(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-512658
(P2022-512658A)
(43)公表日　令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*35/19 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/19	Ｚ	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*3/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｋ	*35/39 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/39		
Ａ６１Ｐ	*37/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		

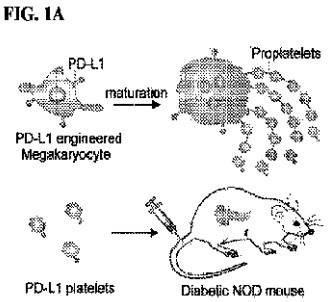
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全40頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-519735(P2021-519735)
(86)(22)出願日　令和1年10月10日(2019.10.10)
(85)翻訳文提出日　令和3年6月1日(2021.6.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/055524
(87)国際公開番号　WO2020/077037
(87)国際公開日　令和2年4月16日(2020.4.16)
(31)優先権主張番号　62/743,857
(32)優先日　平成30年10月10日(2018.10.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　517366013
ノース カロライナ ステート ユニバーシティ
ＮＯＲＴＨ ＣＡＲＯＬＩＮＡ ＳＴＡＴＥ ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＹ
アメリカ合衆国、ノースカロライナ州　２７６０６、ラレー、セカンド フロアー、メイン キャンパス ドライブ １０２１
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木 康仁
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＰＤ－Ｌ１提示血小板は、新たに発症する１型糖尿病を逆転させる

(57)【要約】
治療剤カーゴおよび標的化部分を含む修飾された血小板を含む治療剤送達ビヒクル、ならびに糖尿病、自己炎症性疾患、および／または移植片対宿主病を治療するための方法であって、該治療剤送達ビヒクルを対象に投与することを含む、方法が開示される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
膜結合型外因性ＰＤ－Ｌ１を含む、操作された血小板。
【請求項２】
膜結合型ＣＤ４０Ｌおよび／またはＴｏｌｌ様受容体をさらに含む、請求項１に記載の操作された血小板。
【請求項３】
標的化部分、請求項１に記載の操作された血小板。
【請求項４】
前記標的化部分が、ペプチド、ポリペプチド、重合体、小分子、核酸、抗体、または糖である、請求項３に記載の操作された血小板。
【請求項５】
前記標的化部分が、骨髄、肝臓、脾臓、膵臓、前立腺、膀胱、心臓、肺、脳、皮膚、腎臓、卵巣、精巣、リンパ節、小腸、大腸、または胃を標的とする、請求項３に記載の操作された血小板。
【請求項６】
対象における糖尿病を治療／低減する方法であって、前記対象に請求項１に記載の操作された血小板を投与することを含む、方法。
【請求項７】
前記対象にβ膵島細胞を投与することをさらに含む、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記操作された血小板が、前記β膵島細胞の前記投与の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、３０、３６、４２、４８時間、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４日、３、４、５、６、７、８週間前に投与される、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
対象における移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）を治療／低減／予防／阻害する方法であって、前記対象に請求項１に記載の操作された血小板を投与することを含む、方法。
【請求項１０】
自己炎症性病態を治療／低減／予防／阻害する方法。
【請求項１１】
前記自己炎症性病態が、アカラシア、急性散在性脳脊髄炎、急性運動性軸索型ニューロパチー、アジソン病、有痛脂肪症、成人スチル病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アルツハイマー病、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、抗ＧＢＭ／抗ＴＢＭ腎炎、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、自己免疫性血管浮腫、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性腸疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患（ＡＩＥＤ）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性精巣炎、自己免疫性膵炎、多腺性自己免疫症候群、自己免疫性網膜症、自己免疫性じんま疹、軸索型および神経細胞型ニューロパチー（ＡＭＡＮ）、バロー病、ベーチェット病、良性粘膜類天疱瘡（Ｂｅｎｉｇｎ　ｍｕｃｏｓａｌ　ｅｍｐｈｉｇｏｉｄ）、ビッカースタッフ脳炎、水疱性類天疱瘡、キャッスルマン病（ＣＤ）、セリアック病、シャガス病、慢性疲労症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎（ＣＩＤＰ）、慢性再発性多発性骨髄炎（ＣＲＭＯ）、チャーグ・ストラウス症候群（ＣＳＳ）、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（ＥＧＰＡ）、瘢痕性類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性心ブロック、コクサッキー心筋炎、ＣＲＥＳＴ症候群、クローン病、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、１型糖尿病、円板状エリテマトーデス、ドレッスラー症候群、子宮内膜症、腱付着部炎、好酸球性食道炎（ＥｏＥ）、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、本態性混合型クリオグロブリン血症、エバンス症候群、フェルティー症候群、線維筋痛症、線維性肺胞炎、巨細胞動脈炎（側頭動脈炎）、巨細胞性心筋炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多

発血管炎性肉芽腫症、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本脳症、橋本病、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病（ＨＳＰ）、妊娠性疱疹または妊娠性類天疱瘡（ＰＧ）、化膿性汗腺炎（ＨＳ）（反対型ざ瘡）、低ガンマグロブリン血症、ＩｇＡ腎障害、ＩｇＧ４関連硬化性疾患、免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、封入体筋炎（ＩＢＭ）、間質性膀胱炎（ＩＣ）、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、若年性関節炎、若年性糖尿病（１型糖尿病）、若年性筋炎（ＪＭ）、川崎病、ランバート・イートン症候群、白血球破壊性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、線状ＩｇＡ（ＬＡＤ）、ループス腎炎、ループス血管炎、慢性ライム病、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎（ＭＰＡ）、混合性結合組織病（ＭＣＴＤ）、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多巣性運動ニューロパチー（ＭＭＮ）またはＭＭＮＣＢ、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、新生児ループス、視神経脊髄炎、好中球減少症、眼部瘢痕性類天疱瘡、視神経炎、オード甲状腺炎、回帰性リウマチ（ＰＲ）、ＰＡＮＤＡＳ、傍腫瘍性小脳変性症（ＰＣＤ）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（ＰＮＨ）、パリーロンバーグ症候群、周辺部ぶどう膜炎（周辺性ぶどう膜炎）、パーソネージ・ターナー症候群、天疱瘡、末梢神経障害、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血（ＰＡ）、ＰＯＥＭＳ症候群、結節性多発動脈炎、１、２、３型多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、乾癬、乾癬性関節炎、赤芽球ろう（ＰＲＣＡ）、壊疽性膿皮症、レイノー現象、反応性関節炎、反射性交感神経性ジストロフィー、再発性多発軟骨炎、下肢静止不能症候群（ＲＬＳ）、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、リウマチ性血管炎、サルコイドーシス、シュミット症候群、シュニッツラー症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、精液および精巣自己免疫、全身硬直症候群（ＳＰＳ）、亜急性細菌性心内膜炎（ＳＢＥ）、スザック症候群、シデナム舞踏病、交感性眼炎（ＳＯ）、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、トロサ・ハント症候群（ＴＨＳ）、横断性脊髄炎、１型糖尿病、潰瘍性大腸炎（ＵＣ）、未分化結合組織病（ＵＣＴＤ）、じんま疹、じんま疹様血管炎、ぶどう膜炎、血管炎、白斑、フォークト・小柳・原田病、ならびにウェゲナー肉芽腫症（または多発血管炎性肉芽腫症（ＧＰＡ））からなる群から選択される、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

前記自己炎症性病態が、関節リウマチである、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

前記操作された血小板が、少なくとも１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８時間毎に１回、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１日毎に１回、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２ヶ月毎に１回、前記患者に投与される、請求項６～８のいずれかに記載の糖尿病を治療する方法、請求項６に記載の移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）を治療／低減／予防／阻害する方法、または請求項１０～１２のいずれかに記載の自己炎症性病態を治療／低減／予防／阻害する方法。

【請求項１４】

前記操作された血小板が、１週間あたり少なくとも１、２、３、４、５、６、７回投与される、請求項６～８のいずれかに記載の糖尿病を治療する方法、請求項６に記載の移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）を治療／低減／予防／阻害する方法、または請求項１０～１２のいずれかに記載の自己炎症性病態を治療／低減／予防／阻害する方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【０００１】

本出願は、２０１８年１０月１０日に出願された米国特許仮出願第６２／７４３，８５７号の利益を主張するものであり、この開示の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】
１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）は、遺伝的素因、環境因子、および病態生理によって引き起こされる免疫制御の崩壊から生じるｈｔｔｐ：／／ｃｎ．ｂｉｎｇ．ｃｏｍ／ｄｉｃｔ／ｓｅａｒｃｈ？ｑ＝ａｒｉｓｅ＆ＦＯＲＭ＝ＢＤＶＳＰ６＆ｍｋｔ＝ｚｈ－ｃｎｈｔｔｐ：／／ｃｎ．ｂｉｎｇ．ｃｏｍ／ｄｉｃｔ／ｓｅａｒｃｈ？ｑ＝ｆｒｏｍ＆ＦＯＲＭ＝ＢＤＶＳＰ６＆ｍｋｔ＝ｚｈ－ｃｎ。自己反応性リンパ球は、インスリン産生β細胞を破壊し、これは、インスリンの不十分な産生につながり、制御されない血糖値および多くの種類の二次合併症をもたらす。複数の種類のリンパ球の浸潤が、Ｔ１Ｄ患者の膵臓内で検出されている。これらの膵臓貫通リンパ球のうち、膵島抗原反応性Ｔ細胞は、疾患開始および進行において支配的な役割を果たす。これらのＴ細胞は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）媒介細胞毒性、およびインターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）などのサイトカインの産生を通して、β細胞を破壊し得る。Ｔ１Ｄの病態形成における自己反応性リンパ球の中心的な役割のために、免疫介入は、Ｔ１Ｄを治療する上で大いに有望である。抗ＣＤ３モノクローナル抗体（テプリズマブおよびオテリキシズマブ）の治療によるＴ細胞枯渇は、新たに診断された患者における持続したインスリン産生に寄与する。抗ＣＤ３抗体は新たに発症するＴ１Ｄを逆転させることができるが、この抗原非特異的介入は、有害作用および安全性の懸念を引き起こし得る。したがって、限定された副作用でＴ１Ｄを治療するための、増強された安全性を提供することができる膵島抗原特異的Ｔ細胞の介入が必要とされている。

【発明の概要】
【０００３】
膜結合型ＰＤ－Ｌ１を含む、操作された血小板に関する方法および組成物が開示される。
【０００４】
膜結合型外因性ＰＤ－Ｌ１を含む、操作された血小板が本明細書に開示される。一態様では、膜結合型ＣＤ４０Ｌおよび／またはＴｏｌｌ様受容体をさらに含む、任意の先行する態様に記載の操作された血小板が本明細書に開示される。
【０００５】
標的化部分（例えば、ペプチド、ポリペプチド、重合体、小分子、核酸、抗体、または糖など）をさらに含む、任意の先行する態様に記載の操作された血小板もまた本明細書に開示される。標的化部分は、骨髄、肝臓、脾臓、膵臓、前立腺、膀胱、心臓、肺、脳、皮膚、腎臓、卵巣、精巣、リンパ節、小腸、大腸、または胃を標的とするように設計または操作され得ることが理解され、本明細書で企図される。
【０００６】
一態様では、対象における糖尿病、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、および／または自己炎症性疾患もしくは病態を治療／低減／予防／阻害する方法であって、対象に任意の先行する態様に記載の操作された血小板を投与することを含む、方法が本明細書に開示される。
【０００７】
任意の先行する態様に記載の糖尿病、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、および／または自己炎症性疾患もしくは病態を治療／低減／予防／阻害する方法であって、対象にβ膵島細胞を投与することをさらに含む、方法もまた本明細書に開示される。

【図面の簡単な説明】
【０００８】
本明細書に組み込まれ、その一部を構成する添付の図面は、いくつかの実施形態を例証し、発明を実施するための形態とともに、本開示の組成物および方法を例証する。
【０００９】
図１Ａ、１Ｂ、１Ｃ、１Ｄ、１Ｅ、１Ｆ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉ、１Ｊ、１Ｋ、および１Ｌは、模式図、およびＰＤ－Ｌ１提示血小板の産生を示す。
【図１Ａ】図１Ａは、ＰＤ－Ｌ１血小板の産生、およびβ細胞保護のためのＣＤ８＋Ｔ細胞の阻害の模式図を示す。（Ｉ）マウスＰＤ－Ｌ１を安定して発現するＬ８０５７細胞株の確立、およびＰＤ－Ｌ１血小板の産生。（ＩＩ）ＰＤ－Ｌ１血小板は、ＰＤ－Ｌ１によるＰＤ－１遮断を介して、β細胞を自己反応性Ｔ細胞から保護する。

【図１Ｂ】図１ＢはマウスＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１を安定して発現するＬ８０５７細胞株の共焦点画像を示す。ＷＧＡ　Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ５９４色素を使用して、細胞膜を染色した（スケールバー：１０μｍ）。
【図１Ｃ】ｃ　ウエスタンブロットによるＬ８０５７細胞株上のＰＤ－Ｌ１の発現の分析。Ｌ８は、Ｌ８０５７細胞には短い。
【図１Ｄ】図１Ｄおよび１Ｅは、免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーによる、ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１　Ｌ８０５７細胞内のＣＤ４１ａの検出を示す（スケールバー：１０μｍ）。
【図１Ｅ】図１Ｄおよび１Ｅは、免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーによる、ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１　Ｌ８０５７細胞内のＣＤ４１ａの検出を示す（スケールバー：１０μｍ）。
【図１Ｆ】図１Ｆおよび１Ｇは、免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーによる、５００ｎＭのＰＭＡで治療したＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１　Ｌ８０５７細胞内のＣＤ４２ａの検出を示す（スケールバー：１０μｍ）。
【図１Ｇ】図１Ｆおよび１Ｇは、免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーによる、５００ｎＭのＰＭＡで治療したＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１　Ｌ８０５７細胞内のＣＤ４２ａの検出を示す（スケールバー：１０μｍ）。
【図１Ｈ】図１Ｈは、成熟および分化を受けるＰＤ－Ｌ１　ＭＫの異なる段階を示す（スケールバー：１０μｍ）。Ｉ：　成熟ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１　ＭＫ細胞、ＩＩ：　ＭＫ細胞からの血小板前駆細胞の出芽、ＩＩＩ：　ＭＫ細胞からの血小板前駆細胞の拡張、ＩＶ：　ＭＫ細胞からの血小板前駆細胞の放出。
【図１Ｉ】図１Ｉは、Ｌ８０５７細胞から拡張したＰＤ－Ｌ１血小板前駆細胞の形態を示す（スケールバー：１０μｍ）。
【図１Ｊ】図１Ｊは、精製されたＰＤ－Ｌ１血小板の共焦点画像を示す（スケールバー：２μｍ）。
【図１Ｋ】図１Ｋは、ＰＤ－Ｌ１血小板の形態を示す代表的なＴＥＭ画像を示す（スケールバー：１μｍ）。
【図１Ｌ】図１Ｌは、ＤＬＳによって測定したＰＤ－Ｌ１血小板のサイズ分布を示す。
【００１０】
図２Ａ、２Ｂ、２Ｃ、２Ｄ、２Ｅ、２Ｆ、２Ｇ、２Ｈ、および２Ｉは、ＰＤ－Ｌ１血小板のインビトロおよびインビボでの生物学的特性評価を示す。
【図２Ａ】図２Ａは、ＰＤ－Ｌ１血小板、活性化ＰＤ－Ｌ１血小板、および放出された血小板マイクロパーティクル（ＰＭＰ）の代表的なＴＥＭ画像を示す。画像ＩおよびＩＩのスケールバー：１μｍ。画像ＩＩＩのスケールバー：１００ｎｍ。
【図２Ｂ】図２Ｂは、トロンビンによる活性化の３０分後のＰＤ－Ｌ１血小板およびＰＭＰのサイズ分布の測定を示す。
【図２Ｃ】図２Ｃは、３０分にわたる、コラーゲン被覆ウェル上のＰＤ－Ｌ１血小板の保持を示す（スケールバー：５０μｍ）。
【図２Ｄ】図２Ｄは、ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１血小板、およびＴ細胞に結合した遊離血小板を示す（スケールバー：１０μｍ）。
【図２Ｅ】図２Ｅおよび２Ｆは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓単離ＧｚｍＢ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的なプロット（２ｅ）および定量化（２ｆ）を示す（ＣＤ８＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝５）。全体を通して、ＮＳ：有意性なし、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１であり、テューキー事後検定分析による２元配置ＡＮＯＶＡを実行して、分析を行った。
【図２Ｆ】図２Ｅおよび２Ｆは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓単離ＧｚｍＢ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的なプロット（２ｅ）および定量化（２ｆ）を示す（ＣＤ８＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝５）。全体を通して、ＮＳ：有意性なし、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１であり、テューキー事後検定分析による２元配置ＡＮＯＶＡを実行して、分析を行った。

【図２Ｇ】図２Ｇは、遊離血小板およびＰＤ－Ｌ１血小板のインビボでの血液循環保持特性を示す。蛍光を、示される異なる時点で測定した（ｎ＝３）。誤差バー、±標準偏差。
【図２Ｈ】図２Ｈは、膵臓および主要な器官内の遊離血小板およびＰＤ－Ｌ１血小板の体内分布のインビボでの蛍光画像を示す。マウスに、ＮＨＳ－Ｃｙ５．５で標識した遊離血小板およびＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１血小板（２００μＬ、約２×１０^{8}）を注射し、器官内の分布を、注射の２０時間後に測定した。
【図２Ｉ】図２Ｉは、示される脾臓および主要な器官内の１グラムの組織あたりの蛍光強度を示す（ｎ＝８）。誤差バー、±標準偏差。
【００１１】
【図３Ａ】図３Ａおよび３Ｂは、ｈＰＤ－Ｌ１血小板がＰＤ－１陽性Ｔ細胞上に結合することを示す。ＣＤ３／ＣＤ２８Ｄｙｎａｂｅｅｄｓ活性化ＰＤ－１陽性Ｔ細胞および未刺激のＴ細胞に結合した、ＭＥＧ－０１由来ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１血小板の代表的な画像（３ａ）および定量化（３ｂ）（スケールバー：１０μｍ）。
【図３Ｂ】図３Ａおよび３Ｂは、ｈＰＤ－Ｌ１血小板がＰＤ－１陽性Ｔ細胞上に結合することを示す。ＣＤ３／ＣＤ２８Ｄｙｎａｂｅｅｄｓ活性化ＰＤ－１陽性Ｔ細胞および未刺激のＴ細胞に結合した、ＭＥＧ－０１由来ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１血小板の代表的な画像（３ａ）および定量化（３ｂ）（スケールバー：１０μｍ）。
【００１２】
【図４】図４は、ＣＤ８＋Ｔ細胞が細胞培養および拡大のために生存可能に選別されたことを示す。フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群のＣＦＳＥ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的なプロット（ＣＤ３＋Ｔ細胞でゲート）。ＣＤ３＋Ｔ細胞を、ＰＤ－Ｌ１血小板および遊離血小板とともに７２時間にわたってインキュベートし、その後カルボキシフルオセインサクシニミジルエステル（ＣＦＳＥ）で１０分にわたって標識し、その後ＣＤ３＋Ｔ細胞でゲートしたＦＡＣＳを使用して、ＣＤ８＋Ｔ細胞を分析した。
【００１３】
図５Ａ、５Ｂ、５Ｃ、５Ｄ、５Ｅ、および５Ｆは、ＰＤ－Ｌ１血小板が糖尿病ＮＯＤマウスにおいて高血糖を逆転させることを示す。
【図５Ａ】図５Ａは、示される異なる治療を行った糖尿病ＮＯＤマウスの血糖値を示す（ｎ＝１２）。
【図５Ｂ】図５Ｂは、示される異なる治療を行った糖尿病ＮＯＤマウスの平均血糖値を示す（ｎ＝１２）。濃緑色の線：非逆転糖尿病ＮＯＤマウス（ｎ＝３）、淡緑色の線：逆転糖尿病ＮＯＤマウス（ｎ＝９）。データを、平均±標準偏差として表す。
【図５Ｃ】図５Ｃおよび５Ｄは、脾臓切片内のインスリン＋β細胞の代表的な共焦点画像（５ｃ）および定量化（５ｄ）を示す（スケールバー：１００μｍ）。
【図５Ｄ】図５Ｃおよび５Ｄは、脾臓切片内のインスリン＋β細胞の代表的な共焦点画像（５ｃ）および定量化（５ｄ）を示す（スケールバー：１００μｍ）
【図５Ｅ】図５Ｅは、示される異なる治療後の糖尿病ＮＯＤマウスのインスリンレベルを示す（ｎ＝１２）。（５Ｃ、５Ｇ、５Ｉ）。
【図５Ｆ】図５Ｆは、糖尿病を発症したＮＯＤマウスの発生率を示す（ｎ＝１０）。全体を通して、ＮＳ：有意性なし、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１であり、テューキー事後検定分析による１元配置ＡＮＯＶＡ（５ｄおよび５ｅ）を実行して、またはログランク（マンテル・コックス）検定によって（５ｆ）、分析を行った。
【００１４】
図６Ａおよび６Ｂは、ＰＤ－Ｌ１血小板が５回の治療で糖尿病ＮＯＤマウスにおいて高血糖を逆転させることを示す。
【図６Ａ】図６Ａは、治療スケジュールを示す。
【図６Ｂ】図６Ｂは、示される異なる治療を行った糖尿病ＮＯＤマウスの血糖値を示す（ｎ＝１２）。
【００１５】
図７Ａおよび７Ｂは、ＰＤ－Ｌ１血小板が１０回の治療で糖尿病ＮＯＤマウスにおいて高

血糖を逆転させることを示す。
【図７Ａ】図７Ａは、治療スケジュールを示す。
【図７Ｂ】図７Ｂは、示される異なる治療を行った糖尿病ＮＯＤマウスの血糖値を示す（ｎ＝１２）。
【００１６】
図８Ａ、８Ｂ、８Ｃ、８Ｄ、８Ｅ、８Ｆ、８Ｇ、８Ｈ、８Ｉ、および８Ｊは、脾臓治療を受ける糖尿病ＮＯＤマウスの脾臓内のＴ細胞状態の特性評価を示す。
【図８Ａ】図８Ａおよび８Ｂは、免疫蛍光染色による膵島浸潤ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的な共焦点画像（８ａ）および定量化（８ｂ）を示す（スケールバー：１００μｍ）。
【図８Ｂ】図８Ａおよび８Ｂは、免疫蛍光染色による膵島浸潤ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的な共焦点画像（８ａ）および定量化（８ｂ）を示す（スケールバー：１００μｍ）。
【図８Ｃ】図８Ｃおよび８Ｄは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓浸潤ＣＤ３＋Ｔ細胞の代表的なプロット（８ｃ）および定量化（８ｄ）を示す（ＣＤ３＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。
【図８Ｄ】図８Ｃおよび８Ｄは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓浸潤ＣＤ３＋Ｔ細胞の代表的なプロット（８ｃ）および定量化（８ｄ）を示す（ＣＤ３＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。
【図８Ｅ】図８Ｅおよび８Ｆは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓浸潤ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞の代表的なプロット（８ｅ）および定量化（８ｆ）を示す（ＣＤ３＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。
【図８Ｆ】図８Ｅおよび８Ｆは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓浸潤ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞の代表的なプロット（８ｅ）および定量化（８ｆ）を示す（ＣＤ３＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。
【図８Ｇ】図８Ｇおよび８Ｈは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓浸潤ＧｚｍＢ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的なプロット（８ｇ）および定量化（８ｈ）を示す（ＣＤ８＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。
【図８Ｈ】図８Ｇおよび８Ｈは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓浸潤ＧｚｍＢ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的なプロット（８ｇ）および定量化（８ｈ）を示す（ＣＤ８＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。
【図８Ｉ】図８Ｉおよび８Ｊは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓浸潤ＩＮＦ－γ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的なプロット（８ｇ）および定量化（８ｈ）を示す（ＣＤ８＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。全体を通して、ＮＳ：有意性なし、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１であり、テューキー事後検定分析による１元配置ＡＮＯＶＡを実行して、分析を行った（８ｂ、８ｄ、８ｆ、８ｈ、および８ｊ）。
【図８Ｊ】図８Ｉおよび８Ｊは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓浸潤ＩＮＦ－γ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の代表的なプロット（８ｇ）および定量化（８ｈ）を示す（ＣＤ８＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。全体を通して、ＮＳ：有意性なし、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１であり、テューキー事後検定分析による１元配置ＡＮＯＶＡを実行して、分析を行った（８ｂ、８ｄ、８ｆ、８ｈ、および８ｊ）。
【００１７】
【図９Ａ】図９Ａおよび９Ｂは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓のＦｏｘＰ３＋ＣＤ４＋Ｔ細胞の代表的なプロット（９ａ）および定量化（９ｂ）を示す（ＣＤ８＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。全体を通して、ＮＳ：有意性なし、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１であり、テューキー事後検定分析による１元配置ＡＮＯＶＡを実行して、分析を行った。
【図９Ｂ】図９Ａおよび９Ｂは、フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓のＦｏｘＰ３＋ＣＤ４＋Ｔ細胞の代表的なプロット（９ａ）および定量化（９ｂ）を示す（ＣＤ８＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。全体を通して、ＮＳ：有意性なし、＊

Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１であり、テューキー事後検定分析による１元配置ＡＮＯＶＡを実行して、分析を行った。

【００１８】

【図１０Ａ】図１０Ａおよび１０Ｂは、マウスの異なる治療群のＣＤ４９ｂ＋ＣＤ４＋Ｔｒ１細胞集団のパーセンテージを示す。フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓のＣＤ４９ｂ＋ＣＤ４＋Ｔｒ１細胞の代表的なプロット（１０ａ）および定量化（１０ｂ）（ＣＤ３＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。全体を通して、ＮＳ：有意性なし、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１であり、テューキー事後検定分析による１元配置ＡＮＯＶＡを実行して、分析を行った。

【図１０Ｂ】図１０Ａおよび１０Ｂは、マウスの異なる治療群のＣＤ４９ｂ＋ＣＤ４＋Ｔｒ１細胞集団のパーセンテージを示す。フローサイトメトリーによって分析した、異なる治療群の膵臓のＣＤ４９ｂ＋ＣＤ４＋Ｔｒ１細胞の代表的なプロット（１０ａ）および定量化（１０ｂ）（ＣＤ３＋Ｔ細胞でゲート）（ｎ＝１２）。全体を通して、ＮＳ：有意性なし、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１であり、テューキー事後検定分析による１元配置ＡＮＯＶＡを実行して、分析を行った。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

本発明の化合物、組成物、物品、装置、および／または方法を開示および説明する前に、それらは、別段指定されない限り、特定の合成方法もしくは特定の組み換えバイオテクノロジー方法に限定されず、または別段指定されない限り、当然ながら変化し得る特定の試薬に限定されないことを理解されたい。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することは意図しないこともまた理解されたい。

【００２０】

Ａ．　定義

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、別段文脈が明確に指示しない限り、複数の参照対象を含む。したがって、例えば、「薬学的担体」への参照は、２つ以上のそのような担体の混合物を含む、などである。

【００２１】

範囲は、本明細書では「約」１つの特定の値から、および／または「約」別の特定の値までとして表され得る。そのような範囲が表される場合、別の実施形態は、一方の特定の値から、および／または他方の特定の値までを含む。同様に、値が近似値として表される場合、先行詞「約」の使用によって、特定の値が別の実施形態を形成することが理解される。それらの範囲の各々の終点は、他方の終点に関して、かつ他方の終点とは独立しての両方で、有意であることがさらに理解される。本明細書に開示されるいくつかの値が存在すること、および各値はまた、その値自体に加えて、本明細書では「約」その特定の値としても開示されることもまた理解される。例えば、「１０」という値が開示される場合、「約１０」もまた開示される。ある値が開示される場合、当業者によって適切に理解されるように、その値「以下」、「その値以上」、および値間の可能な範囲もまた開示されることもまた理解される。例えば、「１０」という値が開示される場合、「１０以下」および「１０以上」もまた開示される。本出願全体を通して、データは、いくつかの異なる形式で提供されること、ならびにこのデータは、終点および開始点、ならびにデータ点の任意の組み合わせの範囲を表すこともまた理解される。例えば、「１０」という特定のデータ点および１５という特定のデータ点が開示される場合、１０および１５超、以上、未満、以下、およびそれと等しいもの、ならびに１０～１５の間が開示されると見なされることが理解される。２つの特定の単位間の各単位もまた開示されることもまた理解される。例えば、１０および１５が開示される場合、１１、１２、１３、および１４もまた開示される。

【００２２】

本明細書およびそれに続く特許請求の範囲では、いくつかの用語が参照され、それらは、

以下の意味を有するものとして定義されるものとする。
【００２３】
「任意の」または「任意で」は、その後に記載の事象または状況が発生しても発生しなくてもよいこと、ならびにその説明が該事象または状況が発生する事例およびそれが発生しない事例を含むことを意味する。
【００２４】
対象への「投与」は、対象に薬剤を導入または送達する任意の経路を含む。投与は、経口、局所、静脈内、皮下、経皮（ｔｒａｎｓｃｕｔａｎｅｏｕｓ）、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）、筋肉内、関節内、非経口、細動脈内、皮内、脳室内、頭蓋内、腹腔内、病巣内、鼻腔内、直腸、膣内、吸入によって、植え込み型リザーバーを介して、非経口（例えば、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑膜内、胸骨内、くも膜下腔内、腹腔内、肝内、病巣内、および頭蓋内注射または注入技術）などを含む任意の好適な経路によって実行することができる。「同時投与（Ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ　ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）」、「組み合わせた投与」、「同時投与（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ　ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）」、または「同時に投与される」は、本明細書で使用される場合、化合物が同じ時点で、または本質的に互いの直後に投与されることを意味する。後者の場合、２つの化合物は、観察される結果が化合物が同じ時点で投与されたときに達成される結果と区別不能であるように、十分に近い時間に投与される。「全身投与」は、薬剤を対象の身体の広範な領域（例えば、身体の５０％超）に導入または送達する経路を介して、例えば、循環系またはリンパ系への進入を通して、対象に薬剤を導入または送達することを指す。対照的に、「局所投与」は、薬剤を投与点の領域または投与点に直に隣接した領域に導入または送達し、薬剤を治療的に有意な量では全身に導入しない経路を介して、対象に薬剤を導入または送達することを指す。例えば、局所投与された薬剤は、投与点の局所的な近傍では容易に検出可能であるが、対象の身体の遠位部では検出不能であるか、または検出可能な量が無視できるものである。投与には、自己投与および別の者による投与が含まれる。
【００２５】
「生体適合性」は一般に、レシピエントに対して一般に無毒であり、対象に対して有意な有害作用を引き起こさない材料およびその任意の代謝産物または分解産物を指す。
【００２６】
「を含む」は、組成物、方法などが列挙される要素を含むが、他の要素を排除しないことを意味することが意図される。「から本質的になる」は、組成物および方法の定義に使用される場合、列挙される要素を含むが、その組み合わせに対して任意の本質的に有意な他の要素を排除することを意味するものとする。したがって、本明細書に定義される要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法に由来する微量の混入物、ならびにリン酸緩衝食塩水、保存剤などの薬学的に許容される担体を排除しない。「からなる」は、他の成分の微量の要素、および本発明の組成物を投与するための実質的な方法ステップを超えるものを排除することを意味するものとする。これらの連結語句の各々によって定義される実施形態は、本発明の範囲内にある。
【００２７】
「対照」は、比較目的の実験で使用される代替的な対象または試料である。対照は、「陽性」または「陰性」であり得る。
【００２８】
「放出制御」または「徐放」は、インビボでの所望の薬物動態プロファイルを達成するための、制御された様式での所与の剤形からの薬剤の放出を指す。「放出制御」薬剤送達の一態様は、製剤および／または剤形を操作して、所望の動態の薬剤放出を確立する能力である。
【００２９】
ある薬剤の「有効量」は、所望の効果を提供するために十分な薬剤の量を指す。「有効」である薬剤の量は、対象の年齢および全身状態、特定の薬剤（複数可）などの多くの因子

に応じて、対象によって変化する。したがって、定量化された「有効量」の特定は、常に可能であるわけではない。しかしながら、任意の対象の場合に適切な「有効量」は、当業者が通例の実験方法を使用して決定することができる。また、本明細書で使用される場合、および別段具体的に述べられない限り、ある薬剤の「有効量」はまた、治療有効量および予防有効量の両方を網羅する量も指し得る。治療効果を達成するために必要なある薬剤の「有効量」は、対象の年齢、性別、および体重などの因子に従って変化し得る。投薬量レジメンは、最適な治療応答を提供するように調節することができる。例えば、いくつかの分割された用量を毎日投与してもよく、または治療状況の緊急事態によって示される場合、用量を比例的に低減してもよい。

【００３０】

「薬学的に許容される」構成成分は、生物学的または別様に望ましくないものではない構成成分、すなわち、有意な望ましくない生物学的効果を引き起こしたり、それが含有される製剤の他の構成成分のいずれかと有害な様式で相互作用したりすることなく、本明細書に記載のように本発明の薬学的製剤中に組み込まれ、対象に投与され得る構成成分を指し得る。ヒトへの投与に関して使用される場合、その用語は一般に、構成成分が毒性および製造試験の必要な基準を満たしていること、またはそれが米国食品医薬品局によって用意された不活性成分ガイドに含まれることを意味する。

【００３１】

「薬学的に許容される担体」（「担体」と称されることもある）は、一般に安全かつ無毒である薬学的組成物または治療組成物を調製する上で有用である担体または賦形剤を意味し、獣医学および／またはヒトの薬学的用途または治療用途に許容される担体を含む。「担体」または「薬学的に許容される担体」という用語には、リン酸緩衝食塩水溶液、水、乳濁液（油／水もしくは水／油乳濁液など）、および／または様々な種類の湿潤剤が含まれ得るが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「担体」という用語は、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、脂質、安定剤、または薬学的製剤中での使用が当該技術分野で周知であり、本明細書でさらに記載される、他の材料を包含するが、これらに限定されない。

【００３２】

「薬理学的に活性な」誘導体または類似体における場合などの「薬理学的に活性な」（または単に「活性な」）は、親化合物と同じ種類かつおよそ等しい程度の薬理学的活性を有する誘導体または類似体（例えば、塩、エステル、アミド、共役体、代謝産物、異性体、断片など）を指し得る。

【００３３】

「重合体」は、天然または合成の比較的高い分子量の有機化合物を指し、その構造は、反復小単位である単量体によって表すことができる。重合体の非限定的な例には、ポリエチレン、ゴム、セルロースが含まれる。合成重合体は、典型的には、単量体の付加または縮合重合によって形成される。「共重合体」という用語は、２つ以上の異なる反復単位（単量体残基）から形成された重合体を指す。例として、かつ非限定的に、共重合体は、交互共重合体、ランダム共重合体、ブロック共重合体、またはグラフト共重合体であり得る。特定の態様では、ブロック共重合体の様々なブロックセグメント自体が共重合体を構成し得ることもまた企図される。「重合体」という用語は、天然重合体、合成重合体、同種重合体、異種重合体または共重合体、付加重合体などを含むがこれらに限定されない、全ての形態の重合体を包含する。

【００３４】

「治療剤」は、有益な生物学的効果を有する任意の組成物を指す。有益な生物学的効果には、治療効果、例えば、障害または他の望ましくない生理学的病態の治療、および予防効果、例えば、障害または他の望ましくない生理学的病態（例えば、非免疫原性がん）の予防の両方が含まれる。その用語はまた、塩、エステル、アミド、プロ薬剤、活性代謝産物、異性体、断片、類似体などを含むがこれらに限定されない、本明細書で具体的に言及される有益な薬剤の、薬学的に許容される薬理学的に活性な誘導体も包含する。「治療剤」

という用語が使用される場合、または特定の薬剤が具体的に特定される場合、その用語は、薬剤自体および薬学的に許容される薬理学的に活性な塩、エステル、アミド、プロ薬剤、共役体、活性代謝産物、異性体、断片、類似体などを含むことを理解されたい。

【００３５】

ある組成物（例えば、薬剤を含む組成物）の「治療有効量」または「治療有効用量」は、所望の治療結果を達成するために有効である量を指す。いくつかの実施形態では、所望の治療結果は、１型糖尿病の制御である。いくつかの実施形態では、所望の治療結果は、肥満症の制御である。ある所与の治療剤の治療有効量は、典型的には、治療される障害または疾患の種類および重症度、ならびに対象の年齢、性別、および体重などの因子に関して変化する。その用語はまた、疼痛緩和などの所望の治療効果を促進するために有効な、ある治療剤の量またはある治療剤の送達速度（例えば、経時的な量）も指し得る。正確な所望の治療効果は、治療される病態、対象の寛容、投与される薬剤および／または薬剤製剤（例えば、治療剤の効力、製剤中の薬剤の濃度など）、ならびに当業者によって理解される様々な他の因子に従って変化する。いくつかの事例では、所望の生物学的または薬学的応答は、数日間、数週間、または数年間にわたって複数の投薬量の組成物を対象に投与した後に達成される。

【００３６】

本出願全体を通して、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物の開示の全体が、これにより参照により本出願に組み込まれることで、これが関連する最新技術をより完全に説明する。開示される参考文献はまた、参考文献が依拠した文章において考察されるそれらに含有される材料について、参照により本明細書に個々かつ具体的に組み込まれる。

【００３７】

Ｂ．　組成物

本開示の組成物の調製に使用される構成成分、および本明細書に開示される方法において使用される組成物自体が開示される。これらおよび他の材料が、本明細書に開示されており、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが開示される場合、これらの化合物の様々な個々のおよび集合的な組み合わせおよび並べ換えの特定の参照は、明示的には開示されない場合があるが、各々が、具体的に企図され、本明細書に記載されることが理解される。例えば、特定のＰＤ－Ｌ１発現血小板が開示および考察され、ＰＤ－Ｌ１発現血小板を含むいくつかの分子に対して行われ得るいくつかの修飾が考察される場合、それとは反対であることが具体的に示されない限り、ＰＤ－Ｌ１発現血小板のありとあらゆる組み合わせおよび並べ換え、ならびに可能である修飾が具体的に企図される。したがって、分子Ａ、Ｂ、およびＣのクラス、ならびに分子Ｄ、Ｅ、およびＦのクラスが開示され、組み合わせ分子の一例であるＡ－Ｄが開示される場合、各々が個々に列挙されない場合でも、各々は、個々かつ集合的に企図され、これは、Ａ－Ｅ、Ａ－Ｆ、Ｂ－Ｄ、Ｂ－Ｅ、Ｂ－Ｆ、Ｃ－Ｄ、Ｃ－Ｅ、およびＣ－Ｆの組み合わせが開示されると見なされることを意味する。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせもまた開示される。したがって、例えば、Ａ－Ｅ、Ｂ－Ｆ、およびＣ－Ｅのサブグループが開示されると見なされる。この概念は、本開示の組成物を作製および使用する方法におけるステップを含むがこれらに限定されない、本出願の全ての態様に適用される。したがって、実行され得る様々な追加のステップが存在する場合、これらの追加のステップの各々は、本開示の方法の任意の特定の実施形態または実施形態の組み合わせで実行され得ることが理解される。

【００３８】

自己抗原捕捉ＤＣは、ＣＤ４＋Ｆｏｘｐ３＋Ｔｒｅｇ細胞の拡大を通して、末梢性寛容に対して重要な役割を果たす。Ｔｒｅｇ細胞は、自己反応性Ｔ細胞およびＮＫ細胞の活性を直接制限して、β細胞を攻撃から保護する。Ｔｒｅｇ細胞を用いて、β細胞を保護するために、Ｔ１Ｄを治療するための自己抗原特異的Ｔｒｅｇ細胞を誘導するための膵島自己抗原（インスリンＢ鎖９～２３など）が開発されている。Ｔｒｅｇ細胞に加えて、正常な組織はまた、リンパ球の活性を阻害して、末梢性寛容を維持するための免疫阻害リガンドも

発現する。正常な組織細胞の表面上に提示される、重要な免疫チェックポイントリガンドであるプログラム死リガンド１（ＰＤ－Ｌ１）は、ＣＤ８＋細胞毒性Ｔ細胞からの自己免疫攻撃を予防する。ＰＤ－Ｌ１とプログラム死１　ＰＤ－１（ＰＤ－１）受容体との相互作用は、Ｔ細胞消耗につながる。ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１阻害軸の欠損は、マウスにおいてＴ１Ｄにつながる。さらに、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１遮断療法を受けるがん患者は、Ｔ１Ｄを発症するリスクを有し、これは、ＰＤ－Ｌ１がＴ１Ｄの病態形成を予防する上で重要な役割を果たすことを示す。本明細書では、ＰＤ－Ｌ１を遺伝的に提示する血小板を、免疫抑制調節因子として利用して、ＮＯＤマウスにおいてＴ細胞の活性を制限し、Ｔ１Ｄ糖尿病を逆転させた（図１ａ）。したがって、一態様では、膜結合型外因性ＰＤ－Ｌ１を含む、操作された血小板が本明細書に開示される。

【００３９】

止血および血栓症に加えて、血小板はまた、炎症および免疫応答を調節する上で重量な機能も果たす。例えば、血小板は、Ｔ細胞、ＤＣ細胞、および好中球を含む自然免疫細胞と直接相互作用し得る、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）およびＣＤ４０Ｌなどの強力な免疫制御性分子を含有する。したがって、一態様では、ＣＤ４０Ｌおよび／またはＴｏｌｌ様受容体をさらに含む、膜結合型ＰＤ－Ｌ１を発現する操作された血小板が本明細書に開示される。

【００４０】

血小板はまた、Ｔリンパ球にも結合し、その活性を阻害することができ、関節リウマチにおける抗炎症療法に寄与する。加えて、血小板はまた、Ｔ細胞機能を阻害し、宿主のがん免疫を弱め得る、トランスフォーミング増殖因子β（ＴＧＦ－β）を含む複数の抗炎症性サイトカインも含有する。この研究では、生理学的特性の組み合わせ、および操作された血小板の組み込まれた免疫遮断機能を活用して、ＮＯＤマウスモデルにおいて新たに発症するＴ１Ｄを逆転させることができることが実証された。

【００４１】

膜結合型ＰＤ－Ｌ１を発現する本開示の操作された血小板は、特定の組織または器官の部位に浸潤するＴ細胞に対してＰＤ－Ｌ１を標的とするように設計されることが理解され、本明細書で企図される。血小板を、対象となる特定の組織または器官の部位に指向させるための１つの方法は、標的化部分の使用を通したものである。例えば、標的化部分は、骨髄、肝臓、脾臓、膵臓、前立腺、膀胱、心臓、肺、脳、皮膚、腎臓、卵巣、精巣、リンパ節、小腸、大腸、または胃を標的とするように設計または操作され得る。本明細書に開示される操作された血小板を、標的組織または器官に対して標的化し得るいくつかのアプローチが存在することが理解され、本明細書で企図される。したがって、ペプチド、ポリペプチド、重合体、核酸、抗体、糖、または細胞を含むがこれらに限定されない、特定の組織または器官を標的とするための、修飾された血小板に連結され得る任意の分子を含む、操作された血小板が本明細書で具体的に企図される。一態様では、血小板は、標的化部分に化学的に共役される。

【００４２】

操作された血小板は、化学的な連結または共役を通して標的化部分に連結され得ることが理解され、本明細書で企図される。一態様では、膜結合型ＰＤ－Ｌ１を発現する操作された血小板であって、銅（Ｉ）触媒［３＋２］アジド－アルキン環化付加（ＣｕＡＡＣ）、歪み促進型アジド－アルキン環化付加（ＳＰＡＡＣ）、歪み促進型アルキン－ニトロン環化付加（ＳＰＡＮＣ）、またはジベンゾシクロオクチル（ＤＢＣＯ）無銅環化付加（例えば、ジベンゾシクロオクチル（ＤＢＣＯ）－ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）４ＮＨＳエステル）を介して標的化部分に化学的に共役される、血小板が本明細書に開示される。共役を促進するために、標的化部分はまた、血小板への連結を完成させるように修飾されてもよい。したがって、任意の先行する態様に記載の治療剤送達ビヒクルであって、標的化部分が、活性化アジド分子（例えば、Ｎ－アジドアセチルガラクトサミン－テトラアシル化（Ａｃ４ＧａｌＮＡｚ）など）で処理される、ビヒクルが本明細書に開示される。

【００４３】

１．薬学的担体／薬学的生成物の送達
一態様では、本明細書に開示される治療剤送達ビヒクルは、糖尿病、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、および／または自己炎症性疾患もしくは病態を治療、予防、阻害、または低減するための対象への投与が意図されることが理解される。したがって、本明細書に開示される操作された血小板のいずれかを含む薬学的組成物が本明細書に開示される。
【００４４】
一態様では、本明細書に開示される膜結合型ＰＤ－Ｌ１を発現する任意の操作された血小板、および標的化部分を含む薬学的組成物であって、血小板が、治療剤カーゴおよび化学的な連結を含むように修飾されており、化学的な連結が、ジベンゾシクロオクチル（ＤＢＣＯ）－ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）４ＮＨＳエステルを含み、血小板が、標的化部分に化学的に共役され、１つ以上の治療カーゴ剤が、（１－メチル－トリプトファン（１－ＭＴ）、Ｎｏｒｈａｒｍａｎｅ、ロスマリン酸、エパカドスタット、Ｎａｖｏｏｘｉｍｏｄ、ドキソルビシン、タモキシフェン、パクリタキセル、ビンブラスチン、シクロホスファミド、および５－フルオロウラシルを含むがこれらに限定されない）小分子、ｓｉＲＮＡ、ペプチド、重合体、ペプチド模倣物、ならびに／または抗体（例えば、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ピディリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５９、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、およびアベルマブを含むがこれらに限定されない、抗ＰＤＬ－１抗体）を含む、薬学的組成物が本明細書に開示される。
【００４５】
上記のように、組成物はまた、薬学的に許容される担体中、インビボで投与されてもよい。「薬学的に許容される」とは、生物学的または別様に望ましくないものではない材料、すなわち、任意の望ましくない生物学的効果を引き起こしたり、それが含有される薬学的組成物の他の構成成分のいずれかと有害な様式で相互作用したりすることなく、核酸またはベクターとともに対象に投与され得る材料を意味する。担体は当然、当業者に周知であるように、活性成分のいかなる分解も最小化するように、かつ対象におけるいかなる有害な副作用も最小化するように選択される。
【００４６】
組成物は、局所鼻腔内投与または吸入剤による投与を含む、経口、非経口（例えば、静脈内）、筋肉内注射によって、腹腔内注射によって、経皮、体外、局所などで投与することができる。本明細書で使用される場合、「局所鼻腔内投与」は、鼻孔の一方または両方を通した鼻および鼻腔への組成物の送達を意味し、噴霧機構もしくは液滴機構による、または核酸もしくはベクターのエアロゾル化を通した送達を含み得る。吸入剤による組成物の投与は、噴霧または液滴機構による送達を介した鼻または口を通したものであり得る。送達はまた、挿管を介した呼吸系（例えば、肺）の任意の領域への直接的なものであってもよい。必要とされる組成物の正確な量は、対象の種、年齢、体重、および全身状態、治療されるアレルギー性障害の重症度、使用される特定の核酸またはベクター、その投与様式などに応じて、対象によって変化する。したがって、全ての組成物の正確な量の特定は、可能ではない。しかしながら、適切な量は、当業者が本明細書の教示を考慮して通例の実験方法のみを使用して決定することができる。
【００４７】
使用される場合、組成物の非経口投与は一般に、注射を特徴とする。注射剤は、液体溶液もしくは懸濁液、注射前の液体中の懸濁液の溶液に好適な固体形態、または乳濁液のいずれかとして、従来の形態で調製することができる。非経口投与のためのより近年改訂されたアプローチは、一定の投薬量が維持されるような緩徐放出または徐放システムの使用を伴う。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第３，６１０，７９５号を参照されたい。
【００４８】
材料は、溶液、懸濁液中にあってもよい（例えば、マイクロパーティクル、リポソーム、または細胞内に組み込まれてもよい）。これらは、抗体、受容体、または受容体リガンドを介して特定の細胞型に対して標的化され得る。以下の参考文献は、この技術を使用して

、腫瘍組織に対して特定のタンパク質を標的とする例である（Ｓｅｎｔｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．，２：４４７－４５１，（１９９１）、Ｂａｇｓｈａｗｅ，Ｋ．Ｄ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，６０：２７５－２８１，（１９８９）、Ｂａｇｓｈａｗｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，５８：７００－７０３，（１９８８）、Ｓｅｎｔｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．，４：３－９，（１９９３）、Ｂａｔｔｅｌｌｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３５：４２１－４２５，（１９９２）、Ｐｉｅｔｅｒｓｚ ａｎｄ ＭｃＫｅｎｚｉｅ，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇ．Ｒｅｖｉｅｗｓ，１２９：５７－８０，（１９９２）、およびＲｏｆｆｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ，４２：２０６２－２０６５，（１９９１））。「ステルス」および他の抗体共役リポソーム（結腸癌に対する脂質媒介薬標的化を含む）などのビヒクル、細胞特異的リガンドを通したＤＮＡの受容体媒介標的化、リンパ球指向腫瘍標的化、ならびにインビボでのマウス神経膠腫細胞の高度に特異的な治療レトロウイルス標的化。以下の参考文献は、この技術を使用して、腫瘍組織に対して特定のタンパク質を標的とする例である（Ｈｕｇｈｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４９：６２１４－６２２０，（１９８９）およびＬｉｔｚｉｎｇｅｒ ａｎｄ Ｈｕａｎｇ，Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ，１１０４：１７９－１８７，（１９９２））。一般に、受容体は、恒常的またはリガンド誘導のいずれかのエンドサイトーシスの経路に関与する。クラスリン被覆ピット内のこれらの受容体クラスターは、クラスリン被覆小胞を介して細胞に進入し、受容体が選別される酸性化エンドソームを通過し、その後細胞表面に循環されるか、細胞内で選別されるか、またはリソソーム内で分解される。内部移行経路は、栄養素取り込み、活性化タンパク質の除去、巨大分子のクリアランス、ウイルスおよび毒素の日和見的な進入、リガンドの解離および分解、ならびに受容体レベルの制御などの様々な機能を果たす。多くの受容体は、細胞型、受容体濃度、リガンドの種類、リガンド結合価、およびリガンド濃度に応じて、２つ以上の細胞内経路に従う。受容体媒介エンドサイトーシスの分子および細胞機構は、概説されている（Ｂｒｏｗｎ ａｎｄ Ｇｒｅｅｎｅ，ＤＮＡ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ１０：６，３９９－４０９（１９９１））。

【００４９】

ａ）薬学的に許容される担体

抗体を含む組成物は、薬学的に許容される担体と組み合わせて治療的に使用することができる。

【００５０】

好適な担体およびそれらの製剤化は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ： Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ（１９ｔｈ ｅｄ．）ｅｄ．Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ１９９５に説明されている。典型的には、適切な量の薬学的に許容される塩を製剤中で使用して、製剤を等張性にする。薬学的に許容される担体例には、食塩水、リンゲル溶液、およびブドウ糖溶液が含まれるが、これらに限定されない。溶液のｐＨは、好ましくは約５～約８、およびより好ましくは約７～約７．５である。さらなる担体には、抗体を含有する固体疎水性重合体の半透性マトリックスなどの徐放調製物が含まれ、これらのマトリックスは、成形された物品、例えば、フィルム、リポソーム、またはマイクロパーティクルの形態である。例えば、投与経路および投与される組成物の濃度に応じて、特定の担体がより好ましくあり得ることは、当業者に明らかである。

【００５１】

薬学的担体は、当業者に既知である。これらは、最も典型的には、滅菌水、食塩水、および生理学的ｐＨの緩衝溶液などの溶液を含む、ヒトへの薬物の投与に標準的な担体である。組成物は、筋肉内または皮下投与することができる。他の化合物は、当業者によって使用される標準的な手順に従って投与される。

【００５２】

薬学的組成物は、選択される分子に加えて、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝液、保存剤、界面活性剤などを含み得る。薬学的組成物はまた、抗菌剤、抗炎症剤、麻酔剤などの１つ以上の活性成分も含み得る。

【００５３】

薬学的組成物は、局所治療が望ましいか全身治療が望ましいか、および治療される領域に応じて、いくつかの方法で投与することができる。投与は、局所（眼内、膣内、直腸、鼻腔内を含む）、経口、吸入によって、または非経口、例えば、静脈内注入、皮下、腹腔内、もしくは筋肉内注射によってであり得る。本開示の抗体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、または経皮投与することができる。

【００５４】

非経口投与のための調製物には、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、および乳濁液が含まれる。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、食塩水および緩衝培地を含む、水、アルコール／水溶液、乳濁液、または懸濁液が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、または固定油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流体および栄養素補充剤、電解質補充剤（リンゲルブドウ糖に基づくものなど）などが含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどの保存剤および他の添加剤もまた、存在してもよい。

【００５５】

局所投与のための製剤には、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、液滴、坐剤、噴霧剤、液体、および粉末が含まれ得る。従来の薬学的担体、水性、粉末、または油性基剤、増粘剤などが必要であるか、または望ましい場合がある。

【００５６】

経口投与のための組成物には、粉末もしくは顆粒、水もしくは非水溶性培地中の懸濁液もしくは溶液、カプセル、サシェ、または錠剤が含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が、望ましい場合がある。

【００５７】

組成物のいくつかは、潜在的に、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、およびリン酸などの無機酸、ならびにギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、およびフマル酸などの有機酸との反応によって、または水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムなどの無機塩基、ならびにモノ、ジ、トリアルキルおよびアリールアミンおよび置換エタノールアミンなどの有機塩基との反応によって形成される、薬学的に許容される酸または塩基付加塩として投与することができる。

【００５８】

ｂ）治療用途

組成物を投与するための有効投薬量およびスケジュールは、経験的に決定することができ、そのような決定を下すことは、当該技術分野の範囲内である。組成物を投与するための投薬量範囲は、障害の症状が影響される所望の効果を生成するのに十分に大きいものである。投薬量は、望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応などの有害な副作用を引き起こすほど大きくあるべきではない。一般に、投薬量は、患者の年齢、病態、性別、および疾患の程度、投与経路、またはレジメンに他の薬物が含まれるかどうかとともに変化し、当業者が決定することができる。何らかの禁忌症が生じた場合には、投薬量は、個々の医師が調節することができる。投薬量は、変化してもよく、１つ以上の用量投与で毎日、例えば、１日または数日にわたって投与することができる。所与のクラスの薬学的生成物の適切な投薬量についてのガイダンスは、文献に見出すことができる。例えば、抗体の適切な用量を選択する上でのガイダンスは、抗体の治療用途についての文献、例えば、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｆｅｒｒｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｎｏｇｅｓ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｐａｒｋ Ｒｉｄｇ

ｅ，Ｎ．Ｊ．，（１９８５）ｃｈ．２２ａｎｄ ｐｐ．３０３－３５７、Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｈａｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９７７）ｐｐ．３６５－３８９に見出すことができる。単独で使用される抗体の典型的な一日投薬量は、上記に言及した因子に応じて、１日あたり約１μｇ／体重ｋｇ～１００ｍｇ／体重ｋｇ以上の最大範囲であり得る。

【００５９】

Ｃ．１型糖尿病、移植片対宿主病、および／または自己炎症性疾患もしくは病態を治療する方法

本明細書に記述されるように、本開示の操作された血小板および／または薬学的組成物を使用して、糖尿病、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、および／または自己炎症性疾患もしくは病態を治療、予防、阻害、または低減することができる。したがって、対象における糖尿病、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、および／または自己炎症性疾患もしくは病態を、膜結合型ＰＤ－Ｌ１を発現する本開示の操作された血小板および／または薬学的組成物で、治療、予防、阻害、または低減する方法が本明細書に開示される。一態様では、方法は、することができ、本開示の方法で使用される血小板は、膜結合型ＣＤ４０Ｌおよび／またはＴｏｌｌ様受容体をさらに発現することができる。

【００６０】

本明細書に開示される操作された血小板の投与を通して治療、阻害、予防、または低減することができる自己炎症性疾患または病態には、アカラシア、急性散在性脳脊髄炎、急性運動性軸索型ニューロパチー、アジソン病、有痛脂肪症、成人スチル病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アルツハイマー病、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、抗ＧＢＭ／抗ＴＢＭ腎炎、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、自己免疫性血管浮腫、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性腸疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患（ＡＩＥＤ）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性精巣炎、自己免疫性膵炎、多腺性自己免疫症候群、自己免疫性網膜症、自己免疫性じんま疹、軸索型および神経細胞型ニューロパチー（ＡＭＡＮ）、バロー病、ベーチェット病、良性粘膜類天疱瘡（Ｂｅｎｉｇｎ ｍｕｃｏｓａｌ ｅｍｐｈｉｇｏｉｄ）、ビッカースタッフ脳炎、水疱性類天疱瘡、キャッスルマン病（ＣＤ）、セリアック病、シャガス病、慢性疲労症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎（ＣＩＤＰ）、慢性再発性多発性骨髄炎（ＣＲＭＯ）、チャーグ・ストラウス症候群（ＣＳＳ）好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（ＥＧＰＡ）、瘢痕性類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性心ブロック、コクサッキー心筋炎、ＣＲＥＳＴ症候群、クローン病、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、１型糖尿病、円板状エリテマトーデス、ドレッスラー症候群、子宮内膜症、腱付着部炎、好酸球性食道炎（ＥｏＥ）、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、本態性混合型クリオグロブリン血症、エバンス症候群、フェルティー症候群、線維筋痛症、線維性肺胞炎、巨細胞動脈炎（側頭動脈炎）、巨細胞性心筋炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発血管炎性肉芽腫症、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本脳症、橋本病、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病（ＨＳＰ）、妊娠性疱疹または妊娠性類天疱瘡（ＰＧ）、化膿性汗腺炎（ＨＳ）（反対型ざ瘡）、低ガンマグロブリン血症、ＩｇＡ腎障害、ＩｇＧ４関連硬化性疾患、免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、封入体筋炎（ＩＢＭ）、間質性膀胱炎（ＩＣ）、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、若年性関節炎、若年性糖尿病（１型糖尿病）、若年性筋炎（ＪＭ）、川崎病、ランバート・イートン症候群、白血球破壊性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、線状ＩｇＡ（ＬＡＤ）、ループス腎炎、ループス血管炎、慢性ライム病、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎（ＭＰＡ）、混合性結合組織病（ＭＣＴＤ）、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多巣性運動ニューロパチー（ＭＭＮ）またはＭＭＮＣＢ、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、新生児ループス、視神経脊髄炎、好中球減少症、眼部瘢痕性類天疱瘡、視神経炎、オード甲状腺炎、回帰性リウマチ（ＰＲ）、ＰＡＮＤＡＳ、傍腫瘍性小脳変性症（ＰＣＤ）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（ＰＮＨ）、パリーロンバーグ症候

群、周辺部ぶどう膜炎（周辺性ぶどう膜炎）、パーソネージ・ターナー症候群、天疱瘡、末梢神経障害、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血（ＰＡ）、ＰＯＥＭＳ症候群、結節性多発動脈炎、１、２、３型多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、乾癬、乾癬性関節炎、赤芽球ろう（ＰＲＣＡ）、壊疽性膿皮症、レイノー現象、反応性関節炎、反射性交感神経性ジストロフィー、再発性多発軟骨炎、下肢静止不能症候群（ＲＬＳ）、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、リウマチ性血管炎、サルコイドーシス、シュミット症候群、シュニッツラー症候群、強膜炎、強皮症、シェーグレン症候群、精液および精巣自己免疫、全身硬直症候群（ＳＰＳ）、亜急性細菌性心内膜炎（ＳＢＥ）、スザック症候群、シデナム舞踏病、交感性眼炎（ＳＯ）、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、トロサ・ハント症候群（ＴＨＳ）、横断性脊髄炎、１型糖尿病、潰瘍性大腸炎（ＵＣ）、未分化結合組織病（ＵＣＴＤ）、じんま疹、じんま疹様血管炎、ぶどう膜炎、血管炎、白斑、フォークト・小柳・原田病、ならびにウェゲナー肉芽腫症（または多発血管炎性肉芽腫症（ＧＰＡ）が含まれるが、これらに限定されないことが理解され、本明細書で企図される。

【００６１】

一態様では、対象における糖尿病、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）（例えば、移植β膵島細胞もしくは腎臓のＧｖＨＤなど）、および／または自己炎症性疾患を治療、低減、予防、または阻害する本開示の方法であって、対象に本明細書に開示される膜結合型ＰＤ－Ｌ１を発現する操作された血小板細胞のいずれかを投与することを含む、方法は、糖尿病、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、および／または自己炎症性疾患の治療、低減、予防、または阻害に適切な任意の頻度で、操作された血小板を投与することを含み得る。例えば、操作された血小板は、少なくとも１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８時間毎に１回、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１日毎に１回、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２ヶ月毎に１回、患者に投与することができる。一態様では、操作された血小板は、１週間あたり少なくとも１、２、３、４、５、６、７回投与される。

【００６２】

一態様では、糖尿病、移植片対宿主病（ＧｖＨＤ）、および／または自己炎症性疾患もしくは病態を治療、低減、予防、または阻害する方法は、対象にβ膵島細胞を投与することをさらに含み得ることが理解され、本明細書で企図される。β膵島細胞は、操作された血小板の投与前、それと同時（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ　ｗｉｔｈ）、それと同時（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓｌｙ　ｗｉｔｈ）、またはその後に投与することができる。一態様では、操作された血小板は、β膵島細胞の投与の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、３０、３６、４２、４８時間、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４日、３、４、５、６、７、８週間前に投与される。

【００６３】

Ｄ．実施例

以下の実施例は、当業者に、本明細書に主張される化合物、組成物、物品、装置、および／または方法の作製および評価方法についての完全な開示および説明を提供するために提示されており、純粋に例示的であることが意図され、本開示を限定することは意図されない。数（例えば、量、温度など）に関する正確性を確保するための努力がなされているが、いくらかの誤差および偏差が考慮されるべきである。別段示されない限り、部は、重量部であり、温度は、℃であるか、または環境温度でのものであり、圧力は、大気圧または大気圧付近でのものである。

【００６４】

１．実施例１
ａ）結果
（１）　ＰＤ－Ｌ１を安定して発現する巨核球（ＭＫ）細胞株を確立する。
血小板は元々、骨髄に常在する成熟ＭＫから血液中に放出される。血小板をインビトロで産生するために、マウスＭＫ前駆細胞株Ｌ８０５７を用いた。Ｌ８０５７細胞は、ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＰＭＡ）で刺激された後に、成熟、分化、および血小板放出のプロセスを受けた。ＰＤ－Ｌ１を安定して発現するＬ８０５７細胞を遺伝的に操作するために、Ｌ８０５７細胞を、マウスＰＤ－Ｌ１をコードするレンチウイルスに感染させた。その後に、感染させた細胞をピューロマイシンで選択して、安定した細胞株を得た。細胞膜色素Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５９４共役体コムギ胚芽凝集素（ＷＧＡ５９４）によって示されるように、ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１は、Ｌ８０５７細胞の細胞膜上で過剰発現し、局在化した（図１ｂ）。ウエスタンブロットによって、Ｌ８０５７細胞内のＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１の発現をさらに検査した（図１ｃ）。さらに、ＭＫ細胞マーカーＣＤ４１ａが、ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１　Ｌ８０５７細胞上で検出された（図１ｄおよび１ｅ）。ＭＫの成熟を示すマーカーであるＣＤ４２が、ＰＭＡの刺激によって、Ｌ８０５７細胞内で集中的に発現した（図１ｆおよび１ｇ）。加えて、ＧＰＶＩおよびＰ－セレクチンを含む血小板マーカーもまた、成熟ＰＤ－Ｌ１　Ｌ８０５７細胞内で検出可能であった。
【００６５】
ＰＭＡの刺激によって、ＰＤ－Ｌ１陽性ビヒクルが、成熟Ｌ８０５７細胞内に血漿中に蓄積した（図１ｈおよび１ｉ）。その後に、血小板前駆細胞が、細胞膜から出芽および拡張した（図１ｈおよび１ｉ）。最後に、血小板前駆細胞の断片化が、血小板を放出した（図１ｈ）。ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１を提示する血小板を培養培地から収集し、精製した（図１ｊ）。血小板を提示する単離されたＰＤ－Ｌ１は、透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）下で球状の形態を示した（図１ｋ）。動的光散乱（ＤＬＳ）分析は、ＰＤ－Ｌ１血小板の平均直径が約１．５μｍであり、約－１０ｍＶのゼータ電位を有することを実証した（図１ｌ）。トロンビンで刺激した後、Ｐ－セレクチンの発現が、活性化血小板上で検出された。ホスファチジルセリンもまた、活性化血小板の表面上で提示され、これは、血小板が活性化後に死を受けたことを示した。
【００６６】
（２）ＰＤ－Ｌ１血小板の生物学的特徴。
血小板マイクロパーティクル（ＰＭＰ）は、活性化血小板から脱落した断片であり、それらはまた、止血、血栓症、炎症、および組織再生のプロモーターにおける血小板の役割も果たす。ＰＭＰが活性化ＰＤ－１発現血小板から生成され得るかどうかを検査するために、血小板をインビトロでトロンビンで処理した。トロンビンでの刺激後、操作された血小板は、活性化され、複数の触手を有する無定形形態を示した（図２ａ）。ＴＥＭ画像はまた、約１００ｎｍの平均直径を有する活性化血小板からのＰＭＰの生成も示した（図２ａおよび２ｂ）。血液循環ＰＭＰの数は、いくつかの血栓形成促進性および炎症性障害、ならびにがんにおいて増加する。を有するＮＯＤマウスにおいてＰＤ－Ｌ１がＰＭＰを放出することができるかどうかを調査するために、インビボで血小板から放出することを観察した。血小板のほとんどは、個々の細胞であり、これは、ＰＤ－Ｌ１血小板の低い血栓症の潜在性を示した。ＰＭＰは、静止する血小板と比較して、有意により小さいサイズを有し、これは、ＰＤ－Ｌ１提示粒子の膵臓浸潤およびＴ細胞とのさらなる相互作用を増強した。ｈｔｔｐ：／／ｃｎ．ｂｉｎｇ．ｃｏｍ／ｄｉｃｔ／ｓｅａｒｃｈ？ｑ＝ｒｕｐｔｕｒｅ＆ＦＯＲＭ＝ＢＤＶＳＰ６＆ｍｋｔ＝ｚｈ－ｃｎ血管血管の破裂は、血小板を動員して止血を行うことができるコラーゲンタンパク質の曝露につながる。ＰＤ－Ｌ１血小板のコラーゲン結合効果の機能を試験するために、ＰＤ－Ｌ１血小板を、インビトロでコラーゲン被覆ウェルとともにインキュベートした。注目すべきことに、ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１血小板は、コラーゲン被覆ウェルに効果的に接着することができる（図２ｃ）。他方、血栓形成は、止血応答の別の重要な事象である。トロンビンによる活性化後、ＰＤ－Ｌ１血小板は、互いに結合し、凝集を形成した。次に、インビトロでのＰＤ－Ｌ１血小板とＴ細

胞との間の相互作用が、検出された。高血糖（５００ｍｇ／ｄＬ超の血糖）を有する１６週のＮＯＤマウスの膵臓から単離したＣＤ９０．２＋Ｔ細胞膵臓をそれぞれ、ＰＤ－Ｌ１血小板および遊離血小板とともにインキュベートした。ＰＤ－Ｌ１血小板および遊離血小板の両方が、Ｔ細胞と結合することができる（図２ｄ）。重要なことに、ＧｚｍＢ陽性ＣＤ８＋Ｔ細胞の頻度は、ＰＤ－Ｌ１とともにインキュベートした後に有意に低下し、これは、ＰＤ－Ｌ１血小板がＣＤ８＋Ｔ細胞を消耗させ得ることを示した（図２ｅおよび２ｆ）。さらに、遊離血小板は、ＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化に対して有意により低い効果を有した（図２ｅおよび２ｆ）。この限定された抑制効果は、Ｐ－セレクチン依存性であることが報告されている。加えて、血小板由来ＴＧＦ－βはまた、免疫応答も弱める。Ｔ１Ｄの療法に寄与する、培養培地に由来し、血小板から放出されるＴＧＦ－β１もまた、検出された。さらに、ヒト巨核球細胞株ＭＥＧ－０１は、遺伝的に操作され、ヒトＰＤ－Ｌ１（ｈＰＤ－Ｌ１）を安定して発現し、成熟および分化を受けた。同様に、ｈＰＤ－Ｌ１血小板は、ヒトＰＤ－１陽性Ｔ細胞に結合し、それらの活性を制限することができ、生命力および増殖に対して限定された効果を有する（図３Ａ、３Ｂ、および図４）。

【００６７】

操作された血小板の全身循環を調査するために、ＰＤ－Ｌ１血小板をＣｙ５．５で標識し、その後に高血糖を有するＮＯＤマウスに尾部静脈を通して注射した。ＰＤ－Ｌ１血小板は、遊離血小板と同様の血液保持を示し（図２ｇ）、ＰＤ－Ｌ１血小板および遊離血小板の半減期（ｔ１／２）はそれぞれ、およそ３０．６時間および２３．９時間であった。次に、高血糖を有するＮＯＤマウスにおいて、ＰＤ－Ｌ１血小板のインビボ組織体内分布を調査した。注目すべきことに、促進型ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１血小板および遊離血小板は、ＮＯＤマウスの膵臓内に蓄積することができ（図２ｈおよび２ｉ）、遊離血小板で治療したＮＯＤマウスと比較して、高いグルコースレベルを観察することができた（図２ｈおよび２ｉ）。さらに、ＰＤ－Ｌ１血小板はまた、健康なマウスの膵臓内での蓄積と比較して、糖尿病ＮＯＤマウスの膵臓内での蓄積に対する優先が示された。一方、ＰＤ－Ｌ１血小板はまた、肝臓内でも集中的に蓄積した（図２ｈおよび２ｉ）。

【００６８】

（３）ＰＤ－Ｌ１血小板は、ＮＯＤマウスにおいて新たに発症するＴ１Ｄを逆転させる。ＰＤ－Ｌ１は、末梢性免疫寛容を維持する上で重要な役割を果たし、これは、Ｔ細胞の活性の制御に寄与する。したがって、ＰＤ－Ｌ１提示血小板は、β細胞を膵島特異的自己反応性Ｔ細胞の攻撃から保護するための免疫抑制細胞として機能すると思われる。ＰＤ－Ｌ１血小板が新たに発症するＴ１Ｄを逆転させることができるかどうかを調査するために、ＮＯＤマウスを３つの群に分け、生後１０週で２日毎に血糖を試験した。健康なマウスは、８０～１３０ｍｇ／ｄＬの血糖で正常血糖を維持した。ＮＯＤマウスの血糖値が２５０ｍｇ／ｄＬを超えたときに、マウスを、新たに発症する糖尿病を呈するものと見なした。その後、糖尿病ＮＯＤマウスに、遊離血小板またはＰＤ－Ｌ１血小板のいずれかをそれぞれ、終点（４０日）まで２日毎に静脈内注射した。図５ａに示されるように、ＮＯＤマウスにおいて新たに発症するＴ１Ｄ（２５０ｍｇ／ｄＬ超の血糖）を未治療のままにした場合、血糖は、徐々に増加し、最終的に高血糖（６００ｍｇ／ｄＬ超の血糖）に達した。対照的に、新たに発症するＴ１ＤマウスがＰＤ－Ｌ１血小板の治療を受けた場合には、新たに発症するＴ１Ｄの進行は、７５％のマウスにおいて著しく阻害され、高血糖は、正常血糖に逆転した（合計１２匹のマウスのうち９匹）（図５ａおよび５ｂ）。しかしながら、新たに発症するＴ１Ｄの遊離血小板での治療は、Ｔ１Ｄの進行の阻害に対して限定された効果を有し、高血糖を逆転させることができなかった（図５ａおよび５ｂ）。インスリン産生β細胞をさらに検査するために、異なる治療群に由来するＮＯＤマウスの膵臓を収集し、免疫蛍光染色によって分析した。図５ｃに示されるように、インスリン産生β細胞は、正常血糖（１３０ｍｇ／ｄＬ未満の血糖）を有するＮＯＤマウスでは無傷であった。対照的に、高血糖（５００ｍｇ／ｄＬ超の血糖）を有するＮＯＤマウスでは、β細胞のほとんどが喪失した（図５ｃおよび５ｄ）。注目すべきことに、ＰＤ－Ｌ１血小板で治療したＮＯＤマウスは、インスリン産生β細胞の損傷および喪失を部分的に予防した（図５ｃお

よび５ｄ）。逆に、遊離血小板で治療したＮＯＤマウスは、β細胞の喪失を予防することができなかった（図５ｃおよび５ｄ）。さらに、ＮＯＤマウスの血中インスリンのレベルもまた、検査した。ＰＤ－Ｌ１血小板での治療によって、インスリンレベルは、未治療のＮＯＤマウスと比較して、３倍だけ増加した（図５ｅ）。ＰＤ－Ｌ１血小板の短期的な治療効果を確認するために、糖尿病ＮＯＤマウスをそれぞれ、対照血小板およびＰＤ－Ｌ１血小板で５回（１０日）および１０回（２０日）治療した。５回の治療を受けた糖尿病ＮＯＤマウスは、治療期間中には正常血糖を維持したが、２０日目では、マウスの４１％のみが依然として正常血糖を維持していることが観察された（図６Ａおよび６Ｂ）。ＰＤ－Ｌ１血小板での１０回の治療（２０日）を受けた糖尿病ＮＯＤマウスは、２０回の治療を受けたマウスと比較して、同様の利益を達成した（図５ａ）。マウスのほとんど（７５％）が、３０日目で正常血糖を維持した（図７Ａおよび７Ｂ）。マウスがＰＤ－Ｌ１血小板治療後に長期的な利益を達成することができるかどうかを調査するために、１０回のＰＤ－Ｌ１血小板治療を受けたマウスの２０日目以降の血糖値を測定した。その後の８週間、ＰＤ－Ｌ１血小板で治療したマウスの５８％（合計１２匹のマウスのうち７匹）が、正常血糖に逆転した。このデータは、マウスがＰＤ－Ｌ１血小板治療後に長期的な利益を達成することができることを示した。ＮＯＤマウスにおいてＰＤ－Ｌ１が糖尿病の予防に与える効果を調査するために、ＮＯＤマウスを生後１０週で正常血糖について治療した。際だったことに、ＰＤ－Ｌ１血小板治療は、遊離血小板で治療したＮＯＤマウスと比較して、糖尿病ＮＯＤマウスモデルにおける糖尿病発生率の有意な低減をもたらした（Ｐ＜０．０１、カプラン・マイヤー推定）（図５ｆ）。

【００６９】

（４）ＰＤ－Ｌ１血小板は、膵臓貫通Ｔ細胞を消耗させる。

膵臓浸潤自己反応性Ｔ細胞によるβ細胞の攻撃は、Ｔ１Ｄを引き起こす。膵臓浸潤Ｔ細胞の状態を検査するために、異なる治療群に由来するＮＯＤマウスの膵臓を収集し、免疫蛍光染色によって分析した。図８ａに示されるように、正常血糖を有するＮＯＤマウスでは、膵臓を貫通するＣＤ３＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞はほとんど存在しなかったが、高血糖を有するＮＯＤマウスでは、膵臓周縁部および膵島を貫通するＴ細胞が集中的に存在した（図８ａおよび８ｂ）。ＰＤ－Ｌ１血小板の治療によって、膵臓貫通ＣＤ８＋Ｔ細胞は、有意に低減した（図８ａおよび８ｂ）。対照的に、遊離血小板は、Ｔ細胞貫通の予防に対して限定された効果を有した（図８ａおよび８ｂ）。フローサイトメーターによって、膵臓貫通Ｔ細胞をさらに分析した。ＣＤ３＋Ｔ細胞の頻度は、正常血糖ＮＯＤマウスに関連する頻度と比較して、高血糖ＮＯＤマウスで有意に増加した（図８ｃおよび８ｂ）。際だったことに、ＰＤ－Ｌ１血小板の治療は、遊離血小板で治療したマウスと比較して、膵臓Ｔ細胞貫通を集中的に阻害した（図８ｃおよび８ｄ）。さらに、ＣＤ８＋Ｔ細胞の頻度は、未治療の高血糖ＮＯＤマウスの頻度と比較して、ＰＤ－Ｌ１血小板で治療したＮＯＤマウスの膵臓内で有意に低減した（図８ｅおよび８ｆ）一方で、遊離血小板で治療した糖尿病ＮＯＤマウスは、ＣＤ８＋Ｔ細胞貫通の頻度に対して限定された効果を有した（図８ｅおよび８ｆ）。活性化ＣＤ８＋毒性Ｔ細胞は、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）、グランザイムＢ、およびパーフォリンを含む免疫サイトカインを分泌して、β細胞を攻撃する。図８ｇ、８ｈ、８ｉ、および８ｊに示されるように、これらの未治療の高血糖ＮＯＤマウスでは、膵臓貫通ＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＧｚｍＢおよびＩＦＮ－γ陽性であり、これは、Ｔ細胞がβ細胞の損傷を引き起こし得ることを示した。注目すべきことに、ＰＤ－Ｌ１血小板は、遊離血小板治療８ｊを受けたＮＯＤマウスと比較して、ＣＤ８＋Ｔ細胞の活性を阻害する（図８ｇ、８ｈ、８ｉ、および８ｊ）。

【００７０】

ＣＤ４＋ＣＤ２５＋ＦｏｘＰ３＋Ｔｒｅｇ細胞は、抑制Ｔ細胞として機能し、自己抗原に対する寛容を維持しｈｔｔｐｓ：／／ｅｎ．ｗｉｋｉｐｅｄｉａ．ｏｒｇ／ｗｉｋｉ／Ｉｍｍｕｎｅ＿ｔｏｌｅｒａｎｃｅ、Ｔ１Ｄを含む自己免疫疾患を予防する。フローサイトメーターの結果は、Ｔｒｅｇの頻度が未治療の高血糖ＮＯＤマウスにおいて有意に低減することを明らかにした（図９ａ）。ＰＤ－Ｌ１血小板の治療下では、Ｔｒｅｇの喪失もま

た予防されており、これは、β細胞保護に貢献し得る（図９ｂ）。別の種類の制御性Ｔ細胞であるＣＤ４９ｂ＋ＣＤ４＋制御性Ｔ（Ｔｒ１）細胞もまた、自己免疫疾患において免疫を抑圧する上で重要な役割を果たす。主要組織適合抗原クラスＩＩ（ｐＭＨＣＩＩ）の分子で被覆されたナノ粒子は、自己抗原を提示して、Ｔｒ１の拡大を引き起こし、Ｔ１Ｄを含む自己免疫疾患の治療に寄与する。ここでは、Ｔｒ１細胞が、ＰＤ－Ｌ１血小板の治療を受けたマウスの膵臓内で回復したこともまた観察された（図１０Ａおよび１０Ｂ）。まとめると、ＰＤ－Ｌ１血小板は、膵臓貫通ＣＤ８＋Ｔ細胞の活性を効果的に阻害し、Ｔｒｅｇのパーセンテージを増加させることができ、これは、ＮＯＤ糖尿病マウスにおいて新たに発症するＴ１Ｄの逆転に寄与することが実証された。

【００７１】

ｂ）考察

要約すると、ＰＤ－Ｌ１血小板の注入は、ＮＯＤマウスにおいて新たに発症する１型糖尿病の進行を阻害し、それを逆転させることができる。ＰＤ－Ｌ１提示血小板およびその放出されたＰＭＰは、炎症した膵臓内に蓄積し、免疫抑制機能を行う。膵臓貫通効果Ｔ細胞の活性は、集中的に阻害されており、インスリン産生β細胞が動員され、これは、高血糖の正常血糖への逆転につながる。さらに、ＰＤ－Ｌ１血小板治療はまた、膵臓内のＴｒｅｇのパーセンテージも増加させ、膵臓免疫寛容を増強し、これもまた、ＮＯＤマウスにおける新たに発症するＴ１Ｄの逆転に寄与した。この免疫チェックポイント遮断媒介細胞療法をさらに拡張して、標的化能力および限定された副作用で、他の自己免疫疾患を治療することができる。

【００７２】

ｃ）方法

（１）化学物質および試薬。

トロンビンおよび抗マウスＰＤ－Ｌ１抗体は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。免疫蛍光染色に使用した抗マウスＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４１ａ、およびＣＤ４２ａ抗体は、Ａｂｃａｍから購入した。マウスＧＰＶＩ抗体は、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した（ＭＡＢ６７５８）。Ｐ－セレクチン（ｓｃ－８４１９）抗体は、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから購入した。蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）に使用した抗体（Ａｎｔｉ－ＣＤ４１ａ、ＣＤ４２ｄ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、Ｆｏｘｐ３、ＧｒｚｍＢ、およびＩＦＮ－γ）は、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ Ｉｎｃ．から購入した。コムギ胚芽凝集素（ＷＧＡ）Ａｌｅｘａ５９４色素は、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから購入した。

【００７３】

（２）細胞培養。

Ｌ８０５７細胞は、２０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を補充したＲｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）（ＲＰＭＩ）１６４０培地中で培養した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、１０％のＦＢＳを補充したダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で培養した。

【００７４】

（３）安定した細胞株を確立する。

Ｃ末端単量体ＧＦＰタグを有するマウスＰＤ－Ｌ１およびヒトＰＤ－Ｌ１をコードするレンチベクター（ｐＬｅｎｔｉ－Ｃ－ｍＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１－ｐｕｒｏ）およびパッケージングプラスミドをＯｒｉｇｅｎｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから購入した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に、製造業者の説明書に従って、ＰＤ－Ｌ１プラスミドおよびパッケージングプラスミドを一過的に遺伝子導入した。遺伝子導入の４８時間後、レンチウイルスを培養培地から単離し、精製した。その後、Ｌ８０５７細胞をレンチウイルスに感染させ、６μｇ／ｍｌのポリブレンとともにインキュベートした。９６時間感染させた後、Ｌ８０５７細胞を１μｇ／ｍＬのピューロマイシンとともにインキュベートして、マウスＰＤ－Ｌ１を安定して発現する細胞株をスクリーニングした。確立されたＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１発現Ｌ８０５７細胞を、０．５～１μｇ／ｍｌのピューロマイシンを補完した２０％のＦＢＳ中で維

持した。
【００７５】
（４）血小板の産生。
ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１を安定して発現するＬ８０５７細胞を、５００ｎＭのＰＭＡを補充した１６４０培地中で３日にわたって培養した。その後、成熟Ｌ８０５７細胞をさらに６日にわたって培養して、分化させた。分化後に、血小板を培養培地に放出した。培養培地を収集して、血小板を単離した。最初に、培養培地を１０００ｒｐｍで２０分にわたって遠心分離して、Ｌ８０５７細胞を除去した。その後に、上清を１２，０００ｒｐｍで３０分にわたって遠心分離した。最後に、血小板沈殿物を１μＭのＰＧＥ１またはタイロード緩衝液（１３４ｍＭのＮａＣｌ、１２ｍＭのＮａＨＣＯ$_3$、２．９ｍＭのＫＣｌ、０．３４ｍＭのＮａ$_2$ＨＰＯ$_4$、１ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４）を有するＰＢＳ中に慎重に再懸濁した。
【００７６】
（５）免疫蛍光アッセイ。
Ｌ８０５７細胞を４％のパラホルムアルデヒドで１０分にわたって固定した。その後、細胞をＰＢＳで３回洗浄した。その後、固定した細胞を３％のＢＳＡおよび０．２％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００とともにインキュベートして、遮断および透過処理した。その後、Ｌ８０５７細胞を、示される一次抗体とともにそれぞれ４℃で一晩インキュベートした。２日目に、細胞をＰＢＳで３回洗浄して、未結合の抗体を除去した。その後に、細胞をローダミン共役二次抗体（１．５％のＢＳＡ）とともに暗所で１時間インキュベートした。その後、核をＤＡＰＩで２０分にわたって染色した。最後に、細胞をＰＢＳで３回洗浄した。４０倍の対物レンズを使用する共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ）によって、細胞を観察した。
【００７７】
（６）ウエスタンブロットアッセイ。
ウエスタンブロットを記載のように実行した。簡潔には、ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１　Ｌ８０５７細胞を添加緩衝液で溶解した。試料は、１５分にわたって沸騰水浴にあった。その後に、試料を１２％のＳＤＳ－ＰＡＧＥ中に供した。タンパク質をＰＶＤＦ膜に移し、ＰＤ－Ｌ１およびβ－アクチン一次抗体を使用して分析した。
【００７８】
（７）インビトロＴ細胞結合および活性アッセイ。
Ｔ細胞単離キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して、汎Ｔ細胞（ＣＤ９０．２＋Ｔ細胞）をＮＯＤマウスの膵臓から単離した。ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１血小板（約１×１０^8）またはＣｙ５．５標識遊離血小板（約１×１０^8）をＴ細胞とともに一晩インキュベートした。その後、核をヘキストで１０分にわたって染色した。４０倍の対物レンズを使用する共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ）によって、血小板およびＴ細胞の結合を観察した。Ｔ細胞活性アッセイのために、グランザイムＢ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって決定した。
【００７９】
（８）血小板コラーゲン結合アッセイ。
マウスコラーゲンＩ／ＩＩＩ型タンパク質をＢｉｏ－Ｒａｄから購入した。コラーゲン溶液（０．２５％の酢酸中２．０ｍｇ　ｍｌ）を共焦点ウェル上に４℃で一晩被覆した。その後、結合アッセイ前に、ウェルを２％のＢＳＡで遮断した。ＥＧＦＰ－ＰＤ－Ｌ１血小板（約１×１０^8）をコラーゲン被覆ウェルに３０秒かけて添加し、その後ウェルを３回洗浄して、未結合の血小板を除去した。４０倍の対物レンズを使用する共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ）を使用して、結合血小板を観察した。
【００８０】
（９）血小板凝集アッセイ。
血小板の凝集を共焦点撮像によって評価した。血小板をＷＧＡ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ５９４で標識した。その後、血小板を共焦点ウェルに充填し、０．５ＩＵ$^{-1}$のトロンビ

ンで３０分にわたって刺激した。６３倍の対物レンズを使用する連続走査様式の共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ）で、共焦点顕微鏡観察を実行した。

【００８１】

（１０）インビボ循環分析。

単離された血小板をＮＨＳ－Ｃｙ５．５で標識した。その後、血小板をＰＢＳで洗浄して、遊離ＮＨＳ－Ｃｙ５．５を除去した。その後、ＮＯＤマウスに、ＮＨＳ－Ｃｙ５．５標識血小板（２００μＬ、約２×１０^{8}）を尾部静脈を通して注射した。血小板注射後の異なる時間（それぞれ２分、３０分、１時間、２時間、４時間、８時間、２４時間、および４８時間）に、ＮＯＤマウスの血液を収集した。１５００ｒｐｍで５分にわたって遠心分離することによって、血清を精製し、血小板の蛍光をＴｅＣａｎ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｍ２００リーダーで測定した。

【００８２】

（１１）インビボ体内分布分析。

単離された血小板をＰＢＳ緩衝液中のＮＨＳ－Ｃｙ５．５で標識した。２０時間のインキュベーション後、ＮＨＳ－Ｃｙ５．５標識血小板をＰＢＳで洗浄して、遊離ＮＨＳ－Ｃｙ５．５を３回除去した。ＮＯＤマウスに、Ｃｙ５．５標識血小板（２００μＬ、約２×１０^{8}）を尾部静脈を通して注射した。その後、ＮＯＤマウスを安楽死させ、膵臓、肺、心臓、腎臓、脾臓、および肝臓を含む主要器官を収集した。最後に、主要器官の強度をＸｅｎｏｇｅｎ　ＩＶＩＳ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ撮像システムによって記録した。

【００８３】

（１２）糖尿病ＮＯＤマウスの治療。

雌のＮＯＤ／ＳｈｉＬｔＪマウスをＪａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂ（ＵＳＡ）から購入した。全てのマウスの試験は、ノースカロライナ州立大学およびノースカロライナ大学チャペルヒル校の施設内動物管理使用委員会によって承認された動物プロトコルの文脈で実行した。顕性糖尿病は、２日間連続の２５０ｍｇ／ｄＬ超の血糖値として定義した。測定は、尾部出血によって実行した。ＮＯＤマウスの血糖は、生後１０週から開始して監視した。マウスが２日にわたって高血糖（２５０ｍｇ／ｄＬ超）になってから、高血糖マウスを未処置のままにする（対照群）か、または遊離血小板（約２×１０^{8}）もしくはＰＤ－Ｌ１血小板（約２×１０^{8}）を尾部静脈を介して２日毎に注射した。ＮＯＤマウスの血糖を最大特定の終点（４０日）まで２日毎に測定し、その後マウスを　殺して、さらに観察した。

【００８４】

（１３）組織免疫蛍光アッセイ。

ＮＯＤマウスの膵臓を収集し、最適切断培地中で凍結した。クライオトームを使用して、膵臓試料を切断し、スライド上に載せた。最初に、凍結した膵臓切片をＰＢＳで５分にわたって洗浄して、Ｏ．Ｃ．Ｔ．を除去した。その後、３％のＢＳＡおよび０．２％のＴｒｉｔｏｎ－Ｘ１００を含有する緩衝液を使用して、検体を遮断した。その後、検体を、示されるインスリン、グルカゴン、およびＣＤ８一次抗体（１．５％のＢＳＡ中１：１００）とともに一晩インキュベートした。検体をＰＢＳで３回、各回５分にわたって洗浄した。その後に、検体をＦＩＴＣおよびＴＲＩＴＣ標識二次抗体（１．５％のＢＳＡ中に希釈）とともに１時間インキュベートした。最後に、試料の核をＤＡＰＩで２０分にわたって染色し、ＰＢＳで３回洗浄した。４０倍の対物レンズを使用する共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ）を通して、試料を観察した。

【００８５】

（１４）膵臓Ｔ細胞分析。

膵臓浸潤Ｔ細胞の状態を評価するために、示される異なる治療を行ったＮＯＤマウスから膵臓を収集した。膵臓を解離させて、単細胞を生成した。試料を７０ミクロンのフィルターに通過させた。その後に、細胞を、示されるＡＰＣ抗マウスＣＤ３抗体、ＦＩＴＣ共役抗ＣＤ４、ＰＥ共役抗ＣＤ８、ＰＥ共役抗ＦｏｘＰ３、ＦＩＴＣ共役抗グランザイムＢ、およびＦＩＴＣ共役抗ＩＦＮ－γで染色した。ＣＤ３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ３ＣＤ４Ｔ細胞、グランザイムＢ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞、およびＩＦＮ－γ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞、および

ＦｏｘＰ３＋ＣＤ４＋Ｔｒｅｇ細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって決定した。

【００８６】

（１５）統計的分析。

全てのデータは、平均±標準偏差として示した。別段述べられない限り、全ての実験で、生物学的複製を実行した。１元配置または２元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）およびテューキー事後検定を使用して、複数の比較で試料を分析した。生存率データは、ログランク検定を使用して分析した。全ての統計的分析は、ＩＢＭ　ＳＰＳＳ統計で実行した。ｐ＊＜０．０５を統計的に有意であると見なした。

【００８７】

Ｅ．参考文献

Ａｋｂａｒｐｏｕｒ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｉｎｓｕｌｉｎ　Ｂ　ｃｈａｉｎ９－２３ｇｅｎｅ　ｔｒａｎｓｆｅｒ　ｔｏ　ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅｓ　ｐｒｏｔｅｃｔｓ　ｆｒｏｍ　ｔｙｐｅ１ｄｉａｂｅｔｅｓ　ｂｙ　ｉｎｄｕｃｉｎｇ　Ａｇ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ＦｏｘＰ３＋Ｔｒｅｇｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　ｍｅｄｉｃｉｎｅ７，２８９ｒａ２８１，ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｔｒａｎｓｌｍｅｄ．ａａａ３０３２（２０１５）．

Ａｌｉ，Ｒ．Ａ．，Ｗｕｅｓｃｈｅｒ，Ｌ．Ｍ．＆Ｗｏｒｔｈ，Ｒ．Ｇ．Ｐｌａｔｅｌｅｔｓ：ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｉｍｍｕｎｅ　ｓｙｓｔｅｍ．Ｃｕｒｒｅｎｔ　ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ１６，６５－７８（２０１５）．

Ａｎｓａｒｉ，Ｍ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　ｐｒｏｇｒａｍｍｅｄ　ｄｅａｔｈ－１（ＰＤ－１）ｐａｔｈｗａｙ　ｒｅｇｕｌａｔｅｓ　ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ　ｄｉａｂｅｔｅｓ　ｉｎ　ｎｏｎｏｂｅｓｅ　ｄｉａｂｅｔｉｃ（ＮＯＤ）ｍｉｃｅ．Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　ｍｅｄｉｃｉｎｅ１９８，６３－６９，ｄｏｉ：１０．１０８４／ｊｅｍ．２００２２１２５（２００３）．

Ａｎｓｅｌｍｏ，Ａ．Ｃ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｌａｔｅｌｅｔ－ｌｉｋｅ　ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ：ｍｉｍｉｃｋｉｎｇ　ｓｈａｐｅ，ｆｌｅｘｉｂｉｌｉｔｙ，ａｎｄ　ｓｕｒｆａｃｅ　ｂｉｏｌｏｇｙ　ｏｆ　ｐｌａｔｅｌｅｔｓ　ｔｏ　ｔａｒｇｅｔ　ｖａｓｃｕｌａｒ　ｉｎｊｕｒｉｅｓ．ＡＣＳ　ｎａｎｏ８，１１２４３－１１２５３，ｄｏｉ：１０．１０２１／ｎｎ５０３７３２ｍ（２０１４）．

Ｂａｒｃｌａｙ，Ｊ．，Ｃｒｅｓｗｅｌｌ，Ｊ．＆Ｌｅｏｎ，Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ　ａｎｄ　ｔｈｅ　ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ　ｐａｔｈｗａｙ．Ａｒｃｈｉｖｏｓ　ｅｓｐａｎｏｌｅｓ　ｄｅ　ｕｒｏｌｏｇｉａ７１，３９３－３９９（２０１８）．

Ｂｅｎ　Ｎａｓｒ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．ＰＤ－Ｌ１ｇｅｎｅｔｉｃ　ｏｖｅｒｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｒ　ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　ｒｅｓｔｏｒａｔｉｏｎ　ｉｎ　ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ　ｓｔｅｍ　ａｎｄ　ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ　ｃｅｌｌｓ　ｒｅｖｅｒｓｅｓ　ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ　ｄｉａｂｅｔｅｓ．Ｓｃｉ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ９，ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｔｒａｎｓｌｍｅｄ．ａａｍ７５４３（２０１７）．

Ｂｌｕｅｓｔｏｎｅ，Ｊ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｙｐｅ１ｄｉａｂｅｔｅｓ　ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ　ｕｓｉｎｇ　ｐｏｌｙｃｌｏｎａｌ　ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　ｍｅｄｉｃｉｎｅ７，３１５ｒａ１８９，ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｔｒａｎｓｌｍｅｄ．ａａｄ４１３４（２０１５）．

Ｂｌｕｅｓｔｏｎｅ，Ｊ．Ａ．，Ｈｅｒｏｌｄ，Ｋ．＆Ｅｉｓｅｎｂａｒｔｈ，Ｇ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，ｐａｔｈｏｇｅｎｅｓｉｓ　ａｎｄ　ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｉｎｔｅｒｖｅｎｔｉｏｎｓ　ｉｎ　ｔｙｐｅ１ｄｉａｂｅｔｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ４６４，１２９３－１３００（２０１０）．

Boldison, J. & Wong, F. S. Immune and Pancreatic beta Cell Interactions in Type1Diabetes. Trends in endocrinology and metabolism: TEM27, 856-867, doi:10.1016/j.tem.2016.08.007 (2016).
Clemente-Casares, X. et al. Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity. Nature530, 434-440, doi:10.1038/nature16962 (2016).
Gauci, M. L. et al. Autoimmune diabetes induced by PD-1inhibitor-retrospective analysis and pathogenesis:a case report and literature review. Cancer immunology, immunotherapy: CII66, 1399-1410, doi:10.1007/s00262-017-2033-8 (2017).
Hu, C. M. et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. Nature526, 118-121, doi:10.1038/nature15373 (2015).
Hu, Q. et al. Anticancer Platelet-Mimicking Nanovehicles. Adv Mater27, 7043-7050, doi:10.1002/adma.201503323 (2015).
Hughes, J. et al. Precipitation of autoimmune diabetes with anti-PD-1immunotherapy. Diabetes care38, e55-57, doi:10.2337/dc14-2349 (2015).
Kapke, J., Shaheen, Z., Kilari, D., Knudson, P. & Wong, S. Immune Checkpoint Inhibitor-Associated Type1Diabetes Mellitus: Case Series, Review of the Literature, and Optimal Management. Case reports in oncology10, 897-909, doi:10.1159/000480634 (2017).
Kapur, R. & Semple, J. W. Platelets as immune-sensing cells. Blood advances1, 10-14, doi:10.1182/bloodadvances.2016000067 (2016).
Katsarou, A. et al. Type1diabetes mellitus. Nature reviews. Disease primers3, 17016, doi:10.1038/nrdp.2017.16 (2017).
Keymeulen, B. et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type1diabetes. The New England journal of medicine352, 2598-2608, doi:10.1056/NEJMoa043980 (2005).
Lefrancais, E. et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. Nature544, 105-109, doi:10.1038/nature21706 (2017).
Lehuen, A., Diana, J., Zaccone, P. & Cooke, A. Immune cell crosstalk in type1diabetes. Nature reviews. Immunology10, 501-513, doi:10.1038/nri2787 (2010).

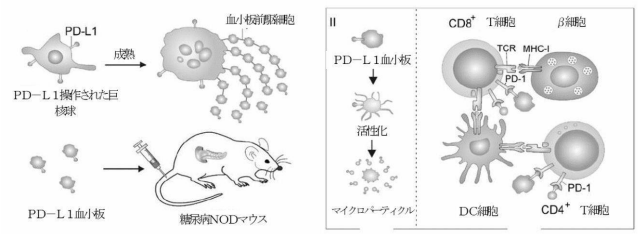
Machlus, K. R. & Italiano, J. E., Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. The Journal of cell biology 201, 785-796, doi:10.1083/jcb.201304054 (2013).
Mause, S. F., von Hundelshausen, P., Zernecke, A., Koenen, R. R. & Weber, C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 25, 1512-1518, doi:10.1161/01.ATV.0000170133.43608.37 (2005).
Mellati, M. et al. Anti-PD-1 and Anti-PDL-1 Monoclonal Antibodies Causing Type 1 Diabetes. Diabetes care 38, e137-138, doi:10.2337/dc15-0889 (2015).
Moreau, T. et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. Nature communications 7, 11208, doi:10.1038/ncomms11208 (2016).
Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M. & Modjeski, K. L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. Blood 123, 2759-2767, doi:10.1182/blood-2013-11-462432 (2014).
Ovalle, F. et al. Verapamil and beta cell function in adults with recent-onset type 1 diabetes. Nature medicine 24, 1108-1112, doi:10.1038/s41591-018-0089-4 (2018).
Piccin, A., Murphy, W. G. & Smith, O. P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood reviews 21, 157-171, doi:10.1016/j.blre.2006.09.001 (2007).
Rachidi, S. et al. Platelets subvert T cell immunity against cancer via GARP-TGFbeta axis. Science immunology 2, doi:10.1126/sciimmunol.aai7911 (2017).
Roep, B. O. et al. Plasmid-encoded proinsulin preserves C-peptide while specifically reducing proinsulin-specific CD8 (+) T cells in type 1 diabetes. Science translational medicine 5, 191ra182, doi:10.1126/scitranslmed.3006103 (2013).
Rondina, M. T. & Garraud, O. Emerging evidence for platelets as immune and inflammatory effector cells. Frontiers in immunology 5, 653, doi:10.3389/fimmu.2014.00653 (2014).

Ruggeri, Z. M. & Mendolicchio, G. L. Adhesion mechanisms in platelet function. Circulation research 100, 1673-1685, doi:10.1161/01.RES.0000267878.97021.ab (2007).
Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. Nature reviews. Immunology 11, 264-274, doi:10.1038/nri2956 (2011).
Siljander, P. R. Platelet-derived microparticles-an updated perspective. Thrombosis research 127 Suppl 2, S30-33, doi:10.1016/S0049-3848(10)70152-3 (2011).
Sun, C., Mezzadra, R. & Schumacher, T. N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. Immunity 48, 434-452, doi:10.1016/j.immuni.2018.03.014 (2018).
Ueno, H. et al. Dendritic cell subsets in health and disease. Immunological reviews 219, 118-142, doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x (2007).
von Hundelshausen, P. & Weber, C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. Circulation research 100, 27-40, doi:10.1161/01.RES.0000252802.25497.b7 (2007).
Wan, X. et al. Pancreatic islets communicate with lymphoid tissues via exocytosis of insulin peptides. Nature 560, 107-111, doi:10.1038/s41586-018-0341-6 (2018).
Xing, Y. & Hogquist, K. A. T-cell tolerance: central and peripheral. Cold Spring Harbor perspectives in biology 4, doi:10.1101/cshperspect.a006957 (2012).
Zamora, C. et al. Binding of Platelets to Lymphocytes: A Potential Anti-Inflammatory Therapy in Rheumatoid Arthritis. J Immunol 198, 3099-3108, doi:10.4049/jimmunol.1601708 (2017).
Zhang, X. et al. Engineering PD-1-Presenting Platelets for Cancer Immunotherapy. Nano letters, doi:10.1021/acs.nanolett.8b02321 (2018).
Zhang, X. et al. The effect of autophagy inhibitors on drug delivery using biodegradable polymer nanoparticles in cancer treatment. Biomaterials 35, 1932-1943, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.10.034 (2014).
Zhou, Q. & Melton, D. A. Pancreas regeneration. Nature 557, 351-358, doi:10.1038/s41586-018-0088-0 (2018).

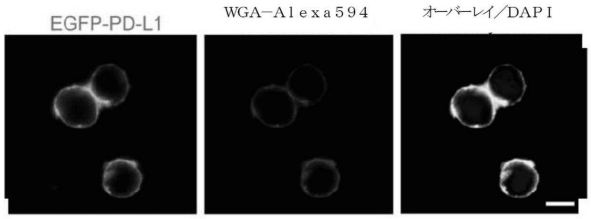
Ｚｈｏｕ，Ｑ．Ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ ｍｅｄｉｃｉｎｅ：Ｉｎｔｅｒｓｐｅｃｉｅｓ ｐａｎｃｒｅａｓ ｔｒａｎｓｐｌａｎｔｓ．Ｎａｔｕｒｅ５４２，１６８－１６９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ２１４９０（２０１７）．
Ｚｏｕ，Ｗ．，Ｗｏｌｃｈｏｋ，Ｊ．Ｄ．＆Ｃｈｅｎ，Ｌ．ＰＤ－Ｌ１ （Ｂ７－Ｈ１） ａｎｄ ＰＤ－１ｐａｔｈｗａｙ ｂｌｏｃｋａｄｅ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｔｈｅｒａｐｙ：Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ，ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ，ａｎｄ ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ ｍｅｄｉｃｉｎｅ８，３２８ｒｖ３２４，ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｔｒａｎｓｌｍｅｄ．ａａｄ７１１８（２０１６）．

【図面】

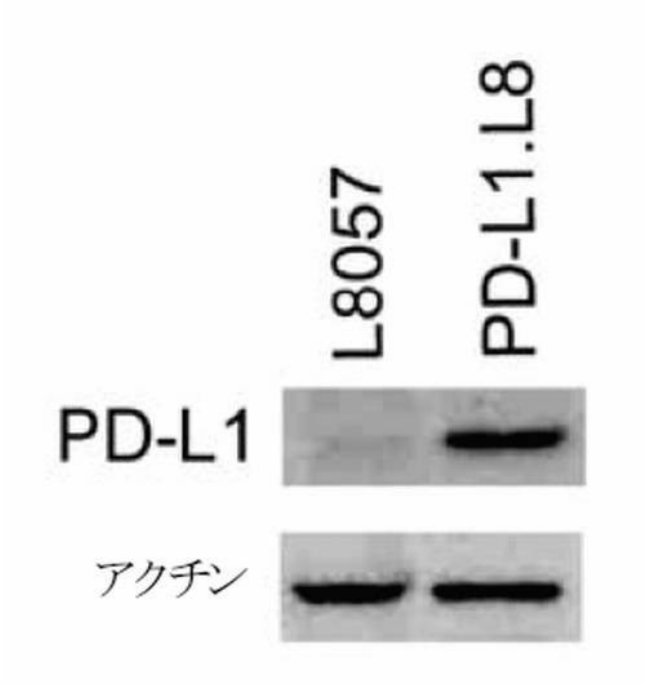
【図１Ａ】



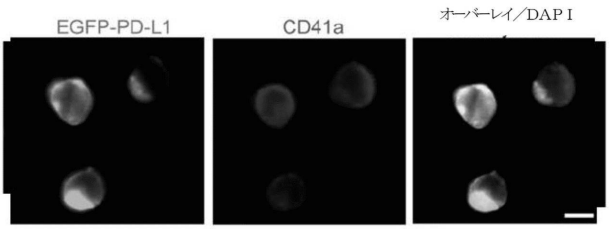
【図１Ｂ】



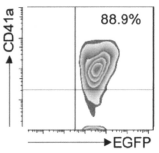
【図１Ｃ】



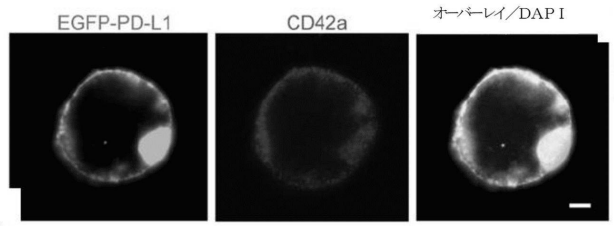
【図１Ｄ】



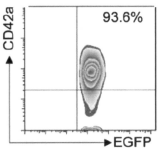
【図１Ｅ】



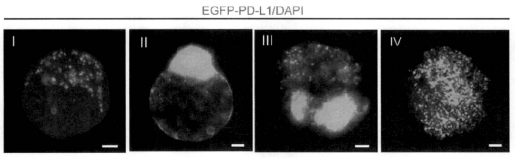
【図１Ｆ】



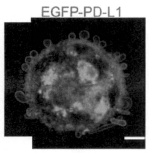
【図１Ｇ】



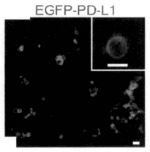
【図１Ｈ】



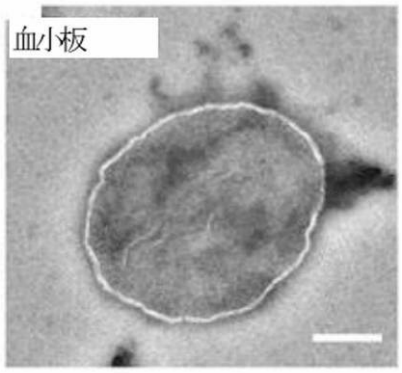
【図１Ｉ】



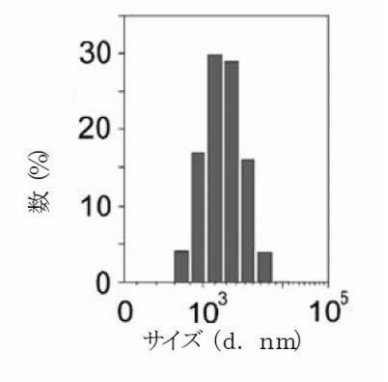
【図１Ｊ】



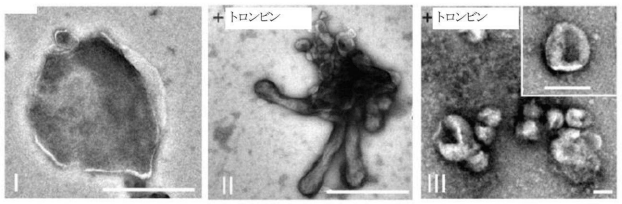
【図１Ｋ】



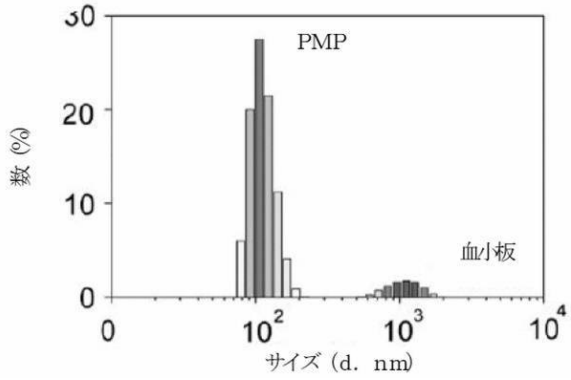
【図１Ｌ】



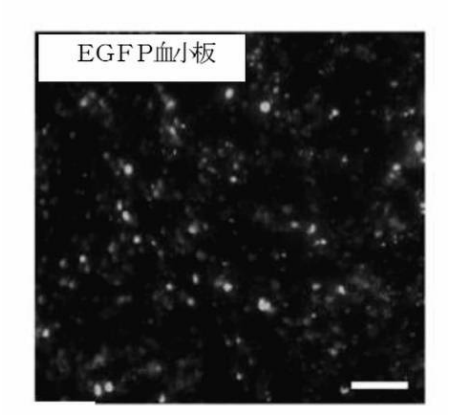
【図２Ａ】



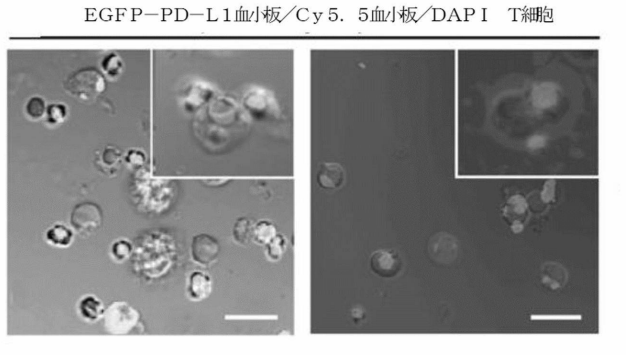
【図２Ｂ】



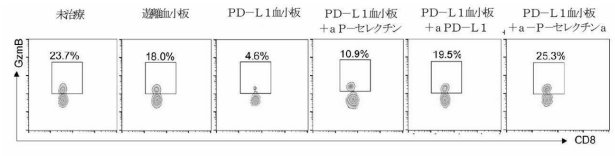
【図２Ｃ】



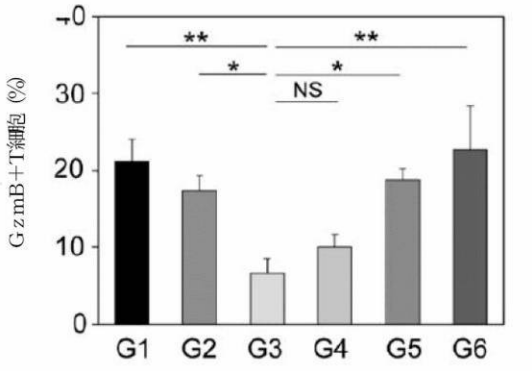
【図２Ｄ】



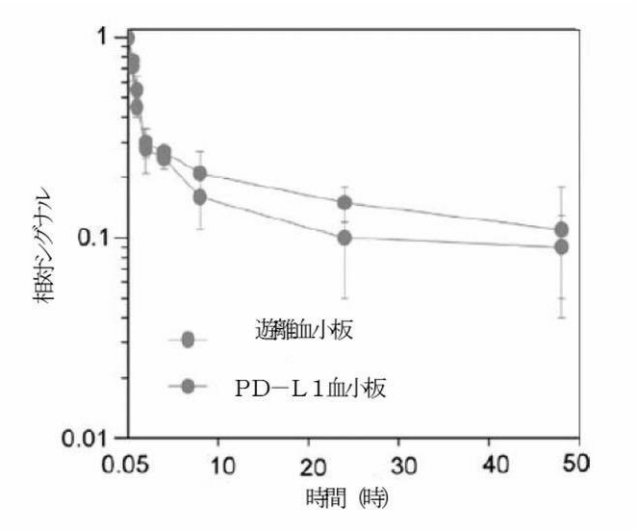
【図２Ｅ】



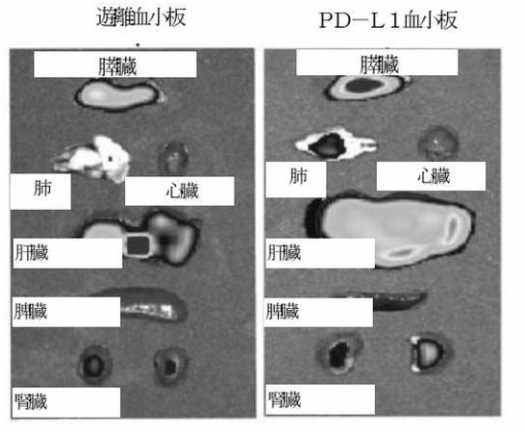
【図２Ｆ】



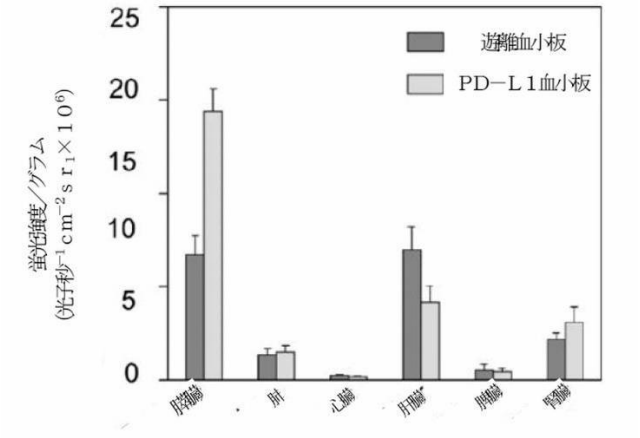
【図２Ｇ】



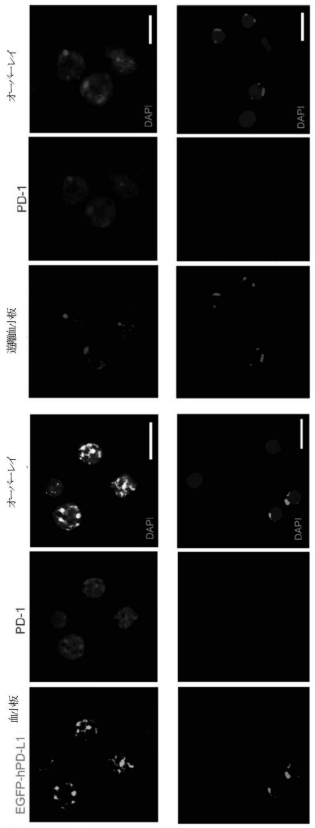
【図２Ｈ】



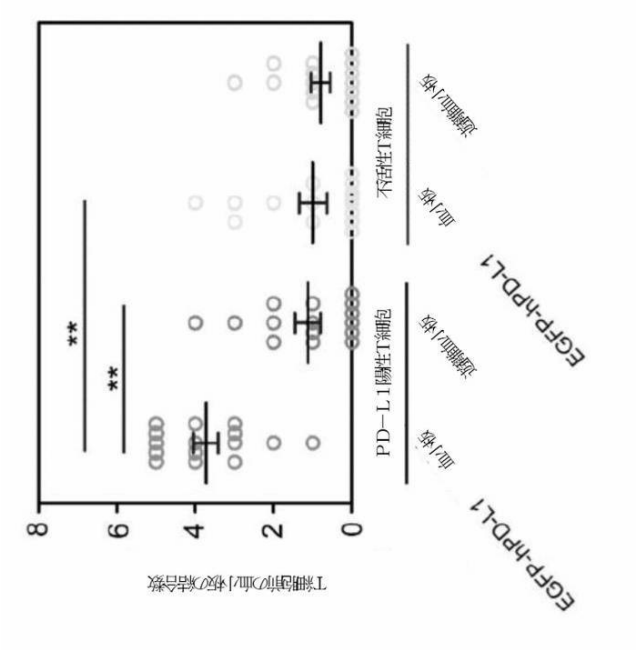
【図２Ｉ】



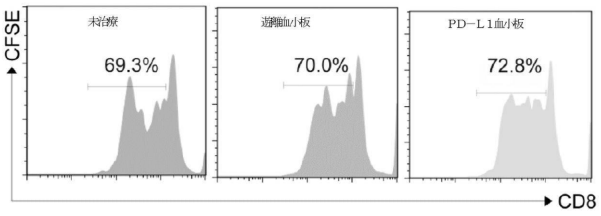
【図３Ａ】



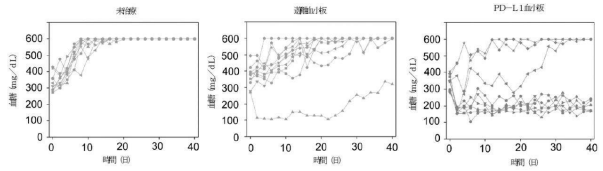
【図３Ｂ】



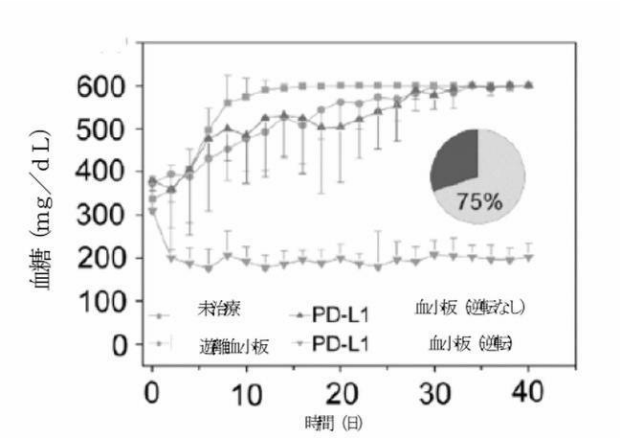
【図４】



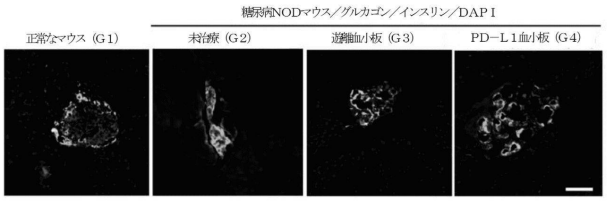
【図５Ａ】



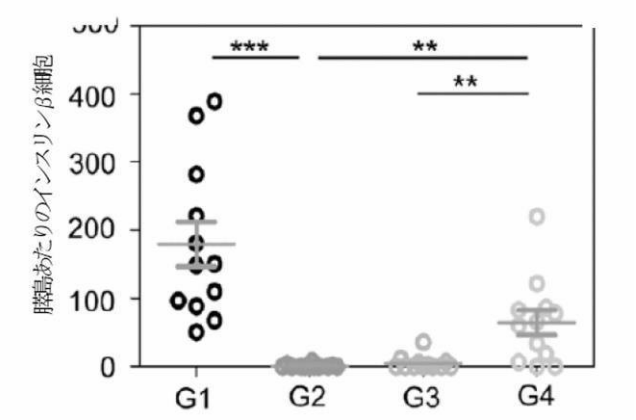
【図５Ｂ】



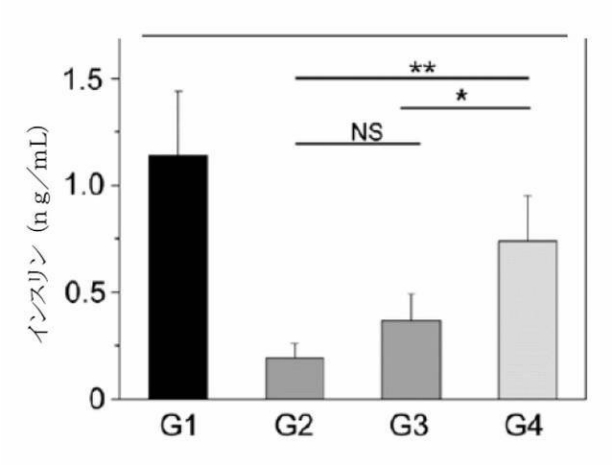
【図５Ｃ】



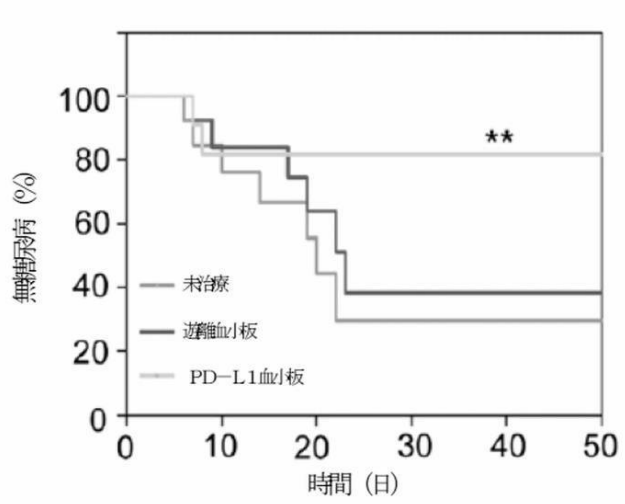
【図５Ｄ】



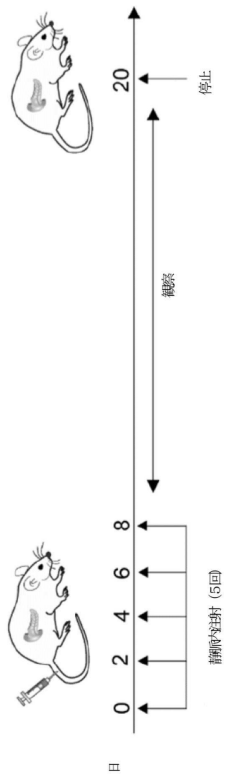
【図５Ｅ】



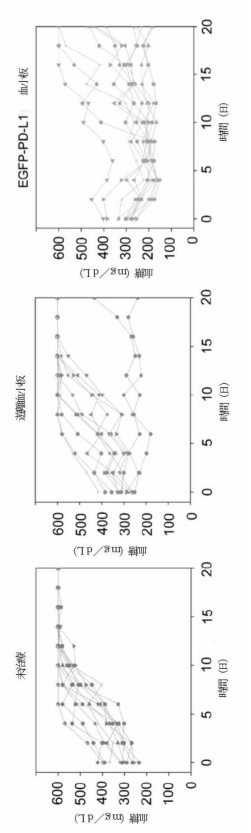
【図５Ｆ】



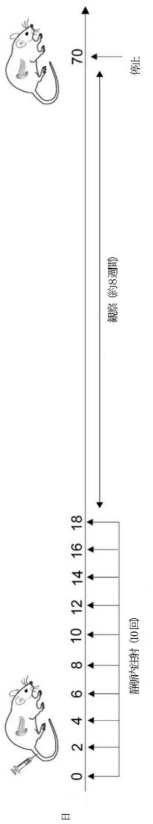
【図６Ａ】



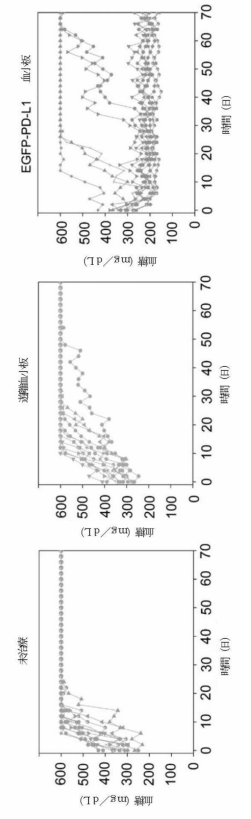
【図６Ｂ】



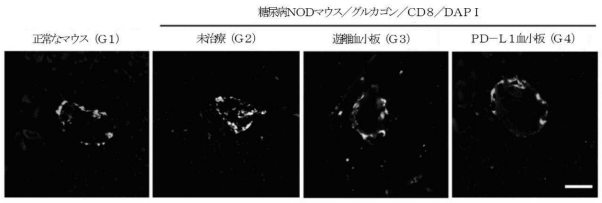
【図７Ａ】



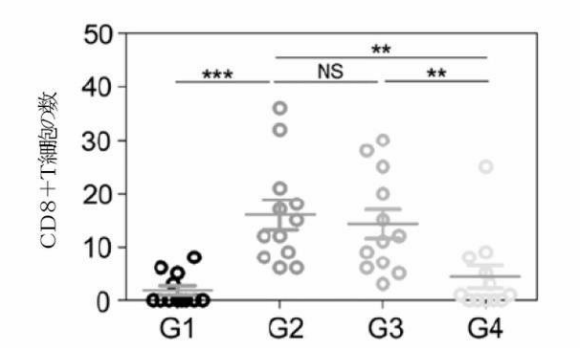
【図７Ｂ】



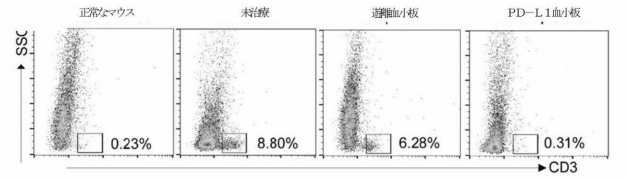
【図８Ａ】



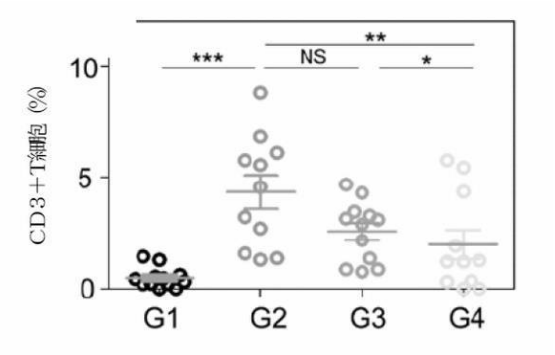
【図８Ｂ】



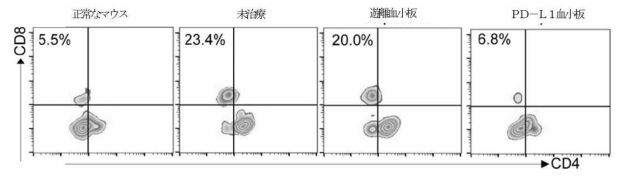
【図８Ｃ】



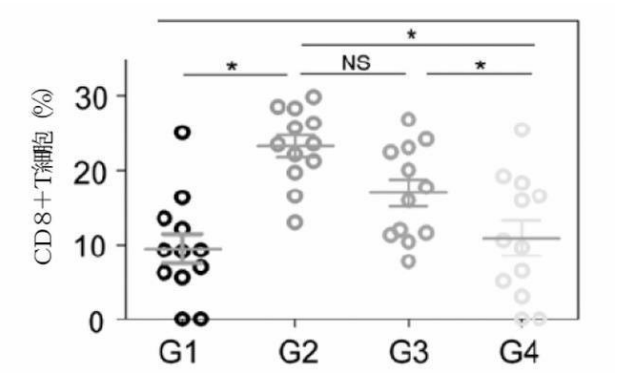
【図８Ｄ】



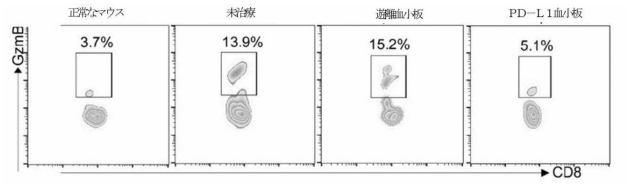
【図８Ｅ】



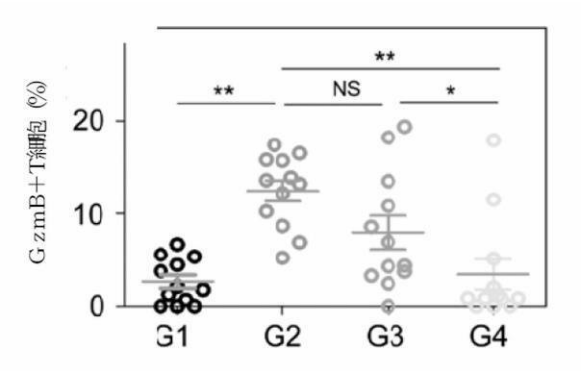
【図８Ｆ】



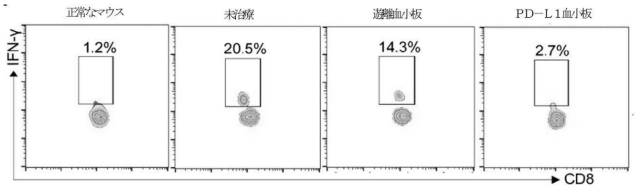
【図８Ｇ】



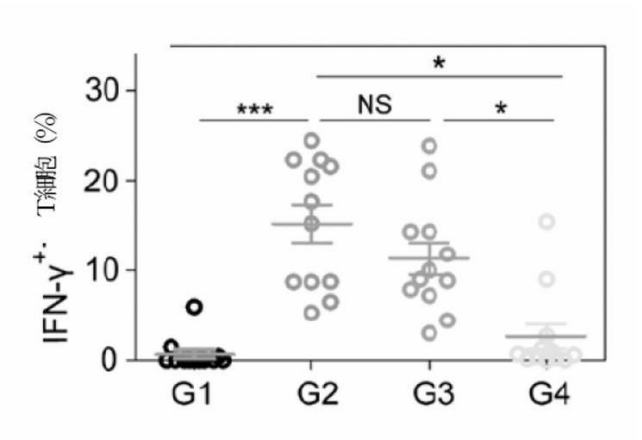
【図８Ｈ】



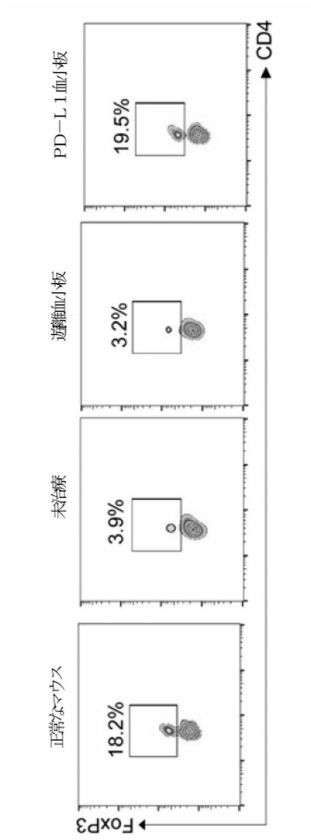
【図８Ｉ】



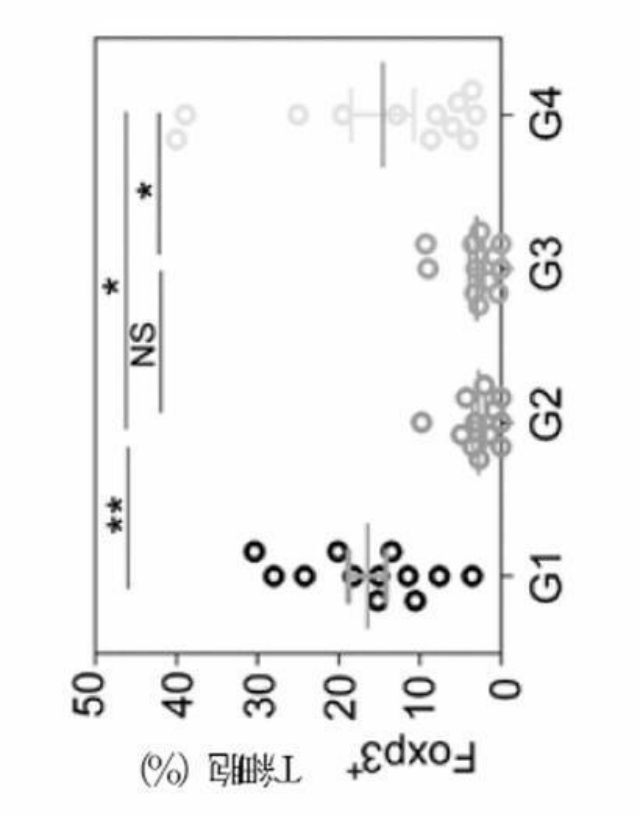
【図８Ｊ】



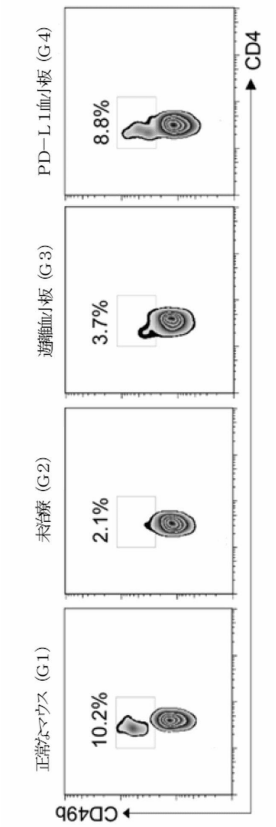
【図９Ａ】



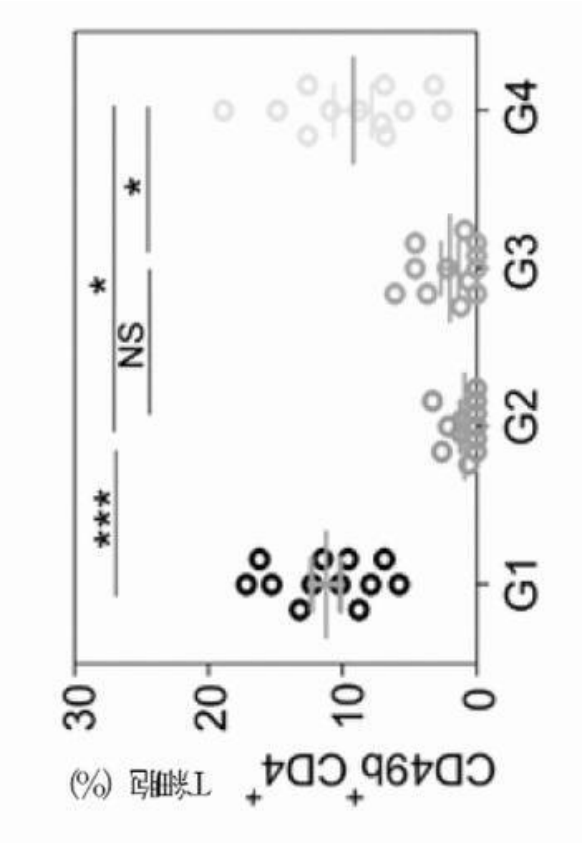
【図９Ｂ】



【図１０Ａ】



【図１０Ｂ】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/55524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 35/19, 39/00, 47/69; A61P 3/10, 37/06; C07K 14/705; C12N 5/00, 15/85 (2019.01)

CPC - A61K 35/19, 39/001102, 47/6901; A61P 3/10, 37/06; C07K 14/705; C12N 5/0644

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	(HE, Y et al.) Drug targeting through platelet membrane-coated nanoparticles for the treatment of rheumatoid arthritis. Nano Research. November 2018, Epub 30 June 2018, Vol. 11, No. 11; pages 6086-6101; abstract; page 6086, 1st column, 1st paragraph; page 6091, 2nd column, 3rd paragraph; DOI: 10.1007/s12274-018-2126-5	10-12, 13/10-12, 14/10-12
X --- Y	US 2018/0214487 A1 (THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 2 August 2018; abstract; paragraphs [0010], [0011], [0012], [0068], [0143], [0170], [0180], [0300], [0305], [0311], [0391]; Figures 4B and 12	10-12 ---- 1-9, 13/6-9, 14/6-9
Y	WO 2018/053010 A1 (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY) 22 March 2018; abstract; page 2, lines 6-25; page 3, lines 30-31; page 5, lines 28-29; page 9, lines 9-10; page 16, line 19; page 28, lines 29-31; page 37, lines 10-11; Figure 9	1-9, 13/6-9, 14/6-9
A	(ZHANG, X et al.) Engineering PD-1-Presenting Platelets for Cancer Immunotherapy. Nano Letters. 12 September 2018, Epub 31 July 2018, Vol. 18, No. 9; pages 5716-5725; DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b02321	1-12, 13/6-12, 14/6-12
A	(ROLFES, V et al.) PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. Oncotarget. 8 June 2018, Vol. 9, No. 44; pages 27460-27470; DOI: 10.18632/oncotarget.25446	1-12, 13/6-12, 14/6-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 December 2019 (09.12.2019)	06 JAN 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*1/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/00	
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ	*5/44 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/44	
Ａ６１Ｐ	*7/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/00	
Ａ６１Ｐ	*17/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/14	
Ａ６１Ｐ	*7/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/06	
Ａ６１Ｐ	*1/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16	
Ａ６１Ｐ	*27/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/16	
Ａ６１Ｐ	*9/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/04	
Ａ６１Ｐ	*15/08 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/08	
Ａ６１Ｐ	*1/18 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/18	
Ａ６１Ｐ	*27/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02	
Ａ６１Ｐ	*17/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/04	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*17/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00	
Ａ６１Ｐ	*21/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00	
Ａ６１Ｐ	*19/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/04	
Ａ６１Ｐ	*29/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ	*11/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ	*13/12 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｐ	*5/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/16	
Ａ６１Ｐ	*13/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/10	
Ａ６１Ｐ	*19/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02	
Ａ６１Ｐ	*25/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/20	
Ａ６１Ｐ	*25/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/02	
Ａ６１Ｐ	*9/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10	
Ａ６１Ｐ	*17/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06	
Ａ６１Ｐ	*31/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ	*25/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00 １０１	
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/14	
Ｃ１２Ｎ	*5/078(2010.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00 １２１	
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/078	
Ｃ１２Ｎ	*15/867 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12	
		Ｃ１２Ｎ	15/867 Ｚ	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

(72)発明者 グ，ヂェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９００４９，ロサンゼルス，ナンバー１０１，サウス バンディー ドライヴ １１５７

(72)発明者 ワン，ジンチャン
アメリカ合衆国 ノース カロライナ州 ２７６０６，ラレー，メイン キャンパス ドライブ １０２１ セカンド フロアー

(72)発明者 チャン，シュードン
アメリカ合衆国 ノース カロライナ州 ２７６０６，ラレー，メイン キャンパス ドライブ １０２１ セカンド フロアー

Ｆターム（参考） 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

Fターム（参考）

4C087 AA01 AA02 BB38 BB51 MA02 MA66 NA14 ZA01 ZA29 ZA33
ZA34 ZA36 ZA51 ZA55 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA92 ZA94
ZA96 ZB08 ZB11 ZB15 ZB26 ZB35 ZC06 ZC35 ZC75