

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-506332

(P2017-506332A)

(43) 公表日 平成29年3月2日(2017.3.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2016-548091 (P2016-548091)  
 (86) (22) 出願日 平成27年1月23日 (2015. 1. 23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月22日 (2016. 7. 22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/012776  
 (87) 国際公開番号 W02015/112913  
 (87) 国際公開日 平成27年7月30日 (2015. 7. 30)  
 (31) 優先権主張番号 61/931, 470  
 (32) 優先日 平成26年1月24日 (2014. 1. 24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516181871  
 オベクサ セラピューティクス, インコー  
 ポレイティド  
 アメリカ合衆国, テキサス 77381,  
 ザ ウッドランズ, テクノロジー フォレ  
 スト プールバード 2635  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療薬のための効力アッセイ

(57) 【要約】

治療薬が免疫寛容原性マーカー、例えばPD-L1の発現を上昇させる能力を、単球、マクロファージ、B細胞及び樹状細胞などの抗原提示細胞によって判定することを含む治療薬の免疫寛容原性能力の判定方法が本明細書に提供される。

【選択図】 図1A、図1B

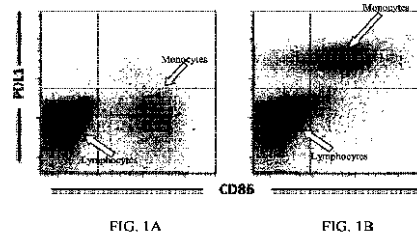


FIG. 1A

FIG. 1B

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

治療薬の免疫寛容原性の判定方法であって、

a . 前記治療薬をインピボで検査抗原提示細胞を含む検査試料と接触させること、  
b . 前記治療薬と接触した前記検査抗原提示細胞によってPD - 1リガンドを含む少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーの発現を測定し、この中で、前記測定工程は、前記接触工程後の72時間以内に生じること、及び

c . 前記検査抗原提示細胞による前記少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーの発現を適切な対照と比較すること

を含む前記方法であって、この中で、前記対照抗原提示細胞と比較した前記検査抗原提示細胞による前記少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーの発現の上昇は、前記治療薬が免疫寛容原性であることを判定する、前記方法。

10

## 【請求項 2】

前記測定工程は、前記接触工程の約24時間後に生じる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記治療薬はT細胞を含み、かつ前記検査及び対照抗原提示細胞は、前記T細胞に対して自家性である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記治療薬はT細胞を含み、かつ前記検査及び対照抗原提示細胞は、前記T細胞に対してアロジェニックである、請求項1に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記T細胞は、アレルゲン及び自己抗原からなる群から選択される抗原に対して反応性がある、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記T細胞は、自己抗原に対して反応性がある、請求項5に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記自己抗原は、ミエリタンパク質、アクアポリン、または血小板糖タンパク質からなる群から選択される請求項5に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記ミエリタンパク質は、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、及びミエリン乏突起膠細胞タンパク質からなる群から選択される、請求項7に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

前記PD - 1リガンドは、PD - L1である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記抗原提示細胞は、単球を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記抗原提示細胞は、B細胞を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記抗原提示細胞は、樹状細胞を含む、請求項1に記載の方法。

40

## 【請求項 13】

前記測定工程は、前記検査及び対照抗原提示細胞を免疫寛容原性マーカーに特異的な抗体とともにインキュベートすること、ならびに前記検査及び対照抗原提示細胞へ結合した抗体の量を測定することを含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記抗体は、検出可能な標識で標識される、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記抗体は、フローサイトメトリーによって検出される、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 16】

免疫寛容原性マーカーに対する抗体及び抗原提示細胞マーカーに対する抗体を含む治療

50

用マーカーの免疫寛容原性を判定するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療薬の免疫寛容原性及び/または効力の判定方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

現在、物理化学的特性、抗原性、免疫原性、感染性及び感染または疾患に対する防護に関するアッセイなどの異なる検査方法が、治療薬の効力を測定するのに使用されている。この適用は、治療薬の性質及び検査の目的による。例えば、ワクチンの場合、効力はしばしば、標的動物種におけるまたは別の種、例えばマウスまたはラットにおける免疫応答を測定することによって判定される。

10

【0003】

先行報文は、自己免疫疾患のT細胞免疫療法、例えば、弱毒化自己反応性T細胞による予防接種が、自己反応T細胞に対する抗イディオタイプ及び/または抗エルゴタイプの活性を上昇させることによって異常な自己免疫応答を制御するよう調節性免疫応答を誘導することを示している。自己抗原特異的T細胞の投与が独特なパラクリンシグナルを誘発することができ、当該シグナルが、自己免疫障害と関係する炎症を制御するのを支援するよう抗原提示細胞(APC)及び/またはエフェクターT細胞の免疫寛容原性ネットワークを促進すると考えられている。このようなものとして、このようなT細胞を基にした治療薬の効力を測定することは、調節性免疫応答の誘導を測定することを必要とする。

20

【0004】

治療薬、特に調節性免疫を誘導する治療薬の効力を測定することのできる高処理量の、好ましくはインビトロでのアッセイが必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

治療薬の免疫寛容原性を判定することを含む、治療薬の効力を評価する方法が本明細書に開示される。治療薬の免疫寛容原性の判定方法は概して、治療薬を、検査抗原提示細胞を含む検査試料と好ましくはインビトロで接触させる工程、治療薬と接触した検査抗原提示細胞による少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーの発現を測定する工程、及び検査抗原提示細胞による少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーの発現を適切な対照と比較する工程を含み、この中で、対照抗原提示細胞と比較した検査抗原提示細胞による少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーの発現の上昇は、当該治療薬が免疫寛容原性であることを判定する。好ましい実施形態において、少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーは、PD-1リガンド、例えば、PD-L1を含む。好ましい実施形態において、測定する工程は、接触する工程の約24~72時間後以内に、なおもより好ましくは約48~72時間以内に、最も好ましくは約72時間以内に実施される。一実施形態において、治療薬の効力は、当該治療薬の免疫寛容原性と直接相関している。

30

【0006】

一実施形態において、当該治療薬は、これを必要とする患者を特定の作用因子に対して寛容化する、例えば、アレルゲンまたは自己抗原などの当該抗原に対する当該患者の免疫応答を下方制御するよう投与される。一実施形態において、当該治療薬は、アレルゲン、その寛容化エピトープ、当該アレルゲンに特異的な免疫細胞を含むワクチン、当該アレルゲンに特異的な免疫細胞の断片を含むワクチン、及び当該アレルゲンまたはその寛容化エピトープをコードする核酸からなる群から選択される。好ましくは、当該治療薬は、自己抗原、その寛容化エピトープ、当該自己抗原に特異的な免疫細胞を含むワクチン、当該自己抗原に特異的な免疫細胞の寛容化断片を含むワクチン、及び当該自己抗原またはその寛容化エピトープをコードする核酸からなる群から選択される。

40

【0007】

例示的な好ましい実施形態において、当該治療薬は、自己抗原に特異的なT細胞を含み

50

、この中で、当該自己抗原は好ましくは、ミエリタンパク質（例えば、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリン突起膠細胞タンパク質）、アクアポリン4、ならびに血小板膜糖タンパク質IIb-IIa及びIIb-IXからなる群から選択される。最も好ましくは、当該治療薬は、ミエリタンパク質に特異的な弱毒化T細胞を含む。別の実施形態において、当該T細胞ならびに当該検査及び対照抗原提示細胞はアロジェニックである。ある好ましい実施形態において、当該T細胞並びに当該検査及び対照抗原提示細胞は自家性である。

【0008】

好ましい実施形態において、抗原提示細胞を含む検査及び/または対照試料は、単球、樹状細胞、B細胞及び/または単球、マクロファージ、樹状細胞、もしくはB細胞に由来する細胞株を含む。いくつかの実施形態において、抗原提示細胞は、単球、例えば、U937、THP-1などに由来する細胞株を含む。好ましくは、検査及び対照抗原提示細胞は、B細胞を含む。最も好ましくは、検査及び対照抗原提示細胞は、単球を含む。

10

【0009】

一実施形態において、少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーは、CD86などの抗原提示細胞の少なくとも1つのマーカーとの組み合わせで測定される。より好ましくは、免疫寛容原性マーカーを検出する高処理量方法、及び任意に抗原提示細胞マーカーが使用される。最も好ましくは、フローサイトメトリー分析は、抗原提示細胞上での少なくとも1つの免疫寛容原性マーカー、例えば、PD-L1、及び抗原提示細胞マーカー、好ましくはCD86の細胞表面発現を同時に検出するために使用される。

20

【0010】

治療薬の免疫寛容原性を判定するためのキットも本明細書に提供され、当該キットは、免疫寛容原性マーカーに対する抗体及び抗原提示細胞マーカーに対する抗体を含む。好ましくは、当該キットは、抗体もしくは複数の抗体を検出するための検出試薬及び/または当該キットを使用するための説明書も含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、(A)単独でまたは(B)TCELNA（登録商標）の存在下でインキュベートした場合の自己リンパ球（CD86<sup>+</sup>、x軸）または自己単球（CD86、x軸）による細胞表面PD-L1発現（y軸）を示すフローサイトメトリードットプロットを示す。

30

【図2】図2は、単独で（ ）または5つの独立したTCELNA（登録商標）製品由来の自己T細胞（ ）の存在下でインキュベートした場合（x軸）の、細胞表面上でのPD-L1を発現する単球の割合（y軸）を示す。

【図3】図3は、5つの独立したTCELNA（登録商標）製品由来の自己T細胞都のインキュベーション後の蛍光抗PD-L1抗体と結合した単球（x軸）の平均蛍光強度（MFI）の倍数変化（y軸）を示す。

【図4】図4は、(A)24時間または(B)72時間単独でまたはアロジェニックなTCELNA（登録商標）製品由来のT細胞とインキュベートした場合の細胞表面上でPD-L1を発現する免疫細胞の割合（y軸）を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0012】

抗原提示細胞（APC）、特に専門的な抗原提示細胞は、照射されたアポトーシス細胞（弱毒化自己反応性T細胞など）と相互作用する際、有意な表現型変化及び免疫寛容原性変化を受けることができる。照射された自家性白血球との曝露後、樹状細胞は、IL-10の分泌亢進及び無感作T細胞増殖の刺激欠損を含む免疫寛容原性特徴を実証している（Zheng DHら（2010）Biochem Biophys Res Commun. 395（4）：540～546）。その上、HIVによる慢性ウイルス感染は結果的に、種々の細胞型におけるPD-L1の発現亢進、単球からのIL-10分泌、及びT細胞増殖の抑制を生じる（Said EAら（2010）Nat Med. 16（4）：4

50

52～459)。T細胞増殖及び機能は、例えば、PD-L1とPD-1の間及びIL-10RとIL-10の間の相互作用を遮断することによって回復し、PD-L1及び/またはIL-10を包含する相互作用、これらの個々の受容体及び個々の経路における他の分子が、寛容誘導の有用なマーカーであり得ることを示唆している。

#### 【0013】

本明細書で使用する場合、免疫寛容原性マーカーは、その発現の上方制御が寛容化剤と接触した抗原発現細胞によって即時検出され得るタンパク質を含み得る。例えば、PD-1リガンド、好ましくは、PD-L1を含む免疫寛容原性マーカーの発現は、寛容化剤との接触後24時間、48時間、または72時間以内に、好ましくは、48時間以内に、最も好ましくは24時間以内に検出され得る。

10

#### 【0014】

多発性硬化症において、PD-L1のAPC発現低下及び炎症誘発性サイトカインの分泌亢進は、多発性硬化症患者における進行と相関している(Karni Aら(2006) J Immunol. 177(6):4196～4202)。逆に、IFN-療法を用いた多発性硬化症の治療は、単球及び樹状細胞に及ぼすPD-L1発現を強く亢進し、自家性CD4 T細胞活性化を有意に阻害する(Schreiner B(2004) J Neuroimmunol. 155:172～182.)。

#### 【0015】

TCELLNA(登録商標)は、個体の末梢血単核細胞から増殖した自家性ミエリン反応性T細胞のプールから構成された多発性硬化症(MS)のためのT細胞免疫療法である。本明細書で開示する場合、TCELLNA(登録商標)製品の効力は、TCELLNA(登録商標)曝露に応じて抗原提示細胞によるPD-L1の発現をモニターすることによって検査され得る。具体的には、TCELLNA(登録商標)製品との培養に応じて、PD-L1の発現は、レスポンダー単球において誘導される。

20

#### 【0016】

これらの先の見解は、治療薬の免疫寛容原性を判定するための手段としての抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカー、例えば、PD-1リガンド、例えば、PD-L1を含む免疫寛容原性マーカーの発現の検出を支持する。

#### 【0017】

(治療薬)

したがって、一局面において、本発明は、治療薬の免疫寛容原性の判定方法を提供する。本明細書で使用する場合、「免疫寛容原性」という用語は、特定の抗原に対して「寛容化する」または「寛容性」を誘導するための治療薬の能力を指す。「寛容性」という用語は、適応性免疫応答、例えば、特異的抗原に対するT細胞及び/または抗体の応答における低下を指す。特異的抗原に対する免疫応答の低下は、免疫調節細胞、例えば、抗イデオタイプの及び/または抗エルゴタイプの免疫細胞の特別なサブセットの感作及び/または応答の増強と同時であり得る。

30

#### 【0018】

当業者は、治療薬の免疫寛容原性が当該治療薬の効力と関係し得ることを認識するであろう。本明細書で使用する「効力」は、投与後に所望の効果を生じるための治療薬の能力を指す。

40

#### 【0019】

好ましい実施形態において、治療薬の所望の効果とは、特定の抗原、例えばアレルゲン、自己抗原に対する免疫応答の寛容化である。これらの実施形態において、治療薬の免疫寛容原性は、その効力と直接相関している。好ましい実施形態において、本明細書に開示する方法は、アレルゲンまたは自己抗原に対する寛容性を誘導しようとする治療薬の効力を判定するために使用する。

#### 【0020】

「アレルゲン」は、対象における望ましくない(例えば、1型過敏性)免疫応答(すなわち、アレルギー性応答またはアレルギー性反応)を生じることのできる何らかの物質で

50

ある。アレルギーには、植物アレルギー（例えば、花粉、ブタクサアレルギー）、虫アレルギー、虫刺傷アレルギー（例えば、ミツバチ虫刺傷アレルギー）、動物アレルギー（例えば、動物フケまたはネコ Fel d1抗原などのペットアレルギー）、ラテックスアレルギー、カビアレルギー、真菌アレルギー、化粧品アレルギー、薬剤アレルギー、食物アレルギー、塵埃、虫毒液、ウイルス、細菌などが含まれるが、これらに限定しない。食物アレルギーには、乳アレルギー、卵アレルギー、ナッツアレルギー（例えば、ピーナッツアレルギーまたはツリーナッツアレルギーなど（例えば、ウォルナッツ、カシューナッツなど））、魚アレルギー、貝アレルギー、ダイズアレルギー、マメ科植物アレルギー、種子アレルギー及びコムギアレルギーが含まれるが、これらに限定しない。虫刺傷アレルギーには、ミツバチ穿刺、スズメバチ（wasp）穿刺、スズメバチ（hornet）穿刺、スズメバチ（yellow jacket）穿刺などであるまたはこれらと関係しているアレルギーが含まれる。虫アレルギーには、ハウスダストダニアレルギー（例えば、Der P1抗原）及びゴキブリアレルギーも含まれる。薬剤アレルギーには、抗生物質、ステロイド系抗炎症薬、麻酔薬などであるまたはこれらと関係しているアレルギーが含まれる。花粉アレルギーには、草アレルギー、樹木アレルギー、雑草アレルギー、花アレルギーなどが含まれる。「アレルギーと関係しているアレルギー」とは、単独でまたは他のアレルギーとの組み合わせで、対象におけるアレルギー応答もしくはアレルギー反応またはアレルギー応答もしくはアレルギー反応の症状を結果的に生じる、あるいは結果的に生じると臨床医によって予測されるであろう望ましくない免疫応答を生じるアレルギーである。

10

20

#### 【0021】

「自己抗原」とは、組織に対する損傷及び/または自己免疫疾患をしばしば結果的に生じる自己体液性（B細胞）またはT細胞仲介性免疫応答によって標的とした身体中の正常な組織構成要素である。本明細書で使用する「自己」は、同じ個体由来の細胞もしくは組織または、例えば同一のMHC/HLAハプロタイプを有する、免疫学的に互換性のある細胞もしくは組織を指す。本明細書で使用する「アロジェニックな」は、遺伝的に類似していないかつ免疫学的に互換性のない、例えば異なるMHC/HLAハプロタイプを有する細胞または組織を指す。自己抗原の非限定例としては、ミエリンタンパク質の構成要素（例えば、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、ミエリン突起膠細胞タンパク質）、アクアポリン4、血小板膜糖タンパク質IIb-IIa及びIb-IX、インスリン、プロインスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）、GAD65、GAD67、熱ショックタンパク質65（hsp65）、膵島細胞抗原69（ICA69）、膵島細胞抗原関連タンパク質チロシンホスファターゼ（PTP）、GM2-1ガングリオシド、Tep69、膵島細胞タンパク質チロシンホスファターゼ及びそれに由来する37kDa自己抗原（IA-2を含む）、フォグリン、ヒト軟骨細胞糖タンパク質39、コラーゲン、II型コラーゲン、軟骨結合タンパク質、エズリン、ラジキシン、モエシン、ミコバクテリア熱ショックタンパク質6、デスモグレイン、 $\alpha$ -2-GPI、Ku(p70/p80)自己抗原もしくはその80kdサブユニットタンパク質、核内自己抗原La(SS-B)及びRo(SS-A)、プロテアソーム型サブユニットC9、セントロソーム自己抗原PCM-1、多発性筋炎-強皮症自己抗原(PM-Sc1)、自己抗原CENP-A、U5、核小体U3-リボ核タンパク質及びTh(7-2)リボ核タンパク質、リボソームタンパク質L7、hPop1、核マトリックス抗原由来の36kdタンパク質、甲状腺ペルオキシダーゼ及び甲状腺刺激ホルモン受容体、ヒトTSH受容体、アセチルコリン受容体、筋受容体キナーゼ、またはその他の適切な自己抗原が挙げられる。

30

40

#### 【0022】

当業者は、全長のアレルギーもしくは全長の自己抗原、アレルギーの寛容化エピトープもしくは自己抗原の寛容化エピトープ、弱毒化し得、アレルギーもしくは自己抗原に特異的もしくは応答性がある免疫細胞を含むワクチン、アレルギーもしくは自己抗原に特異的もしくは応答性がある免疫細胞の寛容化断片（例えば、T細胞受容体、B細胞受容体、こ

50

これらの誘導体など)を含むワクチン、及び核酸、例えばDNAもしくはRNAを含み、アレルゲン、自己抗原、これらの寛容化エピトープ、ならびに抗原もしくは自己抗原に特異的及び/もしくは応答性のある免疫細胞の寛容化断片をコードするワクチン、を含むがこれらに限定しないアレルゲンまたは自己抗原に対する寛容を誘導しようとする治療薬を容易に認識するであろう。本明細書で使用する場合、アレルゲンまたは自己抗原の寛容化エピトープにはそれぞれ、アレルゲンまたは自己抗原の断片、融合タンパク質、ペプチドミメオ型、及び変化したペプチドが含まれ得るが、これらに限定しない。

#### 【0023】

抗原決定基としても公知の「エピトープ」は、例えば抗体、B細胞、またはT細胞によって特異的に免疫系によって認識される抗原、例えば、アレルゲン、自己抗原の一部である。エピトープはしばしば、有核細胞上に認められるMHCまたはHLA分子によって免疫細胞へ呈される。いくつかの実施形態において、エピトープ自体は抗原である。

10

#### 【0024】

一実施形態において、当該治療薬は、自己抗原に対する寛容を誘導しようとする。好ましい実施形態において、自己抗原は、ミエリタンパク質、アクアポリン4、及び血小板膜糖タンパク質IIb-IIa及びIb-IXからなる群から選択される。より好ましい実施形態において、当該自己抗原は、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、及びミエリン突起膠細胞タンパク質からなる群から選択されるミエリタンパク質である。好ましくは、自己抗原に対する寛容を誘導しようとする治療薬は、弱毒化したT細胞を含み、この中で、当該T細胞は、自己抗原特異的である。

20

#### 【0025】

一実施形態において、治療薬の所望の効果は、特定の抗原に対する免疫応答の活性化である。このような治療薬に、病原性抗原、腫瘍抗原、病原性抗原の断片、腫瘍抗原の断片、病原性抗原をコードする核酸、及び腫瘍抗原をコードする核酸が含まれることは当該技術分野において周知である。周知の腫瘍抗原に関する非限定例としては、サイトケラチン、特に癌腫についての抗原としてのサイトケラチン8、18及び19、上皮膜抗原(EMA)、ヒト胚性抗原(HEA-125)、ヒト乳脂肪小球、MBR1、MBR8、Ber-EP4、17-1A、C26及びT16、筋原性肉腫の抗原としての筋特異的デスミン及びアクチン、胎盤アルカリホスファターゼ、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ならびに絨毛性細胞腫瘍及び生殖細胞腫瘍の抗原としてのフェトプロテイン、前立腺癌腫の抗原としての前立腺特異的抗原、結腸腺癌の癌胎児抗原、黒色腫の抗原としてのHMB-45、ならびに神経内分泌及び神経外胚葉性腫瘍の抗原としてのクロモグラニンA及びシナプトフィジンが挙げられる。これらの実施形態において、治療薬の免疫寛容原性は、治療薬の効力と直接相関しておらず、代わりに、当該治療薬の免疫寛容原性がその効力と逆相関していることがあり得る。

30

#### 【0026】

(抗原提示細胞、免疫寛容原性マーカー、及び当該マーカーの測定)

本明細書に開示する場合、本明細書に開示する治療薬の免疫寛容原性の判定方法は概して、治療薬を抗原提示細胞と接触させること、及び抗原提示細胞による少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーの発現を測定することを含む。

40

#### 【0027】

先に論議したように、エピトープはしばしば、有核細胞全部に認められるMHC分子またはHLA分子によって免疫細胞へ提示される。換言すれば、有核細胞はすべて、クラスI分子を用いた抗原提示ができる。しかしながら、いくつかのエピトープは、マクロファージ、単球、B細胞、樹状細胞、及びこれらに由来する細胞株など、専門的な抗原提示免疫細胞において認められるMHC分子またはHLA分子によって免疫細胞へ提示される。好ましい実施形態において、本明細書に開示する方法は、専門的な抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカーの発現を測定することを含む。好ましい実施形態において、単球、マクロファージ、B細胞、またはこれらに由来する細胞株を含む抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカーの発現が測定される。より好ましくは、マクロファージ、単球、及び/ま

50

たはこれらに由来する細胞株、例えば、U937細胞株もしくはTHP-1細胞株、最も好ましくは、単球を含む抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカーの発現が測定される。

【0028】

二次性進行型多発性硬化症(SP-MS)に罹患している個体由来の抗原提示細胞(APC)の表現型を、再発寛解型多発性硬化症(RR-MS)に罹患している個体または健康対照と比較する研究は、自己免疫疾患に罹患している個体由来のAPCが炎症性応答へと偏向し、PD-L1発現の低下によって特色づけられ、炎症性仲介因子の分泌を高めることを示唆している(Karni Aら(2006) J. Immunol. 177(6): 4196~4202)。しかしながら、IFN-療法を用いた処置は、単球及びDCにおけるPD-L1発現を強く亢進し、DCをより免疫寛容原性/調節性にしており、二次培養の際に自家性CD4 T細胞活性化を誘導し損ねたことによって支持されている(Schreiner Bら(2004) J. Neuroimmunol. 155: 172~182)。総合すると、これらのデータは、SP-MS患者におけるPD-L1発現の誘導が、SP-MS患者における機能障害となる免疫寛容原性/調節性ネットワークを回復させるのを支援し得、新規の治療目的を明らかにし得る。本明細書で開示する場合、PD-L1発現は、TCENA(登録商標)への曝露の結果として、単球において強く誘導されており、抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカーの誘導が、生成物の効力及び作用機序の両方の示度として機能することができることを示唆している。

10

【0029】

したがって、一実施形態において、免疫寛容原性マーカーとしてのPD-1リガンド、例えば、PD-L1、PD-L2などの発現を測定する。一実施形態において、抗原提示細胞によるPD-L1の発現を測定する。他の実施形態において、PD-1リガンドの発現を、抗原提示細胞と治療薬の接触後72時間以内に測定する。好ましくは、抗原提示細胞によるPD-1リガンドの発現を、抗原提示細胞と治療薬の接触約24時間後に測定する。抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカーの発現を検出するための、当業者に公知の種々のアッセイフォーマットがある。例えば、Harlow及びLane, 抗体:実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照されたい。非限定例として、免疫寛容原性マーカータンパク質の検出は、当該タンパク質へ結合しかつ好ましくは(例えば、放射性標識、発光標識、蛍光標識、酵素などを用いて)検出可能に標識した抗体を用いて実施され得る。抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカータンパク質の発現は、周知の方法またはアッセイ、例えば、免疫沈降、ELISA、ウェスタンブロット分析、免疫組織化学、免疫蛍光、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイツイムノアッセイ、沈降反応、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、プロテインAアッセイ、免疫電気泳動法、蛍光標識細胞分取(FACS)分析、ラジオイムノアッセイ、ストリップ検査、臨床現場即時検査、及びこれらに類するものによって特異的抗体により結合した免疫寛容原性マーカーを検出することによって測定され得る。いくつかの実施形態において、自動検出アッセイを利用する。イムノアッセイの自動化方法には、これらの各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,885,530号、第4,981,785号、第6,159,750号、及び第5,358,691号に説明されている方法が含まれる。いくつかの実施形態において、結果の分析及び提示も自動化する。

20

30

40

【0030】

抗原提示細胞による細胞表面タンパク質、例えばPD-L1を含む免疫寛容原性マーカーの発現は、蛍光標識細胞分取によって測定され得る。あるいは、サイトカインを含む免疫寛容原性マーカーの発現は、周知のイムノアッセイ、好ましくはELISAを用いて測定され得る。

【0031】

感度を改善するために、複数のマーカーが所与の使用内でアッセイされ得る。特に、1つ以上の他の免疫寛容原性マーカーは、抗原提示細胞のマーカーと組み合わせてアッセイ

50

され得る。抗原提示細胞に対する細胞表面マーカーの例としては、MHCクラスI、MHCクラスII、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDCA-2、MARCO、DEC-205、マンノース受容体、ランゲリン、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN-受容体及びIL-2受容体、ICAM-1、Fc受容体または抗原提示細胞によって比較的特異的に発現する他の受容体が挙げられるが、これらに限定しない。樹状細胞についての細胞表面マーカーの例としては、MHCクラスI、MHCクラスII、CD1、CD2、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD29、CD31、CD40、CD43、CD44、CD45、CD54、CD56、CD57、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR、DC-ASPGR、CLEC-6、CD40、BDCA-2、MARCO、DEC-205、マンノース受容体、ランゲリン、DECTIN-1、B7-1、B7-2、IFN-受容体及びIL-2受容体、ICAM-1、Fc受容体または樹状細胞によって比較的特異的に発現する他の受容体が挙げられるが、これらに限定しない。単球/マクロファージについての細胞表面マーカーの例としては、CD14、CD32、CD68、CD115、CD83、p55、CD40及びCD86が挙げられるが、これらに限定しない。B細胞についての細胞表面マーカーの例としては、B220/CD45R、CD19、CD21、CD24、CD37、CD38、CD40、CD80、及びCD86が挙げられるが、これらに限定しない。

10

20

#### 【0032】

組み合わせアッセイは、同時にまたは連続して実施され得る。マーカーの選択は、最適な感度を結果的に生じる組み合わせを判断するために所定の実験に基づき得る。好ましい実施形態において、抗原提示細胞の細胞表面免疫寛容原性マーカー及び細胞表面マーカーを、蛍光標識細胞分取及び/またはフローサイトメトリー分析を用いて同時に測定する。より好ましくは、PD-L1及びCD86の細胞表面発現は、フローサイトメトリー分析によって同時に測定する。

#### 【0033】

好ましい実施形態において、検査試料（すなわち、治療薬と接触した抗原提示細胞）による少なくとも1つの免疫寛容原性マーカーの発現を測定する上で、検査抗原提示細胞による発現の検出されたレベルは概して、対応する及び適切な対照試料（すなわち、治療薬と接触していない、好ましくは検査抗原提示細胞と同種の抗原提示細胞）による発現の検出されたレベルと比較され得る。好ましい実施形態において、対照抗原提示細胞と比較した、検査抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカーの発現レベルにおける及び/または免疫寛容原性マーカーを発現する検査抗原提示細胞数における相対的な増大は、治療薬の免疫寛容原性及び/または効力と直接関連している。

30

#### 【0034】

検査試料抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカーの発現レベル及び/または免疫寛容原性マーカーを発現する検査抗原提示細胞の割合は、対照試料の倍数増加の点で測定され得、例えば、検出可能な発現レベル及び/または免疫寛容原性マーカーを発現する細胞の割合の3倍増加は、3の免疫寛容原性レベルとみなし得、検出可能な発現レベルの5倍増加及び/または免疫寛容原性マーカーを発現する細胞の割合は、5の免疫寛容原性レベルとみなし得、対照を上回る10倍増加は、10の免疫寛容原性レベルとみなし得、対照を上回る100倍増加は、100の免疫寛容原性レベルとみなし得るなどである。一実施形態において、治療薬の免疫寛容原性レベルが少なくとも約3、例えば少なくとも約5、例えば少なくとも約10、例えば少なくとも約20、例えば少なくとも約100である場合、当該治療薬は免疫寛容原性であると判定する。

40

#### 【0035】

治療薬の免疫寛容原性を判定するためのキットも本明細書に説明する。このようなキッ

50

トは典型的には、効力アッセイを実施するのに必要な2つ以上の構成要素を含む。構成要素は、化合物、試薬、容器、説明書及び/または用具であり得る。例えば、キット内の1つの容器は、免疫寛容原性マーカーに特異的な抗体、及び抗原提示細胞マーカーに特異的な抗体を含有し得る。このようなキットは、抗体結合の直接的または間接的な検出に適したリポーター基を含有する先に説明した検出試薬も含有し得る。

#### 【0036】

したがって、抗原提示細胞による免疫寛容原性マーカーの発現レベルを測定するためのキットが本明細書に説明され、当該キットは、治療薬の免疫寛容原性及び/または効力を判定するのに適した結果を提供するのに有用である。キットは、例えば放射性標識、発光標識、蛍光標識、酵素などを用いて任意に検出可能に標識され得る免疫寛容原性マーカーに対する抗体を含み得る。タンパク質の検出可能な標識方法は当該技術分野で周知である。このようなキットにはさらに、抗原提示細胞のマーカーに特異的な検出試薬を含み得る。特定の治療薬の脈絡でこのような免疫寛容原性マーカーのレベルを定量化及び/または評価するための適切な比較標準を含む、評価目的のためにキットを使用するための説明書はまた、印刷形態で有利に提供され得及び/または適切な媒体に記録され得る。

10

#### 【実施例】

#### 【0037】

(実施例1：抗原提示細胞の源としてのPBMC)

(実施例1.1：材料及び方法)

効力アッセイにおいて使用するレスポンダー細胞は、ficoll分離したPBMCの凍結ストックから得た。PBMCを解凍し、洗浄し、培地中に再懸濁した後に、TCELNA(登録商標)製品へ曝露した。

20

#### 【0038】

TCELNA(登録商標)製品は、液体窒素保管庫から取り出し、水浴中で37で解凍した。試料を照射し、効力アッセイのための製剤化に際して即時使用した。レスポンダーPBMC( $1 \times 10^6$ )をポリプロピレンチューブ中で3日間、単独またはTCELNA(登録商標)( $1 \times 10^6$ )との組み合わせのいずれかで培養した。培養1または3日後、CD14+CD19-CD3-単球によるPD-L1、CD95、PD1、CD86、LAG-3、IL-6、IL-4、IL-10、IL-23、IL-1b、IL-27、IL-21及び/またはIL-22の発現を、フローサイトメトリーによって適宜モニターした。アイソタイプの合致したmAbを使用して、PD-L1染色の特異性を確認した(データ非掲載)。

30

#### 【0039】

(実施例1.2：結果)

単球系効力アッセイは、TCELNA(登録商標)がPD-L1発現の誘導によって示されるレスポンダー単球に関して免疫寛容原性/調節性表現型を与えることを実証している。単球の表現型の生産性調節は結果的に、TCELNA(登録商標)製品への曝露の結果として、単球の90%超のPD-L1発現を生じる。示すデータにおいて、単球は、CD14発現に基づいて識別される。TCELNA(登録商標)の非存在下で、(PBMCを単独培養した)単球は、PD-L1陽性画分において15%以下の細胞しか実証していないようにPD-L1を発現し損ねている(図1A及び図2)。比較すると、TCELNA(登録商標)製品を用いたPBMCの培養は結果的に、PD-L1を発現する単球の少なくとも60%を生じ(図1B及び図2)、免疫寛容原性/調節性表現型の強力な誘導を示唆している。図2は、5個の独立した患者製剤へ曝露した後の単球におけるPD-L1の誘導を実証している。図3は、5個の異なるTCELNA(登録商標)製品を用いたインキュベーション後の単球による平均蛍光強度の倍数増加を示す。総合すると、本データは、インビトロでTCELNA(登録商標)製品へ曝露された単球が、インビボでの製品の作用機序も示し得る調節性マーカーPD-L1の発現の基本的な変化を受けることを示唆している。

40

#### 【0040】

50

アロジェニックな抗原提示細胞を検査する上で、製剤化及び照射されたTCELLNA（登録商標）製品をアロジェニックなレスポンダーPBMC集団と1：1の比で組み合わせた。24時間及び72時間後、培養物を収穫し、レスポンダー細胞集団におけるPD-L1の発現についてフローサイトメトリーを用いて評価した。図4は、レスポンダーのみの条件及びレスポンダー+TCELLNA（登録商標）（+Tc）条件の両方の%PD-L1発現を示す。対形成した独立の試料についてのウィルコクソン順位和検定は、24時間及び72時間の両方で単球におけるPD-L1の発現の有意な上方制御を実証した（それぞれ、 $p < 0.004$ 及び $p < 0.00002$ ）ので、それぞれ図4A及び図4Bを参照されたい。B細胞及びT細胞におけるPD-L1の発現に関する類似の分析もB細胞集団における72時間の培養でPD-L1の発現の有意な誘導を示している（ $p < 0.003$ ）が、いずれの時点においてもT細胞によるPD-L1の誘導はない。

10

**【0041】**

単球によるPD-L1、CD95、PD1、CD86、LAG-3の細胞表面発現及びIL-6、IL-4、IL-10、IL-23、IL-1b、IL-27、IL-21及びIL-22のサイトカイン発現を、照射したTCELLNA（登録商標）製品を用いたインキュベーションの約24時間後に分析した。検査したマーカーのうち、PD-L1発現のみが、単球によって有意に上昇した。TCELLNA（登録商標）製品の非存在下で24時間インキュベートした1%未満の単球は、PD-L1を発現した。対照的に、平均97.8%の単球は、TCELLNA（登録商標）製品とともにインキュベートした24時間後にPD-L1を発現した（ $n = 4$ ）。

20

**【0042】**

（実施例2：抗原提示細胞の源としての細胞株）

製剤化及び照射されたTCELLNA（登録商標）製品由来の細胞を、U937またはTHP-1細胞と1：1の比で組み合わせる。24時間後及び72時間後、培養物を収穫し、フローサイトメトリーを用いてU937またはTHP-1細胞におけるPD-L1発現について評価する。U937またはTHP-1細胞によるPD-L1の発現は、TCELLNA（登録商標）製品を用いたインキュベーション後に上昇するであろうと期待される。

**【0043】**

本明細書に引用する特許及び特許公開はすべて、参照により本明細書により組み込まれる。

30

**【0044】**

ある一定の改変及び改善は、先の説明の読み取りの際に当業者に生じるであろう。このようなすべての改変及び改善は、本明細書において簡潔さ及び読みやすさの目的のために欠失しているが、以下の特許請求の範囲内に適切にある。



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/012776
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHREINER B ET AL: "Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis", JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 155, no. 1-2, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 172-182, XP004549423, ISSN: 0165-5728, DOI: 10.1016/J.JNEUROIM.2004.06.013 abstract; figures 1,2 page 173, paragraph 2.1 page 175, paragraph 2.3 ----- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "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
21 April 2015		30/04/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Celler, Jakub

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/012776
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/184976 A2 (UNIV NORTHWESTERN [US]; MYELIN REPAIR FOUNDATION INC [US]; MILLER STEP) 12 December 2013 (2013-12-12) abstract page 15, paragraph 42 -----	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2015/012776

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013184976	A2	NONE	12-12-2013
-----			

## フロントページの続き

(81)指定国 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, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ドン ヒーリー

アメリカ合衆国, テキサス 77830, アンダーソン, カウンティ ロード 188 1730

(72)発明者 ローレン ウェスト コリソン

アメリカ合衆国, テキサス 78382, ザ ウッドランズ, プレイヤー オークス プレイス  
2

专利名称(译)	治疗剂的功效测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017506332A</a>	公开(公告)日	2017-03-02
申请号	JP2016548091	申请日	2015-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	オペクサセラピューティクスインコーポレイティド		
申请(专利权)人(译)	Opekusa治疗, Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ドンヒーリー ローレンウエストコリソン		
发明人	ドン ヒーリー ローレン ウエスト コリソン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/505 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/5047 G01N33/5052 G01N2333/70596 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.597		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 池田 达则		
优先权	61/931470 2014-01-24 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

治疗剂的致耐受性，包括确定治疗剂通过抗原呈递细胞（例如单核细胞，巨噬细胞，B细胞和树突状细胞）增加免疫耐受标记物（例如PD-L1）表达的能力 本文提供确定容量的方法。 [选择图]图1A和1B

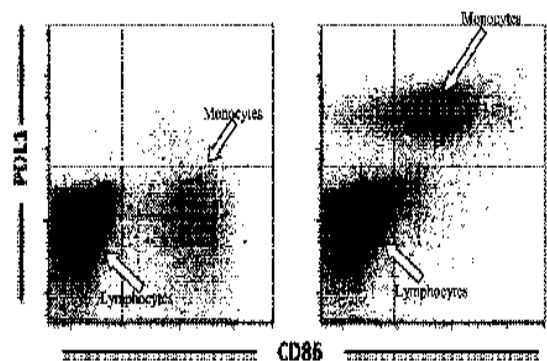


FIG. 1A

FIG. 1B