[0526] 외부 프라이머:

[0527] Tat-F1(5'-GATGAATGGGTAGTGGAGGTTCTGG-3') (서열 번호 53)

[0528] Tat-R2(5'-CCCAAGTATCCCTATTCTTGGTTGCAC-3') (서열 번호 54)

[0529] 내부 프라이머:

[0530] Tat-F3(5'-TGATCCTCGCTTGCTAACTG-3') (서열 번호 55)

[0531] Tat-R3(5'-AGCAAGATGGCGATAAGCAG-3') (서열 번호 56).

[0532] 하기 프로그램을 이용하여 제1 라운드의 사이클 반응을 실시하였다: 1분 동안 94℃, 이후 30초 동안 94℃, 30초 동안 55℃ 및 1분 동안 68℃의 10 사이클, 이후 제1의 10 사이클과 동일하지만 매 사이클마다 연장 시간에 5초를 추가한 25 사이클 이상, 이후 7분 동안 68℃의 최종 연장. 하기 프로그램을 이용하여 제1 라운드의 사이클 반응을 실시하였다: 1분 동안 94℃, 이후 30초 동안 94℃, 30초 동안 53℃ 및 1분 동안 68℃의 35 사이클, 이후 7분 동안 68℃의 최종 연장. ExoSap-IT(USB Corporation) 후의 클린업 후에, 자동 서열기에서 내부 프라이머를 사용하여 PCR 산물을 직접 서열결정하였다. Sequencher 4.8(Gene Codes Corporation)을 이용하여 콘틱을 조립하였다. 이중 크로마토그램 피크를 가지는 뉴클레오티드 함유 앰플리콘을 배제하였다.

[0533] *통계학적 분석:* 항-PD-1 항체 처리된 동물과 대조군-항체-처리된 동물 사이의 혈액 화학 및 전혈구검사 값의 차이를 측정하기 위해서 선형 혼합 효과 모델을 사용하였다. Bonferroni 방법을 사용하여 다회 테스트에 대한 *P* 값을 조정하였다. PD-1 차단 전후에 면역반응 비교를 위해 페어드 t-테스트를 사용하였다. 데이타가 정규화되지 않고 로그값은 정규화되는 경우에는 로그 변환 데이트를 사용하였다. Wilcoxon 순위합 테스트(Wilcoxon rank-sum test)를 사용하여 그룹 간의 바이러스 양의 감소 배수를 비교하였다. Mantel-Haenszel 로그 순위 테스트를 이용하여 그룹 간의 생존 곡선을 비교하였다. S-PLUS 8.0을 사용하여 통계학적 분석을 실시하였다. 양쪽 $P < 0.05$는 통계학적으로 유의적인 것으로 간주하였다.

[0534] **실시예 27: PD-1 차단에 의해 유도되는 기억 B 세포의 증식**

[0535] 만성 면역결핍 바이러스 감염은 세포성 및 체액성 항바이러스 면역 반응의 부전을 특징으로 한다. 따라서, 바이러스 특이적 면역성의 기능을 증강 및/또는 회복하는 면역 조절 요법으로 질병 진행을 방지할 수 있다. 만성 유인원 면역결핍 바이러스(SIV) 감염 동안 동시억제 수용체 예정된 세포사 1(PD-1) 차단의 안전한 면역 회복 가능성을 짧은꼬리원숭이에서 조사하였다. PD-1에 대한 항체를 사용한 PD-1 차단은 잘 관용되며 기능성이 향상된 바이러스 특이적 CD8 T 세포의 급속한 증식을 초래하는 것이 입증되었다. T 세포 면역성 향상은 혈액과 SIV 감염의 주요 저장소인 장에서도 관찰되었다. PD-1 차단은 또한 기억 B 세포의 증식과 SIV 엔벨로프 특이적 항체의 증가를 초래하였다. 면역 반응 개선은 혈장 바이러스 양의 유의적인 감소와 관련이 있으며 SIV 감염된 짧은꼬리원숭이의 생존을 연장시켰다. 중증 림프구감소증 증상 하에서도 만성 감염의 초기(10주)와 후기(~90주) 동안 차단이 효과적이었다. 이들 결과는 단일 억제 경로를 차단하여 병원체 면역결핍 바이러스 감염 동안 세포성 및 체액성 면역 반응의 증강을 입증하며 인간 면역결핍 바이러스/후천성 면역결핍 증후군에 대한 신규한 치료법을 확인시켜주는 것이며, B 세포 반응 모니터링을 이용하여 치료 효능을 평가할 수 있음을 입증한다.

[0536] 바이러스 특이적 T 세포는 만성 감염 동안 다양한 정도의 기능 손상을 나타낸다(Wherry et al., *Immunity* 27, 670-684 (2007); Klenerman et al., *Nat Immunol* 6, 873-879 (2005)). 이들 T 세포가 일부 항바이러스 기능을

보유하지만, 급성 감염시 관찰되는 항바이러스 T 세포와 비교하여 다작용성이 적다. T 세포 기능의 결함은 숙주가 지속성 감염원을 제거하는 능력 부재에 크게 기인한다. 바이러스 특이적 T 세포의 소진은 마우스의 지속성 LCMV 감염(Zajac et al.,*J Exp Med* 188, 2205-2213 (1998); Galimore et al., *J Exp Med* 187, 1383-1393 (1998)) 및 다른 바이러스 감염, 예를 들어 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간의 B형 간염 바이러스(HBV) 및 C형 간염 바이러스(HCV) 감염(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)) 동안 존재하는 것으로 개시되어 있다. 동시억제성 수용체 PD-1은 소진된 바이러스 특이적 CD8 T 세포에 의해 고도로 발현된다(Barber et al., *Nature* 439, 682-687 (2006); Sharpe et al., *Nat Immunol* 8, 239-245 (2007)). PD-1은 또한 HIV-1 특이적(Petrovas et al., *J Exp Med* 203, 2281-2292 (2006); Day et al., *Nature* 443, 350-354 (2006)) 및 SIV-특이적(Velu et al., *J Virol* 81, 5819-5828 (2007))에서 상향조절된다. CD8 T 세포 및 시험관내 PD-1 차단은 이들 세포의 사이토킨 생성 및 증식 능력을 향상시킨다. SIV/짧은꼬리원숭이 모델을 이용하여 만성 면역결핍 바이러스 감염 동안 바이러스 특이적 세포성 및 체액성 면역의 안전한 회복에 대한 PD-1의 생체내 차단 효과를 평가하였다.

[0537] PD-1 차단은 짧은꼬리원숭이 PD-1과 그 리간드(PDL)의 시험관내 상호작용을 차단하는 인간 PD-1에 특이적인 항체를 사용하여 실시하였다(Velu et al., *J Virol* 81, 5819-5828 (2007). 만성 SIV 감염의 초기(10주) 및 후기(~90주) 동안 차단을 실시하였다. 9 마리의 짧은꼬리원숭이(초기 5마리 및 후기 4마리)에게 항-PD-1 항체를 제공하고 5마리의 짧은꼬리원숭이(초기 3 마리 및 후기 2 마리)에게 이소타입 대조군 항체를 제공하였다(Synagis, 항-라우스 육종 바이러스(RSV)-특이적) (Malley et al., *J Infect Dis* 178, 1555-1561 (1998)).

[0538] 만성 SIV 감염 동안 PD-1 차단은 모든 짧은꼬리원숭이의 혈액에서 SIV-특이적 CD8 T 세포의 급속한 증식을 초래하였다(도 30a, b). 2종의 면역우성 에피토프 Gag CM9 및 Tat SL8/TL8에 대한 CD8 T-세포 반응(Allen et al., *Nature* 407, 386-390. (2000))은, Mamu A*01 주요 조직적합성 분자를 발현하는 대조군 항체 처리된 짧은꼬리원숭이 3 마리와 항-PD-1 항체 처리된 짧은꼬리원숭이 7 마리에서 주요 조직적합성 복합체(MHC) I 사량체 복합체를 사용하여 연구하였다. Gag-CM9 사량체-특이적 CD8 T 세포의 대부분(>98%)은 차단 전에 PD-1을 발현하였다. PD-1 차단 후에, Gag-CM9 사량체 특이적 CD8 T 세포는 급속하게 증식하였으며 7-21일에 피크였다. 피크 반응시, 이들 수준은 0일째의 각 수준보다 약 2.5-11배 더 높았으며(P = 0.007), 28-45일까지 여전히 높았다(도 30b). 만성 SIV 감염의 초기 및 후기 동안 차단과 함께 유사한 결과가 관찰되었다. Gag 특이적 인터페론(IFN)-γ-양성 CD8 T 세포 빈도의 3-4배 증가가 또한 2마리의 Mamu A*01-음성 동물(RTd11 및 RDb11)에서의 차단 14일 후에 관찰되었는데, 이는 PD-1 차단이 비-Mamu A*01 대립유전자에 의해 제한되는 바이러스 특이적 CD8 T 세포 빈도를 증가시킬 수 있다는 것을 입증한다. 예상한 바와 같이, SIV-특이적 CD8 T 세포의 증식이 대조군-항체-처리된 짧은꼬리원숭이에서는 관찰되지 않았다(도 30).

[0539] PD-1 차단은 또한 기능성이 향상된 생체내 활성 세포분열을 진행하는 바이러스 특이적 CD8 T 세포 빈도의 유의적인 증가와 관련이 있다(도 30b). SIV 특이적 CD8 T 세포의 급속 증식과 함께, Ki67(증식 세포에 대한 마커)를 동시발현하는 Gag-CM9 사량체 특이적 CD8 세포의 빈도는 또한 차단 7일 후까지 초기에 증가하였다(P = 0.01). 유사하게, 퍼포린 및 그랜자임 B(세포용해능; 각각 P = 0.001 및 P = 0.03), CD28(동시자극능; P = 0.001), CD127(증식능; P = 0.0003)(Kaech et al., *Nat Immunol* 4, 1191-1198 (2003)) 및 CCR7(핌프절 귀소능; P = 0.001)을 동시발현하는 Gag-CM9 사량체 특이적 CD8 T 세포 빈도 증가가 관찰되었다(Salusto et al, *Nature* 401, 708-712. (1999)). 차단 후 사량체 음성 및 Ki67 양성 CD8 T 세포 빈도의 일시적인 1.5-2배 증가가 또한 관찰되었다. 이것은 Gag에서 다른 에피토프에 특이적인 CD8 T 세포 증식뿐 아니라 SIV의 다른 단백질과 이들 동물에서의 다른 만성 바이러스 감염에 기인하는 것이다. 3마리의 대조군-항체-처리된 짧은꼬리원숭이에서 이들 마커에 대한 유의적인 증가는 관찰되지 않았다.

[0540] 특히, 차단 후 Tat-TL8-특이적 CD8 T 세포에 대한 증식은 관찰되지 않았다. 이것은, T 세포 수용체를 통해 동시에 신호를 수신하는 경우에만 PD-1 차단이 T 세포 증식을 초래하는 것으로 알려진 것처럼, Tat-TL8-특이적 CD8 T 세포에 의한 인식으로부터의 바이러스 회피에 기인할 수 있다. 이러한 가능성을 시험하기 위해서, SIV251에 감염되고 감염 초기에 차단 항체를 제공받은 모두 3 마리의 Mamu A*01-양성 짧은꼬리원숭이로부터 차단 개시 직전에 혈장에 존재하는 바이러스 게놈을 서열결정하였다. 실제로, 바이러스 게놈의 돌연변이는 Tat TL8 에피토프 영역에 해당하는 것으로 밝혀졌다. 이들 모든 돌연변이는 Mamu A*01 MHC 분자에 대한 Tat SL8/TL8 에피토프의 결합을 감소시켜, Tat-SL8/TL8-특이적 CD8 T 세포에 의한 인식으로부터 회피되는 것으로 확인되거나 또는 밝혀졌다(Allen et al., *Journal of Immunology* 160, 6062-6071 (1998); Allen et al., *Nature* 407, 386-390. (2000)). 이들 결과는 생체내 PD-1 차단이 바이러스 에피토프의 돌연변이체 회피에 특이적인 T 세포의 증식을

초래하지 않을 수 있음을 제안한다.

[0541] PD-1 차단은 또한 SIV/HIV 복제 선호 부위인 결장직장 점막 조직(장)에서 Gag-CM9-특이적 CD8 T 세포의 증식을 초래한다(Pierson et al., *Annu Rev Immunol* 18, 665-708 (2000))(도 30c). 7 마리의 짧은꼬리원숭이 중 2 마리에 대해 증식이 관찰되지 않았지만, 이중 한 마리에서는 혈액중에서의 증식이 입증되었다. 혈액과 대조적으로, 장에서의 증식은 42일까지 후기에 더욱 높았고 각각 0일째 수준에 비하여 2배 내지 3배 범위였다(P = 0.003). 혈액과 유사하게, Ki67(P = 0.01), 퍼포린(P = 0.03), 그랜자임 B(P = 0.01) 및 CD28(P = 0.01)를 동시발현하는 Gag-CM9 사량체 특이적 세포는 또한 차단 후 장에서 증가하였다.

[0542] PD-1 차단은 항-바이러스 CD8 T 세포의 기능성을 향상시키고, 사이토킨 IFN-γ, 종양 괴사 인자(TNF)-α 및 인터페론 (IL)-2를 동시 생산할 수 있는 다작용성 세포를 형성한다(도 31). 만성 감염 후기에서 PD-1 차단의 개시일에, Gag-특이적 IFN-γ-양성 세포의 빈도는 낮았으며, TNF-α 및 IL-2를 동시발현하지 못하였다(도 31a). 그러나, 차단 후에, 모두 4 마리의 PD-1 항체-처리된 짧은꼬리원숭이에서 IFN-γ-양성 세포 빈도는 증가하였고(P = 0.03) TNF-α 및 IL-2를 동시발현하는 능력을 획득하였다. IFN-γ-양성 세포의 증식은 14-21일까지 피크였으며, 피크 수준은 각각 0일째 수준의 2-10배였다. 21일에, 총 Gag-특이적 세포의 약 16%가 모든 3종의 사이토킨을 동시발현하였으며, 약 30%가 IFN-γ 및 TNF-α를 동시발현하였다(도 31b). 이것은 총 Gag 특이적 세포의 <1%가 3종 모두의 사이토킨을 발현하고(P = 0.01), 약 14%가 0일째에 IFN-γ 및 TNF-α를 동시발현하는(P = 0.04) 것과는 대조적이다. 만성 감염 초기에 차단 후에 유사한 결과가 또한 관찰되었다.

[0543] 만성 면역결핍 바이러스 감염은 B-세포 기능부전과 관련이 있지만(De Milito, *Current HIV Research* 2, 11-21 (2004); Moir and Faucci, *J Allergy Clin Immunol* 122, 12-19; quiz 20-11 (2008)), B-세포 기능/소진 조절에 있어서 PD-1 역활에 관해 알려진 것은 거의 없다. SIV 감염된 짧은꼬리원숭이에서 PD-1 차단 후 B 세포 반응(도 32)을 특성규명하였다. PD-1 차단 이전에 상이한 B 세포 서브세트에서의 PD-1 발현 분석 결과, 나이브 B 세포($CD20^+CD27^-CD21^+$; 도 32a, P < 0.001)와 비교하여 기억 B 세포($CD20^+CD27^+CD21^-$)에 의해 PD-1 우선 발현이 확인되었다. PD-1의 생체내 차단은 차단 후 28일까지 SIV 특이적 결합 항체 역가를 2-8배 증가시켰다(P < 0.001; 도 32b).

[0544] 항-PD-1 항체 및 항-레트로바이러스 요법과 동시에 처리한 SIV 감염 짧은꼬리원숭이에서 기억 B 세포 증식을 연구하였으며, 3일 정도의 초기에 나이브 B 세포는 아니지만, $Ki67^+$(증식성) 기억 B 세포의 유의적인 증가가 관찰되었다(도 32c). 이들 결과는 만성 SIV 감염 동안 B-세포 기능부전을 조절하는 데 있어서 PD-1-PDL 경로의 역할을 입증하는 것이다. 중화 분석 결과 쉽게 중화가능한 실험실 적응 SIV251에 대한 역가는 2배 증가하지만 중화가 어려운 야생형 SIV251 또는 SIV239에 대한 역가는 증가하지 않는다는 것을 밝혀준다. 항-PD-1 항체로 처리한 9 마리의 동물 중 2 마리에서, 차단 후 최소(<2배)한의 SIV 특이적 항체 증식이 관찰되었다. 특히, 이들 2 마리의 동물에서 총 기억 B 세포 빈도는 차단 전의 남은 7 마리의 동물(총 B 세포의 60-90%)와 비교하여 낮았으며(총 B 세포의 ~40%), 이는 차단 전에 SIV 특이적 기억 B 세포의 수준이 차단 후 SIV 특이적 항체의 증식 수준을 결정할 수 있음을 나타낸다.

[0545] PD-1 차단은 혈장 바이러스혈증을 유의적으로 감소시키며(P = 0.03), SIV 감염 짧은꼬리원숭이의 생존을 연장시켰다(P = 0.001; 도 33). 만성 감염 초기 동안 항-PD-1 항체로 처리한 5 마리의 짧은꼬리원숭이 중 2 마리에서, 바이러스 양이 10일까지 감소하였으며, 90일까지 이 수준 또는 그 이하를 유지하였다(도 33a). 한 마리의 짧은꼬리원숭이에서는 바이러스 양이 일시적으로 감소하였으며, 남은 2 마리의 짧은꼬리원숭이에서는 일시적으로 증가하였다가 다시 차단전 수준으로 복귀하였다. 만성 감염 초기와 대조적으로, 만성 감염 후기 동안 항-PD-1 항체로 처리한 모두 4 마리 짧은꼬리원숭이가 7일까지 일시적인 바이러스혈증 증가를 나타내었지만, 21일까지 바이러스 양이 각각 0일째의 수준 이하의 수준으로 급속히 감소하였다(도 33b). 그러나, 바이러스 RNA 수준은 43일까지 차단전 수준으로 복귀되었다. 예상한 바와 같이, 대조군 항체로 처리한 5 마리의 짧은꼬리원숭이 중 어떤 원숭이에서도 혈장 바이러스 양의 유의적인 감소는 관찰되지 않았다(도 33c). 차단 후 21-28일까지, 항-PD-1 항체 처리된 동물의 바이러스 RNA 수준은 각각의 0일째 수준보다 2-10배 더 낮다(P = 0.03; 도 33d). 차단후 150일까지, 대조군에서 5 마리의 짧은꼬리원숭이 중 4 마리가 AIDS 관련 증상으로 죽었지만(예를 들어, 식욕부진, 설사, 체중 감소), 항-PD-1 항체 처리된 그룹에서는 9 마리 동물 모두 생존하였다(P = 0.001; 도 33e).

[0546] 후기 치료 동물 전부와 초기 치료 동물 일부에서 혈장 바이러스혈증 수준의 초기 상승 관찰은 활성화된 CD4 T 세포 빈도 증가에 기인하는 것일 수 있다. 차단 후 Ki67-양성 총 CD4 T 세포의 빈도뿐 아니라, SIV Gag-특이적 IFN-γ-생산 CD4 T 세포(바이러스 복제를 위한 우선 표적(Douek et al., *Nature* 417, 95-98 (2002))의 빈도를

측정하였다. 이들 분석으로 차단 후 7-14일까지 Ki67-양성 CD4 T 세포의 일시적인 증가가 확인되었으며(P = 0.002), 이러한 증가는 감염 초기보다 후기 동안 치료된 동물에서 더 높았다(P = 0.015). 유사하게, Gag-특이적 CD4 T 세포의 빈도 증가가 또한 관찰되었지만, 감염 후기 동안 치료된 동물에서만 관찰되었다. 대조군-항체 처리된 짧은꼬리원숭이에서 활성화된 CD4 T 세포에 대한 유의적인 증가는 관찰되지 않았다. 이들 결과는 활성화된 CD4 T 세포가 차단 후 혈장 바이러스혈증 수준의 초기 증가 관찰의 원인임을 제시하는 것이다.

[0547] PD-1 차단 개시 전에, 혈장 중 설정 바이러스 양과 혈액 및 장에서의 총 CD4 T 세포는 항-PD-1 항체 처리된 그룹과 대조군-항체 처리된 그룹에서 유사하였다. 그러나, 퍼포린, 그랜자임 B 또는 CD28을 동시발현하는 Gag $CM9^+$ 세포 및 Gag $CM9^+$ 세포의 빈도는 생체내 차단 전에 2 치료 그룹에서 유사하지 않았다(도 30b). 이것은, 이러한 차이가 PD-1 차단 후 Gag $CM9^+$ 세포 증식에 기여할 가능성을 높인다. 차단후 증식에 대한 차단전 Gag $CM9^+$ 세포 빈도의 영향을 연구하기 위해서, 항-PD-1 항체 처리된 그룹을 차단 개시 전에 Gag $CM9^+$ 세포 빈도에 기초하여, 한 그룹은 대조군-항체 처리 그룹과 유사한 수준을 가지고, 다른 그룹은 더 높은 Gag $CM9^+$ 세포 수준을 가지도록 2개의 하위그룹으로 나누었다. 그 다음 이들 하위그룹을 차단 후 $CM9^+$ 세포의 증식에 대해 분석하였다. $CM9^+$ 세포 증식은, 차단 전의 수준이 높았든 낮았든 무관하게, PD-1 차단 후에 양 하위그룹의 동물에서 나타났다. 퍼포린, 그랜자임 B, CCR7, CD127 또는 CD28과 같은 더욱 양호한 T 세포 기능과 관련된 분자를 동시발현하는 $CM9^+$ 세포의 빈도에 기초한 하위그룹 분석을 이용한 경우 유사한 결과가 또한 관찰되었다. 그러나, 차단 전 $CM9^+CD28^+$ 세포 수준이 높은 동물에서 $CM9^+CD28^+$ 세포 증식이 더욱 양호한 경향이 있었는데, 이는 CD28 발현이 시험관내 PD-1 차단 결과를 예측하는 바이오마커로서 작용함을 제시하는 것이다.

[0548] PD-1 차단 안전성을 평가하기 위해서, 혈청 단백질, 이온, 지질, 간 및 신장 효소과, 차단후 전혈구 계수를 집중 분석하였다. 이들 분석 결과 항-PD-1 항체 처리된 짧은꼬리원숭이와 대조군-항체 처리된 짧은꼬리원숭이 간에 시험한 모든 파라미터에 대한 유의적인 변화가 없는 것으로 밝혀졌다. 유사하게, 혈청 중 항-핵항체(ANA)(자가 면역의 척도)의 수준은 또한 항-PD-1 항체로 처리한 후 유의적으로 변하지 않았다.

표 6

항 PD-1 항체 처리 후 혈액의 생화학적 파라미터

마커	감염전* (n=8)	SIV 감염후, PD-1 차단후 일수* (n=5)		
생화학적 프로파일		0 일	14 일	56 일
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
알칼리 포스파타제 (U/L)	466 ± 135	410 ± 367	367 ± 78	451 ± 89
빌리루빈 (g/L)	0.2 ± 0.1	0.16 ± 0.1	0.12 ± 0.0	0.2 ± 0.2
크레아티닌 (mg/dL)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.66 ± 0.1	0.6 ± 0.1
총 단백질 (g/dL)	7.3 ± 0.3	7.0 ± 0.3	7.24 ± 0.4	6.9 ± 0.4
알부민 g/L	4.5 ± 0.3	4.28 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2
글로불린 (g/dL)	2.7 ± 0.2	2.72 ± 0.3	3.14 ± 0.3	2.8 ± 0.2
알부민/글로불린 (비율)	1.7 ± 0.2	1.62 ± 0.2	1.32 ± 0.1	1.4 ± 0.1
글루코스 (mg/dL)	82 ± 16	69 ± 8	66 ± 9	64 ± 8.0
콜레스테롤 (mg/dL)	161 ± 32	149 ± 32	145 ± 20	140 ± 18
트리글리세라이드 (mg/dL)	58 ± 19	64 ± 12	60 ± 7	73 ± 34
혈중 우레아 질소 (mg/dL)	18 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	16 ± 3
혈중 우레아 질소-크레아티닌 (비율)	21 ± 3	24 ± 5	26 ± 5	26 ± 5
리파제 (U/L)	21 ± 17	20 ± 7	21 ± 9	23 ± 10
크레아티닌 포스포키나제 (U/L)	428 ± 272	537 ± 303	486 ± 129	462 ± 312**
감마 글루타밀 트랜스펩티다제 (U/L)	74 ± 23	66 ± 16	58 ± 18	71 ± 15
칼슘(mg/dl)	10 ± 0.5	10 ± 0.2	10 ± 0.5	10 ± 0.3
클로라이드 (mEq/L)	110 ± 3	107 ± 3	108 ± 1	107 ± 2
칼륨 (mEq/L)	4 ± 0.3	4 ± 0.2	4 ± 0.1	4 ± 0.6
나트륨 (mEq/L)	150 ± 5	149 ± 3	149 ± 1	147 ± 2
인 (mg/dL)	5 ± 0.9	5 ± 0.6	5 ± 0.8	6 ± 0.4

*값은 평균 ± 표준편차를 나타낸다.

[0549] **56 일에 RBC 세포용해로 인해 91 일 값을 이용하였다.

표 7

항-PD-1 항체 처리 후 전혈구 계수

세포	감염전* (n=8)	SIV 감염후, PD-1 차단후 일수* (n=5)		
		0 일	14 일	56 일
적혈구 (백만/mm^3)	5.7 ± 0.3	5.9 ± 0.3	5.4 ± 0.4	5.9 ± 0.3
헤마토크릿 (%)	41 ± 1	42 ± 1	38 ± 2	41 ± 2
백혈구 (μL 당)	8500 ± 2171	9260 ± 3685	7500 ± 2068	7800 ± 1972
호중구(계수/μL)	3685 ± 1883	3274 ± 2124	2573 ± 865	2028 ± 1585
림프구(계수/μL)	4477 ± 1583	4700 ± 1791	4235 ± 1880	5041 ± 1705
단핵구 (계수/μL)	166 ± 116	635 ± 374	336 ± 123	350 ± 206
호산구 (계수/μL)	161 ± 155	591 ± 580	277 ± 275	342 ± 175
호염기구 (계수/μL)	10 ± 29	29 ± 65	78 ± 78	37 ± 53
혈소판 (계수/μL)	341 ± 64	275 ± 45	364 ± 79	241 ± 74

[0550] *값은 평균 ± 표준편차를 나타낸다.

[0551] 한 마리의 짧은꼬리원숭이에서, ANA 수준은 차단 10일 후까지 약 3배 증가하였지만, 56일까지 0일 수준으로 복귀되었다. 이들 결과는 만성 SIV 감염 동안 항-PD-1 항체 처리가 관찰가능한 독성을 초래하지 않는다는 것을 입증하는 것이다. 이는 진행된 혈액 악성종양 환자에서 PD-1 차단 안전성을 입증하는 최근 연구와 일치하는 것이다(Berger et al., *Clin Cancer Res* 14, 3044-3051 (2008)).

[0552] 생체내 차단 후의 혈청 중 부분적으로 인간화된 항-PD-1 항체의 약동학을 연구하였다. 항-PD-1 항체 역가는 차단 14일 내지 28일에 급격히 감소하였으며, 항-PD-1 항체의 마우스 면역글로불린 가변 도메인에 대한 항체 반응을 형성하는 짧은꼬리원숭이와 일치하였다. 따라서, 완전히 인간화된 항-PD-1 항체는 처리 기간을 늘일 수 있어서 생체내 차단 효능을 추가로 증가시킬 수 있다.

[0553] 이 결과는 만성 SIV 감염 동안 PD-1의 생체내 차단이 안전하고 SIV 특이적 다작용성 CD8 T 세포의 급속한 증식 및 회복과 B 세포 반응 증가를 유발한다는 것을 입증한다. 높은 수준의 지속성 바이러스혈증 및 AIDS의 증상 하에서도 후기 만성 감염뿐 아니라 초기 만성 감염 동안 실시된 차단과 함께 증식이 관찰되었다. 또한, SIV/HIV 복제의 선호 부위인 결장직장 점막 조직에서 증식이 관찰되었다(Pierson et al., *Annu Rev Immunol* 18, 665-708 (2000)). 중요한 것은, PD-1 차단이 혈장 바이러스 양의 유의적인 감소를 유발하고 SIV 감염된 짧은꼬리원숭이의 생존을 연장시킨다는 것이다. 이들 결과는, SIV 감염된 짧은꼬리원숭이에서 바이러스 특이적 CD8 T 세포를 증식시키고 혈장 바이러스 양을 감소시키기 위해 관련된 동시억제 분자 CTLA-4의 차단 실패를 고려하면 대단히 중요한 것이다(Cecchinato *et al. J Immunol* 180, 5439-5447 (2008)). PD-1 차단의 치료 이익은 항-레트로바이러스 및/또는 치료 백신접종과의 병용 요법을 이용하여 추가로 향상시킬 수 있다.

[0554] **실시예 28: 실시예 29를 위한 재료 및 방법**

[0555] *동물, SIV 접종 및 감염 단계:* 인디안 붉은털 원숭이(*Macaca mulatta*) 및 수티 망가베이를 이용하였다. 정맥내 주사로 SIV 감염을 실시하고, 동물을 다음과 같이 감염 단계별로 분류하였다: -급성(감염 후 2주, p.i.), 만성 초기(10-12주, p.i) 및 만성 후기(≥1.5년, p.i.).

[0556] *바이러스 양 측정:* 혈장 바이러스 양은 상기 개시한 바와 같이 정량적 실시간 PCR로 측정하였다(Amara et al., *Science* 292:69-74, 2001). 모든 바이러스 RNA 표본을 추출하고 이중으로 분석하였으며, 평균 결과를 보고하고 분석에 사용하였다.

[0557] *유세포분석에 의한 표현형 분석:* 멀티-파라미터, 멀티-칼라 분석을 이용하여 100 ml 전혈을 사용하여 표면 림프구 염색을 실시하였다. 부검 조직으로부터 림프구를 얻었다. 하기 항체를 사용하였다: CD3(클론 SP34-2), CD21(클론 B-Ly4), CD27(클론 M-T2712), CD80(클론 L307.4), CD11c(클론 S-HCL-3), 이들 모두는 BD BIODSCIENCES® 로부터 입수하였음; CD20(클론 2H7, eBIOSCIENCES®), CD40(클론 MAB89, BECKMAN COULTER®), CD95(클론 DX2, CALTAG®) 및 PD-1(클론 EH-12)에 대한 마우스 항-인간 항체. LSRII 유세포 분석기에서 세포를 분석하고, FLOWJO® 소프테웨어 버전 8.8.2로 데이터를 분석하였다.

[0558] *SIV env-특이적 항체 역가 및 결합활성을 측정하기 위한 콘카나발린 A ELISA:* DNA/89.6 VLP(51)로 293T 세포를 일시 형질감염시켜 생성된 엔벨로프 단백질을 사용하여 항-env IgG Ab의 역가를 측정하였다. 간단히 요약하면, 96-웰 ELISA 플레이트(Costar, Corning Life Sciences)를 10 mM Hepes 완충액 중 25 ㎍/ml 콘카나발린 A(Con A)로 코팅하고, 4℃에서 밤새 항온처리하였다. 0.05% Tween-20(PBS-T)을 함유하는 PBS로 플레이트를 6회 세척하고, 각 웰에 VLP 100 ㎕를 첨가한 다음 실온에서 1 시간 동안 항온처리하고, 웰당 100 ㎕ 차단 완충액(4% 유청 및 5% 분유를 포함하는 PBS-T)을 이용하여 실온에서 1 시간 더 다시 세척하고 차단하였다. 플레이트를 세척하고, PBS-T/4% 유청 중에 연속 희석된 시험 혈청을 이중 웰에 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 항온처리하였다. ELISA 분석을 위해 PBS-T로 플레이트를 6회 세척하였으며, 미결합된 Ab는 호스래디쉬 퍼옥시다제-접합된 항-원숭이 IgG(Rockland Immunochemicals) 및 테트라메틸 벤젠(TMB) 기질(KPL)을 사용하여 검출하였으며, 100 ㎕의 2N H_2SO_4로 반응을 정지시켰다. 각 플레이트는 염소 항-원숭이 IgG(Rockland Immunochemicals) 및 붉은털원숭이 IgG(Accurate chemicals)를 사용하여 형성한 표준 곡선을 포함하였다. 표준 곡선을 대입하고 SOFTMAX® 2.3 소프트웨어를 사용하여 혈청 1 ml당 Ab의 ㎕수로 샘플 농도를 삽입하였다.

[0559] 바이러스 엔벨로프 단백질에 대한 Ab의 결합활성은 env Ab ELISA의 변법에서 카오트로픽제 NaSCN에 의한 용리에 대한 항체-엔벨로스 복합체의 내성을 측정하여 결정하였다. 테스트 혈청을, 1:100으로부터 시작하여 3배 희석액에서 사중으로 플레이트에 첨가하였다. ConA env ELISA에서 테스트 혈청의 결합 후에, 복제물 한 세트를 PBS로 처리하고, 다른 세트는 10 분 동안 1.5M NaSCN로 처리한 후 호스래디쉬 퍼옥시다제-접합된 항-원숭이 IgG 및 TMB 기질을 이용하여 세척 및 검출하였다. 100 ㎕의 2N H_2SO_4로 반응을 정지시켰다. 결합활성 지수는 NaSCN 처리

로 0.5 O.D.를 제공하는 혈청 희석율을 PBS 처리로 0.5 O.D.를 제공하는 혈청 희석율을 나눈 다음 100을 곱하여 계산하였다.

[0560] *중화 분석:* 이전에 보고된 바와 같이(51, 52), 5.25.EGFP.Luc.M7 세포(TCLA SIVmac25) 및 TZM-bl 세포(293T 슈도바이러스)의 감염 1 라운드 후에 루시퍼라제(luc) 리포터 유전자 발현 감소 함수로서 중화를 측정하였다. 보고된 값은 상대적 발광 단위(RLU)가 바이러스 대조군 웰에 비하여 50% 감소되는 혈청 희석율을 나타낸다.

[0561] *아폽토시스 분석:* 하기의 4가지 상이한 배양 조건 하에서 2.5 x 10^5 세포/웰로 96웰 둥근 바닥의 조직 배양 플레이트에서 7 마리의 SIV 감염된 원숭이로부터의 PBMC를 평판배양하였다: 완전 RPMI-1640 배지 단독(자발적 아폽토시스), 완전 RPMI-1640 배지 + 10 ng/ml 가용성 His-태그된 rhFasL(R&D Systems)(Fas-매개의 아폽토시스) & 완전 RPMI-1640 배지 + 10 ng/ml 가용성 His-태그된 rhFasL + 10 ㎍/ml 항-PD-1 차단성 Ab. 플레이트를 37℃에서 24 시간 동안 항온처리하고, 이후 세포를 CD20, CD27, CD21 및 아넥신-V에 대해 염색하고, LSRII 유세포 분석기에서 즉시 분석하였다.

[0562] Huh-7.5 세포(53)를, 네오마이신 내성 유전자와 CMV 프로모터 하에서 HLA-A2를 발현하는 플라스미드로 형질감염시켰다. 클론을 선별하고, 증식시킨 다음, 전길이 INCYTE®인간 cDNA PD-L1(OPEN BIOSYSTEMS®, Huntsville, AL)을 발현하는 제2 플라스미드 (pCDNA3.1-Zeo)로 후속 형질감염시켰다. 네오마이신 및 제오신 둘다에 대해 내성인 클론의 선별 및 증폭의 제2 라운드를 실시하였다. HLA-A2 및 PD-L1의 발현 검증을 유세포 분석을 실시하였다. Huh-7.5.A2.PD-L1 세포를 사용하여 활성화된 기억 B 세포의 PD-L1 매개의 아폽토시스를 평가하고, Huh-7.5 세포를 대조군으로 하였다. 양쪽 세포주를 별도의 24웰 플레이트에 접종하고, 실험 전날 37℃에서 항온처리하였다. NHP 특이적 CD20 마이크로비드(Miltenyi Biotec)를 사용하여 PBMC로부터 B 세포를 분리하고 분리된 B 세포를 세포주에 첨가하고 37℃에서 24 시간 동안 플레이트를 항온처리한 후에, 세포를 CD20, CD27, CD21 및 아넥신-V에 대해 염색하고, LSRII 유세포 분석기로 즉시 분석하였다.

[0563] *시험관내 PBMC 자극 및 기억 B 세포 ELISpot 분석:* PBMC를 자극하고, Crotty 등의 문헌(23)에 개시된 방법의 변법을 사용하여 기억 B 세포 ELISpot 분석에 사용하였다. 간단히 요약하면, PBMC를 하기의 3가지 상이한 배양 조건에서 삼중으로 β-2 머캅토에탄올을 함유하는 완전 RPMI-1640 배지에서 0.5 x 10^6 세포/웰로 멸균 24웰 조직 배양 플레이트에서 평판배양하였다: 배지 단독(대조군); 미토겐 칵테일- 포크위드미토겐 1:1000 희석, 고정된 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 코완종, SAC(SIGMA®), 1:10,000 희석 및 6 ㎍/ml CpG ODN-2006(Qiagen-Operon); 미토겐 칵테일 + 10 ㎍/ml 항-PD-1 차단성 Ab(클론 1540-29C9, GF에 의해 제공). 세포를 6일 동안 5% CO_2에서 37℃에서 항온처리하였다.

[0564] 배양 5일째에, 96웰 필터 ELISpot 플레이트를 10 ㎍/mg의 친화도 정제된 염소 항-원숭이 IgM 및 IgG(Rockland Immunochemicals)와 1 ㎍/ml의 SIVmac239 gp130으로 코팅하고, 4℃에서 밤새 항온처리하였다.

[0565] 6일째에, 플레이트를 PBS-T로 1회 세척하고 PBS로 3회 세척하였으며, 37℃에서 2 시간 동안 RPMI-1640으로 차단하였다. 배양된 PBMC를 2회 세척하고, 준비된 ELISpot 플레이트에 첨가하고 6 시간 동안 37℃에서 항온처리하였다. 이어서, 플레이트를 PBS로 3X 세척하고 PBS-T로 3X 세척하였으며, PBS-T/1% FCS에서 희석된 1 ㎍/ml 비오틴 접합된 항-원숭이 IgM(총 IgM ASC의 검출용) 또는 1 ㎍/ml 항-원숭이 IgG(총 IgG 및 항-gp130 ASC 검출용)와 함께 4℃에서 밤새 항온처리하였다. 플레이트를 PBS-T로 4X 세척하고, PBS-T/1% FCS에서 희석된 5 ㎍/ml HRP-접합된 아비딘 D(Vector laboratories)와 함께 실온에서 1 시간 동안 항온처리하였다. 플레이트를 4X 세척하고 3-아미노-9-에틸카르바졸(AEC)을 사용하여 현상하였다. 현상 플레이트 상의 스폿은 ELISpot 플레이트 리더를 사용하여 계수하였다. 데이터는 10^6 PBMC당 스폿수(ASC)로 나타낸다.

[0566] *통계학적 분석:* GRAPHPAD PRISM®을 사용하여 통계학적 분석을 실시하였다.

[0567] **실시예 29: 만성 감염 진행에 있어서 기억 B 세포 및 PD-1**

[0568] *4종의 별개의 B 세포 서브세트가 붉은털원숭이 말초혈에서 확인될 수 있다:* 붉은털원숭이 B 세포 구획을 특성화하였다. 건강한 RM의 말초혈에서의 4개의 별개의 B 세포 서브세트: $CD20^{int}/CD21^{+}/CD27^{-}$(나이브), $CD20^{int}/CD21^{+}/CD27^{+}$(휴지기 기억 세포), $CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{+}$(활성화된 기억 세포) 및 $CD20^{hi}/CD21^{-}/CD27^{-}$(비전형적인 또는 조직 기억 세포), 이들 모두는 CD20의 평균 형광 강도(MFI)가 유의적으로 다르다($P < 0.0001$). 나이브 및 활성화된 기억 B 세포가 주요 서브세트이며, 각각 총 B 세포의 37% 및 36%를 구성하며, 이후 조직(18%) 및 휴지기(9%) 기억 B 세포가 차지한다. 표면 IgM 및 IgD에 대해 세포를 염색하였으며, 인간과 달리 실질적으로

IgM 단독 세포가 없는 것으로 확인되었다. 나이브 B 세포는 IgD-단독 및 $IgD^{+}IgM^{+}$로 고르게 분할되었다. 모두 3종의 기억 세포 서브세트는 ~20% IgD-단독 세포로 구성되며, 남은 휴지기 기억 B 세포는 $IgD^{+}IgM^{+}$(~50%) 및 $IgD^{-}IgM^{-}$(~30%)였다. 활성화된 기억 B 세포가 최대의 클래스 전환 서브세트이며, 이의 ~60%가 $IgD^{-}IgM^{-}$이고 ~20%가 $IgD^{+}IgM^{+}$이다. 한편, 조직 유사 기억 B 세포는 대부분 IgD+IgM+(~70%)이고 ~10%만 $IgD^{-}IgM^{-}$)였다. 따라서, 신규한 B 세포 서브세트가 붉은털원숭이(RM)에 대해 확인되었으며, 활성화된 기억 B 세포 서브세트와 달리 CD27이 발현되지 않지만, 또한 $CD21^{-}$였다. 이들 B 세포는 고유의 조직 유사 B 세포 서브세트와 유사하였으며, 이의 규정 표면 마커는 인간에서의 면역 조절 분자 FCRL4이다.

[0569] 서브세트를 추가로 특성화하기 위해서, 활성화 및 분화 마커 CD40, CD80, CD95 및 CD11c의 발현을 평가하였다. 실질적으로 모든 나이브 및 휴지기 기억 B 세포와 휴지기 기억 B 세포의 >70%는 $CD40^{hi}$인 반면, 활성화된 B 세포의 대부분(>70%)은 $CD40^{int}$였다. 활성화된 기억 B 세포는 최대 CD80, CD95 및 CD11c를 발현하며, 그 바로 다음이 휴지기 기억 B 세포이다. CD11c는 활성화되고 비통상적인 기억 B 세포 상에서만 발현되며, 나이브 B 세포는 무시할만한 양의 CD80, CD95 및 CD11c을 발현한다.

[0570] *SIV 감염은 활성화된 기억 B 세포의 소진을 초래한다:* 본 연구에 사용한 SIV 감염의 정맥내 경로는 비인간 영장류에서 더욱 신속한 질병 진행 경과와 연관되어 있으며, 이 경로를 통해서 접종된 동물의 최대 30%는 감염 6개월 내에 AIDS로 진행된다. AIDS 유사 증상 또는 진성(full-blown) AIDS가 발병되어 감염 24주 전에 죽은 동물을 급속 진행자로 분류하였으며, 다른 모든 동물은 전형 진행자로 분류하였다. HIV 및 SIV 감염 후에 B 세포 구획에서 발생하는 관찰가능한 제1 변화 중 하나는 총 B 세포의 현저한 감소이지만, 특이적 B 세포 서브세트가 소진되는지는 분명하지 않다. SIV 감염 2주 정도의 초기에, 질병 진행 속도와 무관하게 말초혈 총 B 세포가 심하게 소진된 것을 발견하였다. 급속 및 전형 진행자 모두에서 감염 12주째에 B 세포 수의 재상승이 관찰되었지만, B 세포수는 감염전 수준과는 유의적으로 달랐다($P<0.0001$). 일반적으로 SIV 감염 후에 기억 B 세포가 소진되었으며 활성화된 B 세포의 백분율 및 수의 유의적인 감소가 있었다. 감염 후 12주까지, 급속 진행자는 활성화된 B 세포의 82% 손실이 있는 반면에, 전형 진행자는 23%만 손실이 있었다. 급속 진행자와 대조적으로, 전형 진행자의 활성화된 B 세포 비율은 감염 12주까지 감염전 수준으로 복귀되었다. 급속 진행자와 전형 진행자 사이의 활성화된 기억 세포 소진 정도의 두드러진 대조는 활성화된 기억 B 세포의 소진이 질병 진행 및 SIV 발병에 대해 어떤 유의성을 나타내는지에 관한 연구를 고무시킨다.

[0571] *활성화된 기억 B 세포의 소진은 급속한 질병 진행의 조기 예측자이다:* 설정값 바이러스 양(감염 12주 후)은 SIV 감염의 임상 결과의 양호한 예측자인 것으로 확인되었다. 급속한 질병 진행과 바이러스 양 사이의 관계를 분석하였으며, 흥미롭게도 급속 및 전형 진행자 양쪽에서 유사한 피크(감염 2주 후) 바이러스 양을 나타내었지만($P = 0.8$); 그러나 급속 진행자에서의 설정값 바이러스 양은 전형 진행자에서보다 더 큰 로그값을 나타내었다($P < 0.0001$). 감염 2주 정도의 초기에 활성화된 기억 B 세포 비율의 차이가 관찰되는 경우, 활성화된 기억 B 세포의 소진이 훨씬 더 초기의 급속한 질병 진행의 예측자일 수 있다는 가설을 세웠다. 혈액의 핵심 기억 세포($CD28^{+}CD95^{+}$, T_{CM}) 및 장 $CD4^{+}$ T 세포는 또한 SIV 감염의 질병 진행 마커로서 제안되어 왔으며, 따라서 상호 예측값을 평가하기 위해 이들 마커의 비교를 실시하였다. SIV 감염 2주 후에, 급속 진행자는 전형 진행자와 비교하여 활성화된 B 세포의 비율이 유의적으로 낮았으며, 활성화된 기억 B 세포는 급속 진행자와 전형 진행자 사이에 유의적으로 분포가 다른($P < 0.001$) 유일한 세포 서브세트였다. 감염 후 12주까지, 활성화된 기억 B 세포는 급속 진행자에서 더욱 소진되었으며($P < 0.0001$), 또한 급속 진행자와 전형 진행자 사이의 유의적인 차이가 T_{CM} 및 장 $CD4^{+}$ T 세포($P < 0.01$)의 비율과 관련하여 나타났다(도 3B, 하부 패널). 질병 진행의 초기 마커로서 활성화된 기억 B 세포의 2주 소진의 유용성을 추가로 확인하기 위해서, 설정값(SIV 감염 12주 후) 바이러스 양 대 2주 및 12주의 활성화된 B 세포, 장 $CD4^{+}$ T 세포 및 T_{CM} 세포의 비율의 상관 분석을 실시하였다. 2주 및 12주의 활성화된 B 세포는 설정값 바이러스 양과 역의 상관관계가 있지만, 12주에서의 장 $CD4^{+}$ 비율은 바이러스혈증의 설정값과 상관관계가 있으며, T_{CM}은 설정값 바이러스혈증과 전혀 상관관계가 없었다. 따라서, 활성화된 기억 B 세포의 손실은 붉은털원숭이(RM)에서 급속한 질병 진행의 조기 예측자이며, 피크 바이러스 양, T_{CM} 및 장 $CD4^{+}$ T 세포보다 조기 예측값이 더욱 양호하다.

[0572] *급속히 진행되는 SIV 감염에 있어서 활성화된 기억 B 세포의 소진은 SIV 특이적 체액성 면역반응 및 다른 비-SIV 감염에 대한 내성을 손상시킨다:* 급속히 진행되는 SIV 감염된 RM은 B 세포 구획의 급속 파괴에 의해 낮은 항체 반응을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 기회감염 및 비-SIV 관련 Ags는 SIV 감염된 동물의 중요한 사망 원인이다. 활성화된 기억 B 세포의 손실은 SIV 및 비-SIV Ags에 대한 급속 진행 동물의 체액성 면역 반응을 위해 중요하다. 따라서, SIV env 결합 Ab의 혈청 역가를 급속 진행자 및 전형 진행자에서 측정하였으며; 9 마리의 급속 진행자의 것을 분석한 결과 12주까지 2 마리만이 적당한 env Ab 반응을 나타내었으며, 20주까지 1마리의 동물만이 Ab 역가를 유지하였다. 남은 7 마리의 급속 진행자는 감염 20주 동안 검출가능하지 않은 SIV env Ab 역가를 나타내었다. 한편, 전형 진행자는 감염 후 12주까지 강한 env Ab 반응을 나타내었으며, 20주까지 더 높은 역가를 나타내었다.

[0573] 박테리아 기회 감염은 SIV 감염 동물의 중요한 사망 원인이며, 이들 감염의 원인제는 일반적으로 편모충이다. 플라겔린(살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)으로부터 분리한 FliC)에 대한 혈청 Ab 역가를, 기존 체액성 면역에 대한 활성화된 기억 B 세포의 손실의 효과를 평가하기 위한 수단으로서 측정하였다. 유사한 항-FliC Ab 역가로부터 시작하였지만, 급속 진행자는 역가가 변하지 않은 전형 진행자(P = 0.9)와 비교하여 감염 후 20주까지 유의적으로 더 낮은 역가(P = 0.001)를 나타내었다(도 5C). 초기 SIV 감염 후 6개월 동안 양 그룹에 대해 임상 감염 데이터를 분석하였으며, SIV 감염 후에 동물에서 각종 다른 종류의 감염이 발생한다는 것을 발견하였다. 이들은 박테리아(캄필로박터(*Campylobacter*), 쉬겔라(*Shigella*), 장관병원성 이 콜라이(*E. coli*)), 기생충(트리코모나스(*Trichomonas*), 편충, 지알디아(*Giardia*)) 및 효모(칸디다(*Candida*)) 감염을 포함하였다. 급속 진행자는 1개월 p.i.의 초기 및 3개월 p.i.까지 이들 감염에 굴복하였다. 전형 진행자의 <10%와 비교하여 급속 진행자의 >50%가 감염되었다. 급속 진행자의 감염 속도는 6개월 동안 지속되었다.

[0574] *시험관내 PD-1 차단은 Fas 매개 아폽토시스를 감소시키고, PD-1의 결찰은 활성화된 기억 B 세포의 아폽토시스를 유도한다:* PD-1은 붉은털원숭이의 기억 B 세포에서 주로 발현된다. PD-1 발현을 SIV 감염 전후에 더욱 세밀하게 모든 B 세포 서브세트에서 평가하였으며, 더 높은 비율의 모두 3종의 기억 B 세포 서브세트가 나이브 B 세포와 비교하여 더 많은 양의 PD-1(평균 형광 강도, MFI)을 발현하였다(P < 0.001). 활성화된 기억 세포는 최대량의 PD-1을 발현할 뿐 아니라, 다른 서브세트와 비교하여 최대 비율의 $PD\text{-}1^{+}$ 세포를 가진다(P < 0.001). SIV 감염 후에, 질병 진행 상태와 무관하게, $PD\text{-}1^{+}$ 기억 B 세포의 우선적 소진이 있었다. 이는 PD-1이 활성화된 기억 B 세포의 소진에 역할을 할 가능성을 높인다.

[0575] HIV 감염된 인간의 기억 B 세포를 감작시켜 특히 Fas-FasL 경로를 통한 사멸 수용체 유도 아폽토시스 및 자발적 아폽토시스를 모두 진행하지만, SIV 감염 동안 B 세포 아폽토시스에 있어서 Fas-FasL 경로의 역할이 무엇인지에 대한 정보는 거의 없다. Fas 매개의 아폽토시스에 대한 활성화된 기억 B 세포의 감수성을 결정하고 활성화된 기억 B 세포 소진에서 PD-1에 대한 가능한 역할을 확인하기 위해서, 7 마리의 SIV 감염된 동물로부터의 PMBC를 PD-1 차단과 함께 sFasL의 존재 및 부재 하에 배양하고 분석하였다. 배양 24 시간 후에 활성화된 기억 B 세포 상의 아넥신-V 발현을 평가하였다. 모두 6 마리의 동물에서 아폽토시스의 유의적인 증가가 배양물에 sFasL의 첨가와 함께 관찰되고, 4 마리의 동물에서 FasL 매개 아폽토시스의 감소가 PD-1 차단 후에 관찰되었는데, 이는 PD-1이 활성화된 기억 B 세포의 아폽토시스에 기여함을 나타내는 것이다.

[0576] 활성화된 기억 B 세포의 아폽토시스에 대한 PD-1의 역할을 추가로 입증하기 위해서, 인간 간암 세포주인 Huh-7.5를 PD-L1으로 형질감염시킨 것(Huh-7.5.A2.PD-L1)을 PD-1을 발현하는 활성화된 기억 B 세포에 대한 리간드원으로서 사용하였다. 유세포 분석에 의해 입증되는 바와 같이 PD-L1 발현은, Huh-7.5.A2.PD-L1 세포 상에서의 >90% PD-L1 발현과 비교하여 비형질감염된 Huh-7.5 세포(대조군)에서는 PD-L1이 발현되지 않음을 보여준다. 시험된 7 마리의 동물 중 5 마리에서, 대조군 웰과 비교하여 PD-L1 존재 하에 배양된 활성화된 기억 B 세포에서 아폽토시스의 비율이 증가하였다. 한 동물(4)에서, PD-L1의 존재 또는 부재 하에 유사한 비율의 아폽토시스가 관찰되었으며, 다른 동물(3)에서 자발적 아폽토시스의 비율이 >30%이고 PD-L1의 첨가는 아폽토시스를 유의적으로 변경하지 않았다. 따라서, SIV 감염 동안 PD-1 신호전달은 활성화된 기억 B 세포 아폽토시스에서 역할을 하였다.

[0577] PD-1-PD-L1 상호작용의 차단은 HIV-특이적 $CD8^{+}$ T 세포의 증식 및 생존 능력을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 시험관내 PD-1 차단의 자발적 및 Fas 매개 활성화된 기억 B 세포 아폽토시스에 대한 영향. 시험관내 차단 영향을 SIV 감염 동물로부터의 기억 B 세포가 다클론 자극에 반응하여 생존, 증식하고, 항체 분비 세포(ASC)로 분화되는 능력을 기억 B 세포 ELISPot 분석으로 분석하였다. 차단은 활성화된 기억 B 세포의 Fas 매개 아폽토시

스를 약간 감소시켰지만, 자발적 아폽토시스에 대한 영향은 없었다. PD-1 차단 Ab의 존재 하에 자극된 세포가 더욱 잘 증식하였고, 총 IgM 및 IgG에 대해 ASC를 더 많이 생산하였으나, 또한 env 특이적 스폿이었다.

[0578] *RM 활성화된 기억 B 세포는 BAFF-R의 발현량이 적으며, SIV 감염에 의해 추가로 감소된다:* TNF 패밀리에 속하는 B 세포 활성화 인자인 BAFF(B-lys로도 알려져 있음)는 B 세포 항상성의 중요한 조절인자이고(21), 시노몰거스 원숭이에서 $CD21^-$ B 세포는 그 수용체 중 하나인 BAFF-R를 낮게 발현하는 것으로 알려져 있다. HIV 바이러스혈증 환자의 $CD21^{low}$ B 세포는 또한 BAFF-R을 낮은 수준으로 발현하는 것으로 밝혀졌다. 활성화된 및 조직 기억 B 세포는 나이브 및 휴지기 기억 B 세포와 비교하여 최저 수준의 BAFF-R을 발현하는 것으로 확인되었다. 감염 2주 후에 발현이 추가로 감소되었지만, 흥미롭게도 12주까지 복귀되었다. 따라서, BAFF-R 저 발현은 활성화된 기억 B 세포의 소진에 있어서 기여 인자일 수 있다.

[0579] *시험관내 PD-1 차단은 B 세포 증식 및 항체 생산을 증가시킨다:* 기억 B 세포에 대한 PD-1의 존재가 증식 및 항체 분비 세포(ASC)로의 분화 능력에 영향을 주는지를 조사하였다. 시험관내 ELISpot 분석을 고안하여, 개시된 분석에 기초하여 IgM, IgG 및 SIV gp130 생성 기억 B 세포를 추적하였다. 다클론 자극 후에, 초기(12 주, n = 3) 및 후기(> 1 년, n = 2) 만성 감염 둘다에서 IgM($P < 0.05$) 및 IgG($P < 0.01$) ASC가 유의적으로 증가하였다. α-PD-1 차단성 Ab의 존재 하에 자극된 세포는 차단성 Ab의 부재 하에 자극된 세포보다 일반적으로 더욱 양호하게 증식하였으며 스폿의 수가 더 많았다. 그러나, gp130-특이적 ASC는 후기 만성 감염 원숭이에서만 검출가능하였으며, IgM 및 IgG ASC에서와 같이 다클론 자극은 gp130 특이적 ASC의 수를 유의적으로 증가시키며, PD-1 차단은 ASC의 수를 추가로 증가시켰다.

[0580] *생체내 PD-1 차단은 더 높은 결합활성과 함께 SIV env 결합 항체 역가를 증가시키며, 중화 Ab 역가를 증가시킨다:* SIV 만성 감염 붉은털원숭이에서 PD-1의 생체내 차단은 SIV env 결합 Ab의 역가를 증가시켰다. 생체내 PD-1 차단 후의 env Ab의 결합활성을 측정하였다. 처리 동물에서 env Ab의 역가뿐 아니라, 결합 Ab의 결합활성도 역시 증가하는 것으로 밝혀졌다. 이것은 결합활성이 처리 후에 감소된 대조군 Ab 처리 동물에서의 경우와 달랐다.

[0581] 또, PD-1 처리 동물에서 중화 활성을 평가하였으며, 1차 SIV 단리물에 대한 중화가 유의적으로 다르지는 않지만, 처리 동물에서 TCLA SIV 균주에 대한 중화는 유의적으로 달랐으며, 동물 중 2 마리는 중화 Ab 역가의 3배 내지 6배 증가를 나타내는 것을 발견하였다.

[0582] *수티 망가베이에서 B 세포 서브세트의 분포:* SIV의 천연 숙주 중 하나인 수티 망가베이에서는 붉은털원숭이와 유사한 지속적인 고 바이러스 역가에도 불구하고 AIDS가 발병하지 않았다. 이로 인하여 SM은 RM에서의 병원성 SIV 감염 연구에 대한 흥미로운 "대조군" 모델이 된다. 비감염(n = 8) 및 SIV-감염(n = 10) 수티 망가베이의 코호트를 연구하였다. 건강한 SM은 건강한 RM보다 순환 총 B 세포가 훨씬 적었으며, RM과 달리 SM에서는 SIV 감염 후에 순환 총 B 세포의 비율 감소가 관찰되지 않았다. 동일한 B 세포 서브세트가 SM에서 확인되었지만, SM에서 서브세트의 분포는 RM에서와는 매우 달랐다. 나이브 B 세포가 주요 말초혈 B 세포 서브세트를 구성하였으며(> 40%), 주요 기억 B 세포 서브세트는 조직 유사 기억 B 세포이지, RM에서와 같이 활성화된 기억 B 세포가 아니였다. RM과 같이, SM에서 순환 기억 B 세포의 <10%는 휴지기 기억 B 세포였지만, RM과 대조적으로 활성화된 기억 B 세포의 비율은 SM에서 유의적으로 낮았다. SIV 감염 후에, 활성화된 기억 B 세포의 소진은 없었으며; 실제로 휴지기 및 활성화된 기억 B 세포의 비율이 약간 증가하였지만, 이들 변화는 통계학적 유의성에 도달하지는 못하였다. RM에서와 같이, SM의 B 세포 서브세트 상의 PD-1 발현은 활성화된 기억 B 세포에서 최대였으며, RM에서와 달리 PD-1 발현은 조직 기억 B 세포에서 비슷하게 높았다. RM과 SM의 또 다른 유의적인 차이는 RM과 달리 SM에서 SIV 감염 후에 PD-1를 발현하는 세포의 비율이 높아졌다는 것이다.

[0583] **실시예 30: PD-1 길항제의 효능을 결정하는 방법**

[0584] 피험체를 치료하기 위한 PD-1 길항제의 효능은, 중화 항체, 기억 B 세포의 증식, 나이브 B 세포의 존재를 측정하는 것과 같은 B 세포를 측정하고/하거나 CD28+ T 세포를 측정하여 결정할 수 있다. 일반적으로, 중화 항체, 기억 B 세포의 증식, 나이브 B 세포 및/또는 CD28+ T 세포의 유의적인 증가는 PD-1 길항제가 피험체의 치료에 효과적임을 나타낸다. B 세포는, 예를 들어 미국 특허 7,378,276호 및/또는 미국 특허 6,376,459호에 개시된 바와 같이 측정할 수 있으며, 이들 양 문헌은 참고로 본원에 포함된다. PD-1 길항제는 PD-L1 및 PD-L2에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 7,432,059호 참조.

[0585] PD-1 길항제의 효능을 결정하는 것은 피험체로부터 생물학적 샘플을 얻는 것을 포함한다. 생물학적 샘플, 예컨대 혈액 샘플 또는 말초혈 단핵 세포 샘플을 인간 피험체, 예컨대 지속성 감염된 피험체로부터 채취한다. 증식성 기억 B 세포, 나이브 B 세포 및/또는 CD28+ T 세포의 존재를 FACS 분석을 이용하여 측정한다. 중화 항체의

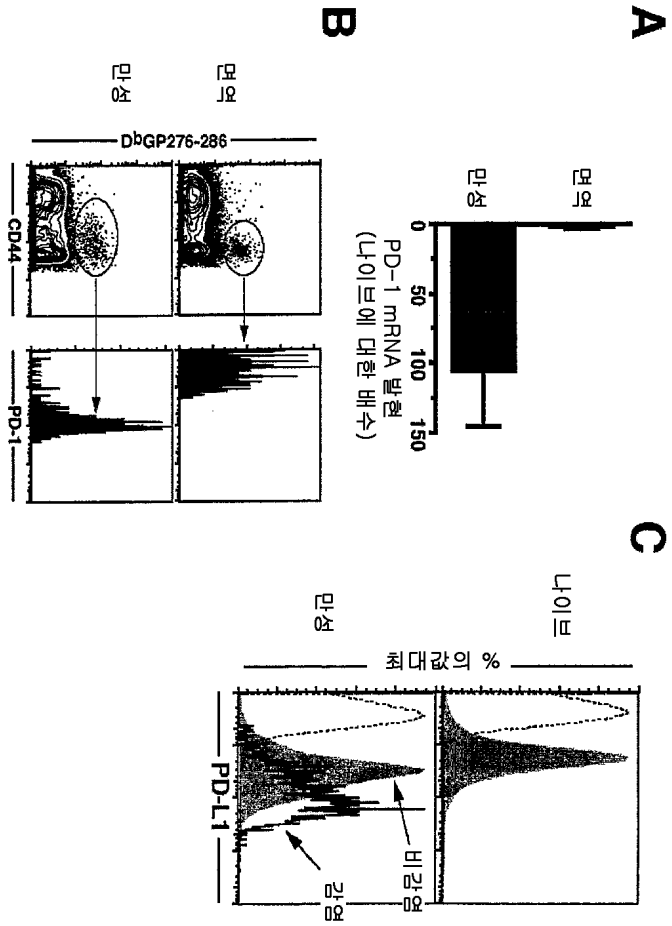
존재를, 예컨대 ELISA를 이용하여 측정할 수 있다. 증식성 기억 B 세포, 나이브 B 세포 및/또는 CD28+ 세포, 및/또는 중화 항체의 존재를 대조군, 예를 들어 PD-1 길항제로 처리하기 전에 피험체로부터 얻은 샘플과 비교하였다. 통계학적 테스트를 실시한다. 대조군과 비교하여 피험체에게 투여 후에 피험체로부터 얻은 혈액 샘플 중 증식성 기억 B 세포 및/또는 중화 항체 및/또는 CD28+ T 세포의 통계학적으로 유의적인 증가는, PD-1 길항제가 피험체 치료에 효과적임을 입증한다. 그러나, 나이브 B 세포는 PD-1 길항제 투여에 의해 영향을 받지 않는다.

[0586] 여러 종류의 피험체를 처리하고 시험하였다. 이들 피험체는 HIV 감염 피험체, 숙주외 세포증식 뮤린 백혈병 바이러스 관련 바이러스(XMRV) 감염 피험체, 및 폴리오마바이러스 JC 감염 피험체를 포함한다. PD-1 길항제를, 예컨대 HIV 및 XMRV 치료를 위해서 항-레트로바이러스 요법과 함께 투여할 수 있다. 적절한 피험체는 또한 종양, 예컨대 고형 조양 또는 림프종 또는 백혈병을 가지는 피험체를 포함한다. 또한 이들 피험체에게 화학요법제 및/또는 종양 항원을 투여할 수 있다.

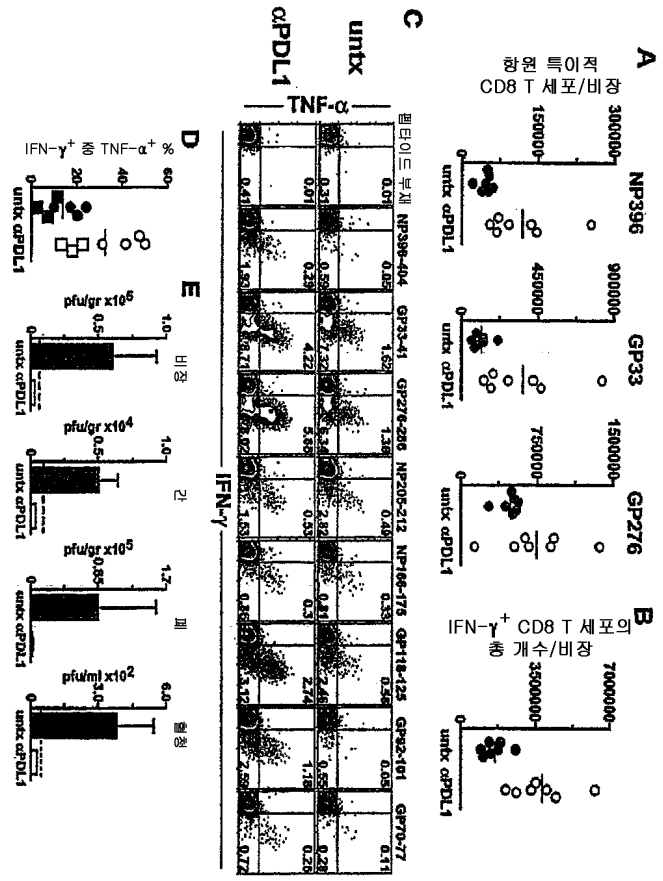
[0587] 상기 기술된 방법 또는 조성물의 상세한 설명은 기술된 발명의 범위를 벗어나지 않고 수정 및 변형될 수 있음은 분명하다. 본원에서는 하기 특허청구범위의 범위 및 개념 내에 포함되는 그러한 모든 변형 및 수정을 모두 청구한다.

도면

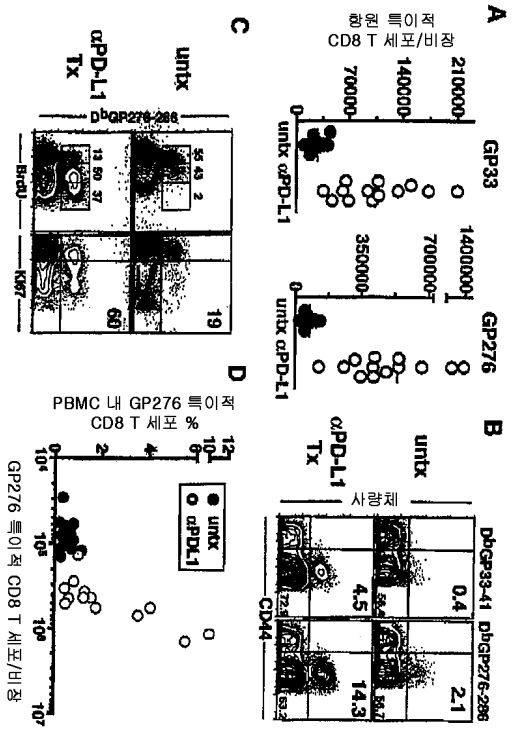
도면1



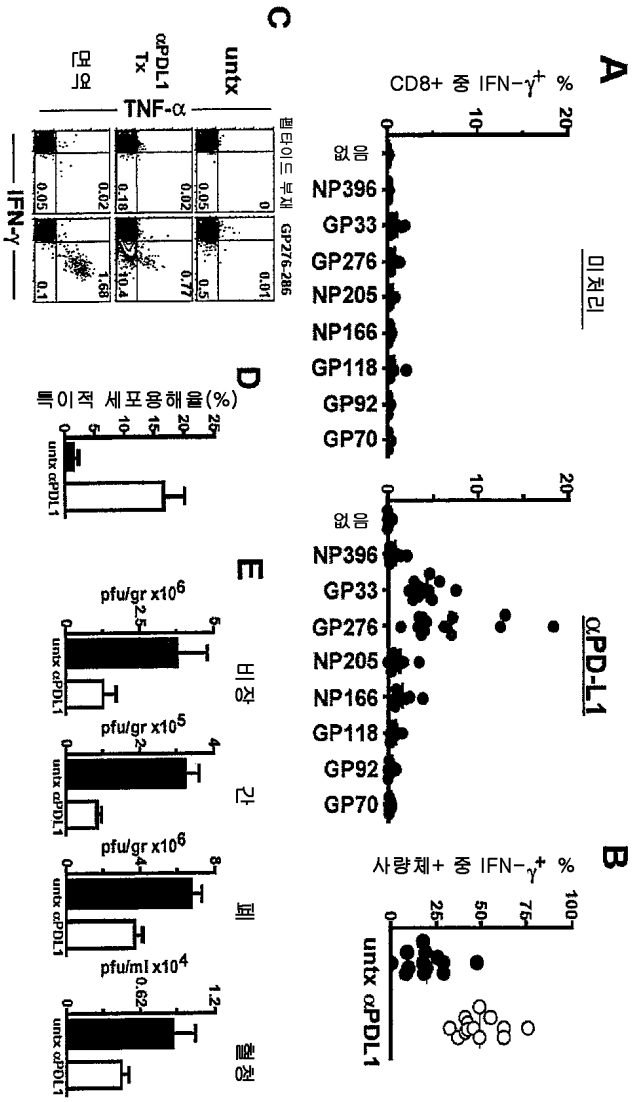
도면2


A
항원 특이적
CD8 T 세포/비장
NP396
GP33
GP276
untx
αPDL1
B
IFN-γ+ CD8 T 세포의
총 개수/비장
C
untx
αPDL1
TNF-α
IFN-γ
펩타이드 부재
NP396-404
GP33-41
GP276-286
NP205-212
NP166-175
GP118-125
GP92-101
GP70-77
D
IFN-γ+ 중 TNF-α+ %
E
pfu/gr x10^5
비장
pfu/gr x10^4
간
pfu/gr x10^5
폐
pfu/ml x10^2
혈청

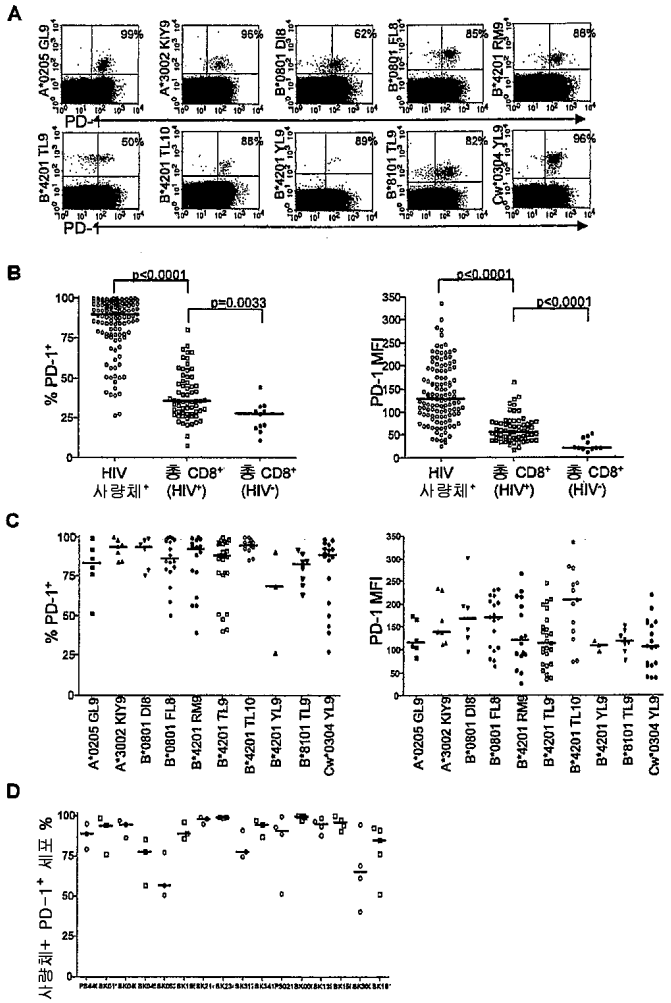
도면3


A
항원 특이적
CD8 T 세포/비장
GP33
GP276
untx
αPD-L1
B
αPD-L1
Tx
untx
사량체
CD44
DbGP33-41
DbGP276-286
C
αPD-L1
Tx
untx
DbGP276-286
BrdU
Ki67
D
PBMC 내 GP276 특이적
CD8 T 세포 %
GP276 특이적 CD8 T 세포/비장
untx
αPDL1

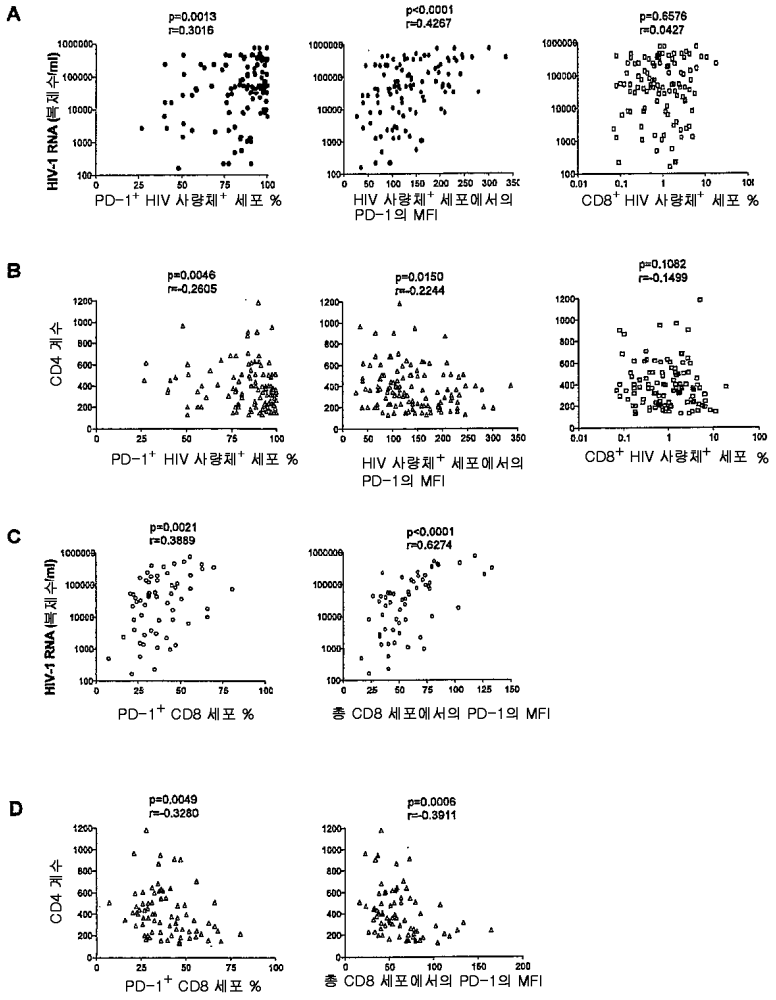
도면4


A
CD8+ 중 IFN-γ+ %
미처리
αPD-L1
없음
NP396
GP33
GP276
NP205
NP166
GP118
GP92
GP70
B
사량체+ 중 IFN-γ+ %
untx αPDL1
C
untx
αPDL1 Tx
TNF-α
IFN-γ
펩타이드 부재
GP276-286
D
특이적 세포용해율(%)
E
pfu/gr x10^6
pfu/gr x10^5
pfu/gr x10^6
pfu/ml x10^4
비장
간
폐
혈청

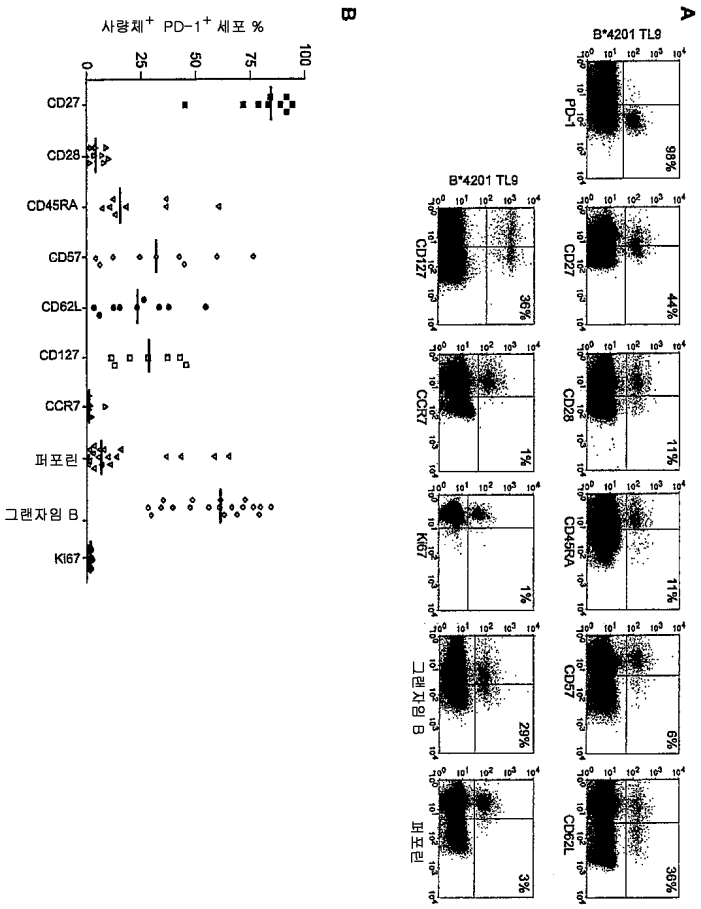
도면5


A
A*0205 GL9
A*3002 KIY9
B*0801 DI8
B*0801 FL8
B*4201 RM9
B*4201 TL9
B*4201 TL10
B*4201 YL9
B*8101 TL9
Cw*0304 YL9
99%
96%
62%
85%
88%
50%
88%
89%
82%
96%
PD-1
B
% PD-1+
PD-1 MFI
p<0.0001
p=0.0033
HIV 사량체+
총 CD8+ (HIV+)
총 CD8+ (HIV-)
C
D
사량체+ PD-1+ 세포 %

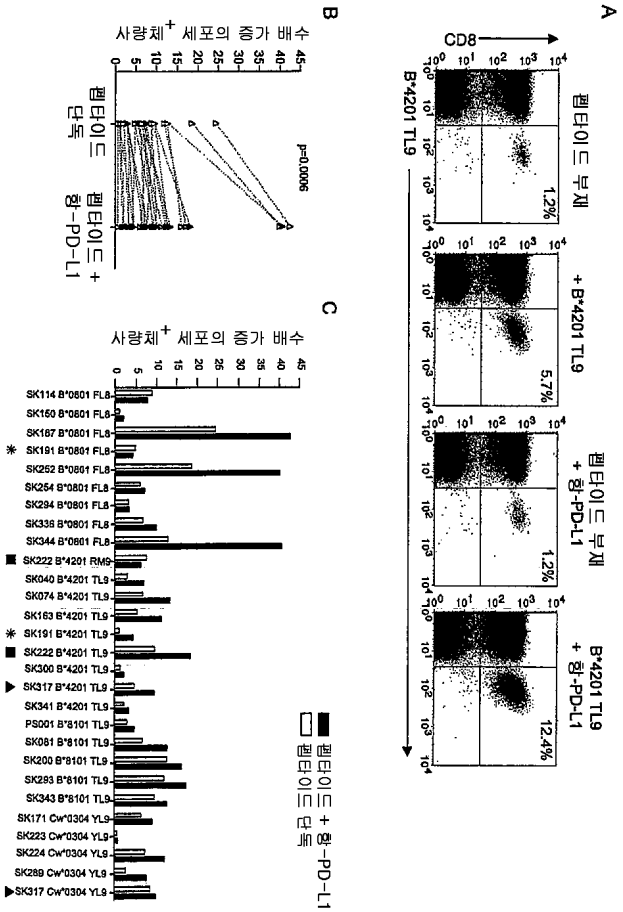
도면6


A
p=0.0013
r=0.3016
HIV-1 RNA (복제수/ml)
PD-1+ HIV 사량체+ 세포 %
p<0.0001
r=0.4267
HIV 사량체+ 세포에서의
PD-1의 MFI
p=0.6576
r=0.0427
CD8+ HIV 사량체+ 세포 %
B
p=0.0046
r=-0.2605
CD4 계수
PD-1+ HIV 사량체+ 세포 %
p=0.0150
r=-0.2244
HIV 사량체+ 세포에서의
PD-1의 MFI
p=0.1082
r=-0.1499
CD8+ HIV 사량체+ 세포 %
C
p=0.0021
r=0.3889
HIV-1 RNA (복제수/ml)
PD-1+ CD8 세포 %
p<0.0001
r=0.6274
총 CD8 세포에서의 PD-1의 MFI
D
p=0.0049
r=-0.3280
CD4 계수
PD-1+ CD8 세포 %
p=0.0006
r=-0.3911
총 CD8 세포에서의 PD-1의 MFI

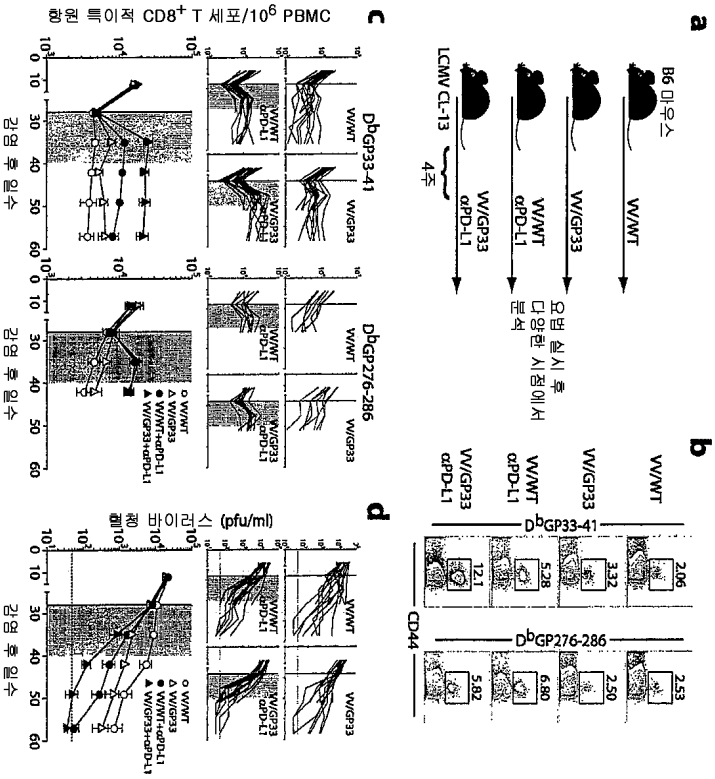
도면7


B
사량체+ PD-1+ 세포 %
0
25
50
75
100
CD27
CD28
CD45RA
CD57
CD62L
CD127
CCR7
퍼포린
그랜자임 B
Ki67
A
B*4201 TL9
PD-1
99%
CD127
35%
CD27
44%
CCR7
1%
CD28
11%
Ki67
1%
CD45RA
11%
그랜자임 B
26%
CD57
6%
퍼포린
3%
CD62L
36%

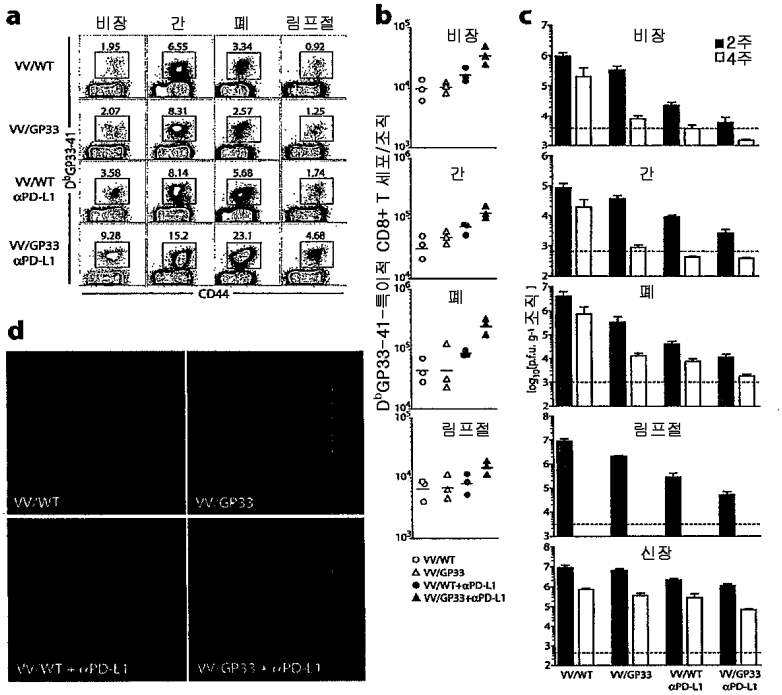
도면8


A
CD8
펩타이드 부재
+ B*4201 TL9
펩타이드 부재
+ 항-PD-L1
B*4201 TL9
+ 항-PD-L1
B*4201 TL9
1.2%
5.7%
1.2%
12.4%
B
사량체+ 세포의 증가 배수
펩타이드
단독
펩타이드 +
항-PD-L1
p=0.0006
C
사량체+ 세포의 증가 배수
펩타이드 + 항-PD-L1
펩타이드 단독

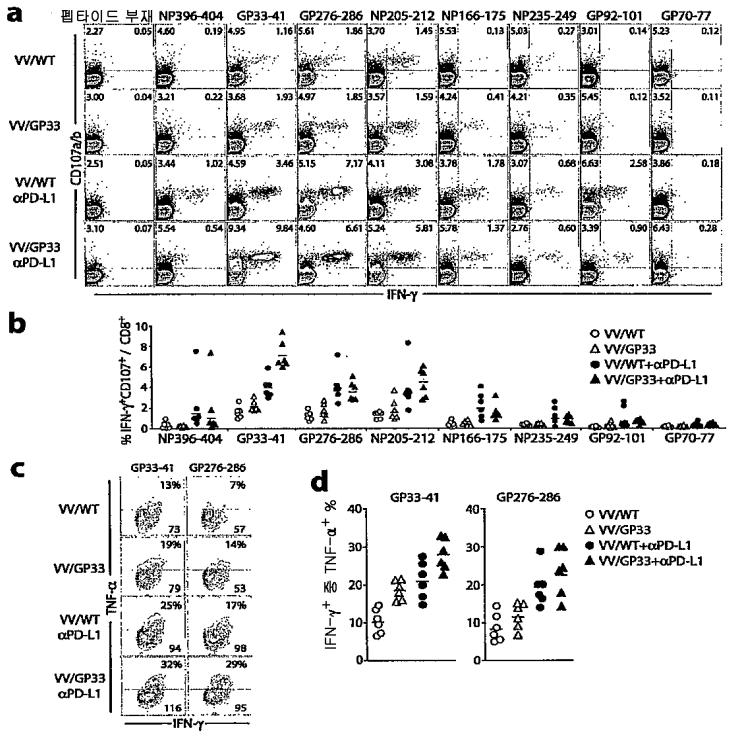
도면9


a
B6 마우스
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
LCMV CL-13
4주
b
DbGP33-41
DbGP276-286
CD44
c
항원 특이적 CD8+ T 세포/10^6 PBMC
수명 후 일수
d
혈청 바이러스 (pfu/ml)

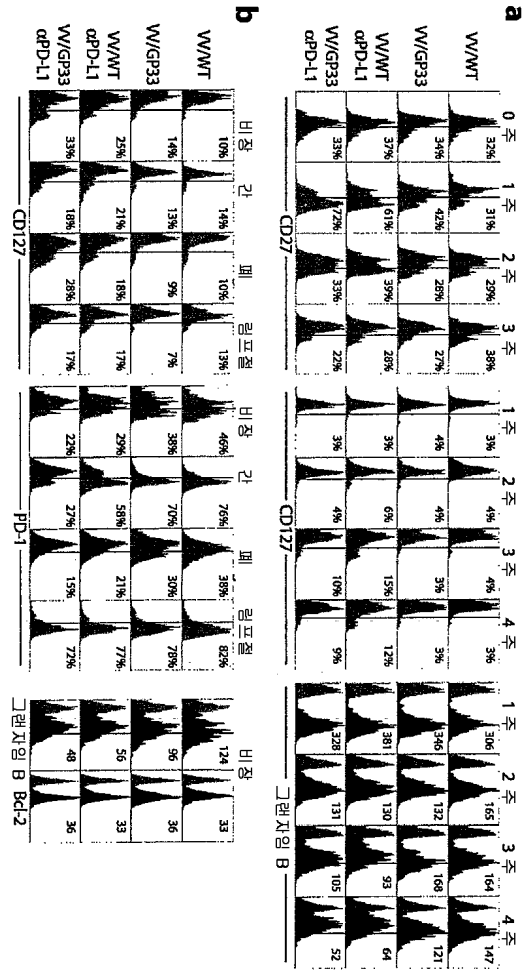
도면10


a
비장
간
폐
림프절
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
DbGP33-41
CD44
b
DbGP33-41 특이적 CD8+ T 세포/조직
VV/WT
VV/GP33
VV/WT+αPD-L1
VV/GP33+αPD-L1
c
■2주
□4주
log10[pfu, g 조직]
신장
d
VV/WT
VV/GP33
VV/WT + αPD-L1
VV/GP33 + αPD-L1

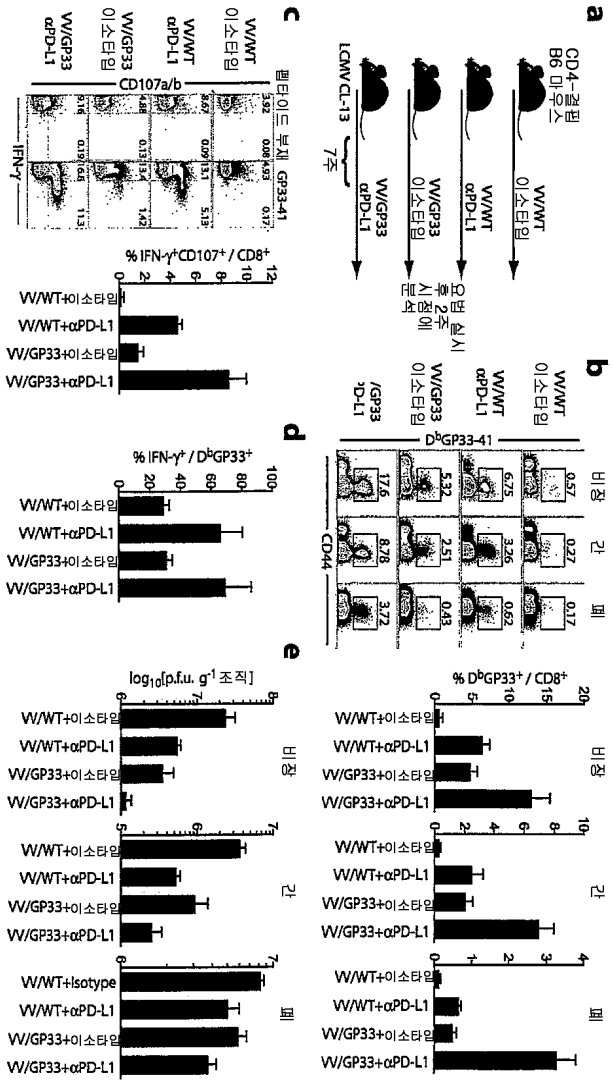
도면11


a
펩타이드 부재
NP396-404
GP33-41
GP276-286
NP205-212
NP166-175
NP235-249
GP92-101
GP70-77
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
CD107a/b
IFN-γ
b
% IFN-γ+CD107+ / CD8+
VV/WT
VV/GP33
VV/WT+αPD-L1
VV/GP33+αPD-L1
c
GP33-41
GP276-286
TNF-α
IFN-γ
d
IFN-γ+ 중 TNF-α+ %

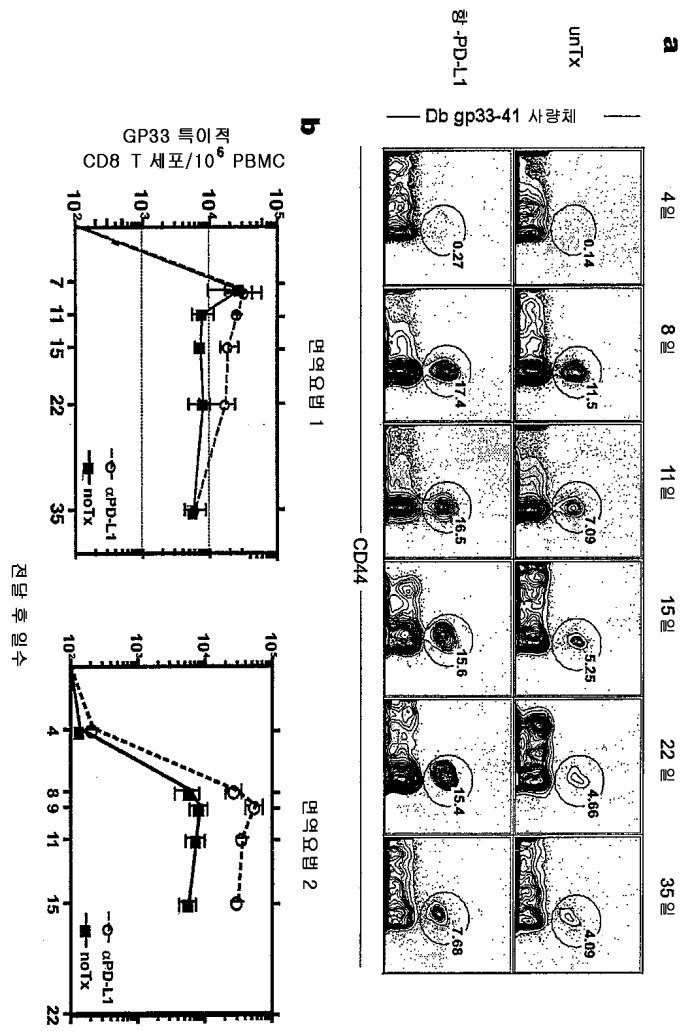
도면12


a
VV/WT
VV/GP33
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 αPD-L1
CD27
CD127
그랜자임 B
0 주
1 주
2 주
3 주
4 주
b
비장
간
폐
임프로
PD-1
CD127
그랜자임 B
Bcl-2

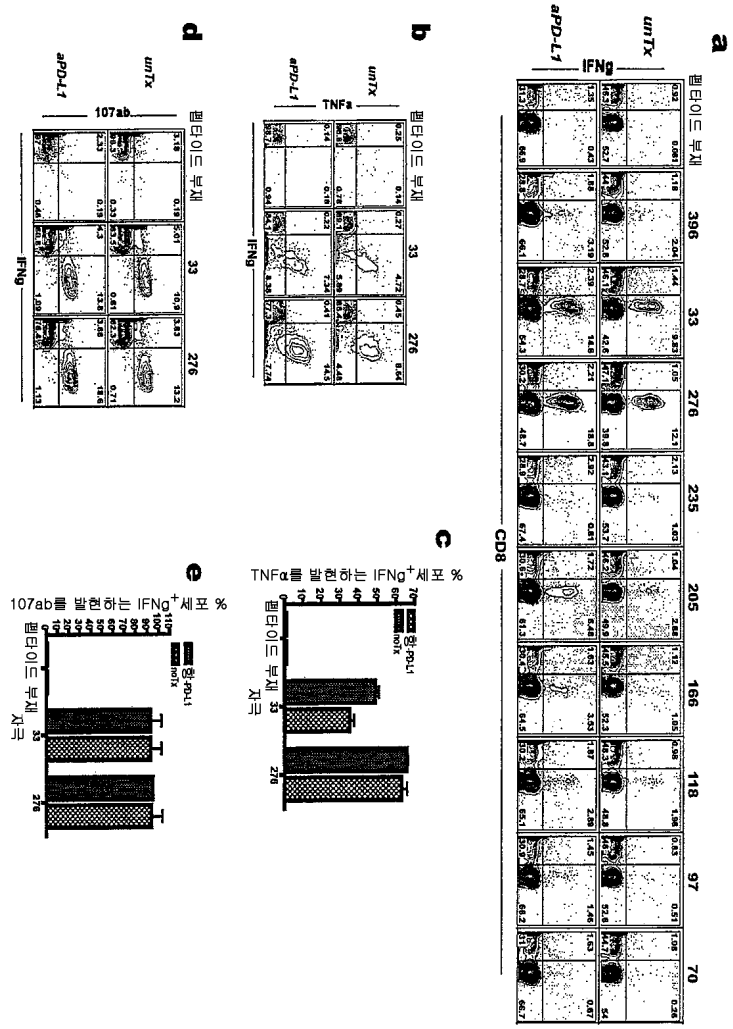
도면13


a
CD4-결핍 B6 마우스
VV/WT 이소타입
VV/WT αPD-L1
VV/GP33 이소타입
VV/GP33 αPD-L1
LCMV CL-13
7주
요법 후 2주에 분석
b
DbGP33-41
CD44
비장
간
폐
c
펩타이드 부재
GP33-41
CD107a/b
IFN-γ
% IFN-γ+CD107+ / CD8+
VV/WT+이소타입
VV/WT+αPD-L1
VV/GP33+이소타입
VV/GP33+αPD-L1
d
% IFN-γ+ / DbGP33+
e
% DbGP33+ / CD8+
log10[p.f.u. g-1 조직]
VV/WT+Isotype

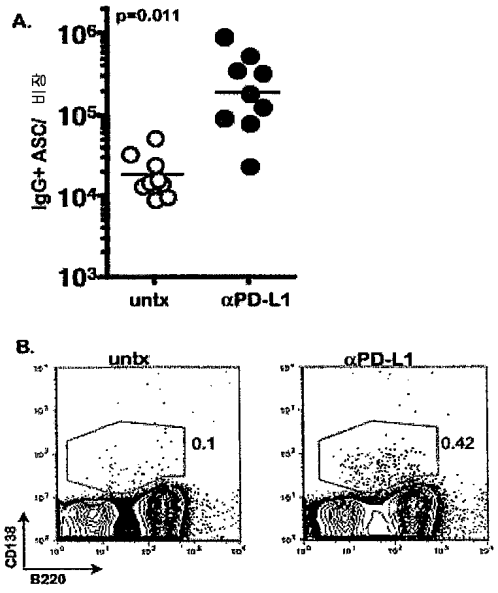
도면14


a
Db gp33-41 사량체
항-PD-L1
unTx
CD44
4일
8일
11일
15일
22일
35일
0.27
0.14
17.4
11.5
16.5
7.09
15.6
5.25
15.4
4.66
7.68
4.09
b
GP33 특이적
CD8 T 세포/10^6 PBMC
면역요법 1
면역요법 2
αPD-L1
noTx
전달 후 일수

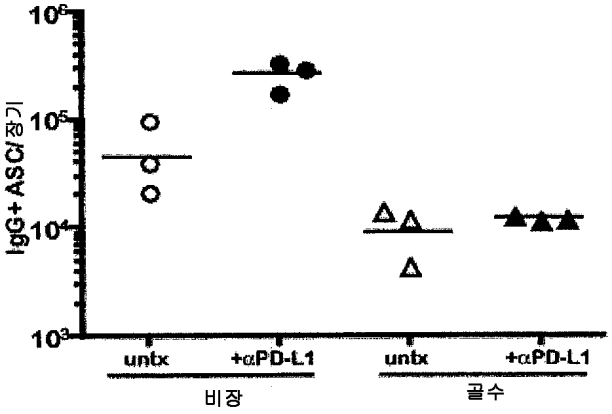
도면15


a
unTx
aPD-L1
IFNg
펩타이드 부재
396
33
276
235
205
166
118
97
70
CD8
b
unTx
aPD-L1
TNFa
IFNg
펩타이드 부재
33
276
c
TNFα를 발현하는 IFNg+세포 %
펩타이드 부재
33
276
d
unTx
aPD-L1
107ab
IFNg
펩타이드 부재
33
276
e
107ab를 발현하는 IFNg+세포 %
펩타이드 부재
33
276

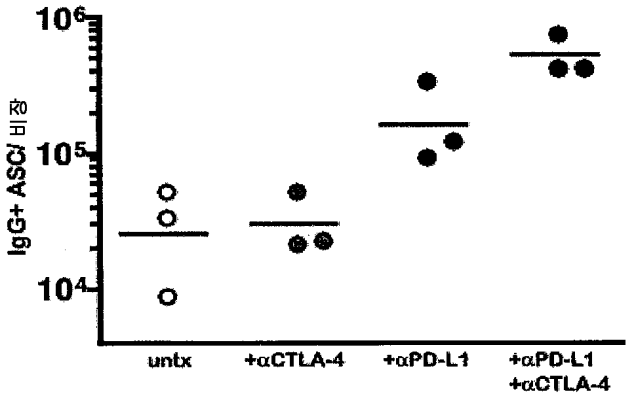
도면16


A.
p=0.011
IgG+ ASC/ 비장
untx
αPD-L1
B.
untx
αPD-L1
0.1
0.42
CD138
B220

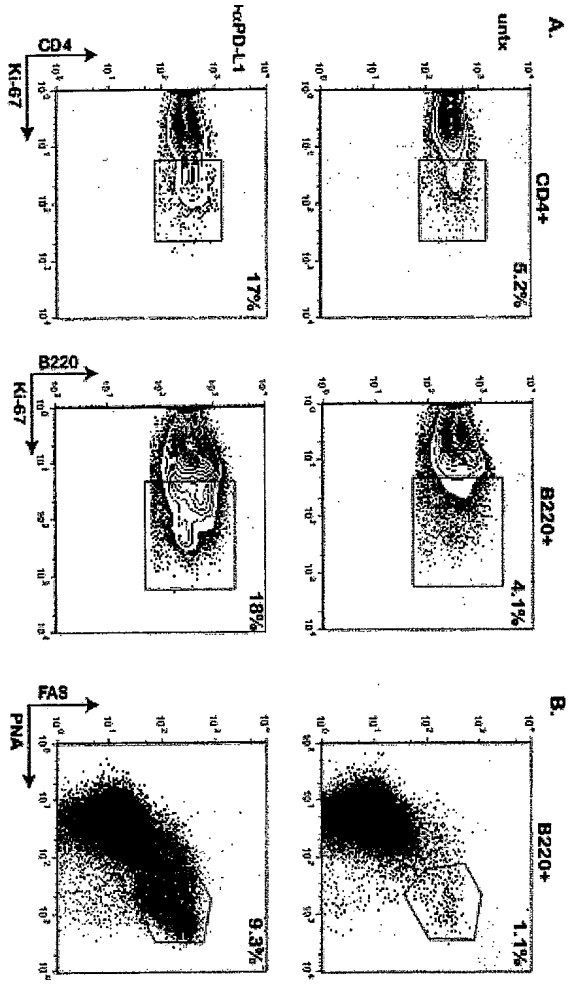
도면17


IgG+ ASC/장기
10^6
10^5
10^4
10^3
untx
+αPD-L1
untx
+αPD-L1
비장
골수

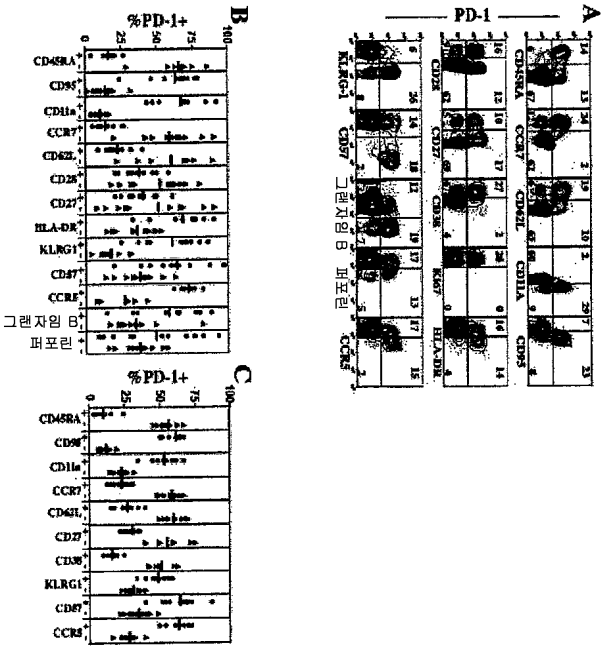
도면18


IgG+ ASC/ 비장
10^6
10^5
10^4
untx
+αCTLA-4
+αPD-L1
+αPD-L1
+αCTLA-4

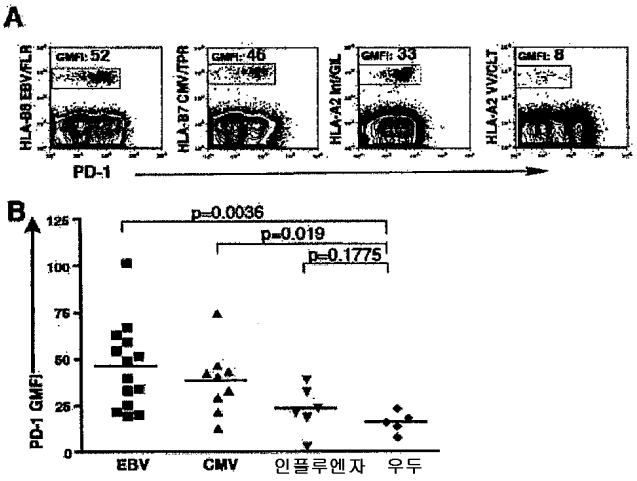
도면19


A.
unfx
αPD-L1
CD4
Ki-67
CD4+
5.2%
17%
B220
Ki-67
B220+
4.1%
18%
B.
FAS
PNA
B220+
1.1%
9.3%

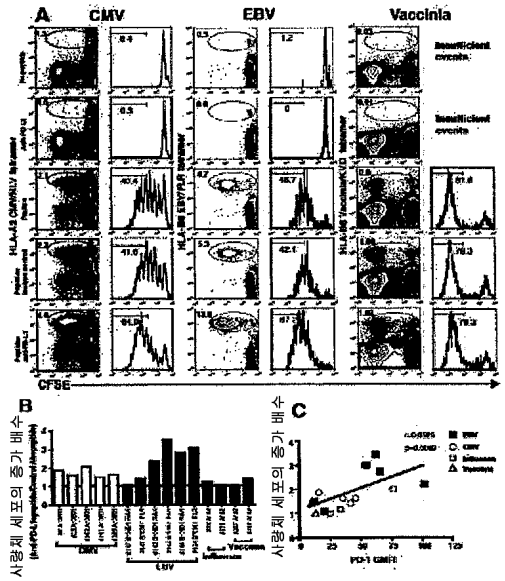
도면20


A
PD-1
KLRG-1
CD28
CD45RA
CD57
CD27
CCR7
CD62L
CD38
CD11A
Ki67
CD95
HLA-DR
CCR5
그랜자임 B
퍼포린
B
%PD-1+
CD45RA
CD95
CD11a
CCR7
CD62L
CD28
CD27
HLA-DR
KLRG1
CD57
CCR5
그랜자임 B
퍼포린
C
%PD-1+
CD45RA
CD95
CD11a
CCR7
CD62L
CD27
CD38
KLRG1
CD57
CCR5

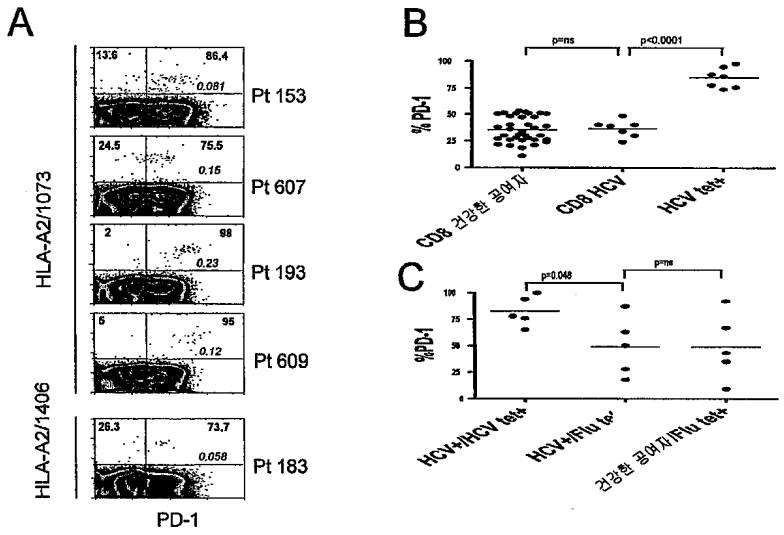
도면21


A
HLA-B8 EBV/FLR
GMFI: 52
HLA-B7 CMV/TPR
GMFI: 46
HLA-A2 Mf/GIL
GMFI: 33
HLA-A2 VV/CLT
GMFI: 8
PD-1
B
p=0.0036
p=0.019
p=0.1775
PD-1 GMFI
125
100
75
50
25
0
EBV
CMV
인플루엔자
우두

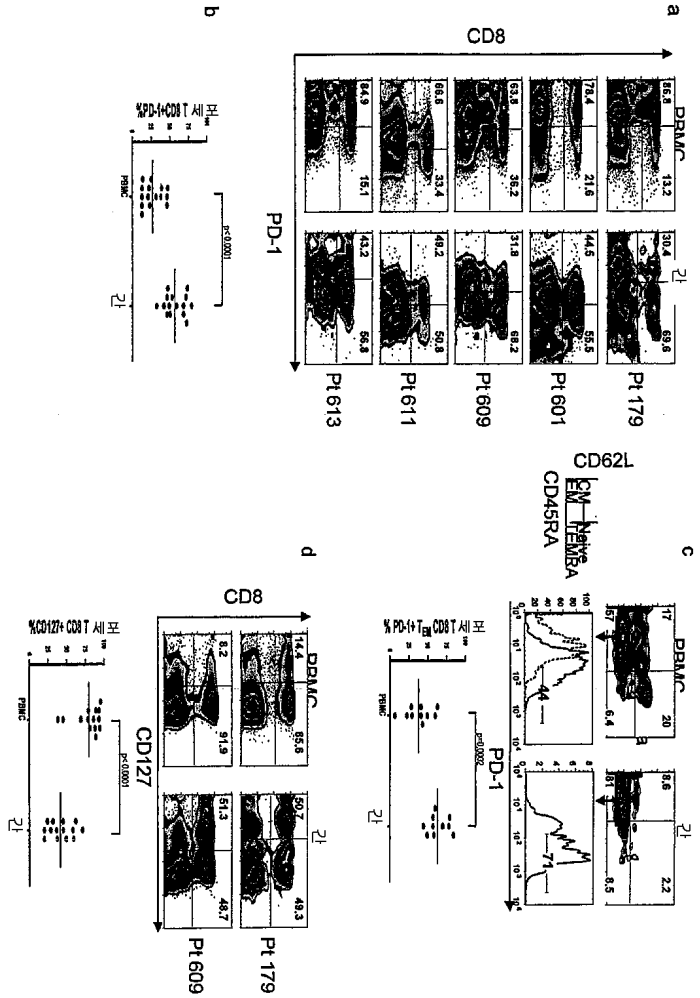
도면22


A
CMV
EBV
Vaccinia
CFSE
B
사량체 세포의 증가 배수
C
사량체 세포의 증가 배수

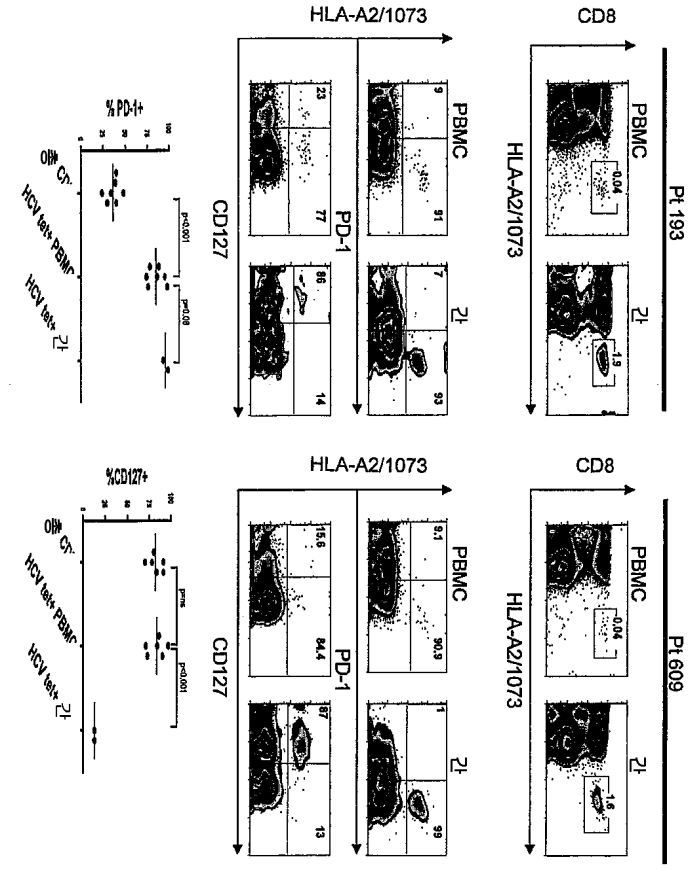
도면23


A
HLA-A2/1073
HLA-A2/1406
Pt 153
Pt 607
Pt 193
Pt 609
Pt 183
PD-1
B
p=ns
p<0.0001
% PD-1
CD8 건강한 공여자
CD8 HCV
HCV tet+
C
p=0.048
p=ns
% PD-1
HCV+/HCV tet+
HCV+/Flu tet+
건강한 공여자/Flu tet+

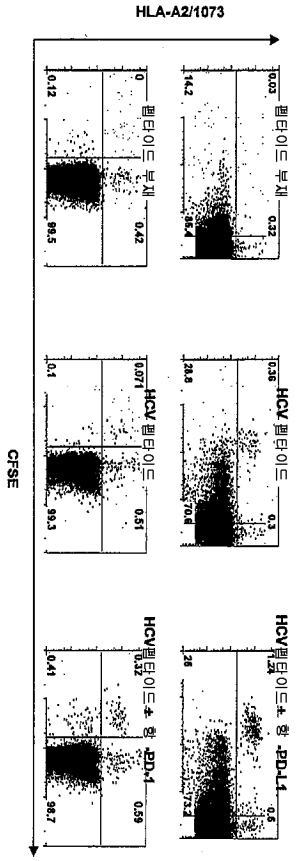
도면24


a
CD8
PD-1
PBMC
간
Pt 613
Pt 611
Pt 609
Pt 601
Pt 179
b
%PD-1+CD8 T 세포
p<0.0001
c
CD62L
CD45RA
CM
Naive
TEM
TEMRA
% PD-1+ TEM CD8 T 세포
p=0.0002
d
CD8
CD127
%CD127+ CD8 T 세포
p<0.0001
Pt 609
Pt 179

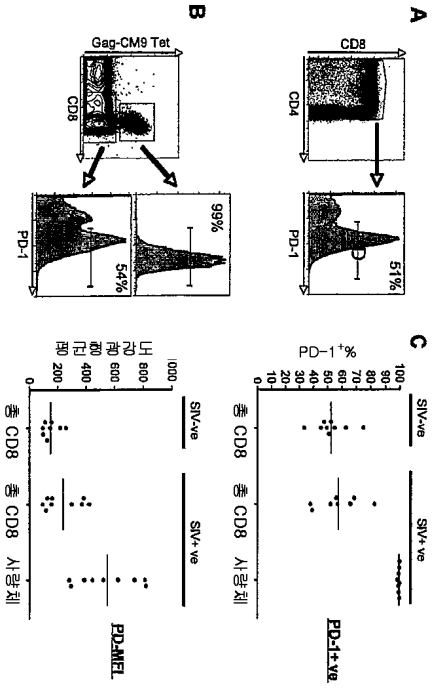
도면25


HLA-A2/1073
CD8
PBMC
간
Pt 193
Pt 609
CD127
PD-1
%PD-1+
%CD127+
HCV tet+ PBMC
HCV tet+ 간

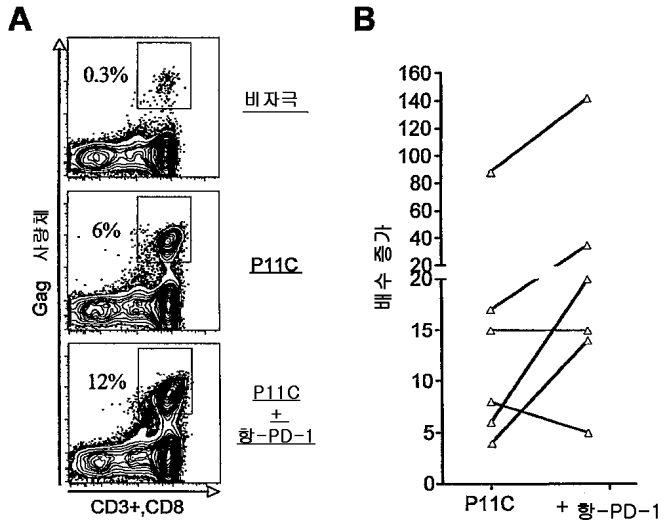
도면26


HLA-A2/1073
CFSE
펩타이드 부재
HCV 펩타이드
HCV펩타이드 + 항 PD-1
HCV펩타이드 + 항 PD-L1

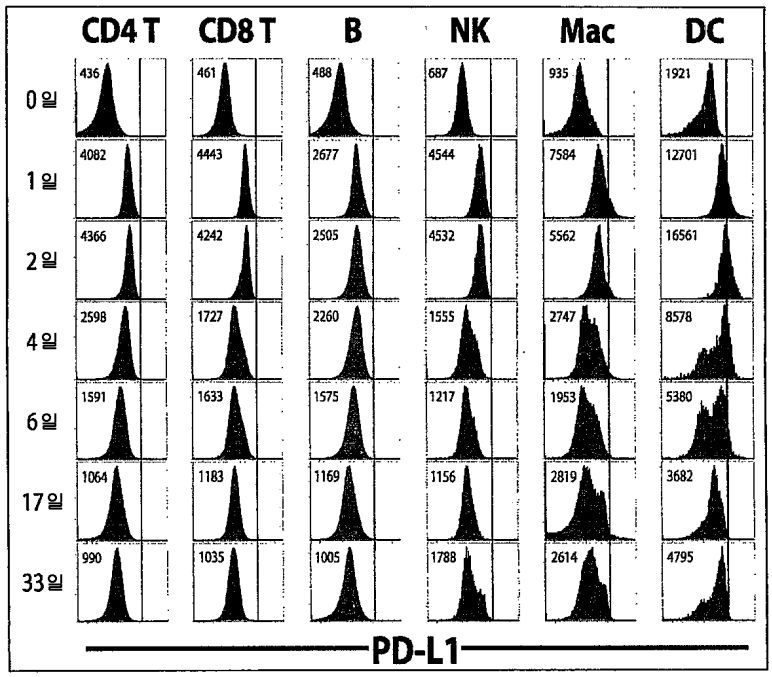
도면27


A
CD8
CD4
PD-1
51%
B
Gag-CM9 Tet
CD8
PD-1
54%
99%
C
PD-1+%
SIV-ve
SIV+ve
총 CD8
총 CD8 사량체
PD-1+ vs
평균형광강도
PD-MFI

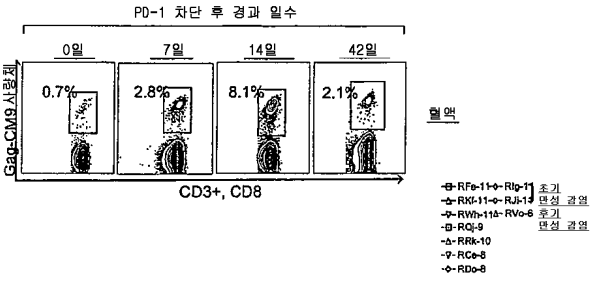
도면28



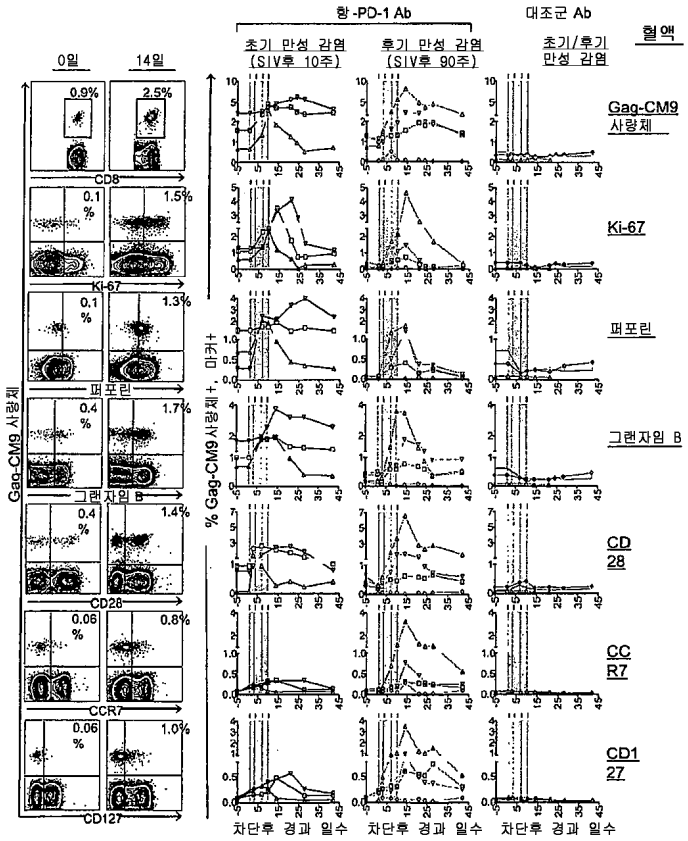
도면29



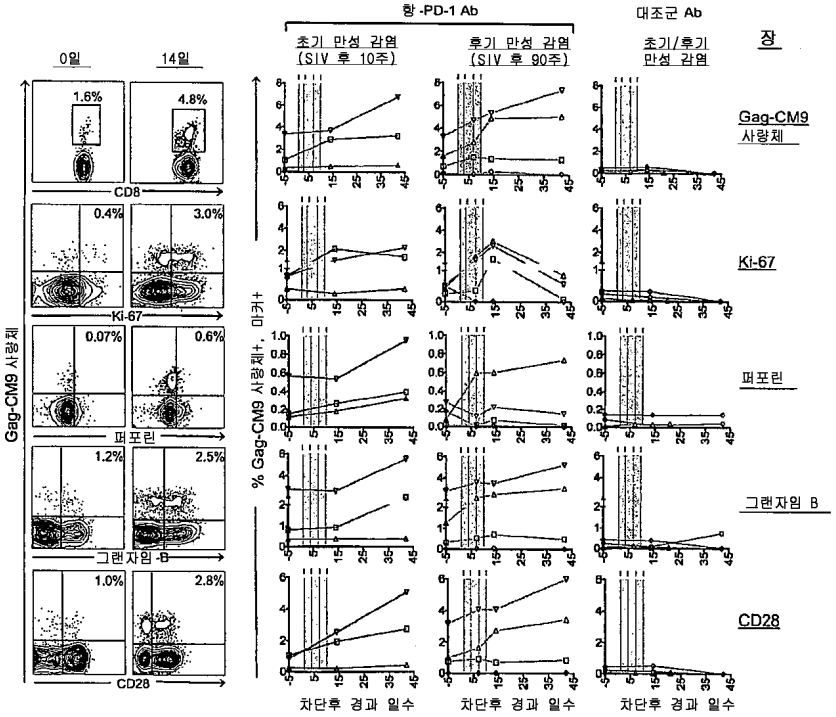
도면30a



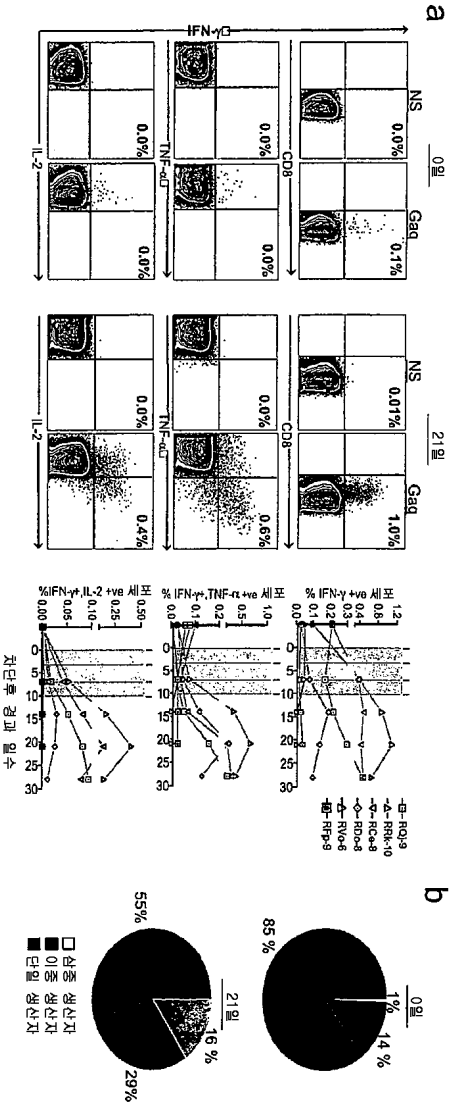
도면30b


항-PD-1 Ab
대조군 Ab
혈액
초기 만성 감염 (SIV후 10주)
후기 만성 감염 (SIV후 90주)
초기/후기 만성 감염
0일
14일
0.9%
2.5%
CD8
0.1 %
1.5%
Ki-67
0.1 %
1.3%
퍼포린
0.4 %
1.7%
그랜자임 B
0.4 %
1.4%
CD28
0.06 %
0.8%
CCR7
0.06 %
1.0%
CD127
Gag-CM9 사량체
% Gag-CM9 사량체+, 마커+
Gag-CM9 사량체
Ki-67
퍼포린
그랜자임 B
CD 28
CC R7
CD1 27
차단후 경과 일수

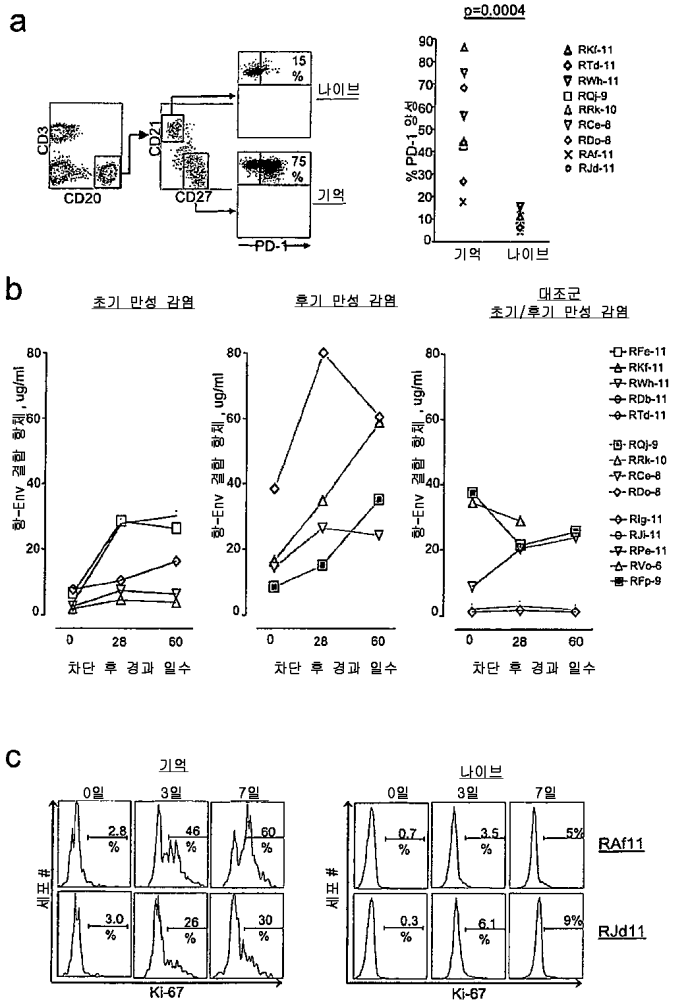
도면30c


항-PD-1 Ab
대조군 Ab
장
초기 만성 감염 (SIV 후 10주)
후기 만성 감염 (SIV 후 90주)
초기/후기 만성 감염
0일
14일
1.6%
4.8%
CD8
0.4%
3.0%
Ki-67
0.07%
0.6%
퍼포린
1.2%
2.5%
그랜자임-B
1.0%
2.8%
CD28
Gag-CM9 사량체
% Gag-CM9 사량체+, 마커+
Gag-CM9 사량체
Ki-67
퍼포린
그랜자임 B
CD28
차단후 경과 일수

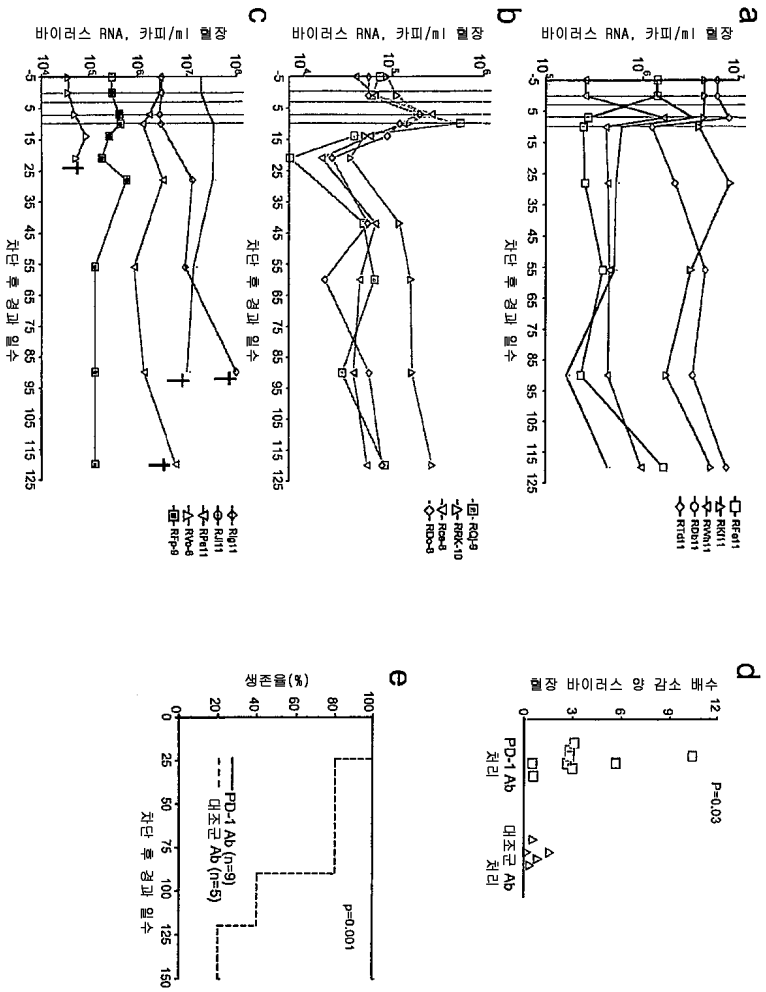
도면31


a
IFN-γ
IL-2
TNF-α
CD8
NS
Gag
0일
21일
0.0%
0.1%
0.01%
1.0%
0.4%
0.6%
%IFN-γ+,IL-2 +ve 세포
% IFN-γ+,TNF-α +ve 세포
% IFN-γ +ve 세포
차단을 효과 입증 수
RQJ-9
RRk-10
RCe-8
RDo-8
RVe-6
RFp-9
b
55%
16 %
29%
21일
85 %
1%
14 %
0일
삼중 생산자
이중 생산자
단일 생산자

도면32


a
p=0.0004
15 %
나이브
75 %
기억
CD3
CD20
CD21
CD27
PD-1
% PD-1 양전
기억
나이브
RKf-11
RTd-11
RWh-11
RQj-9
RRk-10
RCe-8
RDo-8
RAf-11
RJd-11
b
초기 만성 감염
후기 만성 감염
대조군
초기/후기 만성 감염
항-Env 결합 항체, ug/ml
차단 후 경과 일수
RFe-11
RKf-11
RWh-11
RDb-11
RTd-11
RQj-9
RRk-10
RCe-8
RDo-8
RIg-11
RJi-11
RPe-11
RVo-6
RFp-9
c
기억
나이브
0일
3일
7일
2.8 %
46 %
60 %
3.0 %
26 %
30 %
0.7 %
3.5 %
5%
0.3 %
6.1 %
9%
RAf11
RJd11
세포 #
Ki-67

도면33



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> EMORY UNIVERSITY

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE

Ahmed, Rafi

Amara, Rama

Velu, Vijayakumar

Titanji, Kehmia

Freeman, Gordon

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF INFECTIONS AND

TUMORS

<130> 6975-76374-23

<150> US 61/118,570

<151> 2008-11-28

<160> 52

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly

165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys

180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro

195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly

210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro

225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly

245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg

260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275 280 285

<210> 2

<211> 288

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Trp Val Arg Gln Val Pro Trp Ser Phe Thr Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp

20 25 30

Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met

50 55 60

Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala

65 70 75 80

Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln

85 90 95

Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp

100 105 110

Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

115 120 125

His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val

130 135 140

Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro

145 150 155 160

Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Met Val Ile Gly Ile Met Ser Ala

165 170 175

Leu Val Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val

180 185 190

Phe Cys Ser Thr Ser Met Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ser Lys Asp

195 200 205

Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Val Ala

210 215 220

Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro

225 230 235 240

Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly

245 250 255

Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln

260 265 270

Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275 280 285

<210> 3

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr

20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu

35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile

50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser

65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn

85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr

100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val

115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val

130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr

145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser

165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn

180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr

195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu

210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His

225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr

245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys

260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu

275 280 285

Glu Thr

290

<210> 4

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
130 135 140

Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
145 150 155 160

Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
180 185 190

Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
195 200 205

Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
210 215 220
Ile Phe Ile Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
225 230 235 240
Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
245 250 255
Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
260 265 270

Ile

<210> 5
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20
<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Leu Leu Ile Tyr
1 5 10
<210> 7
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Val Pro Asp Arg Pro Phe Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Phe Gly Gln Gly Gln Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gln Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gln Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 13

Thr Leu Tyr Lys Lys Met Glu Gln Asp Val Lys Val Ala His Gln
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 14

Gly Asn Leu Pro Leu Met Arg Lys Ala Tyr Leu Arg Lys Cys Lys
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 15

Thr Phe Ser Arg Met Lys Tyr Asn Ile Cys Met Gly Lys Cys Ile

1 5 10 15

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 16

Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 17

Gln Pro Arg Ala Pro Ile Arg Pro Ile

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 18

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 19

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr

1 5 10

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 20

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223

> Exemplary antigenic peptide

<400> 21

Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 22

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 23

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu

1 5 10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 24

Gly Val Ala Leu Gln Thr Met Lys Gln

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 25

Glu Thr Val Ser Glu Gln Ser Asn Val

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 26

Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 27

Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 28

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 29

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 30

Arg His Arg Pro Leu Gln Glu Val Tyr Pro Glu Ala Asn Ala Pro Ile

1 5 10 15

Gly His Asn Arg Glu

20

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 31

Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp

1 5 10 15

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 32

Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly

1 5 10

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 33

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 34

His Leu Phe Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 35

Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val

1 5 10

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 36

Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu

1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 37

Arg Ala Lys Phe Lys Gln Leu Leu

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 38

Phe Leu Arg Gly Arg Ala Tyr Gly Leu

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 39

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 40

Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met

1 5 10

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 41

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223

> Exemplary antigenic peptide

<400> 42

Cys Leu Thr Glu Tyr Ile Leu Trp Val

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 43

Lys Val Asp Asp Thr Phe Tyr Tyr Val

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 44

Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 45

Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val

1 5 10

<210> 46

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln

1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile

20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser

35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn

50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu

65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp

85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr

100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr

115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln

130 135 140

Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
145 150 155 160

Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
165 170 175
Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
180 185 190
Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
195 200 205
Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
210 215 220

Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
225 230 235 240
Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
245 250 255
Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
260 265 270
Ile

<210> 47
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 47
Cys Glu Leu Asp Asn Ser His Glu Asp Tyr Asn Trp Asn Leu Trp Phe
1 5 10 15
Lys Trp Cys Ser Gly His Gly Arg
20

<210> 48
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 48

Thr Gly His Gly Lys His Phe Tyr Asp Cys Asp Trp Asp Pro Ser His
1 5 10 15

Gly Asp Tyr Ser Trp Tyr Leu Trp
20

<210> 49

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 49

Asp Pro Ser His Gly Asp Tyr Ser Trp Tyr Leu Trp Asp Tyr Leu Cys
1 5 10 15

Gly Asn Gly His His Pro Tyr Asp
20

<210> 50

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 50

Asp Tyr Leu Cys Gly Asn Gly His His Pro Tyr Asp Cys Glu Leu Asp
1 5 10 15

Asn Ser His Glu Asp Tyr Ser Trp
20

<210> 51

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 51

Asp Pro Tyr Asn Cys Asp Trp Asp Pro Tyr His Glu Lys Tyr Asp Trp

1 5 10 15

Asp Leu Trp Asn Lys Trp Cys Asn

20

<210> 52

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary antigenic peptide

<400> 52

Lys Tyr Asp Trp Asp Leu Trp Asn Lys Trp Cys Asn Lys Asp Pro Tyr

1 5 10 15

Asn Cys Asp Trp Asp Pro Tyr His

20