

(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2018-500276
(P2018-500276A)

(43) 公表日 平成30年1月11日(2018.1.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 B O 6 3
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C O 8 4
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 C O 8 7
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 122 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-518533 (P2017-518533)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月7日 (2015. 10. 7)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月29日 (2017. 5. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/054466
 (87) 国際公開番号 W02016/057651
 (87) 国際公開日 平成28年4月14日 (2016. 4. 14)
 (31) 優先権主張番号 62/061, 952
 (32) 優先日 平成26年10月9日 (2014. 10. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

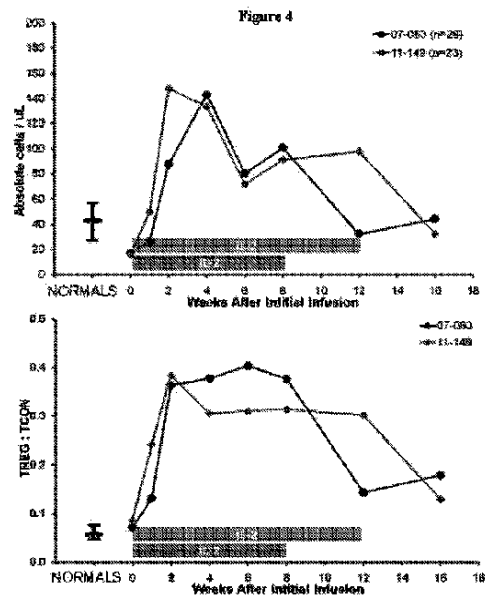
(71) 出願人 399052796
 ダイナ ファーバー キャンサー インス
 ティチュート, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 2 1 5, ポストン, ブルックライン ア
 ベニュー 4 5 0
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫障害を処置するための複数の可変 I L - 2 用量レジメン

(57) 【要約】

本発明は、免疫障害を同定し、評価し、防止し、処置するために、複数の可変 I L - 2 用量を使用する方法の同定に部分的に基づく。一局面では、上記方法は、a) 対象の血漿 I L - 2 レベルを上昇させ、上記対象における、調節性 T リンパ球 (T r e g) の、従来型 T リンパ球 (T c o n) に対する比 (T r e g : T c o n) を増大させる用量で、上記対象に、インターロイキン 2 (I L - 2) を持続的に投与することを含む誘導レジメンを、上記対象に施行するステップと； b) その後、上記誘導レジメンの用量より高量であり、 i) 上記対象の血漿 I L - 2 レベルを、さらに上昇させ、 i i) T r e g の、 T c o n に対する上記比を、さらに増大させる、 I L - 2 の維持用量を、上記対象に持続的に投与することを含む少なくとも 1 つの維持レジメンを、上記対象に施行し、これにより上記対象を処置するステップとを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫障害に罹患した対象を処置する、複数の可変 I L - 2 用量による方法であって、

a) 前記対象の血漿 I L - 2 レベルを上昇させ、前記対象における、調節性 T リンパ球 (T r e g) の、従来型 T リンパ球 (T c o n) に対する比 (T r e g : T c o n) を増大させる用量で、前記対象に、インターロイキン 2 (I L - 2) を持続的に投与することを含む誘導レジメンを、前記対象に施行するステップと；

b) その後、前記誘導レジメンの用量より高量であり、i) 前記対象の血漿 I L - 2 レベルを、さらに上昇させ、i i) T r e g の、T c o n に対する前記比を、さらに増大させる、I L - 2 の維持用量を、前記対象に持続的に投与することを含む少なくとも 1 つの維持レジメンを、前記対象に施行し、これにより前記対象を処置するステップとを含む、方法。

10

【請求項 2】

前記 I L - 2 維持レジメンが、前記対象の血漿 I L - 2 レベルを、前記誘導レジメンにより誘導されたピーク血漿 I L - 2 レベルを超えて上昇させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記血漿 I L - 2 レベルを、I L - 2 の投与後 1 回または複数回、I L - 2 のタンパク質レベル、I L - 2 のタンパク質活性、I L - 2 の核酸レベル、T r e g の増殖、T r e g の活性、T r e g のリン酸化 S T A T 5 レベル、T r e g の F O X P 3 レベル、および T r e g のアポトーシスを解析することにより決定する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記誘導レジメンの用量が、約 0.3×10^6 I U / m² / 日 ~ 約 3.0×10^6 I U / m² / 日である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記誘導レジメンの用量が、約 6.0×10^6 I U / m² / 日未満である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記誘導レジメンの前記持続的投与が、1 日 1 回の投与を含み、患者が、臨床的利益を享受し続ける限りにおいて、無期限に持続される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記誘導レジメンの前記持続的投与が、連続する少なくとも 1 ~ 14 日間中に、1 日 1 回の投与を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記維持レジメンにおける T r e g : T c o n を、前記誘導レジメン中の最大の T r e g : T c o n から少なくとも 20 % 増大させる、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記維持レジメンの用量が、前記誘導レジメンの用量より少なくとも約 20 % 高量である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記維持レジメンの用量が、約 0.3×10^6 I U / m² / 日 ~ 約 3.0×10^6 I U / m² / 日である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記維持レジメンの用量が、約 6.0×10^6 I U / m² / 日未満である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記患者が、臨床的利益を享受し続ける限りにおいて、前記維持レジメンの前記持続的投与が、無期限の投与を含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

50

- 【請求項 13】
前記維持レジメンの前記持続的投与が、連続する少なくとも1～42日間に、1日1回の投与を含む、請求項12に記載の方法。
- 【請求項 14】
前記IL-2を、薬学的に許容される製剤により投与する、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 15】
前記IL-2を、皮下、静脈内、腹腔内、および筋内からなる群より選択される投与経路により投与する、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 16】 10
前記IL-2を、皮下投与する、請求項15に記載の方法。
- 【請求項 17】
前記免疫障害が、移植片対宿主病(GVHD)、固形臓器の移植拒絶、血管炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、1型糖尿病(T1D)、多発性硬化症(MS)、乾癬、関節リウマチ(RA)、炎症性腸疾患(IBD)、およびアレルギー性喘息からなる群より選択される、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 18】
前記免疫障害が、cGVHDである、請求項17に記載の方法。
- 【請求項 19】 20
前記対象の、全身ステロイドに対する応答が、不十分であった、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 20】
前記対象が、ステロイドを含む、少なくとも2回の以前の全身療法にも拘らず、遷延性または再発性の慢性GVHDを有する、請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 21】
前記対象が、IL-2投与の前に、体外フォトフェレーシス(ECP)を受けていた、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 22】 30
前記誘導レジメンおよび/または前記維持レジメンが、前記免疫障害を処置する、1または複数のさらなる治療の施行をさらに含む、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 23】
前記1または複数のさらなる治療が、ECPおよびTregからなる群より選択される、請求項22に記載の方法。
- 【請求項 24】
前記Tregを、Treg以外のT細胞を含む組成物として投与する、請求項23に記載の方法。
- 【請求項 25】 40
前記組成物が、少なくとも1:2のTreg:Tcon比を有する、請求項24に記載の方法。
- 【請求項 26】
前記組成物を、T細胞を含む生体材料に対する、CD8+およびCD19+の共枯渇ならびにCD25+の陽性選択から得る、請求項23から25のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 27】 50
前記Tregを、体重約1kg当たりの細胞 0.1×10^6 個～体重1kg当たりの細胞 1.0×10^6 個の間で投与する、請求項23から26のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 28】
前記対象自身のTregを、前記対象に投与する、請求項23から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

造血幹細胞移植片を得た、同じ造血幹細胞ドナーに由来する T r e g を使用する、請求項 23 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記 T r e g 組成物が、70%超の総細胞生存率、陰性グラム染色、90%以上の C D 4 + C D 2 5 + 細胞、かつ/または50%以上の F o x P 3 + 細胞を有する、請求項 23 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記 T r e g を、注入として投与する、請求項 23 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 32】

前記 T r e g を、I L - 2 の投与前に、I L - 2 の投与と共時的に、または I L - 2 の投与後に投与する、請求項 23 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記 T r e g を、I L - 2 の投与前に投与する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記対象が、哺乳動物である、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記哺乳動物が、免疫障害の動物モデルである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 34 に記載の方法。

20

【請求項 37】

毎日の固定 I L - 2 用量による処置法からの利益に従い、免疫障害に罹患した対象を層別化する方法であって、前記方法は、Tリンパ球を含む生体試料を、対象から得るステップと、前記対象試料中の、調節性Tリンパ球 (T r e g) の、従来型Tリンパ球 (T c o n) に対する比 (T r e g : T c o n) を決定するステップとを含み、ここで約 0 . 0 7 を超えるかまたはそれと等しい T r e g : T c o n 比は、前記対象が、前記毎日の固定 I L - 2 用量による処置法から利益を得ることを示し、そして約 0 . 0 7 未満の T r e g : T c o n 比は、前記対象が、前記毎日の固定 I L - 2 用量による処置法から利益を得ないことを示す、方法。

30

【請求項 38】

毎日の固定 I L - 2 用量による処置法からの利益に従い、免疫障害に罹患した対象を層別化する方法であって、前記方法は、誘導レジメンの後で、Tリンパ球を含む生体試料を、対象から得るステップと、前記対象試料中の、調節性Tリンパ球 (T r e g) の、従来型Tリンパ球 (T c o n) に対する比 (T r e g : T c o n) を決定するステップとを含み、ここで約 0 . 2 0 を超えるかまたはそれと等しい T r e g : T c o n 比は、前記対象が、前記毎日の固定 I L - 2 用量による処置法から利益を得ることを示し、そして約 0 . 2 0 未満の T r e g : T c o n 比は、前記対象が、前記毎日の固定 I L - 2 用量による処置法から利益を得ないことを示す、方法。

【請求項 39】

前記免疫障害が、前記毎日の固定 I L - 2 用量による処置法から利益を得ると決定される場合に、毎日の固定 I L - 2 用量による処置法または請求項 1 から 23 のいずれか一項に記載の処置法を、推奨するか、処方するか、または施行するステップをさらに含む、請求項 37 または 38 に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記免疫障害が、毎日の固定 I L - 2 用量による処置法から利益を得ないと決定される場合に、毎日の固定 I L - 2 用量による処置法以外の抗免疫障害療法を、推奨するか、処方するか、または施行するステップをさらに含む、請求項 37 または 38 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

50

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2014年10月9日に出願された米国仮出願第62/061,952号の利益を主張する；上記出願の全体の内容は、この参照によってその全体が本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

調節性T細胞(Treg)は、免疫寛容に必要であり、適応および先天免疫エフェクター細胞の主要な抑制因子として機能する。Tregベースの治療薬は、固形臓器の移植拒絶および移植片対宿主病(GVHD)などの免疫障害において認められ、また、Tregの機能不全に関連付けられることが多くなってきている、末梢における寛容が損なわれる他の障害(例えば、血管炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、1型糖尿病(T1D)、多発性硬化症(MS)、乾癬、関節リウマチ(RA)、炎症性腸疾患(IBD)、およびアレルギー性喘息を含む全身性自己免疫疾患)(Saadounら(2011年)、N. Engl. J. Med.、365巻：2067~2077頁；Hartemanら(2013年)、Lancet、Diabetes Endocrinol.、1巻：295~305頁；Humrichら(2014年)、Ann. Rheum. Dis.、73巻：A46頁；Lambrechtら(2013年)、Eur. J. Immunol.、43巻：3125~3137頁)においても認められる不適応性の免疫活性化を制御するホメオスタシス機構を提供する。しかし、ex vivoにおいて拡大されたTregの注入に基づく処置法は、実装が困難であり、長期にわたる炎症の制御のために、養子移入された細胞の機能を維持することの必要性に対処していない(Brunsteinら(2011年)、Blood、117巻：1061~1070頁)。さらに、低用量のIL-2は、Tregを増強しうるが、cGVHD患者の半数は、臨床的利益を得ていない(Korethら(2011年)、N. Engl. J. Med.、365巻：2055~2066頁)。したがって、当技術分野には、Tregの能力を改良して、望ましくない免疫反応を改善するための組成物および方法に対する大きな必要性が存在する。特に、とりわけ、多年にわたり、硬化性皮膚、関節拘縮、または肺線維症など、cGVHDの消耗性の帰結を伴って生活する小児のために、cGVHD治療の進展が、火急に必要なとされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Brunsteinら、Blood(2011年)117巻：1061~1070頁

【非特許文献2】Korethら、N. Engl. J. Med. (2011年)365巻：2055~2066頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、少なくとも部分的に、GVHD(例えば、活動性の慢性GVHD)などの免疫障害を処置するために、複数の可変用量のIL-2により、in vivoにおけるTregの数および活性を有意に増加させようという発見に基づく。ECPおよび/またはTregの投与など、1または複数のさらなる抗免疫障害療法と組み合わせて、このような処置の効果をさらに増大させる。

【0005】

一態様では、免疫障害に罹患した対象を処置する、複数の可変IL-2用量による方法であって、a)対象の血漿IL-2レベルを上昇させ、対象における、調節性Tリンパ球(Treg)の、従来型Tリンパ球(Tcon)に対する比(Treg:Tcon)を増大させる用量で、インターロイキン2(IL-2)を、対象に持続的に投与することを含

む誘導レジメンを、対象に施行するステップと； b) その後、誘導レジメンの用量より高量であり、 i) 対象の血漿 I L - 2 レベルを、さらに上昇させ、 i i) T r e g の、 T c o n に対する比を、さらに増大させる、 I L - 2 の維持用量を、対象に持続的に投与することを含む少なくとも 1 つの維持レジメンを、対象に施行し、これにより対象を処置するステップとを含む方法が提供される。

【 0 0 0 6 】

ある特定の実施形態は、本明細書に記載される任意の方法に適用可能である。例えば、一実施形態では、 I L - 2 維持レジメンは、対象の血漿 I L - 2 レベルを、誘導レジメンにより誘導されたピーク血漿 I L - 2 レベルを超えて上昇させる。別の実施形態では、血漿 I L - 2 レベルを、 I L - 2 の投与後 1 回または複数回、 I L - 2 のタンパク質レベル、 I L - 2 のタンパク質活性、 I L - 2 の核酸レベル、 T r e g の増殖、 T r e g の活性、 T r e g のリン酸化 S T A T 5 レベル、 T r e g の F O X P 3 レベル、および T r e g のアポトーシスを解析することにより決定する。さらに別の実施形態では、誘導レジメンの用量は、約 0.3×10^6 I U / m² / 日 ~ 約 3.0×10^6 I U / m² / 日である。さらに別の実施形態では、誘導レジメンの用量は、約 6.0×10^6 I U / m² / 日未満である。別の実施形態では、誘導レジメンの持続的投与は、 1 日 1 回の投与を含み、患者が、臨床的利益を享受し続ける限りにおいて、無期限に持続される。さらに別の実施形態では、誘導レジメンの持続的投与は、連続する少なくとも 1 ~ 1 4 日間中に、 1 日 1 回の投与を含む。さらに別の実施形態では、維持レジメンにおける T r e g : T c o n 比を、誘導レジメン中の最大の T r e g : T c o n から少なくとも 2 0 % 増大させる。別の実施形態では、維持レジメンの用量は、誘導レジメンの用量より少なくとも約 2 0 % 高量である。さらに別の実施形態では、維持レジメンの用量は、約 0.3×10^6 I U / m² / 日 ~ 約 3.0×10^6 I U / m² / 日である。さらに別の実施形態では、維持レジメンの用量は、約 6.0×10^6 I U / m² / 日未満である。別の実施形態では、患者が、臨床的利益を享受し続ける限りにおいて、維持レジメンの持続的投与は、無期限の投与を含む。さらに別の実施形態では、維持レジメンの持続的投与は、連続する少なくとも 1 ~ 4 2 日間中に、 1 日 1 回の投与を含む。

【 0 0 0 7 】

さらに別の実施形態では、 I L - 2 を、薬学的に許容される製剤により投与する。別の実施形態では、 I L - 2 を、皮下、静脈内、腹腔内、および筋肉からなる群より選択される投与経路により投与する。さらに別の実施形態では、 I L - 2 を、皮下投与する。さらに別の実施形態では、免疫障害は、移植片対宿主病 (G V H D)、固形臓器の移植拒絶、血管炎、全身性エリテマトーデス (S L E)、 1 型糖尿病 (T 1 D)、多発性硬化症 (M S)、乾癬、関節リウマチ (R A)、炎症性腸疾患 (I B D)、およびアレルギー性喘息からなる群より選択される。別の実施形態では、免疫障害は、 c G V H D である。さらに別の実施形態では、対象の、全身ステロイドに対する応答は、不十分である。さらに別の実施形態では、対象は、ステロイドを含む、少なくとも 2 回の以前の全身療法にも拘らず、遷延性または再発性の慢性 G V H D を有する。別の実施形態では、対象は、 I L - 2 投与の前に、体外フォトフェレーシス (E C P) を受けている。さらに別の実施形態では、誘導レジメンおよび / または維持レジメンは、免疫障害を処置する、 1 または複数のさらなる治療の施行をさらに含む。さらに別の実施形態では、 1 または複数のさらなる治療は、 E C P および T r e g からなる群より選択される。別の実施形態では、 T r e g を、 T r e g 以外の T 細胞を含む組成物として投与する。さらに別の実施形態では、組成物は、少なくとも 1 : 2 の T r e g : T c o n 比を有する。さらに別の実施形態では、組成物を、 T 細胞を含む生体材料に対する、 C D 8 + および C D 1 9 + の共枯渇ならびに C D 2 5 + の陽性選択から得る。別の実施形態では、 T r e g を、体重約 1 k g 当たりの細胞約 0.1×10^6 個 ~ 体重 1 k g 当たりの細胞 1.0×10^6 個の間で投与する。さらに別の実施形態では、対象自身の T r e g を、対象に投与する。さらに別の実施形態では、造血幹細胞移植片を得た、同じ造血幹細胞ドナーに由来する T r e g を使用する。別の実施形態では、 T r e g 組成物は、 7 0 % 超の総細胞生存率、陰性グラム染色、 9 0 % 以上の C

10

20

30

40

50

D4 + CD25 + 細胞かつ/または50%以上のFoxP3 + 細胞を有する。さらに別の実施形態では、Tregを、注入として投与する。さらに別の実施形態では、Tregを、IL-2の投与前に、IL-2の投与と共時的に(concurrently)、またはIL-2の投与後に投与する。別の実施形態では、Tregを、IL-2の投与前に投与する。さらに別の実施形態では、対象は、ヒトまたは免疫障害の動物モデルなどの哺乳動物である。

【0008】

別の態様では、毎日の固定IL-2用量による処置法からの利益に従い、免疫障害に罹患した対象を層別化する方法であって、Tリンパ球を含む生体試料を、対象から得るステップと、対象試料中の、調節性Tリンパ球(Treg)の、従来型Tリンパ球(Tcon)に対する比(Treg:Tcon)を決定するステップとを含み、約0.07を超えるかまたはそれと等しいTreg:Tcon比は、対象が、毎日の固定IL-2用量による処置法から利益を得ることを示し、約0.07未満のTreg:Tcon比は、対象が、毎日の固定IL-2用量による処置法から利益を得ないことを示す、方法が提供される。一実施形態では、方法は、免疫障害が、毎日の固定IL-2用量による処置法から利益を得ると決定される場合に、毎日の固定IL-2用量による方法または本明細書に記載される処置法を、推奨するか、処方するか、または施行するステップをさらに含む。別の実施形態では、方法は、免疫障害が、毎日の固定IL-2用量による処置法から利益を得ないと決定される場合に、毎日の固定IL-2用量による処置法以外の抗免疫障害療法を、推奨するか、処方するか、または施行するステップをさらに含む。

10

20

【0009】

さらに別の態様では、毎日の固定IL-2用量による処置法からの利益に従い、免疫障害に罹患した対象を層別化する方法であって、誘導レジメンの後で、Tリンパ球を含む生体試料を、対象から得るステップと、対象試料中の、調節性Tリンパ球(Treg)の、従来型Tリンパ球(Tcon)に対する比(Treg:Tcon)を決定するステップとを含み、約0.20を超えるかまたはそれと等しいTreg:Tcon比は、対象が、毎日の固定IL-2用量による処置法から利益を得ることを示し、約0.20未満のTreg:Tcon比は、対象が、毎日の固定IL-2用量による処置法から利益を得ないことを示す、方法が提供される。一実施形態では、方法は、免疫障害が、毎日の固定IL-2用量による処置法から利益を得ると決定される場合に、毎日の固定IL-2用量による方法または本明細書に記載される処置法を、推奨するか、処方するか、または施行するステップをさらに含む。別の実施形態では、方法は、免疫障害が、毎日の固定IL-2用量による処置法から利益を得ないと決定される場合に、毎日の固定IL-2用量による処置法以外の抗免疫障害療法を、推奨するか、処方するか、または施行するステップをさらに含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1、毎日の低用量のIL-2による処置の間の、CD4 + Tregの、in vivoの拡大。CD3 + CD4 + Tにゲートをかけた細胞選別解析の結果が示される。Tregは、CD25 + CD127 - として定義され、Tconは、CD25 - CD127 + である。CD4ゲート内のTregの%を、各プロット内に示す。図1は、用量レベルBにおける代表的な患者を示す。

40

【0011】

【図2】図2は、IL-2療法における、Treg:Tcon比の中央値を示す。IL-2の開始から数週間以内に、急速な上昇およびプラトーの持続が見られ、8週でIL-2を停止させた後で低下が見られた。中央値を四分位数間範囲と共に示す。

【0012】

【図3】図3は、Tregの絶対数が増大すると、IL-2レベルが下降することを示す。左パネルは、IL-2処置の間の、Treg細胞カウントおよびIL-2レベルを示す。8週間のIL-2処置レジメン中の、pg/μL単位の血漿IL-2レベル(三角)と

50

対比した、 $1\mu\text{L}$ 当たりのTregカウント(ボックス)を示す。右パネルは、IL-2受容体(CD25; IL-2R)の細胞表面発現を示す。低用量IL-2の間、Treg(上側の線)については、IL-2R発現の増大の持続が認められたが、Tcon(下側の線)については認められなかった。

【0013】

【図4】図4は、フェーズ1研究における、IL-2に媒介されるTreg効果を、フェーズ2研究と対比した結果を示す。左パネルは、フェーズ1試験における $1\mu\text{L}$ 当たりの $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^-$ Tregカウント(丸)を、フェーズ2試験(ダイヤモンド)と対比して示す。右パネルは、フェーズ1(丸)試験のTreg:Tcon比を、フェーズ2試験(ダイヤモンド)と対比して示す。バーは、フェーズ1(8週間、下方バー)におけるIL-2処置の持続期間を、フェーズ2(12週間、上方バー)と対比して示す。

10

【0014】

【図5】図5は、CyTOFを使用する、FoxP3発現についての、TregサブセットのSPADE解析の結果を示す。12週間の低用量IL-2研究時の代表的な患者において、RTE/ナイーブおよびメモリーTreg集団を、SPADE樹形図内で個別にクラスター化し、活性化Treg部分集団を、各群内でさらに描出する。バブルサイズは、細胞数を反映し、FoxP3発現レベル強度を示す。左上パネルでは、IL-2前のベースラインにおいて、メモリーTreg集団によるFoxP3発現は大きかった。右上パネルでは、1週間で、IL-2は、全てのTregサブセット内で、FoxP3を誘導した。左下パネルでは、12週間のIL-2で、メモリーTregによるFoxP3発現は大きかった。右下パネルでは、IL-2の中断後において、Treg集団は大幅に枯渇し、メモリーTregサブセット内で残存するFoxP3発現は限定的であった。

20

【0015】

【図6】図6は、低用量IL-2による、TregおよびTconのレパトリーの多様性についての、T細胞受容体(TCR)配列解析の結果を示す。Tregエントロピー(E)は、8週間のIL-2後の、cGVHD患者において、Tconエントロピーの変化を伴わずに増大した。Tconを、上パネルに示し、Tregを、下パネルに示す。エントロピー(E)を、各パネルについて示す。Y軸スケールの増大(1K-5K)にも拘らず、右下パネルでは、左パネルと対比して、さらなる産生性のTregTCR配列が明らかとなった。

30

【0016】

【図7】図7は、Treg:Tcon比を使用する、IL-2療法に対する応答の予測因子を示す。ベースラインおよび1週目における、臨床レスポナー(PR)についてのTreg:Tcon比を、非レスポナー(SD/MR/PD)と対比して示す。全てのデータは、固定用量によるIL-2投与に由来する。

【0017】

【図8】図8は、 $\text{CD4}^+\text{DLI} \pm \text{IL-2}$ 後における、FOX P3発現の結果を示す。 $\text{CD4}^+\text{DLI}$ (下側の線)、低用量IL-2(中ほどの線)、または $\text{CD4}^+\text{DLI} + \text{低用量IL-2}$ (上側の線)を施された患者に由来するPBMC中のリアルタイムPCRにより評価されたFOX P3発現(出典:Zornら(2009年)、*Biol. Blood Marrow Transplant.*、15巻:382~388頁)。

40

【発明を実施するための形態】

【0018】

血漿IL-2レベルは、固定用量によるIL-2療法中に、急速に(例えば、1週目までに)上昇し、次いで、Tregカウントが上昇する間、毎日のIL-2投与にも拘らず低下する(Matsuokaら(2013年)、*Sci. Transl. Med.*、5巻:179ra43)ことが決定されており、この結果は、Treg上で構成的に発現する、高アフィニティーのIL-2受容体(CD25)への結合を介するIL-2隔離の増大に起因すると考えられる。その後、IL-2療法中において、Tregの絶対数が増

50

大するにつれ、Treg上のCD25発現のさらなる増大が見られる(Matsuoから(2013年)、Sci. Transl. Med.、5巻:179ra43)。本明細書では、ピークTreg増殖は、IL-2誘導レジメン開始の1週間後までに、全てのTregサブセット内で、Treg集団サイズの増大と共に生じることが決定されている。しかし、IL-2処置の12週目に、拡大されたTreg部分集団が保存される一方で、Tregの増殖は、2週目の後で、Ki-67発現(増殖)の降下と共に低下する。pSTAT5およびFoxP3マーカーを使用して、Treg活性化の同様の時間的パターンであって、初期においてまず、Treg部分集団にわたり、概して増強され、その後、IL-2処置の間に、増強されたTreg集団サイズの持続的な保存にも拘らず低下するパターンが観察される。次いで、IL-2の中断の4週間後までに、Treg活性化マーカー発現の降下およびTreg集団のかなりの枯渇が観察された。したがって、誘導レジメンによるピーク血漿IL-2レベルの後など、個々の患者におけるIL-2用量の漸増を伴う維持レジメンは、血漿IL-2レベルを回復させ、Tconの活性化も過剰な有害事象も誘導することなく、Tregの増殖、活性化、および新生をさらに増進する。このようにして、IL-2により誘導されるTregの増強がin vivoにおいて生じ、数が増大した、CD25発現が高い循環Tregに結合後の血漿IL-2レベルの減退に起因するタキフィラキシーを回避する。したがって、本発明の方法は、IL-2を使用する、免疫障害の処置の予測外の増強を提供し、TregおよびTconを、このような免疫障害の処置におけるIL-2の有効性についてのバイオマーカーとして、直接的にまたは間接的に使用することを可能とする。

10

20

【0019】

I. 定義

本明細書では、冠詞「1つの(a)」および「1つの(an)」を使用して、冠詞の文法的目的語のうちの一つまたは一つを超える(すなわち、少なくとも一つ)を指す。例を目的として述べると、「要素」とは、1つの要素または一つを超える要素を意味する。

【0020】

「変更された量」または「変更されたレベル」という用語は、バイオマーカー核酸の増大または減少されたコピー数(例えば、生殖細胞系列および/または体細胞の)、例えば、対照試料中のバイオマーカー核酸の発現レベルまたはコピー数と比較した生体試料中の増大または減少された発現レベルを指す。バイオマーカーの「変更された量」という用語はまた、正常な対照試料中の対応するタンパク質レベルと比較した、試料、例えば、免疫障害試料中の、バイオマーカータンパク質の増大または減少されたタンパク質レベルも含む。さらに、バイオマーカータンパク質の変更された量は、バイオマーカータンパク質の発現または活性に影響を及ぼしうる、マーカーのメチル化状態など、翻訳後修飾を検出することにより決定することができる。

30

【0021】

バイオマーカーの量が、それぞれ、正常レベルより、量进行评估するのに採用されるアッセイの標準誤差を超える量だけ大きいまたは小さく、好ましくは正常量より、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%大きいまたは小さい場合に、対象におけるバイオマーカーの量は、バイオマーカーの正常量より「有意に」高量または低量である。代替的に、対象におけるバイオマーカーの量は、量が、バイオマーカーの正常量の、少なくとも約2倍または2分の1であり、好ましくは、それぞれ、少なくとも約3、4、もしくは5倍、または最大で約3、4、もしくは5分の1である場合に、正常量より「有意に」高量または低量と考えることができる。

40

【0022】

バイオマーカーの「発現の変更されたレベル」という用語は、被験試料、例えば、免疫障害を患う患者に由来する試料中のバイオマーカーの発現レベルまたはコピー数であって、発現またはコピー数进行评估するのに採用されるアッセイの標準誤差より大きいまたは

50

小さく、対照試料（例えば、関連疾患を有さない健常対象に由来する試料）、好ましくは、いくつかの対照試料中のバイオマーカーの平均発現レベルまたはコピー数の、好ましくは少なくとも2倍または2分の1であり、より好ましくは3、4、5、もしくは10倍、または最大で約3、4、5、もしくは10分の1である、発現レベルまたはコピー数を指す。発現の変更されたレベルは、発現またはコピー数を評価するのに採用されるアッセイの標準誤差より大きいかまたは小さく、対照試料（例えば、関連疾患を有さない健常対象に由来する試料）、好ましくは、いくつかの対照試料中のバイオマーカーの平均発現レベルまたはコピー数の、好ましくは少なくとも2倍または2分の1であり、より好ましくは3、4、5、もしくは10倍、または最大で約3、4、5、もしくは10分の1である。

【0023】

バイオマーカーの「変更された活性」という用語は、正常な対照試料中のバイオマーカーの活性と比較して、疾患状態、例えば、免疫障害試料中において増大または低下するバイオマーカーの活性を指す。バイオマーカーの変更された活性は、例えば、バイオマーカーの変更された発現、バイオマーカーの変更されたタンパク質レベル、バイオマーカーの変更された構造、あるいは、例えば、バイオマーカーと同じもしくは異なる経路に關与する他のタンパク質との変更された相互作用、または転写の活性化因子もしくは阻害剤との変更された相互作用の結果でありうる。

【0024】

バイオマーカーの「変更された構造」という用語は、バイオマーカー核酸またはタンパク質内の変異または対立遺伝子改変体、例えば、バイオマーカー核酸またはタンパク質の発現または活性に、正常または野生型遺伝子またはタンパク質と比較して影響を及ぼす変異の存在を指す。例えば、変異は、置換、欠失、または付加変異を含むがこれらに限定されない。変異は、バイオマーカー核酸のコードまたは非コード領域内に存在しうる。

【0025】

本明細書でそうでないことが明記されない限りにおいて、「抗体 (antibody)」および「抗体 (antibodies)」という用語は、抗体（例えば、IgG、IgA、IgM、IgE）の天然に存在する形態、ならびに単鎖抗体、キメラ、およびヒト化抗体などの組換え抗体、ならびに多特異性抗体のほか、前出の全ての断片および誘導体であって、少なくとも抗原結合性部位を有する断片および誘導体を広く包含する。抗体の誘導体は、抗体とコンジュゲートさせたタンパク質または化学的部分を含みうる。

【0026】

本明細書で使用される「抗体」という用語はまた、抗体の「抗原結合性部分」（または単に、「抗体の部分」）も含む。本明細書で使用される「抗原結合性部分」という用語は、抗原（例えば、バイオマーカーポリペプチドまたはその断片）に特異的に結合する能力を保持する抗体の1または複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片により果たされることが示されている。抗体の「抗原結合性部分」という用語の中に包含される結合性断片の例は、(i) VL、VH、CL、およびCH1ドメインからなる一価断片である、Fab断片；(ii) ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片である、F(ab)₂断片；(iii) VHおよびCH1ドメインからなる、Fd断片；(iv) 抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインからなる、Fv断片；(v) VHドメインからなる、dAb断片 (Wardら、(1989年)、Nature、341巻：544～546頁)；ならびに(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)を含む。さらに、Fv断片の2つのドメインVLおよびVHは、別個の遺伝子によりコードされているが、組換え法を使用して、それらが単一のタンパク質鎖となることを可能とする合成リンカーにより接合することができ、この場合、VL領域とVH領域とは、対合して、一価ポリペプチドを形成する(単鎖Fv(scFv))として公知である；例えば、Birdら(1988年)、Science、242巻：423～426頁；およびHoustonら(1988年)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、85巻：5879～5883頁；およびOsbourneら、1998年、Nature Biotechnology、16巻：778頁を参照された

10

20

30

40

50

い)。抗体の「抗原結合性部分」という用語の中にはまた、このような単鎖抗体も包含することを意図する。完全なIgGポリペプチドまたは他のアイソタイプをコードする発現ベクターを生成するために、特異的なscFvの任意のVHおよびVL配列を、ヒト免疫グロブリン定常領域のcDNAまたはゲノム配列に連結することができる。VHおよびVLはまた、タンパク質化学反応または組換えDNA技術を使用する、免疫グロブリンのFab、Fv、または他の断片の生成においても使用することができる。また、ダイアボディ(diabody)など、単鎖抗体の他の形態も包含される。ダイアボディとは、VHおよびVLドメインを、単一のポリペプチド鎖上で、但し同じ鎖上の2つのドメインの対合を可能とするには短過ぎるリンカーを使用して発現させ、これにより、ドメインに、別の鎖の相補的なドメインと対合させ、2つの抗原結合性部位を創出する、二価の二特異性抗体である(例えば、Holligerら(1993年)、Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 90巻: 6444~6448頁; Poljakら(1994年)、Structure, 2巻: 1121~1123頁を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0027】

なおさらに、抗体またはその抗原結合性部分は、抗体または抗体の部分の、1または複数の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合的または非共有結合的会合により形成される、より大型の免疫接着ポリペプチドの一部でありうる。このような免疫接着ポリペプチドの例は、四量体のscFvポリペプチドを作る、ストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanovら(1995年)、Human Antibodies and Hybridomas, 6巻: 93~101頁)、ならびに二価のビオチン化scFvポリペプチドを作る、システイン残基、バイオマーカーペプチド、およびC末端ポリヒスチジンタグの使用(Kipriyanovら(1994年)、Mol. Immunol., 31巻: 1047~1058頁)を含む。FabおよびF(ab')₂断片など、抗体の部分は、それぞれ、抗体全体のパインまたはペプシン消化など、従来技法を使用して、抗体全体から調製することができる。さらに、抗体、抗体の部分、および免疫接着ポリペプチドは、本明細書に記載される、標準的な組換えDNA法を使用して得ることができる。

【0028】

抗体は、ポリクローナルの場合もあり、モノクローナルの場合もあり、異種の場合もあり、同種の場合もあり、同系の場合もあり、これらの修飾形態(例えば、ヒト化、キメラなど)の場合もある。抗体はまた、完全にヒトのものである場合もある。好ましくは、本発明の抗体は、バイオマーカーポリペプチドまたはその断片に、特異的または実質的に特異的に結合する。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体組成物」という用語は、抗原の特定のエピトープと免疫反応することが可能な、抗原結合性部位の1つの分子種だけを含む、抗体ポリペプチドの集団を指すのに対し、「ポリクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、特定の抗原と相互作用することが可能な、抗原結合性部位の複数の分子種を含む、抗体ポリペプチドの集団を指す。モノクローナル抗体組成物は、それが免疫反応する特定の抗原に対する、単一の結合アフィニティを提示することが典型的である。

【0029】

抗体はまた、「ヒト化」されてもよく、これはヒト細胞により作られる抗体により酷似するように変更された可変および定常領域を有する、非ヒト細胞により作られる抗体を含むように意図される。例えば、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列中に見出されるアミノ酸を組み込むように、非ヒト抗体アミノ酸配列を変更することを介する。本発明のヒト化抗体は、例えば、CDR内に、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基(例えば、in vitroにおけるランダムもしくは部位特異的変異誘発、またはin vivoにおける体細胞変異により導入される変異)を含みうる。本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語はまた、マウスなど、別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列を、ヒトフレームワーク配列へとグラフトした抗体

も含む。

【0030】

「割り当てられたスコア」という用語は、患者試料中で測定された後で、バイオマーカーの各々について指定される数値を指す。割り当てられたスコアは、試料中のバイオマーカーの非存在、存在、または推定量と相関する。割り当てられたスコアは、手作業で（例えば、目視により）、または画像の取得および解析のための装置の補助により生成することができる。ある特定の実施形態では、割り当てられたスコアを、定性的評価、例えば、グレード付けされたスケール上の蛍光リードアウトの検出、または定量的評価により決定する。一実施形態では、複数の測定されたバイオマーカーに由来する、割り当てられたスコアの組合せを指す、「集合スコア (aggregate score)」を決定する。一実施形態では、集合スコアとは、割り当てられたスコアの合計である。別の実施形態では、割り当てられたスコアの組合せは、割り当てられたスコアに対する数学的演算を実行してから、それらを集合スコアへと組み合わせることを伴う。ある特定の実施形態では、本明細書ではまた、集合スコアを、予測スコアとも称する。

10

【0031】

「バイオマーカー」という用語は、抗免疫障害療法および/または抗免疫障害の処置（例えば、複数の可変用量によるIL-2療法単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量によるIL-2療法）の効果を予測することが決定されている、本発明の測定可能な実体を指す。バイオマーカーは、限定なしに述べると、細胞型（例えば、Tregおよび/またはTcon）、細胞比（例えば、Treg対Tcon比）、核酸（例えば、ゲノム核酸および/または転写された核酸）、およびタンパク質、特に、表1に示される、関与するものを含みうる。バイオマーカーはさらに、本明細書でさらに記載される、免疫学的標的、または目的の免疫障害を処置するために望ましくない免疫反応を下方調節する薬剤を含みうる。

20

【0032】

「遮断」抗体または抗体「アンタゴニスト」とは、それが結合する抗原の少なくとも1つの生物学的活性を、阻害または低減する抗体である。ある特定の実施形態では、本明細書で記載される遮断抗体もしくはアンタゴニスト抗体またはそれらの断片は、抗原の所与の生物学的活性を、実質的または完全に阻害する。

【0033】

「体液」という用語は、体内から排出または分泌される流体のほか、通常体内から排出または分泌されない流体（例えば、羊水、房水、胆汁、血液および血漿、脳脊髄液、耳垢 (cerumen) および ear wax)、カウパー腺液または尿道球腺液 (pre-ejaculatory fluid)、乳び、びじゅく、糞便、スキーン腺液 (female ejaculate)、間質液、細胞内液、リンパ、経血、母乳、粘液、胸膜液、膿、唾液、皮脂、精液、血清、汗、滑膜液、涙、尿、膣液 (vaginal lubrication)、硝子体液、および吐瀉物) も指す。ある特定の実施形態では、Tリンパ球およびその部分集団など、リンパ球を含む体液を使用する。

30

【0034】

「コード領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含む、ヌクレオチド配列の領域を指すのに対し、「非コード領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されない、ヌクレオチド配列の領域（例えば、5' および 3' 側非翻訳領域）を指す。

40

【0035】

「相補的な」という用語は、2つの核酸鎖の領域の間または同じ核酸鎖の2つの領域の間の配列相補性についての広範な概念を指す。残基が、チミンまたはウラシルである場合、第1の核酸領域のアデニン残基は、第1の領域とアンチパラレルな、第2の核酸領域の残基と、特異的な水素結合（「塩基対合」）を形成することが可能であることが公知である。同様に、残基が、グアニンである場合、第1の核酸鎖のシトシン残基は、第1の鎖とアンチパラレルな、第2の核酸鎖の残基との塩基対合が可能であることが公知である。2つの領域が、アンチパラレルに配置される場合に、第1の領域の少なくとも1つのヌクレ

50

オチド残基が、第2の領域の残基との塩基対合が可能であれば、核酸の第1の領域は、同じまたは異なる核酸の第2の領域と相補的である。第1の領域は、第1の部分を含み、第2の領域は、第2の部分を含むことが好ましく、これにより、第1および第2の部分が、アンチパラレルに配置されている場合、第1の部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%は、第2の部分内のヌクレオチド残基との塩基対合が可能である。より好ましくは、第1の部分の全てのヌクレオチド残基は、第2の部分内のヌクレオチド残基との塩基対合が可能である。

【0036】

「対照」という用語は、被験試料中の発現産物との比較をもたらすのに適する、任意の基準物質を指す。一実施形態では、対照は、それに由来する発現産物のレベルを検出し、被験試料に由来する発現産物のレベルと比較する、「対照試料」を得ることを含む。このような対照試料は、アウトカムが既知である、対照免疫障害患者に由来する試料（保存された試料による測定値の場合もあり、かつての試料測定値の場合もある）；正常患者もしくは免疫障害患者などの対象から単離された正常組織もしくは細胞、正常対象もしくは免疫障害患者などの対象から単離された培養初代細胞/組織、免疫障害患者の同じ臓器もしくは身体の場所から得られた、隣接正常細胞/組織、正常対象から単離された組織もしくは細胞試料、または受託機関から得られた初代細胞/組織を含むがこれらに限定されない、任意の適切な試料を含みうる。別の好ましい実施形態では、対照は、ハウスキーピング遺伝子、正常組織（または他の既に解析された対照試料）からの発現産物レベルの範囲、ある特定のアウトカム（例えば、1、2、3、4年間にわたる生存など）を伴うか、またはある特定の処置（例えば、免疫障害療法の標準治療）を施される、患者群または患者のセットに由来する被験試料中の、既に決定された発現産物レベルの範囲を含むがこれらに限定されない、任意の適切な供給源に由来する、基準物質の発現産物レベルを含みうる。当業者は、このような対照試料および基準物質の発現産物レベルを、本発明の方法において、対照として組み合わせて使用しうることを理解するであろう。一実施形態では、対照は、正常または非免疫障害の細胞/組織試料を含みうる。別の好ましい実施形態では、対照は、免疫障害患者のセットなど、患者のセット、またはある特定の処置を施される免疫障害患者のセット、または別のアウトカムと対比した1つのアウトカムを伴う患者のセットについての発現レベルを含みうる。前者の場合、各患者の特異的な発現産物レベルを、百分位数による発現レベルへと割り当てることもでき、基準物質による発現レベルの平均値または平均より高いまたは低いレベルとして表すこともできる。別の好ましい実施形態では、対照は、正常細胞、組合せ化学療法により処置された患者に由来する細胞、および目的の処置に应答した免疫障害を有する患者に由来する細胞を含みうる。別の実施形態では、対照はまた、測定値、例えば、同じ集団内のハウスキーピング遺伝子の発現レベルと比較した、集団内の特定の遺伝子の平均発現レベルも含みうる。このような集団は、正常対象、いかなる処置も経ていない免疫障害患者（すなわち、処置ナীব）、標準治療ケアを受けている免疫障害患者、または目的の処置に应答した免疫障害を有する患者を含みうる。別の好ましい実施形態では、対照は、被験試料中の2つの細胞型および/または遺伝子の発現産物レベルの比を決定し、これを、基準物質中の、同じ2つの細胞型および/または遺伝子の任意の適切な比と比較すること；被験試料中の2つまたはそれ超の細胞型および/または遺伝子の発現産物レベルを決定し、任意の適切な対照中の発現産物レベルの差異を決定すること；ならびに被験試料中の2つまたはそれ超の細胞型および/または遺伝子の発現産物レベルを決定し、それらの発現を、被験試料中のハウスキーピング細胞型および/または遺伝子の発現に照らして正規化し、任意の適切な対照と比較することを含むがこれらに限定されない、発現産物レベルの比への変換を含む。特に好ましい実施形態では、対照は、被験試料と同じ系統および/または種類の対照試料を含む。別の実施形態では、対照は、免疫障害を伴う全ての患者など、患者試料のセット中の百分位数または患者試料のセットに基づく百分位数として群分けされた発現産物レベルを含みうる。一実施形態では、対照の発現産物レベルを確立し、この場合、例えば、特定の百分位数と比べ

て高いまたは低い発現産物レベルを、アウトカムを予測するためのベースとして使用する。別の好ましい実施形態では、既知のアウトカムを伴う免疫障害対照患者からの発現産物レベルを使用して、対照の発現産物レベルを確立し、被験試料に由来する発現産物のレベルを、アウトカムを予測するためのベースとして、対照の発現産物レベルと比較する。下記のデータにより裏付けられる通り、本発明の方法は、被験試料中の発現産物レベルを、対照と比較するときの特異的な切断点 (cut-point) の使用に限定されない。

【0037】

バイオマーカー核酸の「コピー数」とは、特定の遺伝子産物をコードする、細胞（例えば、生殖細胞系列および/または体細胞）中のDNA配列の数を指す。一般に、所与の遺伝子について、哺乳動物は、各遺伝子の2つずつのコピーを有する。しかし、コピー数は、遺伝子増幅または重複により増大する場合もあり、欠失により低減される場合もある。例えば、生殖細胞系列のコピー数変化は、1または複数のゲノム遺伝子座における変化であって、前記1または複数のゲノム遺伝子座が、対照中の生殖細胞系列のコピーのうちの、正常相補体中のコピー数（例えば、特異的な生殖細胞系列のDNAおよび対応するコピー数を決定した種と同じ種についての、生殖細胞系列のDNA内の正常コピー数）により説明されない変化を含む。体細胞のコピー数変化は、1または複数のゲノム遺伝子座における変化であって、前記1または複数のゲノム遺伝子座が、対照の生殖細胞系列のDNA中のコピー数（例えば、体細胞のDNAおよび対応するコピー数を決定した対象と同じ対象についての、生殖細胞系列のDNA中のコピー数）により説明されない変化を含む。

10

【0038】

バイオマーカー核酸の「正常」コピー数（例えば、生殖細胞系列および/または体細胞）またはバイオマーカー核酸もしくはタンパク質の「正常」発現レベルとは、生体試料、例えば、免疫障害に罹患していない対象、例えば、ヒト、または免疫障害を有する同じ対象における、対応する非免疫障害組織に由来する組織、全血、血清、血漿、口腔内切屑、唾液、脳脊髄液、尿、糞便、および骨髄を含有する試料中の発現の活性/レベルまたはコピー数である。

20

【0039】

「対象に適する処置レジメンを決定すること」という用語は、本発明に従う解析の結果に基づくか、または本質的に基づくか、または少なくとも部分的に基づき、開始、改変、および/または終了させる対象のための処置レジメン（すなわち、対象における免疫障害を防止および/または処置するために使用される、単一の療法または異なる療法の組合せ）の決定を意味するように理解する。1つの例は、免疫障害に対する標的化療法をもたらし、抗免疫障害療法（例えば、複数の可変用量によるIL-2療法単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせ、複数の可変用量によるIL-2療法）をもたすかどうかを決定することである。決定は、本発明に従う解析の結果に加えて、処置される対象の個人的な特徴にも基づきうる。大半の場合、対象に適する処置レジメンの実際の決定は、主治医 (attending physician または attending doctor) により実施する。

30

【0040】

「発現シグネチャ」または「シグネチャ」という用語は、2つまたはそれ超の協同的に発現するバイオマーカーの群を指す。例えば、このシグネチャを構成する遺伝子、タンパク質などは、特異的な細胞系統、分化段階、または特定の生物学的応答中において発現される。バイオマーカーは、それらが発現する細胞型の生物学的側面を反映しうる。発現データおよび遺伝子の発現レベルは、コンピュータ可読媒体、例えば、マイクロアレイまたはチップ読取りデバイスと共に使用されるコンピュータ可読媒体上に保存することができる。このような発現データを操作して、発現シグネチャを生成することができる。

40

【0041】

分子または細胞は、基材 (substrate) から解離する分子または細胞の実質的な画分を伴わない流体（例えば、標準クエン酸食塩水 (standard saline citrate)、pH 7.4) で、基材をすすぎうるように、基材と共有結合的また

50

は非共有結合的に会合している場合、基材に「固定」されているか、または「付着」している。

【0042】

「相同」という用語は、同じ核酸鎖の2つの領域の間または2つの異なる核酸鎖の領域の間のヌクレオチド配列の類似性を指す。両方の領域内のヌクレオチド残基の位置が、同じヌクレオチド残基で占有されている場合、領域は、その位置において相同である。各領域の、少なくとも1つのヌクレオチド残基の位置が、同じ残基で占有されている場合、第1の領域は、第2の領域と相同である。2つの領域の間の相同性は、同じヌクレオチド残基で占有された、2つの領域のヌクレオチド残基の位置の比率との関係で表される。例を目的として述べると、ヌクレオチド配列である5'-ATTGCC-3'を有する領域と、ヌクレオチド配列である5'-TATGCC-3'を有する領域とは、50%の相同性を共有する。第1の領域は、第1の部分を含み、第2の領域は、第2の部分を含むことが好ましく、これにより、部分の各々のヌクレオチド残基の位置の少なくとも約50%、好ましくは、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%は、同じヌクレオチド残基で占有されている。より好ましくは、部分の各々の全てのヌクレオチド残基の位置は、同じヌクレオチド残基で占有されている。

10

【0043】

「免疫障害」という用語は、所望の抗免疫障害応答が、免疫応答を抑制するような、望ましくない免疫応答を特徴とする状態を指す。免疫応答の下方調節が所望されるこのような状態は、当技術分野で周知であり、限定なしに述べると、移植片対宿主病(GVHD)、炎症、または本明細書でさらに記載される、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、アレルギー、過敏性応答、寄生生物およびウイルス感染、CD4+ T細胞の産生もしくは機能の増大を必要とする障害、ワクチン接種効率の改善を必要とする障害、ならびに調節性T細胞の産生もしくは機能の増大を必要とする障害などの自己免疫疾患における、組織、皮膚、および臓器移植の状況を含む。

20

【0044】

「阻害する」という用語は、例えば、特定の作用、機能、または相互作用の低下、制限、または遮断を含む。一部の実施形態では、免疫障害の少なくとも1つの症状が、緩和されるか、終結するか、緩徐化するか、または防止される場合、免疫障害は、「阻害される」。本明細書で使用される通り、免疫障害の再発または拡大が、低減されるか、緩徐化するか、遅延するか、または防止される場合もまた、免疫障害は、「阻害される」。

30

【0045】

2つの分子の間の相互作用に言及する場合の「相互作用」という用語は、分子の、互いの物理的接触(例えば、結合)を指す。一般に、このような相互作用は、前記分子の一方または両方の活性(生物学的効果を生み出す)を結果としてもたらす。

【0046】

「単離されたタンパク質」とは、細胞から単離されるかもしくは組換えDNA法により作製される場合の、他のタンパク質、細胞物質、分離媒体、および培養培地、または化学合成される場合の、化学的前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まないタンパク質を指す。「単離された」または「精製された」タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分は、抗体、ポリペプチド、ペプチド、もしくは融合タンパク質が由来する細胞もしくは組織供給源に由来する、細胞物質もしくは他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、または化学合成される場合の、化学的前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まない。「細胞物質を実質的に含まない」という表現は、バイオマーカーポリペプチドまたはその断片の調製物であって、タンパク質を、それが単離されるか、または組換えにより作製される細胞の細胞成分から分離した調製物を含む。一実施形態では、「細胞物質を実質的に含まない」という表現は、バイオマーカータンパク質またはその断片の調製物であって、約30%(乾燥重量で)未満の非バイオマーカータンパク質(本明細書ではまた、「夾雑タンパク質」とも称する)、より好ましくは約20%未満の非バイオマーカータンパク質、さらにより好ましくは約10%未満の非バイオマーカータンパク質、最も好ましく

40

50

は約5%未満の非バイオマーカータンパク質を有する調製物を含む。抗体、ポリペプチド、ペプチド、もしくは融合タンパク質、またはそれらの断片、例えば、それらの生物学的に活性な断片を組換えにより作製する場合、それはまた、培養培地も実質的に含まないことが好ましい、すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の体積の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満である。

【0047】

「キット」とは、本発明のマーカーの発現を特異的に検出し、かつ/またはこの発現に治療的に影響を及ぼすための、少なくとも1つの試薬、例えば、治療薬、プローブ、小分子などを含む、任意の製造物（例えば、パッケージまたは容器）である。キットは、本発明の方法を実行するためのユニットとして宣伝、流通、または販売することができる。キットは、本発明の方法において有用な組成物を発現するのに必要な、1または複数の試薬を含みうる。ある特定の実施形態では、キットは、基準物質、例えば、免疫学的応答、細胞の増殖、分裂、遊走、生存、またはアポトーシスを制御するシグナル伝達経路に影響を及ぼさず、これを調節しないタンパク質をコードする核酸をさらに含みうる。当業者は、一般的な分子タグ（例えば、緑色蛍光タンパク質およびベータ-ガラクトシダーゼ）、遺伝子オントロジー基準により、細胞の増殖、分裂、遊走、生存、またはアポトーシスを包含する経路のうちのいずれにも分類されないタンパク質、または普遍的なハウスキーピングタンパク質を含むがこれらに限定されない、多くのこのような対照タンパク質を想定しうる。キット中の試薬は、個別の容器により供給することもでき、単一の容器内の、2つまたはそれ超の試薬の混合物として供給することもできる。加えて、キット内の組成物の使用について記載する指示材料も含まれ得る。

10

20

【0048】

バイオマーカーの「正常」発現レベルは、免疫障害に罹患していない対象、例えば、ヒト患者の細胞内のバイオマーカーの発現レベルである。バイオマーカーの「過剰発現」または「有意に高い発現レベル」とは、発現を評価するのに採用されるアッセイの標準誤差よりも大きい、対照試料（例えば、バイオマーカー関連疾患を有さない健常対象に由来する試料）中のバイオマーカーの発現活性またはレベル、好ましくは、いくつかの対照試料中のバイオマーカーの平均発現レベルより少なくとも10%高く、より好ましくは、この1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍またはそれ超である被験試料中の発現レベルを指す。バイオマーカーの「有意に低い発現レベル」とは、対照試料（例えば、バイオマーカー関連疾患を有さない健常対象に由来する試料）中のバイオマーカーの発現レベル、好ましくは、いくつかの対照試料中のバイオマーカーの平均発現レベルより少なくとも10%低く、より好ましくは、この1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20分の1またはそれ未満の被験試料中の発現レベルを指す。このような「有意性」レベルはまた、発現、阻害、細胞傷害作用、細胞増殖などについて本明細書に記載される、他の任意の測定されるパラメータにも適用することができる。

30

40

【0049】

「予測」という用語は、複数の可変用量によるIL-2療法単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量によるIL-2療法など、抗免疫障害療法に対する免疫障害の応答の可能性を決定するためのバイオマーカーの使用を含む。バイオマーカーの、このような予測的使用は、例えば、(1)コピー数の増大もしくは減少（例えば、FISH、FISHおよびSKY、例えば、当技術分野では、少なくとも、J. Biotechnol.、86巻：289~301頁において記載されている、

50

単一分子シーケンシング、または qPCR による)、バイオマーカー核酸の過剰発現もしくは過少発現(例えば、ISH、ノーザンブロット、または qPCR による)、バイオマーカー細胞または細胞の比の増大または減少(例えば、細胞選別および/または計数による)、タンパク質標的(例えば、IHC による)および/もしくはバイオマーカー標的、または、例えば、アッセイされる免疫障害試料の約 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100% もしくはそれ超の、活性の増大もしくは減少;(2) 生体試料、例えば、免疫障害に罹患した対象、例えば、ヒトに由来する、組織、全血、血清、血漿、口腔内切屑、唾液、脳脊髄液、尿、糞便、または骨髄を含有する試料中の、その絶対的なまたは相対的にモジュレートされた存在または非存在; (3) 免疫障害を伴う患者(例えば、特定の抗免疫障害療法(例えば、複数の可変用量による IL-2 療法単独、または 1 もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量による IL-2 療法)に应答する患者、またはこれに対する抵抗性を発生させる患者)の臨床サブセット中の、その絶対的なまたは相対的にモジュレートされた存在または非存在により確認することができる。

10

【0050】

「防止する」、「防止すること」、「防止」、「予防的処置」などの用語は、疾患、障害、または状態を有さないが、これらを発症する危険性があるか、またはこれらに感受性の対象における、疾患、障害、または状態を発症する確率を低減することを指す。

【0051】

「プローブ」という用語は、具体的に意図される標的分子、例えば、バイオマーカー核酸によりコードされるかまたはこれに対応する、ヌクレオチド転写物またはタンパク質に選択的に結合することが可能な任意の分子を指す。プローブは、当業者により合成される場合もあり、適切な生物学的調製物に由来する場合もある。標的分子の検出を目的として、プローブは、本明細書に記載される通りに標識されるように、特異的にデザインすることができる。プローブとして活用されうる分子の例は、RNA、DNA、タンパク質、抗体、および有機分子を含むがこれらに限定されない。

20

【0052】

「予後診断」という用語は、免疫障害の可能性のある経過およびアウトカムまたは疾患からの回復の可能性についての予測を含む。一部の実施形態では、統計学的アルゴリズムの使用により、個体における免疫障害の予後診断をもたらす。例えば、予後診断は、手術、免疫障害の臨床亜型(例えば、慢性GVHD など、GVHD の亜型)の発症、1 もしくは複数の臨床因子の発症、または疾患からの回復でありうる。

30

【0053】

「抗免疫障害療法(例えば、複数の可変用量による IL-2 療法単独、または 1 もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量による IL-2 療法)に対する应答」という用語は、抗免疫障害療法(例えば、複数の可変用量による IL-2 療法単独、または 1 もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量による IL-2 療法)に対する免疫障害(例えば、GVHD)の任意の应答に関する。抗免疫障害療法は、実施例に記載される基準を含む、当技術分野で周知の方法に従い評価することができる。应答は、百分率の変化のように、定量的に記録することもでき、「病理学的完全应答」(pCR)、「臨床的完全寛解」(cCR)、「臨床的部分寛解」(cPR)、「臨床的安定病態」(cSD)、「臨床的進行性疾患」(cPD)、または他の定性的基準のように、定性的に記録することもできる。应答の評価は、ネオアジュバントまたはアジュバント療法の開始後早期に、例えば、数時間後、数日間後、数週間後、または、好ましくは数カ月間後に行うことができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される治療的処置の臨床有効性は、臨床的有用率(clinical benefit rate)(CBR)を測定することにより決定することができる。臨床的有用率は、治療の終了時から少なくとも 6 カ月後の時点において完全寛解(CR)している患者の百分率と、部分寛解(PR)している患者の数と、安定病態(SD)である患者の数との合計を決定す

40

50

ることにより測定する。この式の略記は、6カ月間にわたる $CBR = CR + PR + SD$ である。一部の実施形態では、特定の抗免疫障害治療レジメンについての CBR は、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、またはそれ超である。抗免疫障害療法に対する応答を評価するためのさらなる基準は、以下：全生存としてもまた公知の死亡までの生存（ここで、前記死亡は、原因を問わない場合もあり、腫瘍に関連する場合もある）；「無再発生存」（ここで、再発という用語は、限局的および遠隔的再発の両方を含むものとする）；無病生存（ここで、疾患という用語は、免疫障害およびこれに関連する疾患を含むものとする）の全てを含む「生存」に関する。前記生存の長さは、規定された開始点（例えば、診断時または処置の開始）および終了点（例えば、死または再発）を参照することにより計算することができる。加えて、処置の有効性についての基準は、生存の確率、所与の期間内の再発の確率などを含むように拡張することができる。例えば、適切な閾値を決定するために、特定の治療レジメンを、対象の集団に施行することができ、アウトカムを、任意の治療を施行する前に決定されたバイオマーカー測定値と関連させることができる。アウトカム測定値は、ネオアジュバント状況において施される治療に対する病理学的応答でありうる。代替的に、全生存および無病生存などのアウトカム尺度を、バイオマーカー測定値が既知である治療後の対象について、ある期間にわたりモニタリングすることができる。対象をモニタリングする期間は、変動しうる。例えば、対象を、少なくとも0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、または60カ月間にわたりモニタリングすることができる。抗免疫障害療法のアウトカムと関連する、バイオマーカーの測定閾値は、実施例節で記載される方法など、当技術分野で周知の方法を使用して決定することができる。

10

20

30

40

50

【0054】

用語はまた、例えば、最初の再発までの期間であり、再発のエビデンスを伴わない最初の事象もしくは死としての第2の独立の免疫障害については打ち切る、再発までの時間の延長、または処置から、任意の原因による死までの期間である、全生存の延長により反映される、予後診断の改善も指す場合がある。応答するまたは応答を有するとは、刺激に曝露された場合に達せられる有益なエンドポイントがあることを意味する。代替的に、刺激に曝露されると、負の(negative)または有害な症状は、最小化されるか、軽減されるか、または緩和される。腫瘍または対象が、好適な応答を呈する可能性を評価することは、腫瘍または対象が、好適な応答を呈さない（すなわち、応答の欠如を呈するか、または非応答性である）可能性を評価することと同等であることが理解されるであろう。

【0055】

本明細書で使用される「RNA干渉剤」は、RNA干渉(RNAi)により、標的バイオマーカー遺伝子の発現に干渉するか、またはこれを阻害する任意の薬剤として定義される。このようなRNA干渉剤は、本発明の標的バイオマーカー遺伝子またはその断片と相同なRNA分子を含む核酸分子、短鎖干渉RNA(siRNA)、およびRNA干渉(RNAi)により、標的バイオマーカー核酸の発現に干渉するか、またはこれを阻害する小分子を含むがこれらに限定されない。

【0056】

「RNA干渉(RNAi)」とは、進化において保存された過程であって、標的バイオマーカー核酸と同一であるか、または高度に類似する配列のRNAを、発現させるか、または導入する結果として、その標的化遺伝子から転写されるメッセンジャーRNA(mRNA)の、配列特異的分解または特異的な転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)をもたらす(Coburn, G. および Cullen, B. (2002年)、J. of Virology、76巻(18号)：9225頁を参照されたい)、これにより、標的バイオマーカー核酸の発現を阻害する過程である。一実施形態では、RNAは、二本鎖RNA(dsRNA)である。この過程は、植物、無脊椎動物、および哺乳動物細胞において記載されている。天然では、RNAiは、長鎖dsRNAの、siRNAと称する二

本鎖断片への加工的切断を促進する、dsRNA特異的エンドヌクレアーゼであるDicerにより誘発される。siRNAは、標的mRNAを認識および切断するタンパク質複合体に組み込まれる。RNAiはまた、核酸分子、例えば、合成siRNA、shRNA、または他のRNA干渉剤を導入して、標的バイオマーカー核酸の発現を阻害またはサイレンシングすることによっても誘発することができる。本明細書で使用される場合、「標的バイオマーカー核酸の発現の阻害」または「マーカー遺伝子の発現の阻害」は、標的バイオマーカー核酸または標的バイオマーカー核酸によりコードされるタンパク質の発現またはタンパク質活性またはレベルの任意の低下を含む。低下は、RNA干渉剤により標的化されていない、標的バイオマーカー核酸の発現または標的バイオマーカー核酸によりコードされるタンパク質の活性もしくはレベルと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%またはそれ超の低下でありうる。

10

【0057】

少なくとも1つのバイオマーカーの存在またはレベルを検出または決定するために使用される「試料」という用語は、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便（例えば、排泄物）、涙、および他の任意の体液（例えば、上記の「体液」の定義下で記載した）、または小腸、結腸試料、または手術による切除組織などの組織試料（例えば、生検材料）であることが典型的である。ある特定の場合には、本発明の方法は、試料中の少なくとも1つのマーカーの存在またはレベルを検出または決定する前に、試料を個体から得るステップをさらに含む。一部の実施形態では、Tリンパ球またはそのサブセットを含む任意の試料が、本発明に従い有用である。

20

【0058】

「相乗効果」という用語は、2つまたはそれ超の抗免疫障害剤または療法の組合せ効果が、このような薬剤または治療単独の各々による個別の効果の合計より大きくなりうることを指す。

【0059】

「対象」という用語は、任意の健常な動物、哺乳動物、もしくはヒト、または免疫障害に罹患した、任意の動物、哺乳動物、もしくはヒトを指す。「対象」という用語は、「患者」と互換的である。

【0060】

「生存」という用語は、以下：全生存としてもまた公知の死亡までの生存（ここで、前記死亡は、原因を問わない場合もあり、腫瘍に関連する場合もある）；「無再発生存」（ここで、再発という用語は、限局的および遠隔的再発の両方を含むものとする）；無病生存（ここで、疾患という用語は、免疫障害およびこれに関連する疾患を含むものとする）の全てを含む。前記生存の長さは、規定された開始点（例えば、診断時または処置の開始）および終了点（例えば、死、再発または転移）を参照することにより計算することができる。加えて、処置の有効性についての基準は、治療への応答、生存の確率、所与の期間内の再発の確率などを含むように拡張することができる。

30

【0061】

「治療効果」という用語は、薬理的活性物質により引き起こされる、動物、特に哺乳動物、より特定すると、ヒトにおける局所または全身効果を指す。したがって、用語は、疾患の診断、治療、軽減、処置、もしくは防止、または動物もしくはヒトにおける、所望の身体もしくは精神の発達および状態の増強における使用のために意図される任意の物質を意味する。「治療有効量」という語句は、何らかの所望の局所または全身効果を、任意の処置に適用可能な、妥当なベネフィット/リスク比で生み出す、このような治療または物質の量を意味する。ある特定の実施形態では、化合物の治療有効量は、その治療指数、溶解度などに依存するであろう。例えば、本発明の方法により発見されるある特定の化合物は、このような処置に適用可能な、妥当なベネフィット/リスク比をもたらすのに十分な量で投与することができる。

40

【0062】

50

「転写されたポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド転写物」とは、バイオマーカー核酸の転写、ならびに、存在する場合、RNA転写物の正常な転写後プロセッシング（例えば、スプライシング）およびRNA転写物の逆転写により作られる成熟mRNAの全部または一部に相補的であるか、またはそれと相同なポリヌクレオチド（例えば、mRNA、hnRNA、cDNA、またはこのようなRNAもしくはcDNAのアナログ）である。

【0063】

I. Treg、Tcon、Treg/Tcon比

調節性T細胞（Treg）とは、循環CD4⁺ T細胞集団の約5～10%を構成し、自己反応性リンパ球を主に抑制し、先天および適応免疫応答を制御するように作用する、天然に存在するCD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Tリンパ球である（PiccirilliおよびShevach（2004年）、*Curr. Opin. Immunol.*、16巻：81～88頁；FehervariおよびSakaguchi（2004年）、*Curr. Opin. Immunol.*、16巻：203～208頁；Azumaら（2003年）、*Cancer Res.*、63巻：4516～4520頁；Cederbomら（2000年）、*Eur. J. Immunol.*、30巻：1538～1543頁；Maloyら（2003年）、*J. Exp. Med.*、197巻：111～119頁；Serraraら（2003年）、*Immunity*、19巻：877～889頁；ThorntonおよびShevach（1998年）、*J. Exp. Med.*、188巻：287～296頁；Janssensら（2003年）、*J. Immunol.*、171巻：4604～4612頁；Gasteigerら（2013年）、*J. Exp. Med.*、210巻：1167～1178頁；Sitrinら（2013年）、*J. Exp. Med.*、210巻：1153～1165頁）。Tregは、従来型T細胞（Tcon）の増殖、拡大、およびエフェクター活性を阻害することにより、この抑制を、少なくとも部分的に達成する。Tregはまた、T細胞の補助（help）および活性化を阻害することにより細胞間接触を介して、またはIL-10もしくはTGF- β など、免疫抑制性サイトカインの放出を介して、エフェクターT細胞がそれらの（自己）標的を破壊することも抑制する。Treg細胞の枯渇は、IL-2誘導性抗腫瘍免疫を増強することが示された（Imaiら（2007年）、*Cancer Sci.*、98巻：416～23頁）。

【0064】

Tconとは、それらによる、1または複数のT細胞受容体の発現のために、免疫応答を増大させるエフェクター機能（例えば、サイトカインの分泌、細胞傷害活性など）を有する、Tconvとしてもまた公知の従来型T細胞である。Tconは、Tregではない任意のT細胞集団として定義され、例えば、ナイーブT細胞、活性化T細胞、メモリーT細胞、休止Tcon、または、例えば、Th1もしくはTh2系統へと分化したTconを含む。「ナイーブTcon」とは、骨髄内で分化し、胸腺における中枢性選択の正および負の過程を経ることには成功したが、いまだ抗原への曝露により活性化してはいないCD4⁺ T細胞である。ナイーブTconは一般に、L-セレクチン（CD62L）の表面発現、CD25、CD44、またはCD69など、活性化マーカーの非存在、およびCD45ROなど、メモリーマーカーの非存在を特徴とする。したがって、ナイーブTconは、静止性でありかつ分裂しないものと考えられ、ホメオスタシス性生存のために、インターロイキン7（IL-7）およびインターロイキン15（IL-15）を必要とする（少なくともWO2010/101870を参照されたい）。このような細胞の存在および活性は、免疫応答の抑制の文脈では所望されない。Tregと異なり、Tconは、アレルギー性ではなく、抗原ベースのT細胞受容体の活性化に应答して増殖しうる（Lechlerら（2001年）、*Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*、356巻：625～637頁）。

【0065】

したがって、Tregの数を増大させ、Tregの活性を増大させ、かつ/またはTregの細胞死（例えば、アポトーシス）を減少させることは、ある範囲の免疫障害（例え

10

20

30

40

50

ば、cGVHD)と関連する望ましくない免疫反応を抑制するために有用である。例えば、マウスモデルにおいて、CD4+ CD25+ Tregと、CD25-エフェクターT細胞との1:1のミックスを、ドナー骨髄幹細胞に添加したところ、移植後における悪性の再発の増大を伴わずに、同種免疫活性化およびGVHDが抑制された(Edingerら(2003年)、Nat. Med.、9巻:1144~1150頁)。ヒトでは、活動性のcGVHDを伴う、HSC TレシピエントにおけるTreg再構成の機能障害が生じる(Zornら(2005年)、Blood、106巻:2903~2911頁)。活動性のcGVHDを伴う患者では、Treg再構成の機能障害、低レベルのテロメラーゼ、およびテロメアの短縮が、Tregの生存の短縮に寄与すると考えられている(Zornら(2005年)、Blood、106巻:2903~2911頁;Matsuokaら(2010年)、J. Clin. Invest.、120巻:1479~1493頁;Kawanoら(2011年)、Blood、118巻:5021~5030頁)。Tregのホメオスタシスおよび機能におけるIL-2の役割は、抗免疫障害療法としてのその限定された有効性の一因となると考えられ、IL-2に同系T細胞枯渇ドナー骨髄を加えたin vivo投与が、GVL応答に影響を与えることなく、MHCミスマッチマウスallo-SCT後におけるGVHDを防止するという知見(Sykesら(1990年)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、87巻:5633~5647頁;Sykesら(1990年)、J. Exp. Med.、171巻:645~658頁)を、部分的に説明する。マウスallo-HSC Tモデルでは、ex-vivoにおいて拡大されたTregの、IL-2との共注入もまた、免疫再構成を改善し、GVL応答を保存しながら、GVHDの抑制を結果としてもたらした(Taylorら(2002年)、Blood、99巻:3493~3499頁;Trenadoら(2003年)、J. Clin. Invest.、112巻:1688~1696頁)。

10

20

30

40

50

【0066】

Tregはまた、炎症の抑制においても重要である。進行中の炎症の文脈では、処置が、GVHDを悪化させうる、従来型T細胞(Tcon)または他のエフェクターの活性化を伴わずに、Tregを優先的に増強することは極めて重要である。in vivoにおけるTregの有効な増進はまた、末梢における寛容が損なわれた他の障害(例えば、SLE、T1D、MS、乾癬、RA、IBD、血管炎のような自己免疫疾患)であって、Tregの機能不全がいつそう関与する障害にも、直接関連する(Grinberg-Bleyerら(2010年)、J. Exp. Med.、207巻:1871~1878頁;Buckner(2010年)、Nat. Rev. Immunol.、10巻:849~859頁;Humrichら(2010年)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、107巻:204~209頁;Carboneら(2014年)、Nat. Med.、20巻:69~74頁)。

【0067】

II. インターロイキン2 (IL-2)

「インターロイキン2 (IL-2)」または「T細胞増殖因子(TCGF)」という用語は、リンパ球の発生、生存、およびホメオスタシスにおいて中心的な役割を果たす、15.5 kDaの球状の糖タンパク質を指す。用語は、免疫阻害効果を所有する(例えば、Tregの増大、Tregの、Tconに対する比の増大、Tregの増殖の増大、Tregの機能の増大などにより)、任意の精製または組換えIL-2分子であって、修飾天然IL-2分子、切断型IL-2分子、改変体IL-2分子、および共有結合的に修飾されたIL-2分子(例えば、グリコシル化または融合タンパク質形態)を含むがこれらに限定されないIL-2分子を含む。

【0068】

IL-2は、アンチパラレルで両親媒性の4つのヘリックスであって、その機能に重要な四次構造を形成するヘリックスからなる(Smith(1988年)、Science、240巻:1169~1176頁;Bazan(1992年)、Science、

257巻：410～413頁)。当技術分野では、ヒトIL-2の核酸およびポリペプチド配列が周知である。例えば、U.S. National Center for Biotechnology Informationにより維持されているGenBankデータベース上で入手可能な、NM_000586.3のcDNA配列は、残基1～20が、シグナルペプチドを表し、残りの残基が、成熟サイトカインを表す、前駆体のIL-2タンパク質(NP_000577.2)をコードする。一部の実施形態では、最初の20、21、22、またはそれ超のアミノ酸を、成熟サイトカインをもたらすために、シグナルペプチドとして除去することができる。ヒト以外の種におけるIL-2オーソログの核酸およびプロポリペプチド配列もまた、周知であり、例えば、チンパンジーIL-2(XM_517425.3およびXP_517425.1)、サルIL-2(NM_001047130.1およびNP_001040595.1)、イヌIL-2(NM_001003305.1およびNP_001003305.1)、マウスIL-2(NM_008366.3およびNP_032392.1)、およびラットIL-2(NM_053836.1およびNP_446288.1)を含む。各プロポリペプチドの残基1～20は、シグナルペプチドを表し、残りの残基は、成熟サイトカインを表す。

10

【0069】

IL-2オーソログの代表的な配列を、下記の表1に提示する。用語はさらに、IL-2分子に関して、本明細書に記載される特色の任意の組合せを指すために使用しうることにより留意されたい。例えば、配列組成、同一性百分率、配列の長さ、ドメインの構造、機能的活性などの任意の組合せを使用して、本発明のIL-2分子について記載することができる。

20

【0070】

さらに他の実施形態では、「IL-2」という用語は、デス-アラニル-1、セリン-125ヒトIL-2(Proleukin(登録商標)(アルデスロイキン); Novartis Inc.およびPrometheus Laboratories, Inc.)および/または酵母内で産生される組換えヒトIL-2(Roncoleukin(登録商標))を含む。アルデスロイキンは、22MIUのアルデスロイキンを含有する単回使用用バイアル内の、滅菌、白色～オフホワイトで、凍結乾燥させたケーキとして供給されている。2200万国単位(MIU)のバイアルでは、1.2mLの注射用滅菌水(SWFI)で再構成した場合、各1mLは、約170mcgの一塩基性リン酸ナトリウムおよび890mcgの二塩基性リン酸ナトリウムにより、7.5(範囲：7.2～7.8)のpHへと緩衝化された18MIU(1.1mg)のIL-2、50mgのマンニトール、および約180mcgのドデシル硫酸ナトリウムを含有する。天然IL-2とは対照的に、組換えIL-2は、グリコシル化されておらず、2つのアミノ酸位置において異なる。IL-2の天然形態と組換え形態との間に、弁別可能な機能的差異は見られない。

30

【0071】

例示的なIL-2改変体、組換えIL-2、IL-2を産生する方法、IL-2を精製する方法、製剤化の方法などは、当技術分野で周知であり、例えば、少なくとも、それらの各々が、参照により、それらの全体において、全ての目的で本明細書に組み込まれる、米国特許第4,530,787号、同第4,569,790号、同第4,572,798号、同第4,604,377号、同第4,748,234号、同第4,853,332号、同第4,959,314号、同第5,464,939号、同第RE33,653号、同第5,229,109号、同第7,514,073号、および同第7,569,215号において見出すことができる。

40

【0072】

例えば、遺伝暗号の縮重に起因して、バイオマーカーに対応するタンパク質をコードする核酸分子のヌクレオチド配列と異なり、したがって、同じタンパク質をコードする、バイオマーカー核酸分子が想定される。遺伝暗号(下記に示される)により規定される通り、特定のタンパク質のアミノ酸配列と、タンパク質をコードしうるヌクレオチド配列との間には、公知で明確な対応が見られる。同様に、遺伝暗号により規定される通り、特定の

50

核酸のヌクレオチド配列とこの核酸によりコードされるアミノ酸配列との間に、公知で明確な対応が見られる。

遺伝暗号

アラニン (Ala, A) GCA, GCC, GCG, GCT
 アルギニン (Arg, R) AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
 アスパラギン (Asn, N) AAC, AAT
 アスパラギン酸 (Asp, D) GAC, GAT
 システイン (Cys, C) TGC, TGT
 グルタミン酸 (Glu, E) GAA, GAG
 グルタミン (Gln, Q) CAA, CAG
 グリシン (Gly, G) GGA, GGC, GGG, GGT
 ヒスチジン (His, H) CAC, CAT
 イソロイシン (Ile, I) ATA, ATC, ATT
 ロイシン (Leu, L) CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
 リシン (Lys, K) AAA, AAG
 メチオニン (Met, M) ATG
 フェニルアラニン (Phe, F) TTC, TTT
 プロリン (Pro, P) CCA, CCC, CCG, CCT
 セリン (Ser, S) AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
 トレオニン (Thr, T) ACA, ACC, ACG, ACT
 トリプトファン (Trp, W) TGG
 チロシン (Tyr, Y) TAC, TAT
 バリン (Val, V) GTA, GTC, GTG, GTT
 終結シグナル (終了) TAA, TAG, TGA

10

20

30

40

50

【0073】

遺伝暗号の重要で周知の特色は、タンパク質を作るのに使用されるアミノ酸の大半について、1つを超えるコードヌクレオチドトリプレット(上記で例示された)を利用しうる、その冗長性である。したがって、いくつかの異なるヌクレオチド配列が、所与のアミノ酸配列をコードしうる。このようなヌクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ酸配列の産生を結果としてもたらずので(ある特定の生物は、一部の配列を、他の配列より効率的に翻訳しうるが)、機能的に同等であると考えられる。さらに、時折、所与のヌクレオチド配列内では、プリンまたはピリミジンのメチル化改変体を見出すことができる。このようなメチル化は、トリヌクレオチドコドンと、対応するアミノ酸とのコード関係には影響を及ぼさない。

【0074】

前出の点では、DNAまたはRNAを、アミノ酸配列に翻訳する遺伝暗号を使用して、ポリペプチドのアミノ酸配列を導出するのに、バイオマーカータンパク質(またはその任意の部分)をコードするDNAまたはRNAのヌクレオチド配列を使用することができる。同様に、ポリペプチドのアミノ酸配列については、ポリペプチドをコードしうる、対応するヌクレオチド配列を、遺伝暗号から推定することができる(その冗長性のために、任意の所与のアミノ酸配列について、複数の核酸配列をもたらずであろう)。したがって、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列についての、本明細書における記載および/または開示は、ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列についての記載および/または開示も含むと考えるものとする。同様に、本明細書における、ポリペプチドのアミノ酸配列についての記載および/または開示は、アミノ酸配列をコードしうる、全ての可能なヌクレオチド配列についての記載および/または開示も含むと考えるものとする。

【0075】

加えて、当業者は、集団(例えば、ヒト集団)内には、アミノ酸配列の変化をもたらず、DNA配列の多型が存在しうることを理解するであろう。このような遺伝子多型は、自然の対立遺伝子変異に起因して、集団内の個体間に存在しうる。対立遺伝子とは、所与の

遺伝子座において代替的に生じる遺伝子群のうちの1つである。加えて、RNAの発現レベルに影響を及ぼすDNA多型はまた、その遺伝子の全発現レベルにも影響を及ぼしうる（例えば、調節または分解に影響を及ぼすことにより）ことが理解されるであろう。

【0076】

本明細書では「対立遺伝子改変体」と互換的に使用される「対立遺伝子」という用語は、遺伝子またはその部分の代替的形態を指す。対立遺伝子は、相同な染色体上の、同じ遺伝子座または位置を占有する。対象が、遺伝子の2つの同一な対立遺伝子を有する場合、対象は、遺伝子または対立遺伝子についてホモ接合性であるという。対象が、遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を有する場合、対象は、遺伝子または対立遺伝子についてヘテロ接合性であるという。例えば、バイオマーカーの対立遺伝子は、単一のヌクレオチドにおいて互いに異なる場合もあり、いくつかのヌクレオチドにおいて互いに異なる場合もあり、ヌクレオチドの置換、欠失、および挿入を含みうる。遺伝子の対立遺伝子はまた、1または複数の変異を含有する遺伝子の形態でもありうる。

10

【0077】

本明細書で互換的に使用される「遺伝子の多型領域の対立遺伝子改変体」または「対立遺伝子改変体」という用語は、集団内の遺伝子のこの領域内で見出される、いくつかの可能なヌクレオチド配列のうちの1つを有する、遺伝子の代替的形態を指す。本明細書で使用される場合、対立遺伝子改変体は、機能的な対立遺伝子改変体、非機能的な対立遺伝子改変体、SNP、変異、および多型を包含することを意図する。

【0078】

「一塩基多型」(SNP)という用語は、対立遺伝子の配列間の変異部位である、単一のヌクレオチドにより占有された多型部位を指す。部位は通例、対立遺伝子の高度に保存された配列（例えば、集団のメンバー100例中1例または1000例中1例未満において変動する配列）を先行させ、これを後続させる。SNPは通例、多型部位における、1つのヌクレオチドによる、別のヌクレオチドの置換に起因して起こる。SNPはまた、基準対立遺伝子と比べた、ヌクレオチドの欠失またはヌクレオチドの挿入からも起こりうる。多型部位は、基準塩基以外の塩基により占有されていることが典型的である。例えば、基準対立遺伝子が、多型部位において、塩基「T」（チミジン）を含有する場合、変更された対立遺伝子は、多型部位において、「C」（シチジン）、「G」（グアニン）、または「A」（アデニン）を含有しうる。SNPは、タンパク質をコードする核酸配列内で生じる可能性があり、この場合、SNPは、欠損性の改変体タンパク質もしくは他の形の改変体タンパク質、または遺伝子疾患をもたらしうる。このようなSNPは、遺伝子のコード配列を変更し、したがって、別のアミノ酸を指定する（「ミスセンス」SNP）場合があり、またはSNPは、終止コドンを導入する（「ナンセンス」SNP）場合がある。SNPが、タンパク質のアミノ酸配列を変更しない場合、SNPは、「サイレント」と呼ばれる。SNPはまた、ヌクレオチド配列の非コード領域内でも生じうる。これは、例えば、選択的スプライシングの結果としての欠損性のタンパク質発現を結果としてもたらしうる場合もあり、タンパク質の機能に対して影響を及ぼさない場合もある。

20

30

【0079】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」および「組換え遺伝子」という用語は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子を指す。このような自然の対立遺伝子変異は、所与の遺伝子のヌクレオチド配列内で、1~5%の分散を結果としてもたらしうるということが典型的である。代替的な対立遺伝子は、いくつかの異なる個体において、目的の遺伝子をシーケンシングすることにより同定することができる。これは、様々な個体における同じ遺伝子座を同定するハイブリダイゼーションプローブを使用することにより、たやすく実行することができる。自然の対立遺伝子変異の結果であり、機能的活性を変更しない、あらゆるかつ全てのこのようなヌクレオチド変異および結果として生じるアミノ酸多型または変異は、本発明の範囲内にあることが意図される。

40

【0080】

50

別の実施形態では、バイオマーカー核酸分子は、少なくとも7、15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3500、4000、4500、またはそれ超のヌクレオチドの長さであり、ストリンジェントな条件下で、本発明のマーカ−に対応する核酸分子または本発明のマーカ−に対応するタンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズする。本明細書で使用される場合、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件であって、その下では、互いと少なくとも60%（65%、70%、75%、80%、好ましくは85%）同一なヌクレオチド配列が、互いとハイブリダイズしたままであることが典型的である条件について記載することを意図する。このようなストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、N.Y（1989年）の、6.3.1~6.3.6節において見出すことができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の、好ましい、非限定的な例は、約45 で、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）中のハイブリダイゼーションとそれに続く、50~65 で、0.2×SSC、0.1%のSDS中の、1回または複数回の洗浄である。

10

【0081】

集団内に存在しうる、本発明の核酸分子の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列の変化を、変異により導入し、これにより、核酸分子によりコードされるタンパク質の生物学的活性を変更せずに、コードされるタンパク質のアミノ酸配列の変化をもたらすことをさらに理解するであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基においてアミノ酸置換をもたらす、ヌクレオチド置換を施すことができる。「非必須」アミノ酸残基が、生物学的活性を変更せずに、野生型配列から変更されうる残基であるのに対し、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要である。例えば、多様な種のホモログの間で保存されないか、または半保存的であるに過ぎないアミノ酸残基は、活性に必須ではない可能性があるため、変更のための標的となる可能性が高いであろう。代替的に、多様な種（例えば、マウスおよびヒト）のホモログの間で保存されるアミノ酸残基は、活性に必須でありうるため、変更のための標的とならない可能性が高いであろう。

20

30

【0082】

したがって、本発明の別の態様は、活性に必須でないアミノ酸残基の変化を含有する、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子に関する。このようなポリペプチドは、アミノ酸配列が、本発明のマーカ−に対応する、天然に存在するタンパク質とは異なるが、生物学的活性を保持する。一実施形態では、バイオマーカータンパク質は、本明細書に記載されるバイオマーカータンパク質のアミノ酸配列と、少なくとも約40%同一であり、50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、87.5%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ超同一なアミノ酸配列を有する。

【0083】

改変体タンパク質をコードする単離された核酸分子は、1または複数のアミノ酸残基の置換、付加、または欠失を、コードされるタンパク質に導入するように、1または複数のヌクレオチドの置換、付加、または欠失を、本発明の核酸のヌクレオチド配列に導入することにより創出することができる。変異は、部位指向変異誘発およびPCR媒介型変異誘発など、標準的な技法により導入することができる。保存的アミノ酸置換は、1または複数の、予測される非必須アミノ酸残基において施すことが好ましい。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基を、類似する側鎖を有するアミノ酸残基で置きかえた置換である。当技術分野では、類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが規定されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を伴うアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を伴うアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電

40

50

極性側鎖を伴うアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を伴うアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ-分枝型側鎖を伴うアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を伴うアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。代替的に、変異は、飽和変異誘発などにより、コード配列の全部または一部に沿って、ランダムに導入することができ、結果として得られる変異体を、生物学的活性についてスクリーニングして、活性を保持する変異体を同定することができる。変異誘発に続き、コードされるタンパク質を、組換えにより発現させ、タンパク質の活性を決定することができる。

10

【0084】

本発明の別の態様は、バイオマーカータンパク質およびその生物学的に活性な部分の使用に関する。一実施形態では、マーカーに対応する天然ポリペプチドは、標準的なタンパク質精製法を使用する、適切な精製スキームにより、細胞または組織供給源から単離することができる。別の実施形態では、本発明のマーカーに対応するポリペプチドを、組換えDNA法により作製する。組換え発現に対する代替法として、本発明のマーカーに対応するポリペプチドは、標準的なペプチド合成法を使用して、化学的に合成することができる。

【0085】

バイオマーカーポリペプチドの生物学的に活性な部分は、本明細書に記載される、バイオマーカータンパク質のアミノ酸配列と十分に同一であるか、またはこれに由来するが、全長タンパク質よりも少ない数のアミノ酸を含み、対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を呈するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。生物学的に活性な部分は、対応するタンパク質の少なくとも1つの活性を伴うドメインまたはモチーフを含むことが典型的である。本発明のタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、またはそれ超のアミノ酸の長さであるポリペプチドでありうる。さらに、タンパク質の他の領域を欠失させた、他の生物学的に活性な部分は、組換え法により調製し、本発明のポリペプチドの天然形態の機能的活性のうち1または複数について評価することができる。

20

30

【0086】

好ましいポリペプチドは、本明細書に記載される核酸分子によりコードされるバイオマーカータンパク質のアミノ酸配列を有する。他の有用なタンパク質は、これらの配列のうち1つと実質的に同一（例えば、少なくとも約40%、好ましくは、50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）であり、対応する天然に存在するタンパク質のタンパク質の機能的活性を保持するが、自然の対立遺伝子変異または変異誘発に起因して、アミノ酸配列が異なる。

40

【0087】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の同一性パーセントを決定するには、最適の比較を目的として、配列をアラインする（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適のアラインメントのために、第1のアミノ酸または核酸配列の配列内に、ギャップを導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列内の位置が、第2の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占有される場合、分子は、その位置において同一である。2つの配列の間の同一性パーセントとは、配列により共有される同一な位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 同一な位置の数 / 位置の総数（例えば、重複する位置）× 100）。一実施形態では、2つの配列は、同じ長さである。

50

【0088】

2つの配列の間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列の比較のために活用される数学的アルゴリズムの、好ましい、非限定的な例は、KarlinおよびAltschul(1990年)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、87巻:2264~2268頁のアルゴリズムであって、KarlinおよびAltschul(1993年)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、90巻:5873~5877頁における通りに改変されたアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschulら(1990年)、J. Mol. Biol., 215巻:403~410頁のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTによるヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得るために、スコア=100、ワード長=12とするNBLASTプログラムにより実施することができる。BLASTによるタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得るために、スコア=50、ワード長=3とするXBLASTプログラムにより実施することができる。比較を目的として、ギャップを施されたアラインメントを得るために、Altschulら(1997年)、Nucleic Acids Res., 25巻:3389~3402頁において記載されている通り、Gapped BLASTを活用することができる。代替的に、PSI-Blastを使用して、分子間の遠隔的關係を検出する反復的検索を実施することができる。BLAST、Gapped BLAST、およびPSI-Blastプログラムを活用する場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)の、デフォルトのパラメータを使用することができる。ncbi.nlm.nih.govにおけるNational Center for Biotechnology Information(NCBI)のウェブサイトを参照されたい。配列の比較のために活用される数学的アルゴリズムの、別の好ましい、非限定的な例は、MyersおよびMiller(1988年)、Comput Appl Biosci, 4巻:11~17頁のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部である、ALIGNプログラム(version 2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するために、ALIGNプログラムを活用する場合、PAM120重みづけ残基表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用することができる。局所的配列類似性の領域およびアラインメントを同定するための、さらに別の有用なアルゴリズムは、PearsonおよびLipman(1988年)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、85巻:2444~2448頁において記載されている、FASTAアルゴリズムである。ヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較するために、FASTAアルゴリズムを使用する場合、PAM120重みづけ残基表は、例えば、k-タプル値を2として使用することができる。

10

20

30

【0089】

2つの配列の間の同一性パーセントは、ギャップの許容を伴うかまたは伴わずに、上記で記載した技法と同様の技法を使用して決定することができる。同一性パーセントの計算では、正確なマッチだけをカウントする。

【0090】

本発明はまた、バイオマーカータンパク質に対応する、キメラまたは融合タンパク質も提供する。本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、異種ポリペプチド(すなわち、マーカーに対応するポリペプチド以外のポリペプチド)に作動可能に連結した、本発明のマーカーに対応するポリペプチドの全部または一部(好ましくは、生物学的に活性な部分)を含む。融合タンパク質内で、「作動可能に連結された」という用語は、本発明のポリペプチドと、異種ポリペプチドとを、互いとインフレームで融合させていることを示すように意図する。異種ポリペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端と融合させることができる。

40

【0091】

1つの有用な融合タンパク質は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドを、GST

50

配列のカルボキシル末端と融合させた、GST融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、本発明の組換えポリペプチドの精製を容易としうる。

【0092】

別の実施形態では、融合タンパク質は、異種シグナル配列、免疫グロブリン融合タンパク質、毒素、または他の有用なタンパク質配列を含有する。本発明のキメラおよび融合タンパク質は、標準的な組換えDNA法により作製することができる。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動化DNA合成器を含む従来の技法により合成することができる。代替的に、遺伝子断片のPCR増幅は、2つの連続的な遺伝子断片の間の相補的な突出をもたらすアンカープライマーを使用して実行することができ、その後、これを、アニールさせ、再増幅して、キメラ遺伝子配列を生成することができる（例えば、Ausubelら、前出を参照されたい）。さらに、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をあらかじめコードする、多くの発現ベクターが、市販されている。本発明のポリペプチドをコードする核酸は、融合部分を、本発明のポリペプチドに、インフレームで連結するように、このような発現ベクターへとクローニングすることができる。

10

【0093】

シグナル配列を使用して、分泌されるタンパク質または目的の他のタンパク質の分泌および単離を容易とすることができる。シグナル配列は、1または複数の切断事象において、分泌中に成熟タンパク質から一般に切断される疎水性アミノ酸のコアを特徴とすることが典型的である。このようなシグナルペプチドは、それらが、分泌経路を通過するときに、シグナル配列の、成熟タンパク質からの切断を可能とするプロセッシング部位を含有する。したがって、本発明は、シグナル配列を有する、記載されるポリペプチドのほか、シグナル配列が、タンパク質分解により切断されたポリペプチド（すなわち、切断産物）に関する。一実施形態では、シグナル配列をコードする核酸配列を、発現ベクター内で、通常分泌されないか、またはその他の点で、単離することが困難なタンパク質など、目的のタンパク質に作動可能に連結することができる。シグナル配列は、発現ベクターが形質転換される真核生物宿主などからのタンパク質の分泌を導き、シグナル配列は、その後、または共時的に、切断される。次いで、タンパク質は、細胞外培地から、当技術分野で認知された方法により、たやすく精製することができる。代替的に、GSTドメインを伴うなど、精製を容易とする配列を使用して、シグナル配列を、目的のタンパク質に連結することができる。

20

30

【0094】

本発明はまた、本明細書に記載されるバイオマーカーポリペプチドの改変体にも関する。このような改変体は、アゴニスト（模倣物（mimetic））またはアンタゴニストとして機能しうる、変更されたアミノ酸配列を有する。改変体は、変異誘発、例えば、個別の点変異または切断により生成することができる。アゴニストは、タンパク質の天然に存在する形態と実質的に同じ生物学的活性、またはタンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを保持しうる。タンパク質のアンタゴニストは、例えば、目的のタンパク質を含む、細胞内シグナル伝達カスケードの下流または上流のメンバーに競合的に結合することにより、タンパク質の天然に存在する形態の活性のうちの1または複数を阻害しうる。したがって、限定された機能の改変体による処置により、特異的な生物学的効果を誘発することができる。タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体による対象の処置は、タンパク質の天然に存在する形態による処置と比べて、対象における少ない副作用を有しうる。

40

【0095】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターを導入した宿主細胞に関する。本明細書では、「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語を、互換的に使用する。このような用語は、特定の対象細胞を指すだけでなく、このような細胞の子孫または潜在的な子孫も指すことが理解される。続く世代には、変異または環境的影響に起因して、ある特定の修飾が生じうるため、このような子孫は、実のところ、親細胞と同一でない場合もあるが、本明細書で使用される用語の範囲内に依然として含まれる。

50

【 0 0 9 6 】

宿主細胞は、任意の原核細胞（例えば、E . c o l i ）または真核細胞（例えば、昆虫細胞、酵母、または哺乳動物細胞）でありうる。

【 0 0 9 7 】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション法を介して、原核細胞または真核細胞に導入することができる。本明細書で使用される場合、「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、外来核酸を、宿主細胞に導入するための、当技術分野で認知された様々な技法であって、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、D E A E - デキストラン媒介型トランスフェクション、リポフェクション、または電気穿孔を含む技法を指すことを意図する。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするのに適する方法は、S a m b r o o k ら（前出）、および他の実験室マニュアルにおいて見出すことができる。

10

【 0 0 9 8 】

哺乳動物細胞の安定的なトランスフェクションのために、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション法に応じて、ほんのわずかな割合の細胞だけが、外来DNAを、それらのゲノムに組み込みうることが公知である。これらの組み込み体を同定および選択するために、選択可能マーカー（例えば、抗生物質に対する抵抗性についての）をコードする遺伝子を、一般に、目的の遺伝子と共に、宿主細胞に導入する。好ましい選択可能マーカーは、G 4 1 8、ハイグロマイシン、およびメトトレキサートなどの薬物に対する抵抗性を付与する選択可能マーカーを含む。導入される核酸を、安定的にトランスフェクトされた細胞は、薬物による選択（例えば、選択可能マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は存続する一方、他の細胞は死滅する）により同定することができる。

20

【表 1 - 1】

表 1

配列番号: 1 **ヒト IL-2 cDNA 配列**

```

1 atgtacagga tgcgaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaaacagt
61 gcacotactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat
121 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaaactcac caggatgctc
181 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa
241 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcct aatttagctc aaagcaaaaa ctttcaactta
301 agacccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaaactaa gggatctgaa
361 acaacattca tgtgtgaata tgotgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga
421 tggattacct ttgtcaaaag catcatctca acactgaact ga

```

10

配列番号: 2 **ヒト IL-2 アミノ酸配列**

```

1 myrmqllsci alsialvtns aptesstkkk qlqlchllld lqmilinginn yknpkitrml
61 tffkfympkka eelkhlgcle eelkpleevl nlaqsknfhi rprdlisni vivlelkgs
121 ttfmceyade nativeflar wltfcqsiis tit

```

配列番号: 3 **チンパンジー IL-2 cDNA 配列**

```

1 atgtacagga tgcgaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaaacagt
61 gcacotactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat
121 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaaactcac caggatgctc
181 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa
241 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcct aatttagctc aaagcaaaaa ctttcaactta
301 agacccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaaactaa gggatctgaa
361 acaacattca tgtgtgaata tgotgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga
421 tggattacct ttgtcaaaag catcatctca acactgaact ga

```

20

配列番号: 4 **チンパンジー IL-2 アミノ酸配列**

```

1 myrmqllsci alsialvtns aptesstkkk qlqlchllld lqmilinginn yknpkitrml
61 tffkfympkka eelkhlgcle eelkpleevl nlaqsknfhi rprdlisni vivlelkgs
121 ttfmceyade nativeflnr wltfcqsiis tit

```

配列番号: 5 **サル IL-2 cDNA 配列**

```

1 atgtacagga tgcgaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaaacagt
61 gcacotactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat
121 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaaactcac caggatgctc
181 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaattga aacatcttca gtgtctagaa
241 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcct aatttagctc aaagcaaaaa ctttcaactta
301 agagatacca aggacttaat cagcaatata aacgtaatag ttctggaaact aaagggatct
361 gaacacaacc tgatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac
421 agatggatca cttttgtca aagcatcctc tcaacactga cctga

```

30

配列番号: 6 **サル IL-2 アミノ酸配列**

```

1 myrmqllsci alsialvtns aptesstkkk qlqlchllld lqmilinginn yknpkitrml
61 tffkfympkka eelkhlgcle eelkpleevl nlaqsknfhi rdkdlisni nvivlelkgs
121 eettmceyad etativefln rwltfcqsii stit

```

配列番号: 7 **イヌ IL-2 cDNA 配列**

```

1 atgtacaaaa tgcgaactcct gtcttgcatt gcactgacgc ttgtacttgt cgcaaaacagt
61 gcacotattta cttcaagctc tacaagaaga acagagcaac agatggagca attactgctg

```

40

【表 1 - 2】

```

121 gattttacagt tgccttttgaa tggagtttaat aattatgaga acccccaact ctccaggatg
181 ctccacattta agtttttacac gcccaagaag gccacagaat ttacacacct tcaatgtcta
241 gcageagaac tcaaaaacct ggaggaagtg ctaggtttac ctcaaagcaa aaacgttcac
301 ttgacagaca ccaaggaatt aatcagcaat atgaatgtaa cacttctgaa actaaaggga
361 totgaacaaa gttacaactg tgaatatgat gaagagacag caaccattac agaatttctg
421 aacaaaatgga ttacottttg tcaaaagcacc ttctcaacac tgacttga

```

配列番号: 8 イヌ IL-2 アミノ酸配列

```

1 mykmqlisci altlylvans apitsesstke tegqmeqlll diqlllngvn nyenpqlsrm
61 lufkfytpkk atefthiqcl aeelknlcev lglpqsknvh ldtkkelism mvvlliklkg
121 setsynceyd detatitEFI nkwtfcqsi fslit

```

10

配列番号: 9 マウス IL-2 cDNA 配列

```

1 atgtacagca tgcagctcgc atcctgtgtc acattgacac ttgtgcacct tgtcaacagc
61 gcccccactt caagctccac ttcaagctct acagcggagc cacagcagca gcagcagcag
121 cagcagcagc agcagcagca cctggagcag ctgttgatgg acctacagga gctcctgagc
181 aggatggaga attacaggaa cctgaaactc cccaggatgc tcaccttcaa attttacttg
241 cccaagcagg ccacagaatt gaaagatctt cagtgcctag aagatgaact tggacctctg
301 cggcatgttc tggatttgac tcaaaagcaaa agctttcaat tggagatgc tgagaatttc
361 atcagcaata tcagagtcaac tgttgtaaaa ctaaaaggct ctgacaacac atttgagtgc
421 caattcgatg atgagtcagc aactgtggtg gactttctga ggagctggat agcttctctg
481 caaagcatca totcaacasy cctcsetaa

```

配列番号: 10 マウス IL-2 アミノ酸配列

```

1 nyemqlascv tltvlilvns aptssstsa tsaqqqqqy qqqqqghleq lmdlqellis
61 rmenyrniki prmitfkfyl pkqateikdl qoledelegpl rhvidltqsk sfqledaenf
121 isnirvtvyk lksdntfec qiddesatv dflrxwiafc qsietspq

```

20

配列番号: 11 ラット IL-2 cDNA 配列

```

1 atgtacagca tgcagctcgc atcctgtgtt gcaactgacg ttgtcctcct tgtcaacagc
61 gcccccactt caagcctctc aaaggaaaac cagcagcacc tggagcagct gttgctggac
121 ttacaggttc cctgagagg gatcgataat tacaagaatc tgsaaactcc catgatgctc
181 acgtttaaat tttacttggc caagcaggcc acagaattga aacatcttea gtgctcggaa
241 aatgaactcg gagctctgca gctgtgtttg gatttgacac aaagcaaaaag ctttcaactg
301 gaagacgctg gaaatttcat cagcaatata agagttaact tggtaaaaac aaagggctct
361 gaaaacaaat ttgagtgcca attcgatgat gagccagcaa ctgtggtgga atttcngagg
421 agatggatag caatctgcca aagcatcacc tcaacaatga ctcagtaa

```

配列番号: 12 ラット IL-2 アミノ酸配列

```

1 nysmqlascv altlvlilvns apusspaker qghleqlild lgvllrgids yknkkipmmi
61 tfkfyipkqa telkhlqole nelgalqrvi ditqsksfhl edagnfleni rvtvvhkks
121 enkfecqfdd epatvveflr rwialcqsii stmtg

```

30

【0099】

* 表 1 には、RNA 核酸分子（例えば、チミンをウリジン（uridine）で置きかえた）、コードされるタンパク質のオーソログをコードする核酸分子のほか、それらの全長にわたり、表 1 に列挙された任意の配列番号の核酸配列、またはその部分と、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、またはそれ超の同一性を有する核酸配列を含む DNA または RNA 核酸配列が含まれる。本明細書でさらに記載される通り、このような核酸分子は、全長核酸の機能を有する。

40

【0100】

* 表 1 には、タンパク質のオーソログのほか、それらの全長にわたり、表 1 に列挙された任意の配列番号のアミノ酸配列、またはその部分と、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、またはそれ超の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド分子が含まれる。本明細書でさら

50

に記載される通り、このようなポリペプチドは、全長ポリペプチドの機能を有しうる。

【0101】

IL-2は、最大で3つの個別のサブユニットからなり、その異なる会合が、IL-2に対するそれらのアフィニティーが異なる受容体形態をもたらしうる、IL-2受容体(IL-2R)に結合することにより、その作用を媒介する。(CD25)サブユニットと、(CD122)サブユニットと、(CD132)サブユニットとの会合は、IL-2に対する、三量体の高アフィニティー受容体を結果としてもたらず。サブユニットとサブユニットとからなる、二量体のIL-2受容体を、中アフィニティーIL-2Rと称する。サブユニットは、単量体の低アフィニティーIL-2受容体を形成する。二量体の中アフィニティーIL-2受容体は、IL-2に、三量体の高アフィニティー受容体の、約100分の1のアフィニティーで結合するが、二量体および三量体のIL-2受容体改変体は両方とも、IL-2への結合時に、シグナルを伝達することが可能である(Minamiら(1993年)、Annu. Rev. Immunol.、11巻:245~268頁)。よって、サブユニットであるCD25は、IL-2シグナル伝達に必須ではない。サブユニットが、その受容体への高アフィニティーの結合を付与するのに対し、サブユニットであるCD122と、サブユニットとは、シグナル伝達に枢要である(Kriegら(2010年)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、107巻:11906~11911頁)。(休止)CD4⁺フォークヘッドボックスP3(FoxP3)⁺調節性T細胞(Treg)により、CD25を含む三量体のIL-2受容体が発現される。三量体のIL-2受容体はまた、従来型の活性化T細胞上でも一過性に誘導されるが、休止状態では、これらの細胞は、二量体のIL-2受容体だけを発現する。Tregは、in vivoにおいて、一貫して、最高レベルのCD25を発現する(Fontenotら(2005年)、Nat. Immunol.、6巻:1142~1151頁)。

10

20

30

【0102】

天然IL-2は、1976年に、Tリンパ球の増殖因子として、最初に同定された。天然IL-2は、ヒトクラスター分類(human cluster designation)(CD)4⁺T細胞およびいくつかのCD8⁺T細胞により産生され、主に活性化T細胞、特にCD4⁺ヘルパーT細胞により合成される。天然IL-2は、T細胞の増殖および分化を刺激し、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の発生、ならびに末梢血リンパ球の、細胞傷害性細胞およびリンホカイン活性化キラー(LAK)細胞への分化を誘導し、T細胞による、サイトカインおよび細胞溶解性分子の発現を促進し、B細胞の増殖および分化、ならびにB細胞による免疫グロブリンの合成を容易とし、ナチュラルキラー(NK)細胞の発生、増殖、および活性化を刺激する(例えば、Waldmann(2009年)、Nat. Rev. Immunol.、6巻:595~601頁;OlejniczakおよびKasprzak(2008年)、Med. Sci. Monit.、14巻:ra179~189頁;Malek(2008年)、Annu. Rev. Immunol.、26巻:453~479頁を参照されたい)。

40

【0103】

IL-2は、免疫応答の発生において、中心的な役割を果たすことが公知である。がんの臨床試験では、高用量の組換えIL-2(例えば、8時間ごと、最大で14用量にわたる、600,000国際単位(IU)/kgのIVボラス用量)は、転移性腎細胞癌(RCC)および転移性黒色腫における抗腫瘍活性を裏付けた。したがって、このような高用量IL-2は、欧州では、1989年に、米国では、1992年に、転移性RCCの処置について承認された。1998年には、転移性黒色腫を伴う患者を処置するための承認が得られた。組換えヒトIL-2(アルデスロイキン)(Proleukin(登録商標)Novartis Inc.およびPrometheus Labs Inc.)は、現在のところ、米国食品医薬品局(USFDA)により承認されている。

【0104】

しかし、IL-2は、エフェクター細胞の拡大および活性を媒介するだけでなく、また

50

、末梢における免疫寛容の維持に枢要に関与するという点で、免疫応答において二重の機能を有する。末梢における自己寛容の根底をなす主要な機構は、T細胞内の、IL-2誘導性活性化誘導型細胞死(AICD)である。AICDとは、完全な活性化T細胞が、CD95(Fasとしてまた公知)またはTNF受容体などの細胞表面発現型細胞死受容体の係合を介して、プログラム細胞死を経る過程である。高アフィニティーIL-2受容体を発現する抗原活性化T細胞(IL-2へのあらかじめの曝露の後における)が、増殖中に、T細胞受容体(TCR)/CD3複合体を介して、抗原により再刺激されると、Fasリガンド(FasL)および/または腫瘍壊死因子(TNF)の発現が誘導され、細胞は、Fasに媒介されるアポトーシスに対して感受性となる。この過程は、IL-2依存性であり(Lenardo(1991年)、Nature、353巻:858~861頁)、STAT5を介して媒介される。Tリンパ球内のAICD過程により、自己抗原に対してだけでなく、腫瘍抗原など、明らかに宿主による組成の一部ではない遷延性抗原に対しても、寛容が確立されうる。

10

【0105】

さらに、IL-2はまた、末梢Tregの維持にも関与する(Fontenotら(2005年)、Nat. Immunol.、6巻:1142~1151頁;D'CruzおよびKlein(2005年)、Nat. Immunol.、6巻:1152~1159頁;MalloyおよびPowrie(2005年)、Nat. Immunol.、6巻:1171~1172頁)。in vivoの生理学的濃度において、IL-2は、Tregの発生、拡大、および生存に必要である(MalekおよびBayer(2004年)、Nat. Rev. Immunol.、4巻:665~674頁;Nelson(2004年)、J. Immunol.、172巻:3983~3988頁)。実のところ、免疫エフェクター細胞を刺激することを意図した、HSC T後早期の低用量IL-2投与は実際、低および中アフィニティー受容体を発現することが典型的なTcon上よりも、Treg上において、高アフィニティーIL-2受容体(CD25)がより多く発現することに起因して、in vivoにおいてTregを優先的に拡大した(Zornら(2006年)、Blood、108巻:1571~1579頁)。ヒトでは、IL-2は、Treg内のFOX P3発現を調節し、in vivoにおけるTregの拡大を誘導する(Zornら(2006年)、Blood、108巻:1571~1579頁)。ステロイド不応性cGVHDを有する患者は、in vivoにおいて、機能的なTregを優先的に増大させることにより、低用量IL-2に应答し(例えば、CD4+Tconカウントに影響を与えずに、Tregカウントは、>7倍上昇し、Treg:Tcon比の中央値は、ベースラインから>5倍増大した(p<0.001)、評価可能な患者の約50%が、皮膚、関節/筋膜/筋肉、肝臓、および末梢神経を含む、cGVHD病変(involverment)の部位において、NIH基準に従う、客観的部分应答(PR)を示した(Korethら(2011年)、N. Engl. J. Med.、365巻:2055~2066頁;Pavleticら(2006年)、Biol. Blood Marrow Transplant.、12巻:252~266頁)。例えば、わずかな应答を有するPRまたは安定病態(SD)である患者15例中12例は、長期IL-2を持続し、長期IL-2における患者12例中10例は、中央値を13カ月間とする追跡にわたり、平均値を60%とするグルコルチコイド漸減(範囲、25~100%)中に、臨床应答を持続した。TregカウントおよびTreg:Tcon比は、8週間の時点で上昇を維持し(両方について、ベースラインと対比したp<0.001)、次いで、IL-2の中止後に低下した。さらに、IL-2は、Tregによる高レベルのFox P3の発現を増強し、自家Tconの阻害が機能的に可能であった。Tregによる免疫応答は、長期IL-2療法中に持続した(Korethら(2011年)、N. Engl. J. Med.、365巻:2055~2066頁)。

20

30

40

【0106】

血漿IL-2レベルは、1週目までに急速に上昇し、次いで、Tregカウントが上昇する間、持続的な毎日のIL-2投与にも拘らず低下した(Matsuoから(201

50

3年)、Sci. Transl. Med.、5巻：179ra43)。Tregの絶対数が増大し、IL-2による治療期間中に、Treg上のCD25発現のさらなる増大が見られるにつれ、IL-2レベルは低下した。IL-2を開始して1週間以内に、Tregのホメオスタシスは、大幅に増強され、Tregの増殖が、急速に誘導され、胸腺のTreg新生の増大は、4～6週目においてピークに達し、Treg内の細胞生存マーカーであるBcl-2は、4週目以降、上昇したが、これは、8週目にIL-2を中断したところ、可逆性であった(Matsuokaら(2013年)、Sci. Transl. Med.、5巻：179ra43)。これと比較して、Tconのホメオスタシスに対する影響は、限定的であった。免疫機能についての検討は、IL-2の相対的な機能的欠損およびTregによるpSTAT5の活性化を伴う、IL-7およびIL-15のレベルの上昇に起因して、cGVHDが、CD4 Tconによる、Stat5の構成的活性化を特徴とすることを明らかにした(Matsuokaら(2013年)、Sci. Transl. Med.、5巻：179ra43)。低用量IL-2療法は、IL-2を開始して1週間以内に、cGVHD患者における、TregによるStat5のリン酸化を、優先的に増強した。TregによるpSTAT5活性化：TconによるpSTAT5活性化比は、2週間後までに、正常範囲へと回復し、IL-2療法の持続期間にわたり維持された。また、自発性およびFas誘導アッセイにより評価されたアポトーシス抵抗性も、Tregにおいて、Tconと比較して優先的に誘導された。低用量IL-2は、TconよりもTregのホメオスタシスの均衡を回復させる可能性があり、免疫寛容を促進しうる(Matsuokaら(2013年)、Sci. Transl. Med.、5巻：179ra43)。

【0107】

同様のTregの増強および臨床的利益はまた、HCV誘導性血管炎においても記録された(Saadounら(2011年)、N. Engl. J. Med.、365巻：2067～2077頁)。低用量IL-2は、小児におけるGVHDの処置のためには使用されていないが、同種および自家HSCTのいずれの後においても、小児における他の適応症のために、安全に使用されている。2つの研究が、SCIL-2を、高リスク白血病および/または再発型転移性ユーイング肉腫を伴う移植後患者において、 $1 \sim 2 \times 10^6$ IU/m²/日の範囲の用量で、ナチュラルキラー(NK)細胞を誘導することにより再発を防止する戦略として使用した(Liuら(2008年)、Bone Marrow Transplant、42巻：535～539頁；Schlegelら(2011年)、Best Pract. Res. Clin. Haematol.、24巻：443～452頁)。1つの研究では、患者の年齢の中央値は、11歳(範囲：4～16歳)であり、治療の持続期間は、15～250日間の範囲であった(Schlegelら(2011年)、Best Pract. Res. Clin. Haematol.、24巻：443～452頁)。同様に、神経芽細胞腫を伴う患者における用量漸増研究では、SCIL-2を、2週間ごとに5日間ずつの6サイクルにおいて、3、6、および 9×10^6 IU/m²/日の用量で施して、NK細胞数を増進した(Ladenssteinら(2011年)、J. Clin. Oncol.、29巻：441～448頁)。この研究における患者の年齢の中央値は、4.1歳(範囲：1.8～7.4歳)であった。3つの研究全てにおいて、主要な有害作用は、発熱および注射部位における局所的炎症であった。

【0108】

「IL-2免疫療法」または「IL-2療法」という用語は、例えば、ある期間にわたる、ボラスとして、または持続的注入による静脈内投与、筋内、腹腔内、脳脊髄内(intracerebrospinal)、皮下、関節内、滑液包内、髄腔内、経口、局所、吸入、および他の公知の経路など、任意の公知の経路を介する、それを必要とする対象へのIL-2の投与を含む。一般に、IL-2の薬物動態は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、およびカニクイザルにわたり線形であるようである。皮下投与の後、IL-2の吸収は、比較的緩徐であり、平均滞留時間は、IV投与と比較して延長され

た。

【0109】

皮下（SC）経路によるIL-2投与は、ラットにおけるいくつかの複数用量研究において、最大で13週間にわたる毎日の投与について評価されている。これらの研究により、ラットにおけるSC高用量毒性プロファイルが、IV投与後の高用量毒性プロファイルと同等であることが確認された。IL-2関連所見は、リンパ球増加症、好酸球増加症、微弱の貧血、髄外造血、リンパ過形成、肝腫大、および脾腫を含んだ。肝臓、肺、リンパ節、腎臓、脾臓、および骨髄を含む多くの臓器において、浸潤性および増殖性変化が見られた。7日間の投与後に、ウサギのSC忍容性研究では、注射部位における局所的炎症性応答は、IL-2についての公知の効果、およびヒト試験において報告されている注射部位反応と符合した。

10

【0110】

したがって、動物におけるIL-2の毒性は、用量および持続期間と関連し、全ての毒性作用は、IL-2の薬理学的活性と、直接的にまたは副次的に関連することが示された。全ての種において、処置に関連する効果は、2～4週間にわたる無処置期間の後で、完全にまたは部分的に可逆性であった。所見は、IL-2のIVまたはSC投与の反復の後で同等であった。標的臓器毒性の重症度は、これらの臓器への炎症性細胞浸潤の程度と関連した。動物における生物学的効果は一般に、臨床試験において報告される効果と同様であった。しかし、これらのMTD研究は、*in vivo*におけるTregの増強のために提起される低用量IL-2ではなく、転移性RCCおよび黒色腫の処置のために使用される高用量IL-2に関する。

20

【0111】

IL-2の薬物動態は、がんを伴う患者およびHIVを伴う患者において評価されている。短時間のIV注入の後、IL-2の薬物動態プロファイルは、高血漿濃度、血管外スペースへの急速な分布、および半減期を1～2時間とする、体内からの排除を特徴とした。SC投与の後、IL-2の吸収は、緩徐であり、平均滞留時間は、IV投与と比較して延長された。HIV患者におけるIL-2の最大血漿濃度は、SC投与後2～5時間以内に達成され、終末期半減期は、5時間であると推定されたことから、吸収の延長が示唆される。

【0112】

ボラス注入についてのクリアランス速度と、持続的IV注入についてのクリアランス速度とは、ほぼ等しい。その短い半減期から予測される通り、定常状態は、注入の約6時間後に達すると予測される。SC IL-2投与についてのデータは、約35%が、血流へと吸収されたことを示唆し、HIVに感染した参加者を伴う研究で、大きなバイオアベイラビリティ（>60%）が報告された。がんまたはHIV患者における、SCまたは持続的IV投与による5日間の処置は、IL-2クリアランスの時間依存的増大を結果としてもたらした。これは、可溶性IL-2受容体の血清レベルの増大と関連した。投与サイクルの間の休薬日は、IL-2のクリアランスを、その初期の値へと回復させた。

30

【0113】

IL-2の全身除去には、少なくとも3つの機構：糸球体濾過、尿細管周囲における抽出、および誘導性受容体媒介型機構（ヒトにおける）が存在する。小型のペプチドおよびタンパク質の、糸球体後毛細血管から腎尿細管への、尿細管周囲における抽出と、その後の細胞内異化とは、糸球体濾過とは独立に生じる、腎による排除機構である。受容体媒介型クリアランスは主に、応答性細胞上の、その特異的な細胞性受容体に係合するIL-2の機能である。B細胞など、他の細胞型は、機能的なIL-2受容体を有するが、IL-2受容体の大部分は、T細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞上にある。

40

【0114】

高用量ボラスIL-2で処置された転移性黒色腫または腎細胞がんでは、CD4+ CD25+ Treg細胞のほぼ6倍の増大が観察され、循環CD4+ FOXP3+ Treg細胞の頻度は4倍増大した（AhmadzadehおよびRosenberg（

50

2006年)、Blood、107巻：2409～2414頁)。過去20年間にわたり、転移性がんを伴う患者におけるIL-2の効果について、かなりの臨床データが蓄積されている。大半のがん試験で使用される高用量のIL-2では、かなりの毒性が記録されており、腫瘍の応答は時折であるに過ぎない。発熱、低血圧、黄疸、および高窒素血症が、頻繁な合併症であり、集中治療室への収容を余儀なくさせることが多い。造血幹細胞移植(HSCT)患者は、高用量IL-2を忍容する可能性が小さい。

【0115】

長期にわたる低用量SC IL-2が、HIV感染およびがんを伴う患者において評価されている。「超低用量」IL-2についての1つの研究では、最初の寛解にあるHIVおよび非ホジキンリンパ腫を伴う7例の患者に、 1×10^6 IU/m²/日のIL-2 (Chiron)が施された(Shahら(2006年)、Clin. Cancer Res.、12巻：3993～3996頁)。約8週間の処置の後、単剤IL-2療法は、NK細胞(1.6倍)およびTreg(9倍)の統計学的に有意な、比例する増大をもたらした。他のリンパ球サブセットは、有意に変化しなかった。毒性は、軽度であり(疲労、局所的搔痒、筋痛、トランスアミナーゼの増大など)、グレード3の有害事象は見られなかった。

10

【0116】

低用量IL-2はまた、同種HSCTの後でも使用されている。1つの研究では、免疫学的移植片対白血病(GVL)効果を増強するために、IL-2(Amgen、Roche)が、持続的IV注入により、最大で3カ月間にわたり、CD6+ T細胞枯渇(TCD)移植後における、29例の無症候性血液悪性疾患患者に、 $2 \sim 6 \times 10^5$ IU/m²/日、(約 $0.6 \sim 1.8 \times 10^6$ U/m²/日のIL-2(Chiron))の範囲の用量で投与された(Soifferら(1994年)、Blood、84巻：964～971頁)。低用量IL-2の忍容は良好であり、毒性に起因して早期に離脱した参加者は、4例だけであった。急性GVHDは、参加者29例中1例だけに発症した。予期されたNK細胞の拡大に加えて、評価された8例中7例において、Tregを表す可能性が高い、CD4+ CD25+ Tリンパ球の、中央値を45%とする増大が生じた。さらに、実質的なTregの増強を示す、FOXP3発現の、約8.5倍増大の中央値も認められた(Zornら(2006年)、Blood、108巻：1571～1579頁)。低用量IL-2の忍容は良好であるようであり、同種HSCTの後における顕著なTregの拡大を伴った。

20

30

【0117】

IL-2免疫療法の非限定的な例は、当技術分野で周知であり、例えば、それらの各々が、参照により、それらの全体において、全ての目的で本明細書に組み込まれる、少なくとも、Rosenbergら(1993年)、J. Natl. Cancer Inst.、85巻：622～632頁；Guirguisら(2002年)、J. Immunother.、25巻：82～87頁；GriffithsおよびMellon(2004年)、Postgrad Med. J.、80巻：320～327頁；Yangら(2003年)、J. Clin. Oncol.、21巻：3127～2132頁；McDermottら(2005年)、J. Clin. Oncol.、23巻：133～141頁；Negrierら(2007年)、Cancer、110巻：2468～2477頁；McDermott(2009年)、Med. Oncol.、26巻：13～17頁；米国特許第5,419,900号、同第5,696,079号、同第6,045,788号、および同第6,548,055号において見出すことができる。

40

【0118】

III. 対象

一実施形態では、抗免疫障害処置が施行されるか、または抗免疫障害療法(例えば、複数の可変用量のIL-2単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量のIL-2)に対して効果的に応答することが予測される対象が、決定され、この対象は、哺乳動物(例えば、マウス、ラット、霊長動物、非ヒト哺乳動物、

50

イヌ、ネコ、ウシ、ウマなどの家畜動物)であり、好ましくはヒトである。成体対象のほか、小児対象も想定される。小児対象は、本明細書に記載される通りに処置しうるほか、最大で成体対象のために使用される用量の治療剤を使用して処置することもできる。

【0119】

本発明の方法の別の実施形態では、対象は、抗免疫障害療法(例えば、複数の可変用量のIL-2単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量のIL-2)などの処置を経ていない。さらに別の実施形態では、対象は、ステロイドなどにより、このような処置を経ていない。

【0120】

本発明の方法を使用して、免疫応答を抑制することまたはその他の方法で下方調節することが所望される多くの異なる免疫障害を処置し、かつ/またはこれらの抗免疫障害療法(例えば、複数の可変用量のIL-2単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量のIL-2)に対する応答性を決定することができる。活性化免疫細胞の機能は、免疫細胞応答を下方調節することにより阻害することができ、免疫細胞内の特異的なアネルギーを誘導することにより阻害することができ、またはこれらの両方により阻害することができる。

10

【0121】

例えば、本発明の方法を使用して、抗原を、このような方法による治療用組成物と共に共投与することにより、特異的な抗原に対する寛容を誘導することができる。特異的なタンパク質に対する寛容を誘導することができる。一実施形態では、それらに対する免疫応答が所望されない、アレルゲン(例えば、食物アレルゲン)または外来タンパク質に対する免疫応答を阻害することができる。例えば、第VII因子を施される患者は、この凝固因子に対する抗体を頻りに発生させる。本発明の方法における組換え第VII因子の共投与(または第VII因子への物理的な連結、例えば、架橋により)は、免疫応答の下方モジュレーションを結果としてもたらしうる。同様に、クローン除去の低減および/または消耗の増大(例えば、T細胞消耗)を誘導することができる。

20

【0122】

免疫応答の下方調節は、限定なしに述べると、造血幹細胞移植拒絶(例えば、移植片対宿主病(GVHD))、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、アレルギー、移植、過敏性応答などの自己免疫疾患、CD4+ T細胞の産生または機能の増大を必要とする障害、ワクチン接種効率の改善を必要とする障害、および調節性T細胞の産生または機能の増大を必要とする障害における、組織、皮膚、および他の固形臓器移植(例えば、腎臓、肝臓、心臓、および血管化複合同種移植である移植)の状況を含む、本発明に従ういくつかの「免疫障害」を処置するのに有用である。例えば、免疫細胞機能の遮断は、組織移植における組織破壊の低減を結果としてもたらす。組織移植では、移植物の拒絶は、免疫細胞による、外来物としてのその認識後、移植物を破壊する免疫反応を介して誘発されることが典型的である。移植の前または移植時における、本明細書に記載される薬剤の投与は、阻害性シグナルの発生を促進しうる。さらに、阻害はまた、免疫細胞をアネルギー化し、これにより、対象における寛容を誘導するのに十分でもありうる。長期にわたる寛容の誘導は、これらの遮断試薬の反復投与の必要性を回避する。

30

40

【0123】

免疫応答の下方モジュレーションはまた、1型糖尿病(T1D)および多発性硬化症などの自己免疫疾患を処置するのに有用でもある。多くの自己免疫性障害は、自己組織に対して反応性であり、疾患の病態に關与するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進する免疫細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性免疫細胞の活性化を防止することにより、疾患の症状を低減するか、または消失させることができる。本明細書に記載される薬剤の投与は、疾患過程に關与しうる自己抗体またはサイトカインの発生を防止するのに有用である。加えて、本発明の方法により、自己反応性免疫細胞の抗原特異的寛容であって、疾患を長期的に和らげうる寛容を誘導することができる。自己免疫性障害の防止または緩和における試薬の有効性は、ヒト自己免疫疾患についての、いくつかの十分に特徴付

50

けられた動物モデルを使用して決定することができる。例は、マウス実験型自己免疫性脳炎、MRL/lpr/lprマウスまたはNZBハイブリッドマウスにおける全身性エリテマトーデス、マウスの自己免疫性コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBラットにおける真性糖尿病、ならびにマウス実験型重症筋無力症（例えば、Paul編、Fundamental Immunology、Raven Press、New York、3版、1993年、30章を参照されたい）を含む。

【0124】

免疫細胞の活性化の阻害はまた、例えば、IgEの産生を阻害することによる、アレルギーおよびアレルギー反応の処置においても、治療的に有用である。アレルギー反応は、アレルギーの侵入の経路およびマスト細胞または好塩基球上のIgEの貯留のパターンに応じて、全身的性質の場合もあり、局所的性質の場合もある。したがって、免疫細胞に媒介されるアレルギー応答（例えば、食物に対する）は、本発明の方法に従い、局所的または全身的に阻害される。一実施形態では、アレルギーは、アレルギー性喘息である。

10

【0125】

免疫細胞の活性化の阻害はまた、免疫細胞の寄生生物およびウイルス感染においても、治療的に重要でありうる。例えば、後天性免疫不全症候群（AIDS）では、免疫細胞の活性化により、ウイルスの複製が刺激される。これらの相互作用のモジュレーションは、ウイルス複製の阻害を結果としてもたらし、これにより、AIDSの経過を改善することが可能である。これらの相互作用のモジュレーションはまた、妊娠の維持の促進においても有用でありうる。胚または胎児に対する免疫的拒絶のために、自然流産の危険性がある女性（例えば、既に自然流産をしたことがある女性または懐胎が困難であった女性）を、これらの相互作用をモジュレートする薬剤により処置することができる。

20

【0126】

本発明の方法に従う免疫応答の下方調節はまた、自家組織に対する自己免疫性の攻撃の処置においても有用でありうる。したがって、自己免疫性障害など、自己免疫性の攻撃により増悪する状態のほか、心疾患、心筋梗塞、およびアテローム性動脈硬化などの状態もモジュレートすることは、本発明の範囲内にある。

【0127】

好ましい実施形態では、免疫障害は、移植片対宿主病（例えば、慢性GVHD）である。血液悪性疾患を伴う多くの患者にとって、同種造血幹細胞移植（HSCT）は、治療の唯一の機会をもたらす。残念ながら、著明な障害が依然として存在し、疾患の再発およびGVHDは最も注目すべき障害である。HSCTを経た患者の40%超が、再発する一方、50%超が、かなりの罹患率および死亡率と関連する多系統での免疫症状発現を伴う消耗性の状態である、cGVHDを発症する（Kahlら（2007年）、Blood、110巻：2744～2748頁；Perez-Simonら（2008年）、Blood Marrow Transplant、14巻：1163～1171頁）。小児集団における発生率は低いが、cGVHDは、依然として、悪性疾患のための同種HSCT後における、再発以外による罹患率および死亡率の主要な原因であり、HSCT後100日間を超えて生存する小児の20～50%において生じる（Bairdら（2010年）、Pediatr. Clin. North Am.、57巻：297～322頁）。ドナー細胞に媒介される免疫応答は、GVLおよびGVHD反応の一因をなす。新たに生着したドナー免疫系による、残存する腫瘍細胞の認識および破壊が不十分であると、患者の悪性疾患の再発が許容される一方、宿主抗原に対する制御不能の反応は、GVHDをもたらす（Antin（1993年）、Blood、82巻：2273～2277頁；Ferraraら（2009年）、Lancet、373巻：1550～1561頁）。慢性GVHDの発症機序は、同種（ドナー/レシピエント多型）および自家（ドナー/レシピエント非多型）抗原に対する炎症性T細胞およびB細胞応答を伴い、依然として、同種HSCT後における、共通の問題であり、主要な治療的課題でもあり、長期生存者は、生活の質が損なわれることが多く、後年における死亡率が増大する（Subramaniamら（2007年）、Leukemia、21巻：853～859頁）。HCT

30

40

50

のための幹細胞の供給源としての、骨髄ではなく、動員末梢血前駆細胞の使用を増大させることの結果として、cGVHDの発生率の明らかな増大がもたらされた(Cutlerら(2001年)、J. Clin. Oncol.、19巻:3685~3691頁; Leeら(2007年)、Blood、110巻:4576~4583頁)。同種HSC Tが、鎌状赤血球貧血、免疫不全症、および先天性代謝性疾患など、非悪性適応症のためにますます実施されるようになるにつれ、小児患者におけるcGVHDの発生率は、上昇することが予測される。成人および小児の両方において、cGVHDと関連する炎症性または線維症性変化は、皮膚、眼、口、肝臓、および気道に及ぶことが最も一般的である。

【0128】

全身ステロイドは、cGVHDを処置するのに日常的に使用されているが、限定された有効性およびかなりの毒性を有する。延長ステロイド療法の、成長および骨密度に対する影響は、小児において特に重大である(Canalisaら(2002年)、J. Pediatr. Endocrinol. Metab.、15巻:1341~1345頁)。小児では、大半のサルベージ剤(salvage agent)の使用は、成人における経験から外挿されており、ミコフェノール酸モフェチル(MMF)、体外フォトフェレーシス(EEP)、およびペントスタチンを含む、少数の治療だけが小児に対する試験で調べられている(Buscaら(2000年)、Bone Marrow Transplant、25巻:1067~1071頁; Bergerら(2007年)、J. Pediatr. Hematol. Oncol.、29巻:678~687頁; Jacobsohnら(2009年)、Blood、114巻:4354~4360頁)。cGVHDのための確立された第二選択治療はない。ステロイド不応性cGVHDのために、それらの有効性は限定されているにも拘らず、さらなる免疫抑制剤が活用されることが多い。したがって、第二選択処置の選択肢は、限定されており、ステロイド不応性cGVHDは、主要な治療的課題を提起している。

【0129】

IV. 抗免疫障害療法

本発明の方法(例えば、複数の可変用量のIL-2単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量のIL-2)は、所望の対象に投与することもでき、対象が、このような療法に対するレスポンスの可能性が高いと示された場合に投与することもできる。別の実施形態では、本発明の治療法は、対象が、療法に対するレスポンスである可能性が高くないと示される場合は回避することができ、標的化および/または非標的化抗免疫療法などの代替的処置レジメンを施行することができる。

【0130】

一実施形態では、免疫障害に罹患した対象を処置する、複数の可変IL-2用量による方法であって、a)対象の血漿IL-2レベルを上昇させ、対象における、調節性Tリンパ球(Treg)の、従来型Tリンパ球(Tcon)に対する比(Treg:Tcon)を増大させる用量で、インターロイキン2(IL-2)を、対象に持続的に投与することを含む誘導レジメンを、対象に施行するステップと; b)その後、誘導レジメンの用量より高量であり、i)対象の血漿IL-2レベルを、さらに上昇させ、ii)Tregの、Tconに対する比を、さらに増大させる、IL-2の維持用量を、対象に持続的に投与することを含む少なくとも1つの維持レジメンを、対象に施行し、これにより対象を処置するステップとを含む方法が提供される。一実施形態では、誘導レジメンから生じる血漿IL-2レベルを、誘導レジメン前の、以前のピーク血漿IL-2レベルを下回るように枯渇させる。ある特定の実施形態では、IL-2維持レジメンは、対象の血漿IL-2レベルを、誘導レジメンにより誘導されるピーク血漿IL-2レベルを超えて上昇させる。「複数の可変IL-2用量による方法」という用語は、1つを超えるIL-2投与を含む治療的介入であって、1つを超えるIL-2投与が、1つを超えるIL-2用量を使用する治療的介入を指す。このような方法は、固定量のIL-2を、毎日など、スケジュールされた形で投与する、「固定」投与方法と対比される。

【0131】

「誘導レジメン」という用語は、対象の血漿IL-2レベルを上昇させ、対象のTreg : Tcon比を増大させる用量における、IL-2の持続的投与を指す。一部の実施形態では、レジメンを、血漿IL-2のピークレベルが達成されるまで施す。対象の血漿IL-2レベルおよび/またはTreg : Tcon比は、治療開始前のベースライン比と比べて、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%またはそれ超増大させることができる。

【0132】

FDAで承認された使用に従う、ある特定の用量および方法では、Treg : Tcon比が実際に減少するように、Tconを、Tregと比べて優先的に活性化させる。対照的に、本発明の方法は、Tconに対してTregを優先的に促進するように本明細書で決定され、免疫障害を有する対象において、安全かつ効果的である範囲の「低用量IL-2」を使用することにより、Treg : Tcon比を増大させる。「低用量IL-2」という用語は、Tregが、Tconと比べて優先的に増強される投与量の範囲を指す。一実施形態では、低用量IL-2は、抗がん免疫療法のために使用される、「高用量IL-2」による用量（例えば、1日当たり1m²当たり1800万IU~1日当たり1m²当たり2000万IU、またはそれ超）の50%未満であるか、またはそれと等しいIL-2用量を指す。「低用量IL-2」の上限は、発熱、悪寒、無力症、および疲労など、処置の有害事象により、さらに限定されうる。IL-2は一般に、所与の時間単位当たり、体表面積(BSA)と比較して投与される、国際単位(IU)で測定される量に従い投与される。BSAは、直接的な測定により計算することもでき、実施例に記載される方法など、いくつもの周知の方法（例えば、デュポアの式）により計算することもできる。一般に、IL-2は、1日当たりのBSA 1m²当たりのIUを単位として投与する。本発明の方法に従う、例示的な低用量IL-2による用量は、10⁶ IU/m²/日を単位として、間の任意の値および/または間の範囲を含む、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、および3.0 × 10⁶ IU/m²/日のうちのいずれか1つを含む。例えば、誘導レジメンの用量は、間の任意の値または範囲を伴う、0.3 × 10⁶ IU/m²/日~3.0 × 10⁶ IU/m²/日の間の範囲でありうる。

【0133】

「持続的投与」という用語は、間の間欠的中断を伴わない、規則的間隔における、IL-2の投与を指す。したがって、IL-2の途絶は生じない。例えば、誘導用量は、連続する少なくとも1~14日間または間の任意の範囲（例えば、連続する少なくとも4~7日間）中に、毎日（例えば、1日1回または複数回）投与することができる。本明細書に記載される通り、長時間作用型IL-2薬剤および/または皮下投与以外の経路により投与されるIL-2薬剤が想定される。当技術分野に記載される、IL-2の間欠的静脈内投与は、本発明に従う、血漿IL-2レベルの上昇およびTreg : Tcon比の増大と適合しない、短いIL-2半減期を結果としてもたらず。しかし、持続的な定常状態のIL-2レベルを達成するために、毎日1回の皮下IL-2投与、持続的IV注入、長時間作用型皮下IL-2製剤などが想定される。

【0134】

血漿IL-2レベルおよびそのピーク値は、直接的または間接的に評価することができる。例えば、IL-2核酸およびタンパク質のレベルおよび/または活性は、核酸プローブ、ELISAキット、IL-2受容体活性化アッセイなど（例えば、それらの各々が、参照により、それらの全体において、全ての目的で本明細書に組み込まれる、Sigma-Aldrich human IL-2 ELISA kit RAB-0286; ならびに米国特許第4,530,787号、同第4,569,790号、同第4,572,798号、同第4,604,377号、同第4,748,234号、同第4,853,3

10

20

30

40

50

32号、同第4, 959, 314号、同第5, 464, 939号、同第RE33, 653号、同第5, 229, 109号、同第5, 419, 900号、同第5, 696, 079号、同第6, 045, 788号、同第6, 548, 055号、同第7, 514, 073号、および同第7, 569, 215号を参照されたい)を使用することによるなど、当技術分野で周知の方法および試薬を使用して、直接的に解析することができる。

【0135】

別の実施形態では、血漿IL-2レベルおよび/または活性は、Tregの増殖、Tregの活性、Tregのアポトーシスなどに対するIL-2の効果を解析することにより、間接的に解析することができる。Tregの増殖、Tregの活性、および/またはTregのアポトーシスを決定するための方法は、当技術分野で周知であり、本明細書に記載される実施例において例示される通りである。例えば、Treg細胞および/またはTcon細胞の分化および/または活性化についてのバイオマーカーは、CD25、リン酸化STAT5 (pSTAT5)、FOXP3、KI67、TUNELなどの状態を解析することなどにより、解析することができる。さらに、リンパ球サブセットについての表現型解析、免疫応答、血漿サイトカインなどの低減をもたらす免疫モジュレーションについての機能アッセイは、本明細書でさらに記載される通りに解析することができる。

10

【0136】

さらに別の実施形態では、血漿IL-2レベルおよび/または活性は、誘導レジメン開始後の時間に従い間接的に決定することができる。例えば、本明細書では、ピーク血漿IL-2レベルには、誘導レジメンの開始後約7日間以内に達することが決定されている。本発明の一部の実施形態では、ピーク血漿IL-2レベルなどの血漿IL-2レベルを、誘導レジメンの開始後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、またはそれ超の日数に従い決定する。

20

【0137】

ピーク血漿IL-2レベルおよび/または活性と、時間において可能な限り近接することが好ましいが、ピーク血漿IL-2レベルおよび/または活性の後など、誘導レジメンの後の任意の時点において、維持レジメンを開始することができる。「維持レジメン」という用語は、誘導レジメンの用量より高量であり、i)対象の血漿IL-2レベルを、さらに上昇させ、ii)Tregの、Tconに対する比を、さらに増大させる用量における、対象への、IL-2の持続的投与を指す。一実施形態では、維持レジメンは、誘導レジメンから生じる血漿IL-2レベルを、誘導レジメン前の、以前のピーク血漿IL-2レベルを下回るように枯渇させた時点またはその後において始まる。上記で記載した通り、これは、誘導レジメンの開始後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、またはそれ超の日数など、誘導レジメン開始後の日数を単位として測定することができる。

30

【0138】

血漿IL-2レベルを上昇させるために、IL-2を、対象に、誘導レジメンの用量より高量で投与する。一実施形態では、 10^6 IU/m²/日を単位として、用量は、間の任意の値および/または間の範囲を含む、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、および 3.0×10^6 IU/m²/日のうちのいずれか1つである。例えば、誘導レジメンの用量は、間の任意の値または範囲を伴う、 0.3×10^6 IU/m²/日~ 3.0×10^6 IU/m²/日の間の範囲でありうる。維持レジメンの用量は、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、もしくはそれ超、または間の任意の値および/もしくは間の範囲でありうる。血漿IL-2レベルの上昇はまた、Treg:Tcon比も、比を、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、もしくは

40

50

はそれ超、または間の任意の値および/もしくは間の範囲だけ増大させることなどにより、誘導レジメンの T r e g : T c o n と比べて増大させる。

【 0 1 3 9 】

誘導レジメンと符合して、「持続的投与」という用語は、間の間欠的中断を伴わない、規則的間隔における、I L - 2 の投与を指す。したがって、I L - 2 の途絶は生じない。これは、間欠的中断を伴わない I L - 2 投与プロトコルを使用することにより達成しうるが、I L - 2 の持続的投与はまた、定常状態の血漿 I L - 2 レベルをもたらす I L - 2 薬剤を使用することにより達成することもできる。例えば、維持用量は、無期限など、長期治療ベースで、毎日（例えば、1日1回または複数回）投与することができ、一部の実施形態では、連続する少なくとも1~42日間または間の任意の範囲（例えば、連続する少なくとも14~42日間）の間である。

10

【 0 1 4 0 】

上記で記載した通り、I L - 2 は、薬学的に許容される製剤により、皮下、静脈内、腹腔内、経口、経鼻、経皮、または筋内投与などにより、任意の適する投与経路により投与することができる。一実施形態では、本発明は、1または複数の薬学的に許容される担体（添加剤）および/または希釈剤と併せて製剤化された、治療有効量の I L - 2 を含む、薬学的に許容される組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、以下：（1）経口投与、例えば、水薬（水性または非水性の液剤または懸濁剤）、錠剤、ポーション、散剤、顆粒剤、ペースト；（2）例えば、滅菌液剤もしくは懸濁剤としての、例えば、皮下、筋内、もしくは静脈内注射による、非経口投与；（3）例えば、皮膚に適用されるクリーム、軟膏、もしくはスプレーとしての、局所適用；（4）例えば、ペッサリー、クリーム、もしくは泡沫として、腔内投与もしくは直腸内投与または（5）例えば、化合物を含有する、水性エアゾール、リポソーム調製物、もしくは固体粒子としてのエアゾールに適合させた固体または液体形態を含む、固体または液体形態における投与のために、特別に製剤化することができる。

20

【 0 1 4 1 】

本明細書では、「薬学的に許容される」という語句は、健全な医療判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴わずに、ヒトおよび動物の組織との接触における使用に適し、妥当なベネフィット/リスク比に合う、薬剤、材料、組成物、および/または剤形を指すように用いられる。

30

【 0 1 4 2 】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という語句は、対象の化学物質を、1つの臓器または身体の部分から、別の臓器または身体の部分へと運ぶかまたは輸送することに関与する、液体または固体の、充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、または封入材料など、薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクルを意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性であり、対象に対して傷害性でないという意味で、「許容可能」でなければならない。薬学的に許容される担体として用いられうる材料の一部の例は、（1）ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの糖；（2）トウモロコシデンブロンおよびバレイショデンブロンなどのデンブロン；（3）セルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロースなど、その誘導体；（4）粉末トラガント；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）滑石；（8）カカオ脂および坐剤用の蠟などの賦形剤；（9）ラッカセイ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、およびダイズ油などの油；（10）プロピレングリコールなどのグリコール；（11）グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；（12）オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；（13）寒天；（14）水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；（15）アルギン酸；（16）発熱物質非含有水；（17）等張性食塩水；（18）リンゲル液；（19）エチルアルコール；（20）リン酸緩衝化溶液；ならびに（21）医薬製剤中で利用される、他の非毒性の適合性物質を含む。

40

【 0 1 4 3 】

50

本発明の方法において有用な製剤は、経口、経鼻、局所（頬側および舌下を含む）、直腸、膣、エアゾール、および/または非経口投与に適する製剤を含む。製剤は、単位剤形で好都合に提示することができ、製薬技術分野で周知の任意の方法により調製することができる。単一の剤形を作製するのに、担体材料と組み合わせられる有効成分の量は、処置される宿主、特定の投与方式に応じて変動するであろう。単一の剤形を作製するのに、担体材料と組み合わせられる有効成分の量は一般に、治療効果をもたらす化合物の量であろう。一般に、100パーセントのうち、この量は、約1パーセント～約99パーセントの有効成分の範囲であり、好ましくは約5パーセント～約70パーセント、最も好ましくは約10パーセント～約30パーセントの範囲であろう。

【0144】

in vivo 投与に適するIL-2製剤は、当技術分野で周知である（例えば、それらの各々が、参照により、それらの全体において、全ての目的で本明細書に組み込まれる、米国特許第4,530,787号、同第4,569,790号、同第4,572,798号、同第4,604,377号、同第4,748,234号、同第4,853,332号、同第4,959,314号、同第5,464,939号、同第RE33,653号、同第5,229,109号、同第5,419,900号、同第5,696,079号、同第6,045,788号、同第6,548,055号、同第7,514,073号、および同第7,569,215号を参照されたい）。

【0145】

一部の実施形態では、IL-2または他の有用なバイオマーカー核酸分子は、有用であり、ベクターに挿入することができ、遺伝子治療用ベクターとして使用することができる。遺伝子治療用ベクターは、対象に、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照されたい）、または定位注射（例えば、Chenら（1994年）、*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91巻:3054~3057頁を参照されたい）により送達することができる。遺伝子治療用ベクターによる医薬調製物は、許容可能な希釈剤中に遺伝子治療用ベクターを含む場合もあり、遺伝子送達ビヒクルを包埋した緩徐放出マトリックスを含む場合もある。代替的に、完全な遺伝子送達ベクター、例えば、レトロウイルスベクターを、組換え細胞から、無傷で作製しうる場合、医薬調製物は、遺伝子送達系をもたらす、1または複数の細胞を含みうる。

【0146】

哺乳動物、ヒトもしくは非ヒトまたはそれらの細胞へとポリヌクレオチドを導入するための任意の手段は、本発明の多様な構築物を、意図されるレシピエントに送達するための本発明の実施に適合させることができる。本発明の一実施形態では、DNA構築物を、細胞に、トランスフェクションにより、すなわち、「ネイキッド」DNAの送達により、またはコロイド分散系との複合体により送達する。コロイド系は、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油エマルジョン、ミセル、混合型ミセル、およびリポソームを含む脂質ベースの系を含む。本発明の好ましいコロイド系は、脂質複合体化DNAまたはリポソーム-製剤化DNAである。前者の手法では、DNAを、例えば、脂質により製剤化する前に、まず、所望のDNA構築物を持つ導入遺伝子を含むプラスミドを、発現について、実験的に最適化することができる（例えば、5'側非翻訳領域内のイントロンの含有および不要な配列の排除（Felgnerら、*Ann NY Acad Sci*, 126~139頁、1995年））。次いで、公知の方法および材料を使用して、例えば、種々の脂質またはリポソーム材料によるDNAの製剤化を行い、レシピエントの哺乳動物に送達することができる。例えば、*Canonic*ら、*Am J Respir Cell Mol Biol*, 10巻:24~29頁、1994年；*Tsan*ら、*Am J Physiol*, 268巻；*Alton*ら、*Nat Genet*, 5巻:135~142頁、1993年；および*Carson*らによる米国特許第5,679,647号を参照されたい。

【0147】

リポソームの標的化は、解剖学および機構的因子に基づき、分類することができる。

解剖学的分類は、選択性のレベル、例えば、臓器特異的、細胞特異的、および細胞小器官特異的選択性に基づく。機構的標的化は、それが、受動的であるか、能動的であるかに基づく、識別することができる。受動的標的化は、洞様毛細血管を含有する、臓器内の細網内皮系 (RES) の細胞へと分布する、リポソームの自然の傾向を活用する。他方、能動的標的化は、リポソームを、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、もしくはタンパク質など、特異的なリガンドとカップリングさせることによる、または天然に存在する局在化部位以外の臓器および細胞型への標的化を達成するために、リポソームの組成またはサイズを変化させることによる、リポソームの変更を伴う。

【0148】

標的化される送達系の表面は、様々な方式で修飾することができる。リポソームによる標的化送達系の場合、標的化リガンドの、リポソーム二重層との安定的な会合を維持するために、脂質基を、リポソームの脂質二重層に組み込むことができる。脂質鎖を、標的化リガンドに接合するために、多様な連結基を使用することができる。ネイキッドDNAまたは送達ビヒクル、例えば、リポソームと会合させたDNAを、対象におけるいくつかの部位に投与することができる(下記を参照されたい)。

【0149】

核酸は、任意の所望のベクターにおいて送達することができる。これらは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびプラスミドベクターを含む、ウイルスまたは非ウイルスベクターを含む。例示的なウイルスの種類は、HSV(単純ヘルペスウイルス)、AAV(アデノ随伴ウイルス)、HIV(ヒト免疫不全ウイルス)、BIV(ウシ免疫不全ウイルス)、およびMLV(マウス白血病ウイルス)を含む。核酸は、十分に効率的な送達レベルをもたらす、任意の所望のフォーマットであって、ウイルス粒子、リポソーム、ナノ粒子、およびポリマーへの複合体化を含むフォーマットで投与することができる。

【0150】

目的のタンパク質をコードする核酸または目的の核酸は、プラスミドもしくはウイルスベクターまたは当技術分野で公知の他のベクターにありうる。このようなベクターは、周知であり、任意のベクターを、特定の適用のために選択することができる。本発明の一実施形態では、遺伝子送達ビヒクルは、プロモーターおよびデメチラーゼコード配列を含む。好ましいプロモーターは、組織特異的プロモーター、ならびにチミジンキナーゼおよびチミジル酸シンターゼプロモーターなど、細胞増殖により活性化するプロモーターである。他の好ましいプロモーターは、 α -および β -インターフェロンプロモーターなど、ウイルスの感染により活性化可能なプロモーター、ならびにエストロゲンなどのホルモンにより活性化可能なプロモーターを含む。使用される他のプロモーターは、モロニーウイルスLTR、CMVプロモーター、およびマウスアルブミンプロモーターを含む。プロモーターは、構成的または誘導性でありうる。

【0151】

別の実施形態では、WO90/11092および米国特許第5,580,859号において記載されている通り、ネイキッドポリヌクレオチド分子を、遺伝子送達ビヒクルとして使用する。このような遺伝子送達ビヒクルは、増殖因子DNAまたはRNAである場合があり、ある特定の実施形態では、死滅させたアデノウイルスに連結される(Curieら、Hum. Gene. Ther.、3巻:147~154頁、1992年)。任意選択で使用される他のビヒクルは、DNA-リガンドの組合せ(Wuら、J. Biol. Chem.、264巻:16985~16987頁、1989年)、脂質-DNAの組合せ(Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci.、USA、84巻:7413~7417頁、1989年)、リポソーム(Wangら、Proc. Natl. Acad. Sci.、84巻:7851~7855頁、1987年)、および微粒子銃(Williamsら、Proc. Natl. Acad. Sci.、88巻:2726~2730頁、1991年)を含む。

【0152】

10

20

30

40

50

遺伝子送達ビヒクルは、任意選択で、ウイルス複製起点またはパッケージングシグナルなどのウイルス配列を含みうる。これらのウイルス配列は、アストロウイルス、コロナウイルス、オルトミクソウイルス、パポウイルス、パラミクソウイルス、パルボウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レトロウイルス、トガウイルスまたはアデノウイルスなどのウイルスから選択することができる。好ましい実施形態では、増殖因子の遺伝子送達ビヒクルは、組換えレトロウイルスベクターである。組換えレトロウイルスおよびそれらの多様な使用については、例えば、Mannら、Cell、33巻：153頁、1983年；CaneおよびMulligan、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、81巻：6349頁、1984年；Millerら、Human Gene Therapy、1巻：5～14頁、1990年；米国特許第4,405,712号、同第4,861,719号、および同第4,980,289号；ならびにPCT出願第WO89/02,468号、同第WO89/05,349号、および同第WO90/02,806号を含む、多数の参考文献において記載されている。本発明では、例えば、EP0,415,731；WO90/07936；WO94/03622；WO93/25698；WO93/25234；米国特許第5,219,740号；WO9311230；WO9310218；VileおよびHart、Cancer Res.、53巻：3860～3864頁、1993年；VileおよびHart、Cancer Res.、53巻：962～967頁、1993年；Ramら、Cancer Res.、53巻：83～88頁、1993年；Takamiyaら、J. Neurosci. Res.、33巻：493～503頁、1992年；Babara、J. Neurosurg.、79巻：729～735頁、1993年（米国特許第4,777,127号、GB2,200,651、EP0,345,242、およびWO91/02805）において記載されているレトロウイルスによる遺伝子送達ビヒクルを含む、多数のレトロウイルスによる遺伝子送達ビヒクルを活用することができる。

【0153】

本発明のポリヌクレオチドを送達するのに使用しうる、他のウイルスベクター系は、ヘルペスウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス（1997年5月20日に交付された、Wooらによる、米国特許第5,631,236号、およびNeurovexによるWO00/08191）、ワクシニアウイルス（Ridgeway（1988年）、「Mammalian expression vectors」、Rodriguez R L、Denhardt D T編、Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses、Stoneham、Butterworth；BaichwalおよびSugden（1986年）、「Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes」、Kuchherlapati R編、Gene transfer、New York、Plenum Press；Couparら（1988年）、Gene、68巻：1～10頁）、およびいくつかのRNAウイルスから導出されている。好ましいウイルスは、アルファウイルス、ポックスウイルス（poxivirus）、アレナウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルスなどを含む。これらは、多様な哺乳動物細胞のために、いくつかの魅力的な特色を提供する（Friedmann（1989年）、Science、244巻：1275～1281頁；Ridgeway、1988年、前出；BaichwalおよびSugden、1986年、前出；Couparら、1988年；Horwichら（1990年）、J. Virol.、64巻：642～650頁）。

【0154】

他の実施形態では、当技術分野で周知の方法を使用して、ゲノム内の標的DNAを操作することができる。これは、対象への注入の前に、対象のT細胞集団を、ex vivoにおいて、組換えにより操作するのに有用でありうる。例えば、ゲノム内の標的DNAは、欠失、挿入、および/または変異、例えばレトロウイルスの挿入、人工染色体法、遺伝

子挿入、組織特異的なプロモーターによるランダムな挿入、遺伝子標的化、転移因子、および/または外来DNAを導入するかもしくは修飾DNA/修飾核DNAを作製するための他の任意の方法により操作することができる。他の修飾法は、ゲノムからDNA配列を欠失させるステップおよび/または核DNA配列を変更するステップを含む。核DNA配列は、例えば、部位指向変異誘発により変更することができる。

【0155】

他の実施形態では、組換えバイオマーカーポリペプチドおよびその断片を、対象に投与することができる。一部の実施形態では、生物学的特性を増強した融合タンパク質を構築し、投与することができる。加えて、バイオマーカーポリペプチドおよびその断片は、バイオアベイラビリティの増大およびタンパク質分解の低下など、所望の生物学的活性をさらに増強するために、当技術分野で周知の薬理学的方法（例えば、PEG化、グリコシル化、オリゴマー化など）に従い、修飾することができる。

10

【0156】

一部の態様では、複数の可変用量によるIL-2療法を、1または複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせることができる。

【0157】

一実施形態では、体外フォトフェレーシス(ECP)が有用である。ECPとは、アフエレーシスにより回収された自家白血球のUVA照射からなるアフエレーシス手順であり、この自家白血球を、8-メトキシソラーレン(8-MOP)で感作し、その後、再注入してTregを増大させ(Gatzara (2008年)、Blood、112巻: 1515~1521頁; Capitiniら(2011年)、Biol. Blood Marrow Transplant.、17巻: 790~799頁; Maedaら(2008年)、J. Immunol.、181巻: 5956~5962頁)、そしてアポトーシス性T細胞を介して、未成熟および形質細胞様DCを誘導し、その後Tregが増大する(Perezら(1991年)、Transplantation、51巻: 1283~1289頁; Stengerら(2012年)、Blood、119巻: 5088~5103頁; Albertら(1998年)、Nature、392巻: 86~89頁; Yooら(1996年)、J. Invest. Dermatol.、107巻: 235~242頁)。ECP機構についてのヒトデータは、Treg表現型(Schmittら(2009年)、Transplantation、88巻: 411~416頁; Biagiら(2007年)、Transplantation、84巻: 31~39頁)またはDC表現型(Shieueら(2013年)、J. Invest. Dermatol.、133巻: 2098~2100頁)について選択的に報告しているが、不均質な集団内のデータにおいて、包含基準またはECP前のベースラインデータを伴わないことが多い。ECPは、cGVHDのための、慣例的に推奨され、CMSにより承認されている、第二選択処置である(Dignanら(2012年)、Br. J. Haematol.、158巻: 62~78頁)。実施は安全であるが、ECP単独は限定された臨床的利益をもたらす。処置された患者のうちの約半数は、臨床応答を示していないが、部分応答が、レスポナーの標準であり、拡大ECP中における免疫抑制剤の漸減は、緩徐であり、不完全なことが多い。

20

30

40

【0158】

別の実施形態では、調節性T細胞の注入が有用である。Tregの注入は、HSC T文脈において良好に忍容される。23例の複数臍帯血(DUCB)によるHSC Tレシピエントにおける試験では、ex vivoにおいて、IL-2により拡大されたUCB Tregを注入する安全性について評価された。IL-2は、in vivoでは投与されなかった。患者には、移植の後で1kg当たりのTreg細胞 $0.1 \sim 30 \times 10^5$ 個の用量が施された。注入による毒性は、観察されなかった。UCB Treg注入を伴わずに、同一に処置された108例の歴史的対照と比較して、グレードII~IVの急性GVHDの発生率が低く(61%と対比した43%、 $P = 0.05$)、感染、再発、または早期死亡への有害な影響は見られなかった(Brunsteinerら(2011年)、Blo

50

od、117巻：1061～1070頁)。しかし、注入されたUCB Tregは、in vivoにおいて14日間しか検出することができなかった。高リスクのHLAハプロタイプ一致(haploidentical)HSC Tを経た、28例の血液悪性疾患患者についての別の試験では、その後Tconの注入を後続させる、ドナーTreg濃縮細胞の、移植前後における注入は、移植後における免疫抑制の非存在下であっても、GVHDを防止し、リンパ球系の再構成を促進し、日和見病原体に対する免疫を改善したが、移植片対白血病効果は弱めなかった(Di Ianniら(2011年)、Blood、117巻：3921～3928頁)。研究では、CliniMACS(Miltenyi Biotec)免疫磁気ビーズによる分離を介する、2ステップのドナーTreg細胞濃縮：a)臨床グレードのCD8+/CD19+共枯渇(2.1枯渇プログラム、CliniMACS)、および、これに続く、b)CD25+の陽性選択(3.1濃縮プログラム、CliniMACS)が活用された。Treg濃縮細胞生成物は、1:2のTreg:Tcon比でin vitroにおいて抑制性であった。1kg当たり最大でTreg濃縮細胞 4×10^6 個の注入の後では、1kg当たり最大でTcon細胞 2×10^6 個(CliniMACSによる、CD19+枯渇させたドナーリンパ球)のその後の注入にも拘らず、毒性が報告されなかった。

10

【0159】

煩瑣で高価な、Tregの拡大および精製手順を伴う調節性T細胞の公知の注入法とは異なり、本明細書では、実験室における細胞の拡大に対する必要を伴わない、HSC Tドナーまたは対象自身のTregの直接的な回収および注入は、免疫障害を処置するのに、簡素で、有効で、永続的な手段を提供することが決定されている。この効果が生じるのは、患者におけるTregを永続的に増強して、免疫障害を永続的に制御するために、低用量IL-2との組合せが、注入されたTregを、体内で直接的に拡大させる、in vivo条件を創出するからである。

20

【0160】

Tregは、精製することもでき、濃縮することもできる。「濃縮Treg」とは、他のT細胞に加えて、組成物が、少なくとも1:2、1:1.9、1:1.8、1:1.7、1:1.6、1:1.5、1:1.4、1:1.3、1:1.2、1:1.1、1:1、1:0.9、1:0.8、1:0.7、1:0.6、1:0.5、1:0.4、1:0.3、1:0.2、1:0.1、もしくはそれ超、または間の任意の範囲および/もしくは間の任意の値であるTregのTconに対する比を有する比率でTregを含む組成物を指す。このような比は、T細胞を含む組成物を、CD25+細胞についての陽性選択と組み合わせた、CD8+およびCD19+の共枯渇により精製することにより達成することができる。濃縮されたTregを含む細胞集団は、対象の体重1キログラム当たりの細胞 0.1×10^6 、 0.2×10^6 、 0.3×10^6 、 0.4×10^6 、 0.5×10^6 、 0.6×10^6 、 0.7×10^6 、 0.8×10^6 、 0.9×10^6 、 1.0×10^6 個、もしくはそれ超、または間の任意の範囲もしくは間の任意の値で投与することができる。このような濃縮Tregはさらに、細胞マーカーおよび/または生存率の関係でも規定することができる。例えば、濃縮Treg細胞組成物は、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、もしくはそれ超、または間の任意の範囲もしくは間の任意の値の総細胞生存率を有しうる。濃縮Treg細胞組成物は、陰性グラム染色を有しうる。濃縮Treg細胞組成物は、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、もしくはそれ超、または間の任意の範囲もしくは間の任意の値のCD4+CD25+細胞を含みうる。濃縮Treg細胞組成物は、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、もしくはそれ超、または間の任意の範囲もしくは間の任意の値のFoxP3+細胞を含みうる。Tregは、注入によるなど、本明細書に記載される任意の適する経路で投与することができる。Tregはまた、IL-2の投与前、IL-2の投与と共時的に、またはIL-2の投与後に投与することができる。

30

40

50

【0161】

さらに別の実施形態では、処置法はさらに、B7-1、B7-2、またはB7-3など、他のBリンパ球抗原の共刺激経路などの共刺激経路の活性を遮断して、免疫応答をさらに下方モジュレートする薬剤を使用しうる。対象において免疫細胞に媒介される免疫応答をより有効に下方調節するのに、免疫応答を下方モジュレートする2つの別個の薬剤を、単一の組成物として組み合わせることもでき、個別に（同時的または逐次的に）投与することもできる。さらに、免疫応答に影響を及ぼすのに、対象薬剤のうちの1または複数の治療的に活性化量を、他の下方モジュレート試薬と共に使用することができる。他の免疫モジュレート試薬の例は、限定なしに述べると、共刺激シグナルを遮断する抗体（例えば、CD28またはICOSに対する）、CTLA4のアゴニストとして作用する抗体、および/または他の免疫細胞マーカーに対する抗体（例えば、CD40に対する、CD40リガンドに対する、またはサイトカインに対する）、融合タンパク質（例えば、CTLA4-Fc）、および免疫抑制性薬物（例えば、ラパマイシン、シクロスポリンA、またはFK506）を含む。

10

【0162】

さらに、免疫チェックポイントタンパク質の活性を促進する薬剤が、有用である。「免疫チェックポイントタンパク質」という用語は、CD4+および/またはCD8+ T細胞の細胞表面上の分子群であって、抗腫瘍免疫応答を下方モジュレートまたは阻害することにより、免疫応答を微調整する分子群を指す。免疫チェックポイントタンパク質は、当技術分野で周知であり、限定なしに述べると、上記で記載したCTLA-4のほか、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリーの受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPアルファ（CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、およびA2aR（例えば、WO2012/177624を参照されたい）を含む。当技術分野では、免疫チェックポイントタンパク質のレベルおよび活性を促進するのに有用な薬剤が周知である。

20

【0163】

さらに別の実施形態では、任意の第一または第二選択の免疫障害処置を、本発明の方法と組み合わせることができる。代表例は、ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル（MMF）、およびベントスタチン（例えば、Buscra（2000年）、Bone Marrow Transplant、25巻：1067～1071頁；Berger（2007年）、J. Pediatr. Hematol. Oncol.、29巻：678～687頁；Jacobsohn（2009年）、Blood、114巻：4354～4360頁を参照されたい）を含むがこれらに限定されない。

30

【0164】

V. 臨床有効性

臨床有効性は、当技術分野で公知の任意の方法により測定することができる。例えば、応答は、罹患面積の百分率の変化など、定量的に記録することもでき、半定量的方法を使用して、「病理学的完全応答」（pCR）、「臨床的完全寛解」（cCR）、「臨床的部分寛解」（cPR）、「臨床的安定病態」（cSD）、「臨床的進行性疾患」（cPD）、「または他の定性的基準など、定性的に記録することもできる。腫瘍応答の評価は、治療開始後の任意の時点、例えば、数時間後、数日間後、数週間後、または、好ましくは数カ月間後において実施することができる。

40

【0165】

一部の実施形態では、本明細書に記載される治療的処置の臨床有効性は、臨床的有用率（CBR）を測定することにより決定することができる。臨床的有用率は、治療の終了時から少なくとも6カ月後の時点において、完全寛解（CR）している患者の百分率と、部分寛解（PR）している患者の数と、安定病態（SD）である患者の数との合計を決定することにより測定する。この式の略記は、6カ月間にわたる $CBR = CR + PR + SD$ で

50

ある。一部の実施形態では、特定の治療レジメンのためのC B Rは、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、またはそれ超である。

【0166】

応答を評価するためのさらなる基準は、以下：全生存としてもまた公知の死亡までの生存（ここで、前記死亡は、原因を問わない場合もある）；「無再発生存」（ここで、再発という用語は、限局的および遠隔的再発の両方を含むものとする）；無病生存（ここで、疾患という用語は、免疫障害およびこれに関連する疾患を含むものとする）の全てを含む「生存」と関連する。前記生存の長さは、規定された開始点（例えば、診断時または処置の開始）および終了点（例えば、死または再発）を参照することにより計算することができる。

10

【0167】

例えば、適切な閾値を決定するために、特定の治療レジメンを、対象の集団に施行することができ、アウトカムを、任意の治療を施行する前に決定されたバイオマーカー測定値と関連させることができる。アウトカム測定値は、ネオアジュバント状況において施される治療に対する病理学的応答でありうる。代替的に、全生存および無病生存などのアウトカム尺度を、バイオマーカー測定値が既知である抗免疫障害療法後における対象について、ある期間にわたりモニタリングすることができる。ある特定の実施形態では、同じ用量の活性薬剤を、各対象に投与する。対象をモニタリングする期間は、変動しうる。例えば、対象を、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、または60カ月間にわたりモニタリングすることができる。抗免疫障害療法のアウトカムと関連する、バイオマーカーの測定閾値は、実施例節で記載される方法などの方法を使用して決定することができる。

20

【0168】

V. 本発明のさらなる方法

バイオマーカー核酸および/またはバイオマーカーポリペプチドを、本明細書に記載されている方法および当業者に公知の技法に従い解析して、診断および予後診断の目的で有用な、このような遺伝子または発現の変更を同定することができる。例えば、T r e gおよび/またはT c o nを同定するバイオマーカーのほか、それらの活性についての細胞内のバイオマーカーも検出することができる。このような方法は、1) バイオマーカー転写物またはポリペプチドのレベルの変更、2) バイオマーカー遺伝子からの、1または複数のヌクレオチドの欠失または付加、4) バイオマーカー遺伝子の1または複数のヌクレオチドの置換、5) 発現調節領域など、バイオマーカー遺伝子の異常な修飾などを含むがこれらに限定されない。

30

【0169】

a. 試料の回収、調製、および分離

一部の実施形態では、対象に由来する試料中の、バイオマーカーの存在、非存在、量、および/または活性の測定値を、所定の対照（標準）試料と比較する。対象に由来する試料は、免疫障害細胞または組織などの罹患組織に由来することが典型的である。対照試料は、同じ対象に由来する場合もあり、異なる対象に由来する場合もある。対照試料は、正常な非罹患試料であることが典型的である。しかし、疾患の病期分類のため、または処置の有効性を評価するためなど、一部の実施形態では、対照試料は、罹患組織に由来する場合がある。対照試料は、何例かの異なる対象に由来する試料の組合せでありうる。一部の実施形態では、対象に由来するバイオマーカーの量および/または活性の測定値を、所定のレベルと比較する。この所定のレベルは、被験試料が得られた種と同じ種のメンバーの細胞もしくは組織型、または被験試料が得られた対象に由来する非罹患細胞もしくは組織における、バイオマーカーの正常なコピー数、量、または活性など、正常試料から得られることが典型的である。本明細書に記載される通り、「所定の」バイオマーカーの量および/または活性の測定値は、例だけを目的として述べると、処置のために選択されうる対象を評価し、抗免疫障害療法に対する応答（例えば、複数の可変用量によるI L - 2療法

40

50

単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量によるIL-2療法)を評価するのに使用される、バイオマーカーの量および/または活性の測定値でありうる。所定のバイオマーカーの量および/または活性の測定値は、免疫障害を伴うかまたは伴わない患者の集団内で決定することができる。所定のバイオマーカーの量および/または活性の測定値は、あらゆる患者に同等に適用可能な、単一の数である場合があり、または所定のバイオマーカーの量および/または活性の測定値は、患者の特異的な部分集団に従い変動しうる。対象の年齢、体重、身長、および他の因子は、個体の所定のバイオマーカーの量および/または活性の測定値に影響を及ぼしうる。さらに、所定のバイオマーカーの量および/または活性は、各対象について個別に決定することができる。一実施形態では、本明細書に記載される方法により決定および/または比較される量は、絶対測定値に基づく。別の実施形態では、本明細書に記載される方法により決定および/または比較される量は、比(例えば、ハウスキーピング遺伝子の発現、または多様な時点における遺伝子発現に照らして正規化されたバイオマーカーの発現)などの相対測定値に基づく。

10

【0170】

所定のバイオマーカーの量および/または活性の測定値は、任意の適切な標準物質でありうる。例えば、所定のバイオマーカーの量および/または活性の測定値は、患者の選択を評価するための、同じまたは異なるヒトから得ることができる。一実施形態では、所定のバイオマーカーの量および/または活性の測定値は、同じ患者についてのかつての評価から得ることができる。このようにして、患者の選択の進行を、ある時間にわたりモニタリングすることができる。加えて、対照は、別のヒトまたは複数のヒト、例えば、対象が、ヒトである場合に、選択されたヒトの群についての評価から得ることができる。このようにして、選択を評価するための、ヒトの選択の範囲を、適切な他のヒト、例えば、同様もしくは同じ状態を患うヒトおよび/または同じ民族(ethnic)群のヒトなど、目的のヒトと同様の状況にある他のヒトと比較することができる。

20

【0171】

本発明の一部の実施形態では、バイオマーカーの量および/または活性の測定値および/または比の、所定のレベルからの変化は、約0.5倍、約1.0倍、約1.5倍、約2.0倍、約2.5倍、約3.0倍、約3.5倍、約4.0倍、約4.5倍、または約5.0倍、またはそれ超である。一部の実施形態では、倍数変化は、約1倍未満、約5倍未満、約10倍未満、約20倍未満、約30倍未満、約40倍未満、または約50倍未満である。他の実施形態では、バイオマーカーの量および/または活性の測定値の、所定のレベルと比較した倍数変化は、約1倍を超える、約5倍を超える、約10倍を超える、約20倍を超える、約30倍を超える、約40倍を超える、または約50倍を超える。

30

【0172】

生体試料は、核酸および/またはタンパク質を含む、体液試料、細胞試料、または組織試料を含む、患者に由来する様々な供給源から回収することができる。「体液」とは、身体から排出または分泌される流体のほか、通常身体から排出または分泌されない流体(例えば、羊水、房水、胆汁、血液および血漿、脳脊髄液、耳垢(cerumen)およびearwax)、カウパー腺液または尿道球腺液、乳び、びじゅく、糞便、スキン腺液、間質液、細胞内液、リンパ、経血、母乳、粘液、胸膜液、膿、唾液、皮脂、精液、血清、汗、滑膜液、涙、尿、膈液、硝子体液、吐瀉物)も指す。好ましい実施形態では、対象および/または対照試料は、細胞、細胞系、組織学スライド、パラフィン包埋組織、生検材料、全血、乳首吸引物、血清、血漿、口腔内切屑、唾液、脳脊髄液、尿、糞便、および骨髄からなる群より選択される。一実施形態では、試料は、血清、血漿、または尿である。別の実施形態では、試料は、血清である。さらに他の実施形態では、Tリンパ球を含む生体試料であって、全血、精製血液、脾臓組織、リンパ液、リンパ節組織などを含むがこれらに限定されない生体試料は、有用である。

40

【0173】

試料は、個体から、長期にわたり繰り返し(例えば、日、週、月、毎年、隔年などのオ

50

ーダーで1回または複数回)回収することができる。多数の試料を、個体から、ある期間にわたり得ることを使用して、早期の検出からの結果を検証し、かつ/または、例えば、疾患の進行、薬物処置などの結果としての、生物学的パターンの変更を同定することができる。例えば、対象試料を、本発明に従い、毎月、隔月、または1、2、もしくは3カ月間隔の組合せで採取およびモニタリングしうる。加えて、ある時間にわたり得られる、対象のバイオマーカーの量および/または活性の測定値は、モニタリング期間中に、互いと比較するほか、正常対照と比較し、これにより、長期モニタリングのための内部または個人対照としての対象自身の値をもたらしうると好都合である。

【0174】

試料の調製および分離は、回収される試料の種類および/またはバイオマーカー測定値の解析に応じる手順のうちのいずれかを伴いうる。このような手順は、例だけを目的として述べると、濃縮、希釈、pHの調整、存在度の大きなポリペプチド(例えば、アルブミン、ガンマグロブリン、およびトランスフェリンなど)の除去、保存剤および校正物質の添加、プロテアーゼ阻害剤の添加、変性剤の添加、試料の脱塩、試料タンパク質の濃縮、脂質の抽出および精製を含む。

10

【0175】

また、試料の調製により、非共有結合的複合体中で、他のタンパク質(例えば、担体タンパク質)と結合した分子を単離することもできる。この工程により、特異的な担体タンパク質(例えば、アルブミン)に結合した分子を単離することもでき、例えば、酸を使用するタンパク質変性と、それに続く、担体タンパク質の除去を介する、全ての担体タンパク質からの、結合した分子の放出など、より一般的な工程を使用することもできる。

20

【0176】

所望されないタンパク質(例えば、存在度が大きいか、情報を与えないか、または検出不能なタンパク質)の、試料からの除去は、高アフィニティー試薬、高分子量フィルター、超遠心分離、および/または電気透析を使用して達成することができる。高アフィニティー試薬は、存在度の大きなタンパク質に選択的に結合する、抗体または他の試薬(例えば、アプタマー)を含む。試料の調製はまた、イオン交換クロマトグラフィー、金属イオンアフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過、疎水性クロマトグラフィー、等電点電気泳動(chromatofocusing)、吸着クロマトグラフィー、等電点電気泳動(isoelectric focusing)、および類縁の技法も含みうる。分子量フィルターは、サイズおよび分子量に基づき、分子を分離する膜を含む。このようなフィルターは、逆浸透、ナノ濾過、限外濾過、および微細濾過をさらに利用しうる。

30

【0177】

超遠心分離とは、所望されないポリペプチドを、試料から除去するための方法である。超遠心分離とは、光学システムで、粒子の沈降(またはその欠如)をモニタリングしながらの、約15,000~60,000rpmにおける、試料の遠心分離である。電気透析とは、電位勾配の影響下で、半透膜を介して、イオンを、1つの溶液から別の溶液へと輸送する工程において、電気膜(electromembrane)または半透膜を使用する手順である。電気透析において使用される膜は、正もしくは負の電荷を有するイオンを選択的に輸送し、反対の電荷を有するイオンを棄却する能力、または分子種が、サイズおよび電荷に基づき、半透膜を介して移動することを可能とする能力を有しうるので、電気透析を、電解質の濃縮、除去、または分離に有用とする。

40

【0178】

本発明における分離および精製は、当技術分野で公知の任意の手順、例えば、キャピラリー電気泳動(例えば、キャピラリー内またはチップ上)またはクロマトグラフィー(例えば、キャピラリー内、カラム内、またはチップ上)などを含みうる。電気泳動とは、電界の影響下で、イオン性分子を分離するのに使用しうる方法である。電気泳動は、ゲル内、キャピラリー内、またはチップ上のマイクロチャンネル内で行うことができる。電気泳動のために使用されるゲルの例は、デンプン、アクリルアミド、ポリエチレンオキシド、アガロース、またはこれらの組合せを含む。ゲルは、その架橋、洗浄剤または変性剤の添加

50

、酵素または抗体（アフィニティー電気泳動）または基質（ザイモグラフィー）の固定化、およびpH勾配の組込みにより修飾することができる。電気泳動のために使用されるキャピラリーの例は、エレクトロスプレーと接続するキャピラリーを含む。

【0179】

キャピラリー電気泳動（CE）は、複合体である親水性分子と、高度に荷電した溶質とを分離するのに好ましい。CE技術はまた、マイクロ流体チップ上でも実装することができる。使用されるキャピラリーおよび緩衝液の種類に応じて、CEは、キャピラリーゾーン電気泳動（CZE）、キャピラリー等電点電気泳動（CIEF）、キャピラリー等速回転電気泳動（cITP）、およびキャピラリー電気クロマトグラフィー（CEC）などの分離法へと、さらに分けることができる。CE法を、エレクトロスプレーによるイオン化とカップリングさせる実施形態は、揮発性溶液、例えば、揮発性の酸および/または塩基と、アルコールまたはアセトニトリルなどの有機物とを含有する水性混合物の使用を伴う。

10

【0180】

キャピラリー等速回転電気泳動（cITP）は、解析物が、キャピラリーを介して、一定の速度で移動するが、それらのそれぞれの移動度により分離される技法である。自由溶液CE（FSCE）としてもまた公知のキャピラリーゾーン電気泳動（CZE）は、分子上の電荷と、移動中に分子にかかる摩擦抵抗であって、分子のサイズに正比例することが多い摩擦抵抗とにより決定される、分子種の電気泳動移動度の差異に基づく。キャピラリー等電点電気泳動（CIEF）は、弱くイオン化可能な両親媒性分子を、pH勾配下の電気泳動により分離することを可能とする。CECとは、従来的高速液体クロマトグラフィー（HPLC）とCEとのハイブリッド法である。

20

【0181】

本発明で使用される分離法および精製法は、当技術分野で公知の、任意のクロマトグラフィー手順を含む。クロマトグラフィーは、ある特定の解析物の差次的な吸着および溶出または移動相と固定相との間における、解析物の分配に基づきうる。クロマトグラフィーの異なる例は、液体クロマトグラフィー（LC）、ガスクロマトグラフィー（GC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などを含むがこれらに限定されない。

【0182】

b. コピー数および/またはゲノム核酸の変異を検出するための方法

30

当業者には、バイオマーカー核酸のコピー数および/またはゲノム核酸の状態（例えば、変異）を評価する方法が周知である。染色体の増加または減少の存在または非存在は、本明細書で同定される領域またはマーカーのコピー数の決定により、簡単に評価することができる。

【0183】

一実施形態では、生体試料を、ゲノムマーカーを含有するゲノム遺伝子座のコピー数の変化の存在について調べる。

【0184】

バイオマーカー遺伝子座のコピー数を評価する方法は、ハイブリダイゼーションベースのアッセイを含むがこれに限定されない。ハイブリダイゼーションベースのアッセイは、サザンプロット、in situハイブリダイゼーション（例えば、FISHおよびSKYを加えたFISH）法など、従来「直接プローブ」法、および比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）、例えば、cDNAベースまたはオリゴヌクレオチドベースのCGHなど、「比較プローブ」法を含むがこれらに限定されない。方法は、基材（例えば、膜またはガラス）結合法またはアレイベースの手法を含むがこれらに限定されない、多種多様なフォーマットで使用することができる。

40

【0185】

一実施形態では、試料中のバイオマーカー遺伝子のコピー数の評価は、サザンプロットを伴う。サザンプロットでは、ゲノムDNA（断片化され、電気泳動ゲル上で分離されることが典型的である）を、標的領域に特異的なプローブとハイブリダイズさせる。標的領

50

域についてのプローブに由来するハイブリダイゼーションシグナルの強度の、正常ゲノム DNA（例えば、同じまたは類縁の細胞、組織、臓器などのうちの、増幅されない部分）の解析に由来する対照プローブシグナルとの比較は、標的核酸の相対的なコピー数についての推定値をもたらす。代替的に、ノーザンプロットを、試料中のコード核酸のコピー数を評価するために活用することができる。ノーザンプロットでは、mRNAを、標的領域に特異的なプローブとハイブリダイズさせる。標的領域についてのプローブに由来するハイブリダイゼーションシグナルの強度の、正常RNA（例えば、同じまたは類縁の細胞、組織、臓器などのうちの、増幅されない部分）の解析に由来する対照プローブシグナルとの比較は、標的核酸の相対的なコピー数についての推定値をもたらす。代替的に、適切な対照と比べて高いまたは低い発現（例えば、同じまたは類縁の細胞、組織、臓器などのうちの、増幅されない部分）により、標的核酸の相対的なコピー数についての推定値がもたらされるように、当技術分野で周知の、RNAを検出する他の方法を使用することができる。

10

20

30

40

50

【0186】

ゲノムコピー数を決定するための代替的手段は、*in situ*ハイブリダイゼーション（例えば、Angerer（1987年）、Meth. Enzymol、152巻：649頁）である。一般に、*in situ*ハイブリダイゼーションは、以下のステップ：（1）解析される組織または生物学的構造の固定；（2）標的DNAのアクセス可能性を増大させ、非特異的結合を低減する、生物学的構造のプレハイブリダイゼーション処理；（3）核酸混合物の、生物学的構造または組織内の核酸とのハイブリダイゼーション；（4）ハイブリダイゼーションにおいて結合しなかった核酸断片を除去するハイブリダイゼーション後の洗浄；および（5）ハイブリダイズさせた核酸断片の検出を含む。これらのステップの各々において使用される試薬と、使用のための条件は、特定の適用に応じて変動する。典型的な*in situ*ハイブリダイゼーションアッセイでは、細胞を、固体支持体、典型的には、スライドガラスに固定する。核酸をプロービングする場合、細胞は、熱またはアルカリにより変性させることが典型的である。次いで、細胞を、ハイブリダイゼーション溶液と、タンパク質をコードする核酸配列に特異的な標識プローブのアニールリングを許容する、中程度の温度で接触させる。次いで、適切なシグナル対ノイズ比が得られるまで、標的（例えば、細胞）を、所定のストリンジェンシーで、またはストリンジェンシーを増大させて洗浄することが典型的である。プローブは、例えば、放射性同位元素または蛍光レポーターで標識することが典型的である。一実施形態では、プローブは、ストリンジェントな条件下で標的核酸と特異的にハイブリダイズするように、十分に長い。プローブは一般に、約200塩基～約1000塩基の長さの範囲である。一部の適用では、反復配列のハイブリダイゼーション能を遮断することが必要である。したがって、一部の実施形態では、tRNA、ヒトゲノムDNA、またはCot-I DNAを使用して、非特異的なハイブリダイゼーションを遮断する。

【0187】

ゲノムコピー数を決定するための代替的手段は、比較ゲノムハイブリダイゼーションである。一般に、ゲノムDNAを、正常基準細胞のほか、被験細胞（例えば、腫瘍細胞）からも単離し、必要な場合は、増幅する。2つの核酸を、差次的に標識し、次いで、*in situ*において、基準細胞の中期染色体とハイブリダイズさせる。基準DNAおよび被験DNAの両方における反復配列を除去するか、またはそれらのハイブリダイゼーション能を、いくつかの手段により、例えば、適切な遮断核酸によるプレハイブリダイゼーションおよび/または前記ハイブリダイゼーション中における前記反復配列に対するこのような遮断核酸配列を含むことにより低減する。次いで、必要な場合、結合させ、標識されたDNA配列を、視覚化可能な形態とする。コピー数が増大または減少している、被験細胞内の染色体領域は、2つのDNAに由来するシグナルの比が変更された領域を検出することにより同定することができる。例えば、被験細胞内のコピー数を減少させた領域は、ゲノムの他の領域と比較して、基準より比較的低い、被験DNAに由来するシグナルを示すであろう。被験細胞内のコピー数を増大させた領域は、被験DNAに由来する、比較的高

いシグナルを示すであろう。染色体の欠失または増倍が存在する場合は、2つの標識に由来するシグナルの比の差異が検出され、比は、コピー数の尺度をもたらすであろう。CGHの別の実施形態である、アレイCGH (aCGH) では、固定化された染色体エレメントを、アレイ上の固体支持体に結合させた標的核酸のコレクションで置きかえ、ゲノムの大部分または全体を、固体支持体に結合させた標的のコレクションにより表すことを可能とする。標的核酸は、cDNA、ゲノムDNA、オリゴヌクレオチド (例えば、一塩基多型を検出する) などを含みうる。アレイベースのCGHはまた、単色の標識化 (対照試料と、可能な腫瘍試料とを、2つの異なる色素で標識化し、それらをハイブリダイゼーションの前に混合し、ハイブリダイゼーションにより、アレイ上のプローブの競合的ハイブリダイゼーションに起因する比をもたらすことと対照的に) により実施することもできる。単色CGHでは、対照を、標識し、1つのアレイとハイブリダイズさせ、絶対シグナルを読み取り、可能な腫瘍試料を、標識し、第2のアレイ (同一な内容物を伴う) とハイブリダイズさせ、絶対シグナルを読み取る。コピー数の差異は、2つのアレイに由来する絶対シグナルに基づき計算する。当技術分野では、固定化された染色体またはアレイを調製し、比較ゲノムハイブリダイゼーションを実行する方法が周知である (例えば、米国特許第6,335,167号; 同第6,197,501号; 同第5,830,645号; および同第5,665,549号; ならびにAlbertson (1984年)、EMBO J.、3巻: 1227~1234頁; Pinkel (1988年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85巻: 9138~9142頁; 欧州特許公開第430,402号; Methods in Molecular Biology、33巻、In situ Hybridization Protocols、Choo編、Humana Press、Totowa、N.J. (1994年)などを参照されたい)。別の実施形態では、Pinkelら (1998年)、Nature Genetics、20巻: 207~211頁、またはKallioniemi (1992年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻: 5321~5325頁 (1992年)のハイブリダイゼーションプロトコールを使用する。

10

20

30

40

50

【0188】

さらに別の実施形態では、増幅ベースのアッセイを使用して、コピー数を測定することができる。このような増幅ベースのアッセイでは、核酸配列は、増幅反応 (例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)) 内の鋳型として作用する。定量的増幅では、増幅産物の量は、元の試料中の鋳型の量と比例するであろう。適切な対照、例えば、健全な組織との比較は、コピー数の尺度をもたらす。

【0189】

当業者には、「定量的」増幅法が周知である。例えば、定量的PCRは、同じプライマーを使用して、既知の量の対照配列を、同時に共増幅することを伴う。これは、PCR反応を校正するのに使用しうる、内部標準をもたらす。定量的PCRのための詳細なプロトコールは、Innisら (1990年)、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications、Academic Press, Inc.、N.Y.)において提示されている。定量的PCR解析を使用する、マイクロサテライト遺伝子座におけるDNAコピー数の測定は、Ginzongerら (2000年)、Cancer Research、60巻: 5405~5409頁において記載されている。遺伝子についての既知の核酸配列は、当業者が、遺伝子の任意の部分を増幅するプライマーを日常的に選択することを可能とするのに十分である。本発明の方法ではまた、蛍光発生定量的PCRも使用することができる。蛍光発生定量的PCRでは、定量化は、蛍光シグナル、例えば、TaqManおよびSYBR greenの量に基づく。

【0190】

他の適切な増幅法は、リガーゼ連鎖反応 (LCR) (WuおよびWallace (1989年)、Genomics、4巻: 560頁、Landegrenら (1988年)、Science、241巻: 1077頁; ならびにBarringerら (1990年)

、Gene、89巻：117頁を参照されたい)、転写増幅(Kwohら(1989年)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、86巻：1173頁)、自己持続配列複製(Guatelliら(1990年)、Proc. Nat. Acad. Sci., USA、87巻：1874頁)、ドットPCR、およびリンカーアダプターPCRなどを含むがこれらに限定されない。

【0191】

ヘテロ接合性の喪失(LOH)およびMCP(major copy proportion)によるマッピング(Wang, Z.C.ら(2004年)、Cancer Res、64巻(1号)：64~71頁; Seymour, A. B.ら(1994年)、Cancer Res、54巻、2761~4頁; Hahn, S. A.ら(1995年)、Cancer Res、55巻、4670~5頁; Kimura, M.ら(1996年)、Genes Chromosomes Cancer、17巻、88~93頁; Liら、(2008年)、MBC Bioinform., 9巻、204~219頁)もまた、増幅または欠失の領域を同定するのに使用することができる。

10

【0192】

c. バイオマーカー核酸の発現を検出するための方法

バイオマーカーの発現は、転写された分子またはタンパク質の発現を検出するための、多種多様な周知の方法のうちいずれかにより評価することができる。このような方法の非限定的な例は、分泌タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞質タンパク質、または核タンパク質を検出するための免疫学的方法、タンパク質の精製法、タンパク質機能または活性アッセイ、核酸ハイブリダイゼーション法、核酸逆転写法、および核酸増幅法を含む。

20

【0193】

好ましい実施形態では、特定の遺伝子の活性は、遺伝子転写物(例えば、mRNA)の尺度、翻訳されるタンパク質の量の尺度、または遺伝子産物の活性の尺度により特徴付けられる。バイオマーカーの発現は、それらのいずれもが標準的な技法を使用して測定される、mRNAレベル、タンパク質レベル、またはタンパク質活性を検出することを含む、様々な方式でモニタリングすることができる。検出は、遺伝子発現(例えば、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、タンパク質、または酵素活性)のレベルの定量化を伴う場合もあり、代替的に、特に対照レベルと比較した遺伝子発現のレベルについての定性的評価である場合もある。検出されるレベルの種類は、文脈から明らかであろう。

30

【0194】

別の実施形態では、バイオマーカーおよび機能的に類似するそのホモログであって、その断片または遺伝子の変更(例えば、その調節性またはプロモーター領域内の)を含むホモログの発現レベルの検出または決定は、目的のマーカーについてのRNAレベルの検出または決定を含む。一実施形態では、被験対象に由来する1または複数の細胞を得、RNAを、細胞から単離する。好ましい実施形態では、乳腺組織(breast tissue)細胞の試料を、対象から得る。

【0195】

一実施形態では、RNAを、単一の細胞から得る。例えば、細胞は、レーザーキャプチャマイクロダイセクション(LCM)により、組織試料から単離することができる。この技法を使用して、細胞を、染色された組織切片を含む組織切片から単離し、これにより、所望の細胞が単離されたことを確認することができる(例えば、Bonnerら(1997年)、Science、278巻：1481頁; Emmerit-Buckら(1996年)、Science、274巻：998頁; Fendら(1999年)、Am. J. Path., 154巻：61頁; およびMurakamiら(2000年)、Kidney Int., 58巻：1346頁を参照されたい)。例えば、Murakamiら、前出は、細胞の、以前に免疫染色された組織切片からの単離について記載している。

40

【0196】

また、RNAを抽出しうるより大きな細胞集団を得るように、細胞を対象から得、細胞をin vitroにおいて培養することも可能である。当技術分野では、非形質転換細

50

胞の培養物、すなわち、初代細胞培養物を確立するための方法が公知である。

【0197】

RNAを、個体に由来する組織試料または細胞から単離する場合、組織または細胞を、対象から取り出した後における、遺伝子発現の、任意のさらなる変化を防止することが重要でありうる。発現レベルの変化は、摂動後、例えば、熱ショック後、またはリポ多糖(LPS)もしくは他の試薬による活性化後において、急速に変化することが公知である。加えて、組織および細胞内のRNAは、迅速に分解されうる。したがって、好ましい実施形態では、対象から得られる組織または細胞を、可能な限り速やかに、瞬時凍結させる。

【0198】

RNAは、様々な方法、例えば、チオシアン酸グアニジウム溶解と、それに続く、CsCl遠心分離により、組織試料から抽出することができる(Chirgwinら、1979年、Biochemistry、18巻:5294~5299頁)。単一細胞に由来するRNAは、Dulac, C. (1998年)、Curr. Top. Dev. Biol.、36巻、245頁;およびJenaら(1996年)、J. Immunol. Methods、190巻:199頁において記載されている方法など、単一の細胞に由来するcDNAライブラリーを調製するための方法において記載されている通りに得ることができる。例えば、RNAsinの包含により、RNAの分解を回避するように、注意を払わなければならない。

10

【0199】

次いで、RNA試料を、特定の分子種において濃縮することができる。一実施形態では、ポリ(A)+ RNAを、RNA試料から単離する。一般に、このような精製は、mRNA上のポリAテールを利用する。特に、かつ、上記で言及した通り、ポリTオリゴヌクレオチドを、固体支持体上に固定化して、mRNAに対するアフィニティリガンドとして用いることができる。これを目的とするキット、例えば、MessageMakerキット(Life Technologies、Grand Island、NY)が市販されている。

20

【0200】

好ましい実施形態では、マーカー配列内のRNA集団を、濃縮する。濃縮は、例えば、プライマー特異的cDNA合成、またはcDNA合成に基づく、複数ラウンドの線形増幅、および鑄型指向的in vitro転写(例えば、Wangら(1989年)、PNAS、86巻、9717頁;Dulacら、前出;およびJenaら、前出を参照されたい)により着手することができる。

30

【0201】

RNAの集団は、特定の分子種または配列が濃縮されている場合であれ、そうでない場合であれ、さらに増幅することができる。本明細書で規定される場合、「増幅工程」は、RNA中の分子を強化するか、増大させるか、または増進するようにデザインされる。例えば、RNAが、mRNAである場合、シグナルが検出可能であるか、または検出が増強されるように、RT-PCRなどの増幅工程を活用して、mRNAを増幅することができる。このような増幅工程は、特に、生体、組織、または腫瘍試料のサイズまたは体積が小さい場合に有益である。

40

【0202】

多様な増幅法および検出法を使用することができる。例えば、mRNAを、cDNAへと逆転写するのについで、ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を施すこと;または、米国特許第5,322,770号において記載されている通り、両方のステップのために単一の酵素を使用すること;または、R. L. Marshallら、PCR Methods and Applications、4巻:80~84頁(1994年)により記載されている通り、mRNAを、cDNAへと逆転写するのについで、シンメトリックギャップリガーゼ連鎖反応(RT-AGLCR)を施すことは、本発明の範囲内にある。また、リアルタイムPCRも、使用することができる。

【0203】

50

本明細書で活用されうる、他の公知の増幅法は、PNAS USA、87巻：1874～1878頁（1990年）において記載されており、また、Nature、350巻（6313号）：91～92頁（1991年）においても記載されている、いわゆる「NASBA」または「3SR」法；欧州特許出願（EPA）公開第4544610号において記載されているQベータ増幅；鎖置換増幅（G. T. Walkerら、Clin. Chem.、42巻：9～13頁（1996年）；および欧州特許出願第684315号において記載されている）；PCT公開WO9322461号により記載されている標的媒介型増幅；PCR；リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えば、WuおよびWallace、Genomics、4巻、560頁（1989年）、Landegrenら、Science、241巻、1077頁（1988年）を参照されたい）；自己持続配列複製（SSR）（例えば、Guatelliら、Proc. Nat. Acad. Sci.、USA、87巻、1874頁（1990年）を参照されたい）；および転写増幅（例えば、Kwohら、Proc. Natl. Acad. Sci.、USA、86巻、1173頁（1989年）を参照されたい）を含むがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0204】

現況技術では、遺伝子発現の絶対および相対レベルを決定するための多くの技法が公知であり、本発明における使用に適する一般に使用される技法は、ノーザン解析、RNアーゼ保護アッセイ（RPA）、マイクロアレイ、ならびに定量的PCRおよびディファレンシャルディスプレイPCRなど、PCRベースの技法を含む。例えば、ノーザンプロット法は、RNAの調製物を、変性アガロースゲル上で泳動させ、これを、活性化セルロース、ニトロセルロース、またはガラス、またはナイロン膜など、適切な支持体に転写するステップを伴う。次いで、放射性標識されたcDNAまたはRNAを、調製物とハイブリダイズさせ、洗浄し、オートラジオグラフィにより解析する。

【0205】

放射性標識されたアンチセンスRNAプローブを、生検試料の薄い切片とハイブリダイズさせ、洗浄し、RNアーゼにより切断し、オートラジオグラフィのために、感光性エマルジョンに曝露する、*in situ*ハイブリダイゼーションによる可視化もまた利用することができる。試料を、ヘマトキシリンで染色して、試料の組織学的組成を裏付けることができ、適切な光フィルターによる暗視野イメージングは、現像されたエマルジョンを示す。ジゴキシゲニンなどの非放射性標識もまた、使用することができる。

【0206】

代替的に、mRNAの発現は、DNAアレイ、チップ、またはマイクロアレイ上で検出することができる。対象から得られた被験試料の、標識された核酸を、バイオマーカーDNAを含む固体表面とハイブリダイズさせることができる。バイオマーカー転写物を含む試料については、陽性ハイブリダイゼーションシグナルが得られる。当技術分野では、DNAアレイを調製する方法およびそれらの使用が周知である（例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第6,618,679号；同第6,379,897号；同第6,664,377号；同第6,451,536号；同第5,48,257号；U.S. 20030157485；ならびにSchenarら（1995年）、Science、20巻、467～470頁；Gerholdら（1999年）、Trends In Biochem. Sci.、24巻、168～173頁；およびLennonら（2000年）、Drug Discovery Today、5巻、59～65頁を参照されたい）。SAGE（Serial Analysis of Gene Expression）もまた、実施することができる（例えば、米国特許出願第20030215858号を参照されたい）。

【0207】

mRNAレベルをモニタリングするために、例えば、mRNAを、被験生体試料から抽出し、逆転写させ、蛍光標識されたcDNAプローブを生成する。次いで、マーカーcDNAとハイブリダイズすることが可能なマイクロアレイを、標識されたcDNAプローブでプロービングし、スライドを走査し、蛍光強度を測定する。この強度は、ハイブリダイ

ゼーション強度および発現レベルと相関する。

【0208】

本明細書で記載される方法において使用されうるプローブの種類は、cDNA、リボプローブ、合成オリゴヌクレオチド、およびゲノムプローブを含む。使用されるプローブの種類は一般に、例えば、in situハイブリダイゼーションのためのリボプローブ、およびノーザンブロット法のためのcDNAなど、特定の状況により指示されるであろう。一実施形態では、プローブを、RNAに固有なヌクレオチド領域へと方向付ける。プローブは、マーカーmRNA転写物を差次的に認識するのに必要となる程度に短くすることが可能であり、例えば、15塩基程度に短くすることも可能であるが、少なくとも17、18、19または20またはそれ超の塩基のプローブを使用することができる。一実施形態では、プライマーおよびプローブは、ストリンジентな条件下で、マーカーに対応するヌクレオチド配列を有するDNA断片と特異的にハイブリダイズする。本明細書で使用される場合、「ストリンジентな条件」という用語は、ヌクレオチド配列内に少なくとも95%の同一性が見られる場合に限り、ハイブリダイゼーションが生じることを意味する。別の実施形態では、「ストリンジентな条件」下におけるハイブリダイゼーションは、配列間で、少なくとも97%の同一性が見られる場合に生じる。

10

【0209】

プローブを標識化する形態は、放射性同位元素、例えば、 ^{32}P および ^{35}S の使用など、適切な任意の形態でありうる。放射性同位元素による標識化は、プローブが化学合成されるのであれ、生体により合成されるのであれ、適切に標識された塩基の使用により達成することができる。

20

【0210】

一実施形態では、生体試料は、被験対象に由来するポリペプチド分子を含有する。代替的に、生体試料は、被験対象に由来するmRNA分子または被験対象に由来するゲノムDNA分子を含有しうる。

【0211】

別の実施形態では、方法は、対照生体試料を、対照対象から得るステップと、マーカーのポリペプチド、mRNA、ゲノムDNA、またはそれらの断片の存在が、生体試料中に検出されるように、対照試料を、マーカーのポリペプチド、mRNA、ゲノムDNA、またはそれらの断片を検出することが可能な化合物または薬剤と接触させるステップと、対照試料中の、マーカーのポリペプチド、mRNA、ゲノムDNA、またはそれらの断片の存在を、被験試料中の、マーカーのポリペプチド、mRNA、ゲノムDNA、またはそれらの断片の存在と比較するステップとをさらに伴う。

30

【0212】

d. バイオマーカータンパク質の発現を検出するための方法

バイオマーカータンパク質の活性またはレベルは、発現したポリペプチドを検出または定量化することにより、検出および/または定量化することができる。ポリペプチドは、当業者に周知の多数の手段のうちいずれかにより、検出および定量化することができる。バイオマーカー核酸および機能的に類似するそのホモログであって、その断片または遺伝子の変更（例えば、その調節性またはプロモーター領域内の）を含むホモログによりコードされるポリペプチドのポリペプチド発現の異常なレベルは、免疫障害の、抗免疫障害療法（例えば、複数の可変用量によるIL-2療法単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量によるIL-2療法）に対する応答の可能性と関連する。ポリペプチドを検出するための、当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。このような方法は、免疫拡散、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素免疫測定アッセイ（ELISA）、免疫蛍光アッセイ、ウェスタンブロット法、結合剤-リガンドアッセイ、免疫組織化学法、凝集反応、補体アッセイ、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、ハイパーディフュージョンクロマトグラフィー（hyperdiffusion chromatography）など（例えば、参照により組み込まれる、Basic and Clinic

40

50

al Immunology、SitesおよびTerr編、Appleton and Lange、Norwalk、Conn.、217~262頁、1991年)を含むがこれらに限定されない。抗体を、1または複数のエピトープと反応させるステップと、標識されたポリペプチドまたはその誘導体を、競合的に置換するステップとを含む、結合剤-リガンド免疫アッセイ法が好ましい。

【0213】

例えば、ELISAおよびRIA手順は、所望のバイオマーカータンパク質の標準物質を標識し(^{125}I もしくは ^3S などの放射性同位元素、または西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなどのアッセイ可能な酵素により)、非標識の試料と併せて、対応する抗体と接触させ、このとき、第1の抗体に結合するように、第2の抗体を使用し、放射能または固定化された酵素をアッセイするように行う(競合アッセイ)。代替的に、試料中のバイオマーカータンパク質を、対応する固定化された抗体と反応させ、放射性同位元素または酵素で標識された、抗バイオマーカータンパク質抗体を、系と反応させ、放射能または酵素をアッセイする(ELISAサンドイッチアッセイ)。適切な場合、他の従来の方法もまた、利用することができる。

10

【0214】

上記の技法は本質的に、「1ステップ」または「2ステップ」アッセイとして行うことができる。「1ステップ」アッセイは、抗原を、固定化された抗体と接触させ、洗浄を伴わずに、混合物を、標識された抗体と接触させるステップを伴う。「2ステップ」アッセイは、混合物を、標識された抗体と接触させる前に、洗浄を伴う。適切な場合、他の従来

20

【0215】

一実施形態では、バイオマーカーのタンパク質レベルを測定するための方法は、生物学的検体を、バイオマーカータンパク質に選択的に結合する、抗体またはその改変体(例えば、断片)と接触させるステップと、前記抗体またはその改変体が、前記試料に結合するかどうかを検出するステップと、これにより、バイオマーカータンパク質のレベルを測定するステップとを含む。

【0216】

バイオマーカータンパク質および/または抗体の酵素標識および放射性標識は、従来

30

【0217】

通例、アッセイ系の1つの構成要素を、支持体上に固定化し、これにより、系の他の構成要素を、この構成要素と接触させ、煩瑣で時間のかかる作業を伴わずに、たやすく除去

40

【0218】

酵素自体を支持体上に固定化することが可能であるが、固相の酵素が必要である場合、これは一般に、抗体に結合させ、抗体を支持体に取り付けることにより、最も良く達成され、そのモデルおよび系は、当技術分野で周知である。単純なポリエチレンは、適切な支持体を提供することができる。

【0219】

標識化のために利用可能な酵素は、特に限定されないが、例えば、オキシダーゼ群のメンバーから選択することができる。これらは、それらの基質との反応により、過酸化水素の生成を触媒するが、その良好な安定性、入手の容易さ、および安価であることのほか、

50

その基質（グルコース）の入手のたやすさのためにも、グルコースオキシダーゼを使用することが多い。オキシダーゼの活性は、当技術分野で周知の制御条件下における、酵素標識された抗体の、基質との反応の後において形成される、過酸化水素の濃度を測定することによりアッセイすることができる。

【0220】

本開示に基づき、バイオマーカータンパク質を検出するのに、実施者の好みに従い、他の技法を使用することができる。1つのこのような技法は、適切に処置された試料を、SDS-PAGEゲル上で泳動させてから、ニトロセルロースフィルターなどの固体支持体に転写する、ウェスタンブロット法（Townbinら、Proc. Nat. Acad. Sci.、76巻：4350頁（1979年））である。次いで、抗バイオマーカータンパク質抗体（非標識）を、支持体と接触させ、標識されたプロテインAまたは抗免疫グロブリン（¹²⁵I、西洋ワサビペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼを含む、適切な標識）などの二次的免疫試薬によりアッセイする。クロマトグラフィーによる検出もまた使用することができる。

10

【0221】

免疫組織化学を使用して、例えば、生検試料中のバイオマーカータンパク質の発現を検出することができる。適切な抗体を、例えば、細胞の薄層と接触させ、洗浄し、次いで、第2の標識された抗体と接触させる。標識化は、蛍光のマーカ、ペルオキシダーゼなどの酵素、アビジン、または放射性標識による標識化でありうる。アッセイは、顕微鏡を使用して、目視によりスコア付ける。

20

【0222】

イントラボディ（intra body）などの抗バイオマーカータンパク質抗体もまた、例えば、対象の細胞および組織内のバイオマーカータンパク質の存在を検出する、イメージング目的で使用することができる。適切な標識は、放射性同位元素である、ヨウ素（¹²⁵I、¹²¹I）、炭素（¹⁴C）、硫黄（³⁵S）、トリチウム（³H）、インジウム（¹¹²In）、およびテクネシウム（^{99m}Tc）、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、ならびにビオチンを含む。

【0223】

in vivoイメージングの目的のために、抗体は、それ自体として、体外から検出可能ではないので、検出を可能とするように、標識するか、または他の方式で修飾しなければならない。この目的のマーカは、抗体の結合に実質的に干渉しないが、外部からの検出を可能とする、任意のマーカでありうる。適切なマーカは、X線撮影、NMR、またはMRIにより検出されうるマーカを含みうる。X線撮影法では、適切なマーカは、例えば、バリウムまたはセシウムなど、検出可能な放射線を放射するが、対象に明らかに有害ではない、任意の放射性同位元素を含む。NMRおよびMRIに適切なマーカは一般に、例えば、関与するハイブリドマのための栄養素の適切な標識化により、抗体に組み込みうる重水素など、検出可能な特徴的スピンを伴うマーカを含む。

30

【0224】

対象のサイズおよび使用されるイメージングシステムが、診断画像をもたらすのに必要とされるイメージング部分の量を決定するであろう。放射性同位元素部分の場合、ヒト対象については、注射される放射能の量は通常、約5～20ミリキュリーのテクネチウム99の範囲であろう。次いで、標識された抗体または抗体断片は、バイオマーカータンパク質を含有する細胞の場所に優先的に蓄積されるであろう。次いで、公知の技法を使用して、標識された抗体または抗体断片を検出することができる。

40

【0225】

バイオマーカータンパク質を検出するのに使用しうる抗体は、自然であれ、合成であれ、全長であれ、その断片であれ、モノクローナルであれ、ポリクローナルであれ、検出されるバイオマーカータンパク質に、十分に強力かつ特異的に結合する、任意の抗体を含む。抗体は、最大で、約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} Mの K_d を有しうる。「特異的に結合する」という語

50

句は、例えば、抗体の、エピトープまたは抗原または抗原性決定基への結合であって、同一または同様のエピトープ、抗原、または抗原決定基の第2の調製物により置換される場合もあり、これと競合する場合もある結合を指す。抗体は、類縁のタンパク質など、他のタンパク質と比べて、バイオマーカータンパク質に優先的に結合しうる。

【0226】

抗体は、市販されているか、または当技術分野で公知の方法に従い調製することができる。

【0227】

使用されうる抗体およびその誘導体は、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、キメラ、ヒト、ヒト化、霊長動物化（CDRグラフト抗体）、ベニヤ化（*veneered*）、または単鎖抗体のほか、抗体の機能的な断片、すなわち、バイオマーカータンパク質結合性断片を包含する。例えば、バイオマーカータンパク質またはその部分に結合することが可能な抗体断片であって、Fv、Fab、Fab'、およびF(ab')₂断片を含むがこれらに限定されない抗体断片を使用することができる。このような断片は、酵素的切断または組換え法により作製することができる。例えば、パインまたはペプシン切断により、それぞれ、FabまたはF(ab')₂断片を生成することができる。また、必須の基質特異性を伴う他のプロテアーゼも、FabまたはF(ab')₂断片を生成するのに使用することができる。抗体はまた、1または複数の終止コドンを、自然の終結部位の上流に導入した、抗体遺伝子を使用して、様々な切断形態でも作製することができる。例えば、F(ab')₂の重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、重鎖のCHドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列を含むようにデザインすることができる。

【0228】

合成および操作抗体については、例えば、Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特許第0,125,023B1号；Bossら、米国特許第4,816,397号；Bossら、欧州特許第0,120,694B1号；Neuberger, M.S.ら、WO86/01533；Neuberger, M.S.ら、欧州特許第0,194,276B1号；Winter、米国特許第5,225,539号；Winter、欧州特許第0,239,400B1号；Queenら、欧州特許第0451216B1号；およびPadlan, E.A.ら、EP0519596A1において記載されている。霊長動物化抗体に関しては、Newman, R.ら、BioTechnology、10巻：1455～1460頁（1992年）、単鎖抗体に関しては、Ladnerら、米国特許第4,946,778号およびBird, R.E.ら、Science、242巻：423～426頁（1988年）もまた参照されたい。ライブラリー、例えば、ファージディスプレイライブラリーから作製される抗体もまた使用することができる。

【0229】

一部の実施形態では、バイオマーカータンパク質に特異的に結合する薬剤であって、ペプチドなど、抗体以外の薬剤を使用する。バイオマーカータンパク質に特異的に結合するペプチドは、当技術分野で公知の任意の手段により同定することができる。例えば、ペプチドのファージディスプレイライブラリーを使用して、バイオマーカータンパク質の特異的なペプチド結合剤についてスクリーニングすることができる。

【0230】

e. バイオマーカーの構造的変更を検出するための方法

以下の例示的な方法を使用して、例えば、Treg、Tcon、および/またはTreg:Tcon比に影響を及ぼす配列または薬剤を同定するために、バイオマーカー核酸分子および/またはバイオマーカーポリペプチド分子内の構造的変更の存在を同定することができる。

【0231】

ある特定の実施形態では、変更の検出は、アンカーPCRもしくはRACE PCRなどのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,683,195号および

10

20

30

40

50

同第4, 683, 202号を参照されたい)、または、代替的に、ライゲーション連鎖反応(LCR)(例えば、Landegranら(1988年)、Science、241巻:1077~1080頁;およびNakazawaら(1994年)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、91巻:360~364頁を参照されたい)におけるプローブ/プライマーの使用を伴うが、これらのうちの後者は、バイオマーカー遺伝子など、バイオマーカー核酸内の点変異を検出するのに、特に有用でありうる(Abravayaら(1995年)、Nucleic Acids Res., 23巻:675~682頁を参照されたい)。この方法は、細胞の試料を対象から回収するステップと、核酸(例えば、ゲノム核酸、mRNA、またはこれらの両方)を、試料の細胞から単離するステップと、核酸試料を、バイオマーカー遺伝子(存在する場合)のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で、バイオマーカー遺伝子と特異的にハイブリダイズする、1または複数のプライマーと接触させるステップと、増幅産物の存在もしくは非存在を検出するか、または増幅産物のサイズを検出するステップと、長さを対照試料と比較するステップとを含みうる。PCRおよび/またはLCRは、本明細書に記載される、変異を検出するために使用される技法のうちのいずれかと共に、予備的な増幅ステップとして使用するのに所望されることが予期される。

10

【0232】

代替的な増幅法は、自己持続配列複製(Guatelli, J. C.ら(1990年)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、87巻:1874~1878頁)、転写増幅系(Kwoh, D. Y.ら(1989年)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA、86巻:1173~1177頁)、Qベータ複製(Lizardi, P. M.ら(1988年)、Bio-Technology、6巻:1197頁)、または他の任意の核酸増幅法に続き、当業者に周知の技法を使用する、増幅された分子の検出を含む。これらの検出スキームは、とりわけ、このような分子が、非常に少数で存在する場合、核酸分子の検出に有用である。

20

【0233】

代替的な実施形態では、試料細胞に由来するバイオマーカー核酸内の変異は、制限酵素の切断パターンの変更により同定することができる。例えば、試料および対照DNAを、単離し、増幅し(任意選択で)、1または複数の制限エンドヌクレアーゼで消化し、ゲル電気泳動により断片長サイズを決定し、比較する。試料DNAと対照DNAとの間の断片長サイズの差異は、試料DNA内の変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイム(例えば、米国特許第5,498,531号を参照されたい)を使用して、リボザイム切断部位の発生または喪失により、特異的な変異の存在についてスコア付けすることができる。

30

【0234】

他の実施形態では、バイオマーカー核酸内の遺伝子変異は、試料核酸および対照核酸、例えば、DNAまたはRNAを、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含有する高密度アレイとハイブリダイズさせること(Cronin, M. T.ら(1996年)、Hum. Mutat., 7巻:244~255頁;Kozal, M. J.ら(1996年)、Nat. Med., 2巻:753~759頁)により同定することができる。例えば、バイオマーカー遺伝子の変異は、Croninら(1996年)、前出において記載されている通り、発光型DNAプローブを含有する二次元アレイにより同定することができる。略述すると、プローブの第1のハイブリダイゼーションアレイを、一連の重複するプローブの直線状のアレイを作ることにより、試料および対照内のDNAの長い連なりを通して走査して、配列間の塩基変化を同定するのに使用することができる。このステップは、点変異の同定を可能とする。このステップに続いて、検出される全ての改変体または変異に相補的な、小型で特化したプローブアレイを使用することにより、特異的な変異の特徴付けを可能とする、第2のハイブリダイゼーションアレイを施す。各変異アレイは、一方は、野生型遺伝子に相補的であり、他方は、変異体遺伝子に相補的である、パラレルなプローブセットから構成される。このようなバイオマーカー遺伝子の変異は、例えば、生殖細胞系列および体細胞変異を含む、様々な文脈で同定することができる

40

50

。

【0235】

さらに別の実施形態では、当技術分野で公知の様々なシーケンシング反応のうちのいずれかを使用して、バイオマーカー遺伝子を直接シーケンシングし、試料バイオマーカーの配列を、対応する野生型（対照）配列と比較することにより、変異を検出することができる。シーケンシング反応の例は、MaxamおよびGilbert（1977年）、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74巻：560頁またはSanger（1977年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74巻：5463頁により開発された技法に基づく反応を含む。また、診断アッセイを実行する場合に、質量分析によるシーケンシング（例えば、PCT国際公開第WO94/16101号；Cohenら（1996年）、Adv. Chromatogr., 36巻：127～162頁；およびGriffinら（1993年）、Appl. Biochem. Biotechnol., 38巻：147～159頁を参照されたい）を含む、様々な自動化シーケンシング手順（Naeve（1995年）、Biotechniques, 19巻：448～53頁）のうちのいずれかを活用しうることも想定される。

10

【0236】

バイオマーカー遺伝子内の変異を検出するための他の方法は、切断剤からの保護を使用して、RNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロ二重鎖内のミスマッチ塩基を検出する方法（Myersら（1985年）、Science, 230巻：1242頁）を含む。一般に、当技術分野における「ミスマッチ切断」法は、野生型バイオマーカー配列を含有する（標識された）RNAまたはDNAを、組織試料から得られる、潜在的に変異体である、RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることにより形成されるヘテロ二重鎖を提供することによって開始される。二本鎖状の二重鎖を、対照鎖と試料鎖との間の塩基対のミスマッチに起因して存在するものなど、二重鎖の一本鎖領域を切断する薬剤で処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖を、RNAアーゼで処理することができ、DNA/DNAハイブリッドを、SINクレーゼで処理して、ミスマッチ領域を酵素的に消化する。他の実施形態では、ミスマッチした領域を消化するために、DNA/DNAまたはRNA/DNA二重鎖を、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムおよびペリジンを処理することができる。ミスマッチ領域の消化の後、次いで、結果として得られる材料を、変性ポリアクリルアミドゲル上で、サイズにより分離して、変異部位を決定する。例えば、Cottonら（1988年）、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85巻：4397頁およびSaleebaら（1992年）、Methods Enzymol., 217巻：286～295頁を参照されたい。好ましい実施形態では、対照DNAまたはRNAを、検出のために標識することができる。

20

30

【0237】

さらに別の実施形態では、ミスマッチ切断反応では、細胞の試料から得られたバイオマーカーcDNA内の点変異を検出およびマッピングするための、規定された系において、二本鎖DNA内のミスマッチ塩基対を認識する、1または複数のタンパク質（いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素）を利用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチにおけるAを切断し、HeLa細胞に由来するチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチにおけるTを切断する（Hsuら（1994年）、Carcinogenesis, 15巻：1657～1662頁）。例示的な実施形態に従い、バイオマーカー配列、例えば、DNAミスマッチ修復酵素で処理された野生型バイオマーカーと、存在する場合、切断産物とに基づくプローブを、電気泳動プロトコールなど（例えば、米国特許第5,459,039号）により検出することができる。

40

【0238】

他の実施形態では、電気泳動移動度の変更を使用して、バイオマーカー遺伝子内の変異を同定することができる。例えば、一本鎖コンフォメーション多型（SSCP）を使用して、変異体核酸と、野生型核酸との間の電気泳動移動度の差異を検出することができる（Oritaら（1989年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8

50

6巻：2766頁；Cotton(1993年)、Mutat. Res.、285巻：125～144頁およびHayashi(1992年)、Genet. Anal. Tech. Appl.、9巻：73～79頁もまた参照されたい)。試料および対照バイオマーカー核酸の一本鎖DNA断片を、変性させ、復元する。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従い変動し、結果として得られる電気泳動移動度の変更は、単一の塩基変化さえも検出可能とする。DNA断片は、標識されたプローブにより標識または検出することができる。アッセイの感度は、二次構造が配列の変化に対してより感受性であるRNA(DNAではなく)を使用することにより増強することができる。好ましい実施形態では、対象の方法により、ヘテロ二重鎖解析を活用して、電気泳動移動度の変化に基づいて、二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離する(Keenら(1991年)、Trends Genet.、7巻：5頁)。

10

【0239】

さらに別の実施形態では、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)を使用して、変性剤の勾配を含有するポリアクリルアミドゲル中の変異体または野生型断片の移動についてアッセイする(Myersら(1985年)、Nature、313巻：495頁)。DGGEを、解析法として使用する場合、例えば、PCRにより、約40bpの高融点のGCリッチDNAのGCクランプを添加することにより、DNAを修飾して、それが完全に変性しないことを確認する。さらなる実施形態では、温度勾配を、変性勾配の代わりに使用して、対照DNAと、試料DNAとの、移動度の差異を同定する(RosenbaumおよびReissner(1987年)、Biophys. Chem.、265巻：1275

20

【0240】

点変異を検出するための他の技法の例は、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長を含むがこれらに限定されない。例えば、既知の変異を中央部に配したオリゴヌクレオチドプライマーを調製し、次いで、完全なマッチが見出される場合に限り、ハイブリダイゼーションを許容する条件下で、標的DNAとハイブリダイズさせることができる(Saikira(1986年)、Nature、324巻：163頁；Saikira(1989年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻：6230頁)。オリゴヌクレオチドを、ハイブリダイズする膜に接合させ、標識された標的DNAとハイブリダイズさせる場合は、このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを、PCR増幅された標的DNAまたはいくつかの異なる変異とハイブリダイズさせる。

30

【0241】

代替的に、選択的PCR増幅に依存する、対立遺伝子特異的増幅技術を、本発明と共に使用することができる。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中央部(増幅が、差次的ハイブリダイゼーションに依存するように)(Gibbsら(1989年)、Nucleic Acids Res.、17巻：2437～2448頁)または、適切な条件下で、ミスマッチが、ポリメラーゼによる伸長を防止または低減しうる、一方のプライマーの3'端の最末端(Prossner(1993年)、Tibtech、11巻：238頁)において、目的の変異を保有しうる。加えて、新規の制限部位を、変異領域内に導入して、切断ベースの検出を創出することは、所望でありうる(Gaspariniら(1992年)、Mol. Cell Probe、6巻：1頁)。ある特定の実施形態では、増幅はまた、増幅のために、Taqリガーゼを使用して実施することもできることが予期される(Barany(1991年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88巻：189頁)。このような場合、ライゲーションは、5'側配列の3'末端において完全なマッチがなされる場合に限り生じることから、増幅の存在または非存在を探索することにより、特異的な部位における、既知の変異の存在を検出することが可能となる。

40

【0242】

本明細書に記載される組成物は、本明細書に記載されるバイオマーカーに関する、様々

50

な診断、予後診断、および治療適用において使用することができる。

【0243】

f. 予測医学

本発明はまた、診断アッセイ、予後診断アッセイ、および臨床試験のモニタリングを、予後診断（予測）の目的で使用して、これにより、個体を予防的に処置し、かつ/または有効性の可能性を決定する予測医学の分野にも関する。したがって、本発明の一態様は、表1で列挙されるバイオマーカーなど、本明細書に記載されるバイオマーカーの存在、非存在、量、および/または活性レベルを、生体試料（例えば、血液、血清、細胞、または組織）の文脈で決定して、これにより、元の免疫障害においてであれ、再発性免疫障害においてであれ、免疫障害に罹患した個体が、抗免疫障害療法（例えば、複数の可変用量によるIL-2療法単独、または1もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量によるIL-2療法）に応答する可能性が高いかどうかを決定するための診断アッセイに関する。このようなアッセイを、予後診断または予測の目的で使用して、これにより、バイオマーカーポリペプチド、核酸の発現または活性を特徴とするか、またはこれらと関連する障害の発症の前、または再発の後で、個体を予防的に処置することができる。当業者は、任意の方法により、表1で列挙されるバイオマーカーなど、本明細書に記載されるバイオマーカーのうちの1または複数（例えば、組合せ）を使用しうることを理解するであろう。

10

【0244】

本発明の別の態様は、薬剤（例えば、薬物、化合物、および核酸ベースの小分子）の、Tregの増殖、Treg数、Tregの活性、Treg:Tcon比などのバイオマーカーの発現または活性に対する影響のモニタリングに関する。

20

【0245】

当業者はまた、ある特定の実施形態では、本発明の方法は、コンピュータプログラムおよびコンピュータシステムを実装することも理解するであろう。例えば、コンピュータプログラムを使用して、本明細書に記載されるアルゴリズムを実施することができる。コンピュータシステムはまた、本発明の方法により生成されるデータであって、本発明の方法の実装において、コンピュータシステムが使用しうる、複数のバイオマーカーシグナルの変化/プロファイルを含むデータを保存し、操作することも可能である。ある特定の実施形態では、コンピュータシステムは、バイオマーカーの発現データを受容し；(ii)データを保存し；(iii)本明細書に記載されるいくつかの方式（例えば、適切な対照と比べた解析）で、データを比較して、免疫障害の影響を受ける組織に由来する、情報を与えるバイオマーカーの状態を決定する。他の実施形態では、コンピュータシステムは、(i)決定されたバイオマーカーの発現レベルを、閾値と比較し；(ii)前記バイオマーカーレベルが、閾値に対して（例えば、閾値を上回るかまたは下回るように）有意にモジュレートされているかどうかについての表示、または前記表示に基づく表現型を出力する。

30

【0246】

ある特定の実施形態では、このようなコンピュータシステムはまた、本発明の一部と考えることもできる。多数の種類のコピュータシステムを使用して、バイオインフォマティクスおよび/またはコンピュータの技術分野における当業者が所有する知識に従い、本発明の解析法を実装することができる。このようなコンピュータシステムの作動中に、いくつかのソフトウェアコンポーネントを、メモリにロードすることができる。ソフトウェアコンポーネントは、当技術分野で標準的なソフトウェアコンポーネント、および本発明に特有のコンポーネント（例えば、Linら（2004年）、Bioinformatics、20巻、1233~1240頁において記載されている、dCHIPソフトウェア；当技術分野で公知の、放射基底型機械学習アルゴリズム（radial basis machine learning algorithm）（RBM））の両方を含みうる。

40

【0247】

50

本発明の方法はまた、式の記号入力と、使用される特殊なアルゴリズムを含む、高レベルの処理仕様とを可能とする、数学ソフトウェアパッケージへとプログラム化またはモデル化し、これにより、使用者を、個々の式およびアルゴリズムを手順通りにプログラミングする必要から解放することもできる。このようなパッケージは、例えば、Mathworks (Natick, Mass.) 製の Matlab、Wolfram Research (Champaign, Ill.) 製の Mathematica、または MathSoft (Seattle, Wash.) 製の S-Plus を含む。

【0248】

ある特定の実施形態では、コンピュータは、バイオマーカーデータを保存するためのデータベースを含む。このような保存されたプロファイルは、後の時点において、目的の比較を実施するのに、アクセスおよび使用することができる。例えば、免疫障害の影響を受けていない対象の組織に由来する試料についての、バイオマーカー発現プロファイルおよび/または同じ種の関与する集団内の、情報を与える、目的の遺伝子座の、集団ベースの分布から生成されるプロファイルを保存し、後に、免疫障害の影響を受けた対象の組織に由来する試料または免疫障害の影響を受けていることが疑われる対象の組織のプロファイルと比較することができる。

10

【0249】

本明細書に記載される例示的なプログラム構造およびコンピュータシステムに加えて、当業者には、他の代替的なプログラム構造およびコンピュータシステムが、たやすく明らかであろう。したがって、上記に記載されたコンピュータシステムおよびプログラム構造から、精神または範囲において逸脱しない、このような代替的システムは、付属の特許請求の範囲内に包含されることを意図する。

20

【0250】

c. 診断アッセイ

本発明は、部分的に、生体試料が、抗免疫障害療法（例えば、複数の可変用量による IL-2 療法単独、または 1 もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量による IL-2 療法）に応答する可能性が高い免疫障害と関連するかどうかを正確に分類するための方法、系、およびコードを提供する。一部の実施形態では、本発明は、統計学的アルゴリズムおよび/または経験的データ（例えば、本明細書に記載されるバイオマーカーの量または活性）を使用して、試料（例えば、対象に由来する）を、抗免疫障害療法（例えば、複数の可変用量による IL-2 療法単独、または 1 もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量による IL-2 療法）に応答するかまたは応答しない免疫障害と関連するかまたはこの危険性があるものとして分類するのに有用である。

30

【0251】

バイオマーカーの量または活性を検出するための例示的な方法であり、したがって、試料が、抗免疫障害療法（例えば、複数の可変用量による IL-2 療法単独、または 1 もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量による IL-2 療法）に応答する可能性が高いか、その可能性が低いかを分類するのに有用な方法は、被験対象から生体試料を得るステップと、生体試料を、生体試料中のバイオマーカーの量または活性を検出することが可能な薬剤であって、抗体もしくはその抗原結合性断片のようなタンパク質結合性薬剤、またはオリゴヌクレオチドのような核酸結合性薬剤などの薬剤と接触させるステップとを伴う。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合性断片を使用し、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超のこのような抗体または抗体断片を、組み合わせて（例えば、サンドイッチ ELISA において）または逐次的に使用することができる。ある特定の場合には、統計学的アルゴリズムは、単一の学習統計分類子システム (learning statistical classifier system) である。例えば、単一の学習統計分類子システムを使用して、バイオマーカーの予測または確率値および存在またはレベルに基づき、試料を分類することができる。単一の学習統計分類子システムの使用は、試料を、例えば、抗免疫障害療法（

40

50

例えば、複数の可変用量による I L - 2 療法単独、または 1 もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量による I L - 2 療法) の、レスポンドーまたはプログレッサー試料である可能性が高いと、少なくとも約 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の感度、特異度、陽性予測値、陰性予測値、および / または全体精度で分類することが典型的である。

【0252】

当業者には、他の適切な統計学的アルゴリズムが周知である。例えば、学習統計分類システムは、複雑なデータセット (例えば、目的のマーカーのパネル) に適応し、このよ
 うなデータセットに基づき、決定を下すことが可能な、機械学習アルゴリズム技術を含む
 10 一部の実施形態では、分類木 (例えば、ランダムフォレスト) など、単一の学習統計分類
 子システムを使用する。他の実施形態では、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8
 つ、9つ、10、またはそれ超の学習統計分類子システムの組合せを、好ましくはタンド
 ムで使用する。学習統計分類子システムの例は、帰納学習 (例えば、ランダムフォレスト
 、分類および回帰木 (C & R T)、ブースティングツリー (boosted tree)
 などの決定 / 分類木)、PAC (Probably Approximately Correct) 学習、コネクショニスト学習 (例えば、ニューラルネットワーク (NN)、
 人工ニューラルネットワーク (ANN)、ニューロファジーネットワーク (NFN)、ネ
 ットワーク構造、パーセプトロン、例えば、多層パーセプトロン、多層フィードフォ
 20 ムネットワーク、ニューラルネットワークの応用、信念ネットワークにおけるベイジアン
 学習など)、強化学習 (例えば、ナイーブ学習、適応動的学習、および時間差学習など、
 既知の環境における受動学習、未知の環境における受動学習、未知の環境における能動学
 習、学習行動値関数、強化学習の応用など)、ならびに遺伝的アルゴリズムおよび進化的
 プログラミングを使用する、学習統計分類子システムを含むがこれらに限定されない。他
 の学習統計分類子システムは、サポートベクターマシン (例えば、カーネル法)、MAR
 S (multivariate adaptive regression splines)、レーベンバーグ - マーカートアルゴリズム、ガウス - ニュートンアルゴリズム、
 ガウス混合、勾配降下アルゴリズム、および学習ベクトル量子化法 (LVQ) を含む。あ
 る特定の実施形態では、本発明の方法は、試料の分類結果を、臨床医、例えば、腫瘍学者
 30 に送るステップをさらに含む。

【0253】

別の実施形態では、対象の診断に続いて、診断に基づき、個体に、治療有効量の、規定された処置を施行する。

【0254】

一実施形態では、方法は、対照生体試料 (例えば、免疫障害を有さないか、またはその
 免疫障害が、抗免疫障害療法 (例えば、複数の可変用量による I L - 2 療法単独、または
 1 もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量による I L - 2 療
 法) に対して感受性である対象に由来する生体試料)、寛解中の対象に由来する生体試料
 40 、または抗免疫障害療法 (例えば、複数の可変用量による I L - 2 療法単独、または 1 も
 しくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数の可変用量による I L - 2 療法)
 にも拘らず、進行性免疫障害を発症することに対する処置期間中の対象に由来する生体試
 料を得るステップをさらに伴う。

【0255】

d. 予後診断アッセイ

本明細書で記載される診断法はさらに、抗免疫障害療法 (例えば、複数の可変用量によ
 る I L - 2 療法単独、または 1 もしくは複数の他の抗免疫障害療法と組み合わせた、複数
 の可変用量による I L - 2 療法) に応答性である可能性が高いか、またはその可能性が低
 い免疫障害を有するか、またはこれを発症する危険性がある対象を同定するのに活用す
 ることができる。前出の診断アッセイまたは以下のアッセイなど、本明細書で記載されるア
 50

ッセイを活用して、免疫障害などにおける、本発明の少なくとも1つのバイオマーカーの量もしくは活性の誤調節と関連する障害を有するか、またはこれを発症する危険性がある対象を同定することができる。代替的に、予後診断アッセイを活用して、免疫障害などにおける、本発明の少なくとも1つのバイオマーカーの誤調節と関連する障害を有するか、またはこれを発症する危険性がある対象を同定することができる。さらに、本明細書に記載される予後診断アッセイを使用して、対象に、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣剤（peptidomimetic）、ポリペプチド、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬物候補）を投与して、異常なバイオマーカーの発現または活性と関連する疾患または障害を処置しうるかどうかを決定することができる。

【0256】

e. 処置法

本発明の別の態様は、本明細書に記載される1または複数のバイオマーカー（例えば、Tregの増殖、Treg数、Tregの活性、Tregのアポトーシス、Treg:Tcon比、表1および実施例で列挙されるバイオマーカーまたはそれらの断片など）の発現または活性を、治療目的でモジュレートする方法に関する。本発明のバイオマーカーは、免疫障害の処置と関連することが裏付けられている。したがって、バイオマーカーの活性および/または発現のほか、1または複数のバイオマーカーまたはそれらの断片と、その自然の結合パートナーまたはそれらの断片との間の相互作用も、免疫障害を処置するためにモジュレートすることができる。

【0257】

本発明のモジュレート法は、上記に記載した通り、細胞を、表1および実施例で列挙される1もしくは複数のバイオマーカーまたはそれらの断片を含む、本発明の1または複数のバイオマーカー、あるいは細胞と関連するバイオマーカー活性のうちの1または複数のモジュレートする薬剤と接触させるステップを伴う。バイオマーカー活性をモジュレートする薬剤は、核酸もしくはポリペプチド、バイオマーカーの天然に存在する結合パートナー、バイオマーカーに対する抗体、バイオマーカーに対する抗体と他の免疫関連標的に対する抗体との組合せ、1もしくは複数のバイオマーカーアゴニストもしくはアンタゴニスト、1もしくは複数のバイオマーカーアゴニストもしくはアンタゴニストのペプチド模倣剤、1もしくは複数のバイオマーカーのペプチド模倣剤、他の小分子、または1もしくは複数のバイオマーカー核酸の遺伝子発現産物を指向する低分子RNAもしくはこれらの模倣剤など、本明細書に記載される薬剤でありうる。

【0258】

表1および実施例で列挙される1もしくは複数のバイオマーカーまたはそれらの断片を含む、本発明の1または複数のバイオマーカーの発現をモジュレートする薬剤は、例えば、アンチセンス核酸分子、RNAi分子、shRNA、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA*、抗miRNA、もしくはmiRNA結合性部位、もしくはそれらの改変体、または他の低分子RNA分子、三重鎖オリゴヌクレオチド、リボザイム、あるいは1または複数のバイオマーカーポリペプチドを発現させるための組換えベクターである。例えば、1または複数のバイオマーカーポリペプチドの翻訳開始部位の周囲の領域に相補的なオリゴヌクレオチドを合成することができる。1または複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞培地に、典型的には、200 μg/mlで添加することもでき、1または複数のバイオマーカーポリペプチドの合成を防止するように、患者に投与することもできる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞により取り込まれ、1または複数のバイオマーカーmRNAとハイブリダイズして、翻訳を防止する。代替的に、三重鎖構築物を形成して、DNAの巻き戻しおよび転写を防止するように、二本鎖DNAに結合するオリゴヌクレオチドを使用することができる。いずれの結果としても、バイオマーカーポリペプチドの合成が遮断される。バイオマーカーの発現をモジュレートする場合、このようなモジュレーションは、バイオマーカー遺伝子をノックアウトすることによる以外の手段により生じることが好ましい。

【0259】

10

20

30

40

50

発現をモジュレートする薬剤は、それらが、細胞内のバイオマーカの量を制御するという事実のために、また、細胞内のバイオマーカ活性の総量もモジュレートする。

【0260】

一実施形態では、薬剤は、表1および実施例で列挙される1もしくは複数のバイオマーカまたはそれらの断片を含む本発明の1または複数のバイオマーカの1または複数の活性を刺激する。このような刺激性薬剤の例は、活性なバイオマーカポリペプチドまたはその断片、および細胞に導入された、バイオマーカまたはその断片をコードする核酸分子（例えば、cDNA、mRNA、shRNA、siRNA、低分子RNA、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA*、抗miRNA、もしくはmiRNA結合性部位、もしくはそれらの改変体、または当業者に公知の、他の機能的に同等の分子）を含む。別の実施形態では、薬剤は、1または複数のバイオマーカ活性を阻害する。一実施形態では、薬剤は、バイオマーカの、その自然の結合パートナーとの相互作用を阻害または増強する。このような阻害性薬剤の例は、アンチセンス核酸分子、抗バイオマーカ抗体、バイオマーカ阻害剤、および本明細書に記載されるスクリーニングアッセイで同定される化合物を含む。

10

【0261】

これらのモジュレート法は、*in vitro*において（例えば、細胞を薬剤と接触させることにより）実施することもでき、代替的に、薬剤を、*in vivo*において、細胞と接触させることにより（例えば、薬剤を対象に投与することにより）実施することもできる。一実施形態では、方法は、薬剤（例えば、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにより同定される薬剤）、またはバイオマーカの発現もしくは活性をモジュレートする（例えば、上方調節または下方調節する）薬剤の組合せを投与するステップを伴う。別の実施形態では、方法は、低減した、異常な、または望ましくないバイオマーカの発現または活性を補完する治療としての、1または複数のバイオマーカポリペプチドまたは核酸分子を投与するステップを伴う。

20

【0262】

バイオマーカが異常に下方調節されている状況、および/またはバイオマーカ活性の増大が、有益な効果を及ぼす可能性が高い状況では、バイオマーカ活性の刺激が所望される。同様に、バイオマーカが異常に上方調節されている状況、および/またはバイオマーカ活性の低下が、有益な効果を及ぼす可能性が高い状況では、バイオマーカ活性の阻害が所望される。

30

【0263】

加えて、これらのモジュレート剤はまた、例えば、化学療法剤、ホルモン、抗血管新生剤（*antiangiogen*）、放射性標識化合物との組合せ治療において投与することもでき、手術、寒冷療法、および/または放射線治療との組合せ治療において投与することもできる。前出の処置法は、従来の治療の他の形態（例えば、当業者に周知の免疫障害のための標準治療処置）と共に施行することができ、従来の治療と連続的に、その前に、またはその後に行うことができる。例えば、これらのモジュレート剤は、治療有効量の免疫抑制剤または治療と共に施行することができる。

【0264】

本発明はまた、本明細書に記載されるバイオマーカを検出および/またはモジュレートするためのキットも包含する。本発明のキットはまた、本明細書で提示される、開示される発明の方法における、開示される発明のキットまたは抗体の使用を開示または記載する指示材料も含みうる。キットはまた、キットがデザインされる特定の適用を容易とする、さらなる構成要素も含みうる。例えば、キットは加えて、標識を検出する手段（例えば、酵素標識のための酵素基質、蛍光の標識、ヒツジ抗マウス-HRPなどの適切な二次標識を検出するフィルターセットなど）、および対照（例えば、対照生体試料または標準物質）のために必要な試薬を含有しうる。キットは加えて、開示される発明の方法における使用のための、認知された緩衝液および他の試薬を含みうる。非限定的な例は、担体タンパク質または洗浄剤など、非特異的結合を低減する薬剤を含む。

40

50

【0265】

以下の実施例では、本発明の他の実施形態について記載する。本発明を、以下の実施例によりさらに例示するが、これらは、さらに限定的を加えるものとみなされるべきでない。

【実施例】

【0266】

(実施例1：低用量IL-2は、TregおよびTreg:Tcon比を増強する)

臨床において、低用量IL-2は、Tregを増強しうる。ステロイド不応性cGVHDについてのフェーズ1研究では、8週間毎日の皮下IL-2 (1×10^6 IU/m²) 療法は、安全かつ忍容可能であった(最大で 3×10 IU/m²の用量)(Korethら(2011年)、N. Engl. J. Med.、365巻:2055~2066頁)。適格性は、4週間にわたる、少なくとも0.25 mg/kgのプレドニゾンに应答しなかったcGVHD、感染の非存在、および事前の、4週間にわたる免疫抑制の安定的な用量を含んだ。研究は、3つの用量レベル(8週間にわたり0.3、1、および 3×10^6 IU/m²/日)を伴う、フェーズ1の用量漸増デザインを有した。

10

【0267】

登録された(accrued)29例の参加者:28例は、毒性について評価可能であり、23例は、应答について評価可能である。 1×10^6 IU/m²/日のIL-2を、MTDであると決定した。2例の参加者が、用量制限毒性(血栓性微小血管症)を発症した。GVHD発赤を経験した参加者は存在しなかった。悪性疾患の再発は、見られなかった。23例の参加者中12例は、客観的臨床应答を示した。低用量IL-2は、従来型CD4+ T(Tcon)カウントに影響を与えずに、in vivoにおけるTregカウントを、選択的に増大させた(図1)。Treg:Tcon比もまた、上昇した(図2)。NK細胞カウントは、より低い程度まで上昇した。低用量IL-2は、CD8+ T、CD8+ B、またはCD8+ NKTカウントに影響を及ぼさなかった。TregカウントおよびTreg:Tcon比は、8週間のIL-2において上昇を維持し、次いで、IL-2を中止したら、低下した。IL-2誘導性Tregは、FOXP3+を発現し、Tcon抑制アッセイにおいて機能的であった。臨床および免疫应答が、12週間を超える長期IL-2療法に対するレスポナーにおいて持続し、併用免疫抑制の漸減を可能としたことは重要であった。

20

30

【0268】

しかし、全例におけるin vivoでのTregの優先的増強にも拘らず、評価可能な参加者の半数しか臨床应答(部分应答、PR)を示さなかった(Korethら(2011年)、N. Engl. J. Med.、365巻:2055~2066頁)。毎日の皮下(SC)低用量IL-2療法でさえも、参加者の半数は、臨床的利益を得ない(Korethら(2011年)、N. Engl. J. Med.、365巻:2055~2066頁)。これらのデータは、低用量IL-2が、cGVHDにおいて安全であり、Tregを優先的に増進することを示す。

【0269】

血漿IL-2レベルは、固定用量によるIL-2療法中に、急速に(例えば、1週目までに)上昇し、次いで、Tregカウントが上昇する間、毎日のIL-2投与にも拘らず低下した(Matsuokaら(2013年)、Sci. Transl. Med.、5巻:179ra43)が、結果は、Treg上で構成的に発現する、高アフィニティーのIL-2受容体(CD25)への結合を介するIL-2隔離の増大に起因すると考えられる。その後、IL-2療法中に、Tregの絶対数が増大するにつれ、Treg上のCD25発現のさらなる増大が見られる(Matsuokaら(2013年)、Sci. Transl. Med.、5巻:179ra43)(図3)。

40

【0270】

かつて、同様の解析を実施して、不可逆性の実質、皮膚、および筋骨格変化が開始する前に、cGVHD経過の早期に誘発される低用量IL-2の効果解析した。このフェー

50

ズ2研究では、2系統 (line) 以下のcGVHD治療を既に施された患者を、 1×10^6 IU/m²/日 (すなわち、上記で記載したMTD) で毎日SC IL-2の12週間のクールにより処置した。4週間の中断の後で、臨床的利益を享受する患者には、長期IL-2療法を施すことができ、この間に、併用免疫抑制の漸減が可能となった。主要目的は、cGVHDの臨床応答率を決定することであった。患者は、NIH基準 (Filipovichら (2005年)、*Biol. Blood Marrow Transplant.*、11巻: 945~956頁) に従い、研究時のベースライン、6、12、および16週間、および1年において、cGVHD評価を受けた。副次的目的は、毒性の評価; 免疫学的影響; 免疫効果の、臨床応答との相関; および1年におけるコルチコステロイドの使用を含んだ。cGVHD病変部位の中央値が4であり、以前のcGVHD治療数の中央値が1である35例の患者を登録した。上記で記載した通り、低用量IL-2処置は一般に、良好に忍容され、患者の悪性疾患は再発しなかった。12週目に、評価可能な患者33例中20例では、cGVHD客観的応答 (PR) が記録され、2例の患者では、cGVHDが進行した。cGVHD応答の部位は、皮膚 (n=9); 関節/筋膜/筋肉 (n=3); 肝臓 (n=7); 消化管 (n=3); GU路 (n=1); および肺 (n=5) を含んだ。臨床的利益 (PRまたはわずかな応答を伴うSD) を伴う23例の患者は、16週目の後で長期IL-2療法を開始し、2013年12月31日現在において、中央値が5.8カ月間 (範囲: 0.4~26.1) の長期IL-2療法中において、平均50%のステロイド用量の漸減 (範囲: 0~100) を示している。14例は、長期IL-2療法を続ける。

10

20

【0271】

上記で記載した結果と同様に、免疫学的には、低用量IL-2は、Tconに影響を及ぼすことなく、Tregカウントの同様の上昇を誘導し、Treg:Tcon比の中央値は上昇した (図4)。TregカウントおよびTreg:Tcon比は、12週目にも上昇を維持し、IL-2の中止後に低下した。このフェーズ2試験は、cGVHDにおける低用量IL-2の臨床的影響と、in vivoにおける、TregおよびTconのホメオスタシスに対するその機能的な効果とを確認する。進行中の検査室研究により、免疫学的効果が、臨床応答と相関しうるかどうかと、それらが低用量IL-2療法の後で持続する程度とが決定されるであろう。

30

【0272】

本明細書では、ピークTreg増殖が、IL-2誘導レジメン開始の1週間後までに、全てのTregサブセット内で、Treg集団サイズの増大と共に生じたことがさらに決定されている。SPADE (spanning-tree progression analysis of density-normalized events) を使用する飛行時間型マスサイトメトリー (CyTOF) 解析を選んだ。なぜなら、CyTOFが、スペクトルの重複および自己蛍光に起因する、蛍光サイトメトリーに固有のバックグラウンドノイズを回避し、抗原に結合した抗体または他のプローブを、高感度で測定するために、最大で37のランタニドアイソトープを同時に提供するからである。Tregの増殖に関しては、ベースラインにおいて、活性化したメモリーTregおよびナイーブTregの小サブセットに制限された、限定されたKi-67の増殖が観察された。ピークTreg増殖は、IL-2の開始の1週間後までに、全てのTregサブセット内で、Treg集団サイズの増大と共に生じた (図5)。しかし、IL-2処置の12週目に、拡大されたTreg部分集団が保存される一方で、Tregの増殖は、2週目の後で、Ki-67発現 (増殖) の降下と共に低下した。しかし、IL-2の中断の4週間後までに、Ki-67 Tregの増殖レベルおよびTreg集団は枯渇した。pSTAT5およびFoxP3マーカーを使用して、Treg活性化の同様の時間的パターンであって、初期においてまず、Treg部分集団にわたり、全身で増強され、その後、IL-2処置期間中に、増強されたTreg集団サイズの持続的な保存にも拘らず低下するパターンが観察された (図5)。次いで、IL-2の中断の4週間後までに、Treg活性化マーカー発現の降下およびTreg集団のかなりの枯渇が観察された。

40

50

【0273】

全ての患者が応答したわけではなく、レスポンドーにおける利益は、部分的であることが多かった。フェーズ1データでは、cGVHDの臨床応答は、研究参入時における、高いTreg:Tcon比と関連し、循環TregカウントまたはTreg:Tcon比の上昇とは関連しないようであった。in vivoにおけるTregの増強にも拘らず、一部の患者において、臨床応答が欠如したことはまた、進行性cGVHDにおける、Treg細胞の内在性欠陥（例えば、短縮したテロメア）を記録する本発明者らのデータとも符合する（Kawanoら（2011年）、Blood、118巻：5021～5030頁）。さらに、IL-2を停止させると、Tregの増強が急速に減衰したことから、重大なTreg欠損を伴う進行性cGVHD患者が、Tregの数および機能をさらに増大させ、それらの低下を遅延させるか、または防止するには、さらなる介入が必要であることが示される。

10

【0274】

本明細書では、このようなさらなる介入は、Tconの活性化も過剰な有害事象も誘導することなく、血漿IL-2レベルをより完全に回復させ、Tregの増殖、活性化、および新生をさらに増進するために、血漿IL-2レベルを誘導した後で、個々の患者におけるIL-2用量の漸増を伴う維持レジメンを含むことが決定された。Treg細胞はCD25を構成的に発現し、これは高アフィニティーIL-2受容体の形成に寄与するので、IL-2の隔離が増大し、持続的な毎日のIL-2投与にも拘らず、血漿IL-2レベルが低下すると考えられる。加えて、IL-2は、Treg上のCD25発現の増大を誘導し、IL-2の取込みをさらに増大させる。IL-2は、Tregの増殖、pSTAT5およびFoxP3 Treg活性化を誘導した。実際、RTE Tregの発生は、その後、IL-2療法の経過中に、血漿IL-2レベルの低下と共に低下した。このようにして、IL-2により誘導されるTregの増強がin vivoにおいて生じ、数が増大した、CD25発現が高い循環Tregに結合後の血漿IL-2レベルの減退に起因するタキフィラキシーを回避する。これらの方法は、低用量IL-2によるin vivoにおけるTregの増進にも拘らず認められる部分的な臨床cGVHD応答を克服する。血漿IL-2レベルの予期される降下時における、個々の患者のIL-2用量の漸増は、IL-2レベルを回復させ、Tconの活性化または全身性AEを誘導することなく、Tregの増殖および活性化をさらに増進する機構をもたらす。

20

30

【0275】

さらに、本明細書では、Tregレパートリーの劇的な増強が、低用量IL-2が、in vivoにおける、T細胞の寛容および免疫に媒介される炎症の抑制を増強する機構のうちの一つであり、in vivoにおける、低用量IL-2の、Tregに対する選択的効果をさらに裏付けることが決定されている。特に、T細胞受容体（TCR）シーケンシング（Adaptive Biotechnologies、Seattle、WA；ワールドワイドウェブ上のimmunoseq.comにおいて入手可能）を使用して、レパートリーの多様性を精査した（Robinsら（2012年）、J. Immunol. Methods、375巻：14～19頁；Robinsら（2009年）、Blood、114巻：4099～4107頁；Robinsら（2010年）、Sci. Transl. Med.、2巻：47ra64）。アッセイでは、マルチプレックスPCRにより、45のV および13全てのJ セグメントに対するプライマーを活用して、V、D、およびJセグメントと、それらの関連する非鋳型化挿入部分との接合により形成される可変領域にわたり、TCRの再配列CDR3領域を増幅する。TCR配列の数および頻度を使用して、エントロピーにより測定されるT細胞レパートリーの多様性を特徴付けたが、この場合、より高いエントロピースコアは、各試料について、TCR頻度内で、より大きな、logによる多様性を反映した。TCR配列解析はまた、ある時間にわたる一連の患者試料中の、個々のT細胞クローンの追跡も可能とした。低用量IL-2療法の後における、cGVHD患者における結果は、Treg TCRの多様性の、2～3logの増大を示したが、Tcon多様性の変化は示さなかった（図6）。データを組

40

50

み合わせると、図7は、予測値応答を、ベースラインまたは1週目におけるTreg : Tcon比に従い層別化する、応答予測因子を示す。

【0276】

本明細書ではまた、BH-3プロファイリング解析により、IL-2処置は、Tregの、外因性および内因性経路によるアポトーシス感受性を、より生理学的レベルへと回復させることも決定されている。

【0277】

(実施例2：代表的な、複数の可変用量によるIL-2治療レジメン)

以下では、本発明の、複数の可変用量によるIL-2治療法についての、代表的な非限定的実施形態を提示する。

【0278】

以下の患者集団基準を使用する：1)慢性GVHDを伴い、全身ステロイドに対する応答が不十分な、成人および小児の参加者；2)少なくとも2回にわたる以前の全身療法(ステロイドを含む)にも拘らず、遷延性または再発性の慢性GVHD；3)制御不良の活動性感染症を伴わないこと；4)悪性疾患の再発を伴わないこと；および5)カルノフスキーPS 60。

【0279】

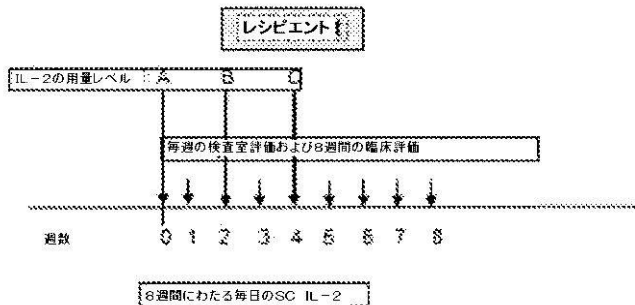
具体的な包含および除外基準については、下記で詳述する。

1)参加者数：20例(成人10例；小児10例)；

2)研究デザインおよび方法：不応性cGVHDを伴う、成人(n=10)および小児(n=10)患者に、3つの用量レベルにわたり、2週間ごとに、各患者において用量漸増される、毎日のSC IL-2(DLTまたは重度のDLT以外のAEの非存在下で)を施し、それらの個々のMTDで、6週間にわたり維持した。

3)フェーズI

【化1】



【0280】

安全性および有効性解析は、以下の通りである。主要評価項目は、個々の患者において用量漸増されるIL-2の安全性、毒性、およびMTDである。副次的評価項目は、個々の患者において用量漸増されるIL-2の臨床的および免疫学的影響であって、1)不応性cGVHDにおける免疫学的影響についての評価；2)臨床的cGVHD応答についての評価；ならびに3)免疫学的効果の、臨床応答との相関、および固定用量IL-2で処置された患者の免疫学的および臨床応答との比較を含む臨床的および免疫学的影響である。

【0281】

評価(8週間にわたる)は、以下の通りである：1)重度の血液毒性についての評価；2)グレード3またはそれ超の非血液毒性についての評価；3)重篤な感染症についての評価；4)免疫学的影響についての評価；および5)GVHDの応答または進行についての評価。

【0282】

参加者は、以前に開始されたcGVHD治療を、8週間の研究中に持続することができる。これらの薬剤の具体的な用量およびスケジュールは、研究の目的にとって重要ではな

10

20

30

40

50

く、施設の基準に従う用量の調整（例えば、薬物レベルに基づく調整）を許容する。8週間の研究における併用cGVHD治療の漸減は、一般に意図されないが、このような変更は、主治医に従い臨床的に必要な場合は許容される。ステロイドの用量は、研究参入時および8週目において記録する。

【0283】

治療前、治療中、および治療後に得られる末梢血試料を活用して、処置の免疫学的効果を評価する。このような研究は、以下を含む。

1) リンパ球サブセットについての表現型解析：末梢血の、リンパ球マーカーに特異的なモノクローナル抗体とのインキュベーションを使用して、機能的に異なるリンパ球サブセットを同定する。末梢血細胞の、蛍光色素とコンジュゲートさせたモノクローナル抗体との直接的なインキュベーションの後、個々のサブセットを、フローサイトメトリーにより数え上げる。CD4+ Tregのほか、他のCD4およびCD8 T細胞のサブセット、B細胞、およびナチュラルキラー細胞についての抗体パネルを開発した。この表現型解析は、胸腺新生のほか、表現型的に十分に規定されたT細胞サブセットの増殖およびアポトーシス感受性を評価する定量的方法を提示する。これらは、用量漸増IL-2療法に应答する、各T細胞集団のホメオスタシス均衡の測定を可能とする。ECPを組み合わせた研究では、これらの変化を、ECPで処置された細胞の用量であって、各ECP手順により再注入されるパフィーコート、フローサイトメトリーの細胞カウントにより決定される用量と関連させる。

【0284】

2) 血漿サイトカイン：ELISAアッセイを使用して、血漿試料中のIL-2のレベルを測定する。必要な場合、T細胞のホメオスタシスにおいて役割を果たす、IL-7、IL-10、およびIL-15など、他のサイトカインもまた、これらの試料中で測定することができる。

【0285】

3) 機能アッセイ：処置に应答して、*in vivo*において拡大するTreg細胞の機能的な能力を評価するために、選択された試料を使用して、それらの免疫抑制性能力を評価する。これらの実験では、Tregを、高速細胞選別により精製し、その後、自家T細胞の増殖を抑制するそれらの能力について調べる。

【0286】

4) DNA解析：免疫細胞の再構成について評価するさらなる遺伝子解析（例えば、TCRシーケンシング）を考慮することができ、このような解析のために、委託されたDNAおよび細胞試料にアクセスすることができる。

【0287】

まとめると、これらのアッセイは、個々の患者のIL-2用量漸増の、参加者の免疫細胞に対する効果を定量化する。

【0288】

参加者は、以下の適格性基準に従い選択する。1) HLA 8抗原（HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1）中7~8抗原をマッチさせた同種造血幹細胞移植のレシピエント；および2) 参加者は、2つまたはそれ超の治療の使用にも拘らず、ステロイド不応性cGVHDを有さなければならない。ステロイド不応性cGVHDとは、0.25mg/kg/日（または0.5mg/kgずつ隔日）で、少なくとも4週間にわたるプレドニゾンの使用（または代替的なグルココルチコイドの同等の投与）にも拘らず、cGVHDの遷延性の徴候および症状（表2および3）を有し、徴候および症状の完全な消失を伴わないことと規定される。全身療法を必要とする、広範性または限局性の慢性GVHDを伴う参加者は、適格である。

【表 2】

表 2 cGVHD の確定的症状発現および推定症状発現

臓器系	慢性 GVHD の確定的症状発現	慢性 GVHD のあり得る症状発現
皮膚	強皮症(表皮性または筋膜炎)、扁平苔癬、白斑、癬痕性脱毛症、毛孔性過角化症 (hyperkeratosis pilaris)、皮膚の不動状態に由来する拘縮、爪床異形成	湿疹様皮疹、皮膚乾燥、斑点状丘疹状皮疹、脱毛、色素過剰
粘膜	扁平苔癬、非感染性潰瘍、角膜びらん/非感染性結膜炎	口内乾燥症、乾性角結膜炎
消化管	食道狭窄、脂肪便	拒食症、吸収不良、体重減少、下痢、腹痛
肝臓	なし	アルカリホスファターゼの上昇、高トランスアミナーゼ血症、胆管炎、高ビリルビン血症
G U路	膣狭窄、扁平苔癬	非感染性膣炎、膣萎縮
筋骨格/漿膜	非敗血性関節炎、筋炎、筋無力症、多漿膜炎、関節の不動状態に由来する拘縮	関節痛
血液	なし	血小板減少症、好酸球増加症、自己免疫性血球減少症
肺	閉塞性細気管支炎	器質化肺炎、間質性肺臓炎を伴う閉塞性細気管支炎

10

20

【表 3 - 1】

表3 慢性GVHDの症状スコア付けスケール
過去2週間に、以下の問題のうちのいずれかが生じたか?

	全くない	わずかに	中程度に	かなり	極度に
皮膚:					
a. 異常な皮膚の色	0	1	2	3	4
b. 発疹	0	1	2	3	4
c. 皮膚の肥厚	0	1	2	3	4
d. 皮膚の痛み	0	1	2	3	4
e. 皮膚の掻痒	0	1	2	3	4
眼および口:					
f. ドライアイ	0	1	2	3	4
g. 頻繁に点眼剤を使用する必要	0	1	2	3	4
h. はっきりと見ることが困難	0	1	2	3	4
i. 口の疼痛のために、ある特定の食物を避ける必要	0	1	2	3	4
j. 口における潰瘍	0	1	2	3	4
k. 静脈内ラインまたは栄養チューブから栄養を施されること	0	1	2	3	4
呼吸:					
l. 頻繁な咳	0	1	2	3	4
m. 痰の着色	0	1	2	3	4
n. 運動に伴う息切れ	0	1	2	3	4
o. 安静時の息切れ	0	1	2	3	4
p. 酸素を使用する必要	0	1	2	3	4
摂食および消化:					
q. 固形食の嚥下困難	0	1	2	3	4
r. 液体の嚥下困難	0	1	2	3	4
s. 嘔吐	0	1	2	3	4
t. 体重の減少	0	1	2	3	4

10

20

30

【表 3 - 2】

	全くない	わずかに	中程度に	かなり	極度に
筋肉および関節:					
u. 関節および筋肉痛	0	1	2	3	4
v. 関節運動の制約	0	1	2	3	4
w. 筋痙攣	0	1	2	3	4
x. 減弱した筋肉	0	1	2	3	4
活力:					
y. 活力の減退	0	1	2	3	4
z. より長く眠る/昼寝をする必要	0	1	2	3	4
Aa. 発熱	0	1	2	3	4
精神および情動:					
Bb. うつ病	0	1	2	3	4
Cc. 不安	0	1	2	3	4
Dd. 入眠が困難	0	1	2	3	4

10

20

【0289】

登録前の4週間にわたる、安定用量のグルココルチコイド。

登録前の4週間にわたり、他の免疫抑制医薬（例えば、カルシニューリン阻害剤、シロリムス、ミコフェノール酸モフェチル）の追加または削減を伴わない。免疫抑制薬の用量は、その薬物の治療範囲に基づき調整することができる。

【0290】

参加者は、下記で規定される通りの十分な臓器機能を有さなければならない：

1) 肝臓：肝機能不全が、推定されるcGVHDの症状発現でない限りにおいて、肝機能が十分である（総ビリルビン 2.0 mg/dl - ギルバート症候群を伴う参加者において許容される例外；AST (SGOT) / ALT (SGPT) $2 \times$ 施設のULN) こと。LFTの異常を、cGVHDの唯一の症状発現として伴う参加者には、登録の前に、肝臓生検についてのGVHDの記録が必要である。主治医が、LFTの異常を、肝臓cGVHDと符合すると記録する場合は、他の臓器系に及ぶ活動性のcGVHDの文脈におけるLFTの異常もまた、許容することができ、この状況では、肝臓生検は、必須でなくなる；

30

2) 肺：肺機能不全が、慢性GVHDに起因するとみなされない限りにおいて、FEV1 予測値の50%またはDLCO (Hb) 予測値の40%であること；

3) 腎臓：血清クレアチニン 施設のULNまたはクレアチニンレベルが施設の正常値を上回る参加者については、クレアチンクリアランス $> 60 \text{ mL/分/1.73 m}^2$ であること；

40

4) 小児患者は、血清クレアチニンレベルに関わらず、クレアチンクリアランス 60 mL/分/1.73 m^2 を有さなければならない；

5) 増殖因子または輸血を伴わずに、絶対好中球カウント (ANC) $1000 / \text{mcl}$ および血小板 $50,000 / \text{mcl}$ により示される十分な骨髄機能；

6) 心臓：登録前6カ月以内の心筋梗塞またはNYHAクラスIIIもしくはIVの心不全、制御不良の狭心症、重度の制御不良の心室性不整脈、あるいは急性虚血症または活動性伝導系の異常 (active conduction system abnormality) についての心電図によるエビデンスがないこと。研究への登録の前に、スク

50

リーニング時における、任意のECG異常は、研究者が、医療上関与性ではないものとして記録しなければならないこと；

7) カルノフスキー/ランスキーパフォーマンスステータス 60%であること(表4)；

【表4】

表4

パフォーマンスステータスの基準

カルノフスキーおよびランスキーによるパフォーマンススコアは、10の倍数であることが意図される

スコア	ECOG (ズブロッド)	カルノフスキー		ランスキー*		スコア
	記載	スコア	記載	スコア	記載	
0	完全に活動的であり、制約を伴わずに、全ての疾患前パフォーマンスを続行することが可能である。	100	正常であり、愁訴はなく、疾患のエビデンスも見られない。	100	完全に活動的であり、正常である。	10
		90	通常の活動を続行することが可能であり、疾患の徴候または症状は軽微である。	90	身体的に激しい活動においてわずかな制約が見られる。	
		80	通常の活動に努力を伴い、疾患のいくつかの徴候または症状が見られる。	80	活動的であるが、より短時間で疲労する	
1	身体的に激しい活動には制約があるが、歩行可能であり、軽いまたは座業的性格の作業、例えば、軽い家事、事務を実行することは可能である。	70	セルフケアを施すが、通常の活動を続行するまたは活動的な作業をすることが不可能である。	70	動きのある活動に制約が大きく、かつ、これに費やされる時間が短い	20
		60	時折の介助が要請されるが、自分の必要の大半について、ケアが可能である。	60	起き上がって動き回るのが、活動的な動きは最小限であり、静かな活動にいそむ。	
2	歩行可能であり、全てのセルフケアが可能であるが、一切の作業活動を続行することが不可能である。覚醒時間のうち、起き上がって動き回る時間は、50%を超える。	50	かなりの介助および頻繁な医療ケアを要請する。	50	着衣しているが、一日のうちの大半は寝転んでおり、活動的な動きは見られず、全ての静かな動きおよび活動には、参与することが可能である。	30
		40	身体機能障害状態であり、特別なケアおよび介助を要請する。	40	大方病臥状態であり、静かな活動に参与する。	
3	限定されたセルフケアだけが可能であり、病床または椅子にとどまる時間が、覚醒時間の50%を超える。	30	重度の身体機能障害状態であり、入院が適応である。死期は近い。	30	病臥状態であり、静かな動きであっても介助を必要とする。	40
		20	重病状態であり、入院が適応である。死期は近い。	20	眠ることが多く、動きは、非常に受動的な活動に完全に限定されている。	
4	完全な身体機能障害状態である。セルフケアの続行が不可能である。全体として、病床または椅子にとどまる状態である。	10	瀕死状態であり、致死性の過程が、急速に進行する。	10	動きはなく、病床から出ることがない。	40

*ランスキースケールの、ECOGスケールへの転換はNCIへの報告だけを目的とすることが意図される。

8) 年齢 2歳であること。施設の経験により、かつ、公表された報告に従い、2歳未満の小児におけるcGVHDの発生率は希少である(Zeccara(2002年)、Blood、100巻:1192~1200頁)。2歳という若齢の、HSC T後の小児患者において、低用量IL-2の、毎日のSC注射が使用されている(Ladenssteinら(2011年)、J. Clin. Oncol.、29巻:441~448頁)。Insufilon(登録商標)留置SCカテーテルを使用することにより、低分子量のヘパ

リンおよびインスリンなど、他の薬物の、長期にわたる毎日のSC注射が、若齢の小児集団において一般に投与され、良好に忍容されている；

9) IL-2の、発生しつつあるヒト胎児に対する効果は未知である。この理由で、かつ、化学療法剤は、催奇形性であることが公知であるため、出産の潜在的可能性のある参加者および父親となる潜在的可能性のある参加者は、研究登録の前に、研究参加期間にわたり、十分な避妊（産児制限のホルモンまたはバリア法；禁欲）を使用することに同意しなければならない。女性またはその配偶者が本研究に参加している間に、その女性が妊娠するかまたは妊娠していることが疑われる場合、その女性は、自らの主治医に速やかに通知するものとする。本プロトコルで処置または登録される男性もまた、研究の前、研究参加期間、およびIL-2投与の完了後4カ月間にわたり、十分な避妊を使用することに同意しなければならないこと；ならびに

10) 参加者またはそれらの親/法的に認証された代表者の、書面でのインフォームドコンセント文書を理解する能力および/またはこれに署名する意向。

【0291】

参加者は、以下の除外基準に従い除外される：1) 進行中のプレドニゾン（同等物）用量要件を、 $> 1 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ （または同等量）とする参加者；2) カルシニューリン阻害剤にシロリムスを加えた併用（どちらかの薬剤単独は許容可能である）がなされている参加者；3) 過去4週間以内に、新規の免疫抑制医薬、体外フォトフェレーシス、またはリツキシマブ療法を開始した参加者；4) 過去100日以内に、ドナーリンパ球注入（DLI）、またはT細胞もしくはIL-2標的化医薬（例えば、ATG、アテムツズマブ、パシリキシマブ、デニロイキンディフチクス）への移植後曝露がなされた参加者；5) 主要研究者により承認されない場合の、登録前4週間以内における他の被験薬。4週間前に中断された、以前の固定用量IL-2療法は、許容される；6) 以前の血液障害の、活動性で悪性の再発または再燃を伴う参加者；7) IL-2処置レジメンに適合することが不可能な参加者；8) 臓器移植（同種移植片）のレシピエント；9) 組合せ抗レトロウイルス療法中のHIV陽性個体は、同種HSCTの後で使用される薬剤との薬物動態相互作用の潜在的可能性のために、不適格であること。加えて、これらの個体は、致死性の感染症の危険性が増大している。適応の場合に組合せ抗レトロウイルス療法を施されている参加者においては、適切な研究が企図されている；10) IL-2と化学的または生物学的組成が類似する化合物に帰せられる、重度のアレルギー反応の既往歴；11) 進行中または活動性の感染症、症候性のうつ血性心不全、不安定狭心症、心不整脈を含むがこれらに限定されない、制御不良の併発性疾病、または研究要件に対する遵守を制限する精神疾病/社会的状況；12) 活動性で制御不良のB型肝炎またはC型肝炎を伴う個体は、HSCT後における、致死性の処置関連肝毒性の危険性が高いので、不適格であること；および13) 妊婦は、催奇形または墮胎作用の潜在的可能性のために、本研究から除外されること。母体の処置に続発して、乳児における有害事象の、未知であるが潜在的な危険性があるため、授乳は中断するべきである。

【0292】

対象は、以下の処置レジメンに従い処置する。

各参加者には、8週間にわたる自己投与として、毎日の皮下IL-2を施す。各参加者の初期登録は、適切な場合、成人または小児への投与のための、IL-2の用量レベルAでなされる。下記のシェーマ（表5）に従い、成人および小児の各参加者（ $n = 10$ ずつ）には、DLTまたは重度のDLT以外のAEの非存在下で、2週目（用量レベルBへと）および4週目において（用量レベルCへと）用量漸増される、毎日のSC IL-2を施し、のべ4週間にわたり、MTD IL-2を持続する。小児は、IL-2に誘導される胸腺Tregの発生が、成人と比較して大きいと予測され、結果として、より少ないIL-2を必要とする場合がある。一連の患者PBMCT料は、処置の効果をモニタリングするために、ベースラインおよびIL-2療法中において得る。略述すると、それらは、Treg、Tcon、CD8、B、NK、およびDCの測定値のほか、血漿サイトカインレベル（例えば、IL-2、IL-7、IL-10、IL-15）を含む。IL-2の免

疫学的影響についての詳細な評価は、T r e g および T c o n のホメオスタシスに焦点を絞る。T r e g 濃縮生成物および患者 P B M C のアリコートは、T C R シークエンシングを経る。

【表 5】

表 5

成人コホート(n=10)	IL-2の用量レベル(IU/m ² /日)
用量レベルA(開始用量)	0.67 x 10 ⁶
用量レベルB	1.35 x 10 ⁶
用量レベルC	2 x 10 ⁶

10

小児コホート(n=10)	IL-2の用量レベル(IU/m ² /日)
用量レベルA(開始用量)	0.33 x 10 ⁶
用量レベルB	0.67 x 10 ⁶
用量レベルC	1 x 10 ⁶

20

【0293】

プレドニゾン（または同等のステロイド）および他の c G V H D 用薬剤は、I L - 2 との併用で持続し、典型的には、用量漸減を伴わない。しかし、参加者の利益になるとみなされる（例えば、ステロイド毒性）場合は、主治医の裁量で、プレドニゾンの漸減を許容する。プレドニゾンを、8週目以前に漸減しなければならない場合、「8週目と同等の」c G V H D 評価を漸減時に行って、応答を記録する。他の免疫抑制治療の漸減中である場合、8週目以前の c G V H D の進行が、毒性または有効性の欠如のエビデンスと考えられないことに留意されたい。

【0294】

長期治療：研究期間（8週間の I L - 2 研究処置）を完了した後で、許容可能な毒性プロファイルで、臨床的利益（完全または部分応答のほか、部分応答についての N I H 基準を満たさないわずかな応答）を享受する参加者には、主治医の裁量で、長期 I L - 2 処置を持続することを許容する。参加者を、長期 I L - 2 療法の6カ月後ごとに再評価して、I L - 2 療法の持続の根拠を記録する主治医の裁量で、I L - 2 療法を持続すべきかどうかを決定する。

30

【0295】

長期 I L - 2 療法中の参加者は、フェーズ I の毒性評価項目について評価可能である。長期 I L - 2 中における、他の免疫抑制薬の漸減は、主治医の裁量下にある。長期治療を持続する参加者のために、応答を増強する他の c G V H D 治療の追加を、主治医の裁量で許容する。I L - 2 に帰せられる毒性が生じた場合は、主治医の裁量で、用量の変更を許容する。長期 I L - 2 療法中、参加者を、以下のスケジュールで評価する：

40

【0296】

1) 4週間（±2週間）ごとの、I L - 2 の毒性および臨床的利益を評価するための、診療所来院および検査室検査（l a b）（C B C、クレアチニン、A L T、A S T、総ビリルビン）；

【0297】

2) 定量的血清免疫グロブリン；血漿パンキング；およびさらなる単核細胞の保存を含む8週間（±2週間）ごとの免疫アッセイ；

【0298】

3) I L - 2 処置の開始から1年となるか、または参加者が、I L - 2 療法を停止する

50

場合のいずれかが先に生じるまで、16週間(±4週間)ごとのcGVHD評価(11.1節)およびcGVHDの症状スコアシート。

【0299】

小児患者における調査研究を目的とする血液の回収：小児患者における免疫学的研究のために、各採血時に回収される血液の体積は、30mlまたは3ml/kgのうちのいずれか少ない方を超えない。この体積は、調査研究目的で許容可能な、最大総採血体積以内である。施設のガイドラインに従い、調査研究目的の採血は、1週間に2回より頻繁には行わない。加えて、28日間に、患者の体重に基づき、調査研究目的で採取されうる血液の体積に対する限界についても、施設のガイドラインに従う。

【0300】

以下の評価を、全ての参加者について、処置の前2週間以内に実施する：1)病歴および患者の疾患の処置についての根拠(ステロイド用量を含む)についての記録；2)バイタルサイン、体重、パフォーマンスステータスを含む身体検査；3)cGVHD評価；4)出産の潜在的可能性がある女性についての妊娠検査；5)感染性疾患マーカーについての検査；6)血液学：鑑別を伴う全血球計算(CBC)；7)血清化学：グルコース、BUN、クレアチニン、総ビリルビン、尿酸、アルカリホスファターゼ、LDH、総タンパク質、アルブミン、AST、ALT、およびカルシウム；8)小児患者については、24時間にわたる尿収集または核医学的糸球体濾過量(GFR)研究により、ベースラインクレアチニンクリアランスを測定しなければならない；9)甲状腺機能検査(TSH、T4、遊離T4)；10)CMVウイルス負荷；および11)免疫学：定量的血清免疫グロブリン；血漿パンキング；およびさらなる単核細胞の保存。

【0301】

以下の評価が、そうでないことが示されない限り、cGVHDが特異的な臓器系に及ぶ参加者について処置の前2週間以内に必要である：1)眼のcGVHDを伴う参加者のための(任意選択の)、シルマー試験を伴う眼検査；2)皮膚のcGVHDを伴う参加者のための皮膚評価(成人には、±生検)；3)口腔のcGVHDを伴う参加者のための(任意選択の)口腔検査(成人には、±生検)；4)cGVHDの肺症状発現を伴う参加者のための肺機能検査；5)cGVHDと関連する拘縮または筋骨格病変を伴う個体のための、罹患関節についての屈曲評価；6)処置期間中(1、2、3、4、5、6、8週目の終了時)の評価；7)病歴および臨床検査；8)既往歴および臨床検査と同じ日に行われる毒性評価；9)血液学：鑑別を伴うCBC；10)血清化学：グルコース、BUN、クレアチニン、尿酸、総ビリルビン、アルカリホスファターゼ、LDH、総タンパク質、アルブミン、AST、ALT、およびカルシウム；11)CMVウイルス負荷；12)免疫学：定量的免疫グロブリン；血漿パンキング；およびさらなる単核細胞の保存；ならびに13)甲状腺機能検査(TSH、T4、遊離T4)(8週目)。

【0302】

cGVHDが特異的な臓器系に及ぶ参加者については、以下の評価(cGVHDの症状スコアに加えた)が、そうでないことが示されない限り、8週間の研究処置の終了時およびステロイド漸減時に必要である(早期の場合)：1)ステロイド用量；2)眼のcGVHDを伴う参加者のための(任意選択の)、シルマー試験を伴う眼検査；3)皮膚のcGVHDを伴う参加者のための皮膚評価(成人には、±生検)；4)口腔のcGVHDを伴う参加者のための(任意選択の)口腔検査(成人には、±生検)；5)cGVHDの肺症状発現を伴う参加者のための肺機能検査；および6)cGVHDと関連する拘縮または筋骨格病変を伴う個体のための、罹患関節についての屈曲評価。

【0303】

以下は、IL-2投与の詳細である。

組換えヒトIL-2(アルデスロイキン)(Proleukin(登録商標)(Novartis Inc.およびPrometheus Labs, Inc.))は、Prometheus Laboratories, Inc.により供給されている。組換えヒトIL-2(Proleukin(登録商標))は、静脈内(IV)投与を意図される、

10

20

30

40

50

22MIUのアルデスロイキンを含有する単回使用用バイアル内の、滅菌、白色～オフホワイトで、凍結乾燥させたケーキとして供給されている。2200万国単位(MIU)のバイアルでは、1.2mLの注射用滅菌水(SWFI)で再構成した場合、各mLは、約170mcgの一塩基性リン酸ナトリウムおよび890mcgの二塩基性リン酸ナトリウムにより、7.5(範囲:7.2~7.8)のpHへと緩衝化された18MIU(1.1mg)のIL-2、50mgのマニトール、および約180mcgのドデシル硫酸ナトリウムを含有する。再構成の後、結果として得られる溶液は、無色透明～黄色がかった液体となるはずである。記載されている手順以外の再構成および希釈手順は、IL-2の送達および/または薬理学を変更する可能性があり、推奨されない。

【0304】

Proleukinは、保存されていない(unpreserved)滅菌生成物である。凍結乾燥させたIL-2のバイアルは、冷蔵庫内、2~8(36~46°F)で保存する。ラベルに印刷された有効期限を超えては使用しない。バイアルは、夾雑の可能性を最小化するように、再構成のための投入を1回限りとするべきである。速やかに使用しない場合、再構成が、層流気流フード内の、制御および確認された無菌条件下で実施されたものでない限りにおいて、使用中の保存時間は通常、2~8で、24時間より長くすべきでない。指示に従い再構成および希釈した場合、IL-2は、冷蔵温度および室温[2~25(36~77°F)]で保存すると、プラスチック製のバッグ(例えば、PVCバッグ)内、最大で48時間にわたり安定である。再構成および希釈された溶液は、冷蔵庫内、2~8で保存するものとする。凍結させない。生成物は、粒子状物質または変色について目視により精査し、投与の前に室温とする。データは、再構成され希釈されたIL-2調製物(SWFIで再構成され、D5Wでさらに希釈された)の安定性および滅菌性;ならびにSWFIで再構成されているがさらに希釈されてはいない生成物の安定性および滅菌性を、毎日の使用のための単回使用用シリンジを、有資格の医療ケア従事者が、無菌状態下で調製する(Proleukin(登録商標)の研究者向け冊子(Chiron Corporation、2003年9月10日、113頁)に従い)場合に、2~8(36~46°F)で、最大で14日間にわたり裏付ける。したがって、再構成および希釈を、層流フードを使用して、制御および確認された条件下で実施する場合、このようにして調製され、2~8(36~46°F)で保存された、1または複数の用量は、14日以内に使用する必要がある。

【0305】

IL-2は、D5Wを加えた注射用滅菌水(SWFI)で再構成するものとする。注射用静菌水または0.9%の注射用塩化ナトリウムによる再構成または希釈は、凝集物の増大のために回避すべきである。再構成および希釈された溶液を含有する、毎日の単回使用用シリンジは、冷蔵庫内、2~8で保存するものとする。凍結させない。生成物は、粒子状物質または変色について目視により精査し、投与の前に室温とする。

【0306】

毎日の外来SC使用のための、全てのIL-2シリンジは、22MIUのIL-2バイアルを、1.2mLのSWFIおよび4.8mLのD5W(最終IL-2濃度=3.6MIU/mL)で希釈した後、調剤室内で同時に調製するものとし、任意の残りの生成物は、速やかに廃棄するものとする。再構成時に、SWFIを、バイアルの側面に方向付けて、発泡を回避し、バイアルの内容物を、静かに旋回させるものとする。バイアルは、振とうしないものとする。再構成の後、家庭用冷蔵庫内の、2~8における保存のために、単回使用用シリンジ(必要な場合冷却パック内の)に、最大で2週間分のIL-2供給がなされる。単回使用用シリンジ1本ずつを、毎日、自宅でのSC自己投与時に使用し、用意されるシャープスコンテナ内に廃棄することになる。

【0307】

IL-2は、毎日の皮下注射により、自宅、外来、または入院状況下で自己投与することができる。参加者は、注射部位を巡回させることが推奨されるであろう。調剤師(または調剤師の監督下にある指定担当者)は、無菌条件下で、薬物を調製する。投与される薬

10

20

30

40

50

物量（IU単位）は、体表面積（BSA）に基づき決定する。BSAは、デュボアの式（表3）または同等の小児用代替式を使用して、体重に基づき計算する。用量は、研究登録時における体重に基づき計算するものとする。その後の用量の改変を行う場合は、本明細書に記載されている。静注（intravenous push）または静脈内ボラスは行わない。初回のIL-2用量またはその後の用量の前における前投薬は、必要でない。

表6：体表面積（BSA）およびクレアチンクリアランス

体表面積（BSA）は、デュボアの式を使用して計算するものとし、これにより、平方メートル（ m^2 ）単位の以下の結果：

$$BSA = (W^{0.425} \times H^{0.725}) \times 0.007184$$

[式中、体重は、キログラム単位であり、身長は、センチメートル単位である]がもたらされる。

【0308】

クレアチンクリアランス（CrCl）は、コックロフト-ゴールの式を使用して、以下の通りに計算することができる。

【化2】

$$CrCl (ml/分) = \frac{(140 - \text{年齢}) (\text{kg単位の実際のwt})}{72 \times \text{血清クレアチン} (mg/dl)}$$

【0309】

女性には、計算されたCrCl値の85%を使用する。

【0310】

注：顕著に肥満した参加者では、コックロフト-ゴールの式は、クレアチンクリアランスを過大評価する傾向がある（脂肪組織は、腎クリアランスを必要とするクレアチンに、ほとんど寄与しない傾向がある）。

【0311】

小児用の使用には、BSA（モステラー）およびCrCl（シュワルツ）のための代替式が許容される。

【0312】

抗ウイルス、抗真菌、および抗細菌の予防およびモニタリングは、HSC Tの標準操作プロトコール（SOP）に準拠して、cGVHD管理のための施設の実施に従うものとする。これらは、HSV予防のための毎日のアシクロビル（または同等物）、PCP予防のためのバクトリム（または同等物）、低ガンマグロブリン血症のためのIVガンマグロブリン、危険性の大きな参加者における真菌予防のためのアゾールの使用のほか、危険性の大きな参加者における、ベータ-グルカンおよびガラクトマンナンレベルのモニタリングを含むことが典型的である。

【0313】

治療の持続期間は、上記で記載したシェーマに従う。有害事象に起因する処置の遅延の非存在下では、以下の基準のうちの1つが、該当するまで、処置を持続することができる：1) 対象が同意を撤回すること；2) 服薬遵守の不履行；3) 運営上の理由；4) 許容不可能な有害事象；5) 重篤なアナフィラキシー反応；6) 他のグレード4の毒性事象；7) 再発性または非消失性のグレード3の毒性事象；8) 持続または再帰する、重度の血液毒性（6.2節）；9) 主治医の裁量下における、IL-2時の重篤な感染症；10) 血液悪性疾患の再発；11) 主治医の判断に従い、8週目の前に新規の免疫抑制医薬の追加を必要とする、GVHDの臨床的増悪。コルチコステロイド用量の増大は、GVHDの増悪のエビデンスと考えられるであろう。治療レベルのみを維持する、他の免疫抑制医薬の用量の変化では、除外の基準とならないこと；または12) 参加者の状態の一般的または特異的な変化は、処置している研究者の見解により、参加者を、さらなる処置に許容不可能とすること。

【0314】

10

20

30

40

50

参加者は、治療の開始からの1年間、または死亡するまでの間のいずれかが先に生じるまで追跡される。許容不可能な有害事象のために除外された参加者は、有害事象が消失または安定化するまで追跡される。参加者はまた、それらが生じた場合に、その後の毒性もまた同定しうるように、長期追跡を可能とすることを求められる。長期治療で利益を得る参加者のためのフォローアップ（有害事象を含む）は、1年間を超えて持続することができる。フォローアップは、参加者が、地元で生活する場合に、DFCIで行うか、または、遠隔で生活する場合に、地元のがん治療提供者と共に行う。参加者が遠隔で生活する場合、地元のがん治療提供者への電話連絡は、6カ月ごとのペースで行うことができる。

【0315】

参加者は、列挙された基準のうちのいずれかが該当する場合、除外される。研究からの除外の理由および参加者を除外する日付は、研究個別の症例報告書（CRF）に記録する。代替的なケア選択肢については、参加者と共に議論する。参加者を研究から除外する理由および参加者を除外する日付は、症例報告書（CRF）に記録する。参加者を除外する場合は、QACTTreatments Ended / Off Study Formに記入する。

10

【0316】

8週間のIL-2研究治療中の用量の遅延および用量の変更は、以下の推奨を使用する。毒性評価は、ワールドワイドウェブ上のctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htmのCTEPウェブサイトにおいて同定および場所が特定される、CTEP Version 4.0 of the NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)を使用する。可能な場合、症状は、症状として管理する。毒性の場合、適切な医療処置を使用する（制吐剤、止瀉剤などを含む）。参加者が受けた、全てのCTCAEグレード3およびこれを超える有害事象は、研究処置の初回用量時から、研究を通して、最終回の研究来院まで収集する。研究以外の来院時に毒性を被り続けている参加者には、毒性が消失するか、または不可逆的であるとみなされるまで、さらなる評価のために連絡を取る。長期IL-2の参加者には、用量の変更が推奨されるが、必須ではない。

20

【0317】

投与される薬剤と関連する有害事象および潜在的危険性のリストを、下記に掲げるが、これにより、用量の遅延および用量の変更を行うかどうか、または事象が、慣用的な報告に加えて、緊急の報告を必要とするかどうかを決定する。

30

【0318】

IL-2 (Proleukin) は、市販の薬剤である。HSCT参加者における、低用量IL-2の、関与する副作用を、下記に記載する。高用量IL-2と主に関連する、さらに詳細な毒性情報は、Proleukinの添付文書中に見出すことができる。

【0319】

局所反応：低用量SC IL-2を施される、大半のHSCT参加者は、注射部位反応、典型的には、数日間で消失し、硬結が2～3週間後に消失する限局性紅斑について報告した。より顕著な硬結（CTCグレード3）を伴う参加者においては時折、用量の途絶が要請された。長期にわたる用量の途絶は、応答について評価不可能な参加者を結果としてもたらず場合がある。

40

【0320】

全身症状：低用量IL-2にある一部のHSCT参加者は、IL-2を開始して72時間以内に、発熱、悪心、疲労、および関節痛を発症した。治療を途絶させる結果として、3日間で症状の消失がもたらされた。参加者は、低用量におけるIL-2の再導入を忍容した。長期にわたる用量の途絶は、応答について評価不可能な参加者を結果としてもたらず場合がある。

【0321】

甲状腺機能不全：低用量IL-2にある一部のHSCT参加者では、甲状腺機能検査異

50

常が認められた。2例の参加者が、IL-2の一方で、治療を余儀なくさせる、臨床的な甲状腺機能低下症を発症した。IL-2の中止後、甲状腺機能は、正常に戻った。よって、研究登録時および研究の8週目に、甲状腺パネル（TSH、T4、遊離T4）レベルを点検する。甲状腺機能低下症のエビデンスを伴う参加者は、精密検査し（抗マイクロソーム、抗サイログロブリン抗体）、臨床的に適応の場合は、チロキシン置換を施す。

【0322】

造血：HSCT後早期に、低用量IL-2は、1週間の治療後、大半の参加者において、絶対リンパ球カウントの初期の減少を引き起こした。その後、注入の持続により、全ての参加者において、リンパ球カウントの定常的な増大が生じた。低用量IL-2はまた、好酸球カウントの初期の増大（3週間でピーク）に続いて、段階的な低下も引き起こした。単球または好中球カウントの変化は、観察されなかった。血小板カウントは、低用量IL-2にある一部のHSCT参加者において、20%超低下した。この減少は、IL-2時の最初の2週間以内に認められたが、処置の持続は、血小板カウントのさらなる低下と関連しなかった。血小板輸血を必要とするか、または出血事象を示す参加者は、見られなかった。低用量IL-2の、ヘモグロビンレベルまたは網状赤血球カウントに対する著明な影響は、認められなかった。

10

【0323】

血栓性微小血管症（TMA）：毎日の低用量SC I L - 2にある2例の参加者は、おそらくIL-2と関連すると考えられる、血栓性微小血管症（血小板減少症、分裂赤血球増加症を伴う微小血管症性溶血性貧血、腎機能不全）のSAEを発症した。TMAはまた、カルシニューリン阻害剤（CNI）およびシロリムス（両方の参加者は、これらの両方を施されている）の公知の合併症でもあるが、IL-2がこれに寄与した可能性がある。1例の患者が、長期にわたる血液透析を必要とした。その後、CNIにシロリムスの使用を加えた組合せを却下した後で、TMAを発症する患者は、見られなかった。

20

【0324】

cGVHDに関連する毒性と、その処置で使用される免疫抑制医薬に関連する毒性とが存在する。これらの毒性は、研究者により日常的に管理される。有害作用の包括的なリストについては、個々の免疫抑制剤の添付文書を参照されたい。

【0325】

毒性は、NCI Common Toxicity Criteria for Adverse Events（CTCAE）、Version 4.0に従い評価するものとする。

30

【0326】

以下の状況のうちのいずれかが見られれば、参加者を除外し、IL-2療法を中止するものとする。

アナフィラキシー：IL-2と関連する重篤なアナフィラキシーは、IL-2の中断を必要とし、DLTと考えられる；

血栓性微小血管症（TMA）：CNS機能不全、血液透析/CVVHを必要とする腎機能不全、または入院の必要を伴うTMAは、IL-2の中断を必要とし、DLTと考えられる；

40

CTCグレード4の毒性：IL-2と関連する、グレード4の非血液毒性は、無症候性の、是正可能な検査室値（例えば、尿酸）だけを表すのでない限りにおいて、IL-2の中断を必要とし、DLTと考えられる；

CTCグレード3の毒性：無症候性の、是正可能な検査室値（例えば、尿酸）だけを表すのでない限りにおいて、グレード3の、予測外の非血液毒性が見られれば、IL-2を差し控える。毒性が、2週間以内に、グレード1またはそれを下回るように消失する場合、IL-2を、再漸増しない、50%の用量（用量レベルAにおける毒性である場合）または以前の低用量レベル（用量レベルBまたはCにおける毒性である場合）で再開することができる。毒性が、2週間以内に、グレード1もしくはそれを下回るように消失しないか、または、低用量のIL-2を再開した後で、グレード3もしくはそれを上回るように

50

再帰する場合、IL-2を中断し、DLTと考える；

重度の血液毒性：悪性疾患の再発、感染症、または他の病因と関連しない、末梢カウントの重度の低下（ANC < 500、血小板 < 10,000）が見られれば、IL-2を差し控える。カウントが、2週間以内に改善すれば（ANC > 1000、血小板 > 20,000）、IL-2を、再漸増しない、50%の用量（用量レベルAにおける毒性である場合）または以前の低用量レベル（用量レベルBまたはCにおける毒性である場合）で再開する。末梢カウントが、2週間以内に改善しないか、またはIL-2を再開した後で、再度低下する（ANC < 500、血小板 < 10,000）場合、IL-2を中断し、DLTと考える；

死：処置に関する死は、DLTと考えられる。

10

【0327】

以下は、さらなる検討事項である。

感染症：cGVHDおよび併用の免疫抑制医薬のいずれも、感染症の公知の危険性因子であるので、感染症は、処置関連であると考えられないことに留意されたい。感染症は、cGVHDの予測される合併症であると考えられる。しかし、IL-2療法の8週目を完了する前に、CTCグレード3またはそれ超の感染症を発症する参加者には、IL-2を差し控える場合がある。IL-2を差し控える場合、感染症の制御後に、主治医の裁量で、IL-2の再開について検討することができる。IL-2用量は、以下の通りである。処置の途絶 1週間または用量レベルAの場合、同じ用量で再開し；処置の途絶 > 1週間であり、用量レベルがBまたはCの場合、これを下回る1つの用量レベルで再開し、シェーマに従い、2週間ごとに漸増する；

20

再発：同様に、cGVHD患者は、公知の再発率を有するので、血液悪性疾患の再発もまた、処置関連であると考えられない。しかし、全ての再発症例は記録し、IL-2は差し控える；

処置の途絶：より短いIL-2療法のクールによるcGVHDの客観的改善が記録されていない限りにおいて、IL-2療法の > 4週間の途絶の結果、参加者は、応答について評価不可能と考えられる；

予測される非血液毒性：CTCAEグレード3未満の毒性（例えば、遷延性の全身性症状）が見られれば、患者の忍容性の利益で、かつ、主治医の裁量により、IL-2を差し控えることもでき、かつ/または、用量漸増しない、50%の用量（用量レベルAにおける毒性である場合）または以前の用量レベル（用量レベルBまたはCにおける毒性である場合）で再開することもできる；

30

cGVHDの増悪：新規の免疫抑制医薬の追加（主治医の裁量で）を必要とする、8週間のIL-2療法中のGVHDの増悪は、IL-2中断の基準である。8週目の前における、ベースラインを上回るコルチコステロイド用量の増大は、cGVHDの増悪のエビデンスであると考えられる。治療レベルのみを維持する、他の免疫抑制医薬の用量の変化では、IL-2中断の基準となったり、cGVHD増悪のエビデンスと考えられたりすることはない。

【0328】

以下の表は、記録のためのデータの要約である。

40

【表 7 - 1】

表7

	IL-2 を施す 2 週間前 以内	IL-2 による 治療期間中 (1、2、3、 4、5、6 週 目の終了 時) ^a	8 週目の終了時 ^a
病歴	X	X	X
身体検査	X	X	X
毒性評価		X	X
cGVHDの症状スコア	X		X
感染性疾患マーカー	X		
EKG	X		
妊娠検査 [†]	X		
肺機能	o		o
皮膚評価 ^b	o		o
口腔評価	o		o
屈曲評価	o		o
眼評価	o		o
鑑別を伴うCBC	X	X*	X
血清化学	X	X*	X
24 時間の CrCl または 核医学的 GFR [#]	X		
免疫学 ¹	X	X	X
ステロイド評価 ²	X		X
CMVウイルス負荷	X	X	X
甲状腺機能	X		X
投薬日誌 ⁺		X	X

10

20

30

40

X:要請される評価

o:これらの臓器系の臨床病変を伴う参加者に要請される(口腔および眼評価は任意選択である)。

1 免疫学: 定量的免疫グロブリン;血漿バンキング;さらなる単核細胞の保存

【表 7 - 2】

2 全身ステロイドは、医療的に必要(例えば、ステロイド毒性)であるとみなされない限りにおいて、8 週目以前に漸減すべきではなく、早期に漸減する場合は、漸減時において、「8 週目相当の」cGVHD 評価に着手して、応答を記録する。

a 1、2、3、4、5、6、8 週目のための検査は、週末、休日などの前後のスケジュールの調整および運営上の柔軟性を可能とするように、±4 日で実施する。

b 皮膚生検は、任意選択であるが、成人参加者について、強く推奨される。

* また、CBC/手作業による鑑別、血清クレアチニン、および LDH についての、さらなる検査室検査も、IL-2 開始の 4 日(±1 日)後に実施して、血栓性微小血管症と関連する、貧血、血小板減少症、分裂赤血球および/または腎機能不全について評価する。

¶ 出産の潜在的可能性がある女性のための検査である。

小児患者だけのための検査である。

+ 完成させ、最初の 8 週間の IL-2 については、少なくとも 2 週間ごとに診療所に戻し、長期 IL-2 については、少なくとも 8 週間ごとに戻す。

10

20

【0329】

毒性および応答の両方について評価する。IL-2 を施される参加者は、毒性について評価可能である。少なくとも 4 週間の IL-2 を施された参加者は、応答の欠如について評価可能であると考えられる。参加者は、NIH ガイドライン(ワールドワイドウェブ上の asbmt.affiniscape.com/associations/11741/files/ResponseCriteriaAPPENDIXAFormA.pdf で入手可能である)に従う、標準化された cGVHD 評価を、ベースラインおよび研究の 8 週目(および、必要な場合、8 週目の前の、早期ステロイド漸減時)に受ける(Flipovich ら(2005 年)、*Biol. Blood Marrow Transplant.*、11 巻: 945~956 頁)。cGVHD 応答は、NIH コンセンサス基準(Pavletic ら(2006 年)、*Biol. Blood Marrow Transplant.*、12 巻: 252~266 頁)に従い評価する。口腔および眼部位は、これらの部位には、さらなる局所治療が許容されるので、応答の決定に含まれない。参加者は、以下の定義に従い分類される応答を示す。

30

【0330】

完全応答: 臓器応答: 特異的な臓器内の、cGVHD と関連する、全ての可逆性の症状発現の消失; 全体応答: cGVHD 病変の各臓器または部位内の、全ての可逆性の症状発現の消失。関与する臓器系病変に応じて、参加者は眼、口腔、皮膚、筋骨格、および肺系についての、詳細な評価を繰り返し受ける;

40

部分応答: 臓器応答: cGVHD と関連する疾患症状発現を測定するのに使用されるスケールにおける、少なくとも 50% の改善(例えば、皮膚発疹の 50% の減少であって、BSA のうちの 80% から BSA のうちの 40% への減少)であって、開始値の百分率だけと対比した、フルスケールにおける、最低 25% の改善(表 8); 全体応答: 他の任意の臓器または部位における尺度の進行を伴わない、少なくとも 1 つの臓器または部位における尺度の改善。包括的評定および類別スケールでは、3 または 7 ポイントのスケールにおける 1 ポイントの変化、または 0~10 ポイントのスケール上の 2~3 ポイントの変化(0.5 SD の変化)を、臨床的に有意義であると考えられることに留意されたい。加えて、閉塞性細気管支炎症候群(BOS)に対する治療への応答についての特徴は、3 カ月間中の FEV1 のさらなる減少を伴わない、肺機能の安定化である。非レスポonder (

50

例えば、わずかな応答、安定病態)は、部分応答または疾患進行についてのNIH基準を満たす、cGVHDの変化を示さない。

【表8】

表8 cGVHDにおける応答の基準

cGVHDの臓器における部分応答について提案される計算。代替的に、臓器特異的類別スコアおよび包括的スコアを使用して、応答を決定することができる。

臓器および開始スコアまたは値	部分応答の基準*	
皮膚(体表面に対するパーセント)		10
> 50 %	$e/s \leq 0.5$ および $e > 0$	
25 - 50 %	$s - e \geq 25$ および $e > 0$	
< 25 %	CRの可能性だけであり、PRの可能性はない	
血小板カウント	$e - s \geq 100,000/uL$ および $e < LLN$	
消化管(および他の0~3のスケール)		
3	$e = 1$ または 2	
2	$e = 1$	
1	CRの可能性だけであり、PRの可能性はない	20
肝機能検査(ALT、アルカリホスファターゼ およびビリルビン)		
$\geq 3x ULN$	$e/s \leq 0.5$ および $e > ULN$	
$< 3x ULN$	CRの可能性だけであり、PRの可能性はない	

* s:開始スコアまたは値:e:終了スコアまたは値:ULN:正常の上限:LLN:正常の下限

例

- 1.皮膚:開始時スコア=85、終了時スコア=30; $e/s=30/85=0.35=PR$
- 2.皮膚:開始時スコア=65、終了時スコア=45; $e/s=45/65=0.75=PR$ ではない
- 3.皮膚:開始時スコア=45、終了時スコア=15; $s-e=30=PR$
- 4.皮膚:開始時スコア=30、終了時スコア=15; $s-e=15=PR$ ではない

30

【0331】

進行性疾患：臓器進行：cGVHDと関連する疾患症状発現を測定するのに使用されるスケールにおける、少なくとも25%の絶対的増大(表9)。包括的評定および類別スケールでは、3または7ポイントのスケールにおける1ポイントの変化、または0~10ポイントのスケール上の2~3ポイントの変化(0.5SDの変化)を、臨床的に有意義であると考えられることに留意されたい。加えて、参加者は、進行についての客観的なNIH基準を満たさない症状の増悪を受ける場合があるので、「cGVHDの臨床的増悪」は、NIH基準に従う、cGVHDの進行と同義ではない。cGVHDの進行と同義である場合、IL-2の有効性の欠如に対して、参加者はさらに、主治医の判断で、IL-2を中断し、さらなる免疫抑制を開始する選択肢を有する。

40

【表 9】

表 9 心疾患についての NYHA 分類

以下の表は、心疾患についての The New York Heart Association による分類を提示する。

クラス	機能的能力	客観的評価	
I	患者は、心疾患は伴うが、結果として生じる身体活動の制限は伴わない。平素の身体活動は、過度の疲労、動悸、呼吸困難、または狭心痛を引き起こさない。	心血管疾患の客観的エビデンスは見られない。	
II	患者は、身体活動のわずかな制限を結果としてもたらず心疾患を伴う。患者は、安静時には、快適である。平素の身体活動が、疲労、動悸、呼吸困難、または狭心痛を結果としてもたらず。	最小限の心血管疾患についての客観的エビデンスが見られる。	10
III	患者は、身体活動の顕著な制限を結果としてもたらず心疾患を伴う。患者は、安静時には、快適である。平素に満たない活動が、疲労、動悸、呼吸困難、または狭心痛を引き起こす。	中等度の心血管疾患についての客観的エビデンスが見られる。	
IV	患者は、不快感を伴わずに身体活動を続行することが不可能な状態を結果としてもたらず心疾患を伴う。心不全または狭心症症候群の症状は、安静時であっても存在しうる。あらゆる身体活動に着手すると、不快感が増大する。	重度の心血管疾患についての客観的エビデンスが見られる。	20

出典:The Criteria Committee of New York Heart Association, Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels, 9 版、Boston, MA:Little, Brown & Co;1994 年:253~256 頁。

【 0 3 3 2 】

参加者は、確認された慢性 G V H D 症状スケール（表 1 0）を使用して、c G V H D の症状および徴候について自己報告する。自己報告される症状スケールは、ベースラインおよび 8 週目の終了時（および、必要な場合、8 週目の前の、早期ステロイド漸減時）において得られる。

【表 1 0】

表 10 cGVHD 進行の基準

cGVHD における臓器進行について提案される計算

臓器および開始スコアまたは値	進行の基準*	
皮膚(体表面に対するパーセント)	e-s ≥ 25	
血小板カウント	s-e ≥ 50,000/uL および e < LLN	
消化管(および他の 0~3 のスケール)	e-s ≥ 1	
肝臓(ALT、アルカリホスファターゼおよびビリルビン)		10
s ≥ 3x ULN	e-s ≥ 3 x ULN	
s < 3x ULN	e-s ≥ 2 x ULN	
肺(12 ポイントの肺機能スケール) [†]	e-s ≥ 3 [†]	

* s:開始スコアまたは値;e:終了スコアまたは値;ULN:正常の上限

[†]肺機能スケールとは、FEV1 スコアと、DLCO(Hb について補正された)スコアとの合計であり、各々、予測値の>80%=1;70~79%=2;60~69%=3;50~59%=4;40~49%=5;<40%=6 として算出される。

[†]開始肺機能スコアが、≥10 である場合、進行は、少なくとも 2 週間を置いて測定される 2 回の検査における、FEV1 の ≥5% の低下として定義される。これらの症候群は、急速に進行しうするため、この時間間隔が選択される。 20

急性 GVHD の病期分類

臓器の病期	皮膚*	肝臓	胃腸 ²	
1	発疹 < 25%	ビリルビン 2-3 mg/dl	下痢 500~999ml/d または生検により確認される上部消化管病変	
2	発疹 25-50%	ビリルビン 3.1-6 mg/dl	下痢 1000-1499 ml/d	
3	発疹 > 50%	ビリルビン 6.1-15 mg/dl	下痢 ≥1500 ml/d	30
4	水泡を伴う全身の紅皮症	ビリルビン > 15 mg/dl	イレウスを伴うかまたは伴わない、重度の腹痛	
総合的なグレード				
I	病期 1-2	なし	なし	
II	病期 3 または	病期 1 または	病期 1	
III	-	病期 2-3 または	病期 2-4	
IV	病期 4 または	病期 4	-	

* 「9 の規則」を使用して、体表面積を決定する。

¹ 範囲は、総ビリルビンとして与えられる。ビリルビンの上昇のさらなる原因が記録されると、病期 1 つ分グレードを下げる。 40

² 下痢のさらなる原因が記録されると、病期 1 つ分グレードを下げる。

(出典:Thomasら、NEJM、1975年、895~90頁)。

【 0 3 3 3】

参加者のコルチコステロイドの総 1 日用量は、ベースラインおよび 8 週間の I L - 2 の終了時において記録される。コルチコステロイドの毎日の代替的投与の場合、研究目的で、平均 1 日用量を記録する。参加者はまた、I L - 2 を開始する前、ならびに 1、2、3、4、6、および 8 週目の終了時に実施される、免疫機能についての検査も受ける。検査は、定量的免疫グロブリン、血漿パンキング、およびさらなる単核細胞の保存を含む。

【 0 3 3 4】

低用量 I L 2 についてのかつての研究では、固定用量を患者コホートに施したところ、血漿 I L - 2 レベルは、治療の 1 週目にピークに達した後で、T r e g カウントが上昇する間、毎日の I L - 2 投与にも拘らず低下することが観察された。さらなる探索は、T r e g の増殖および活性化レベルもまた、2 週目の後に低下することを明らかにした。本明細書では、I L - 2 により拡大された T r e g 上で発現する高アフィニティーの I L - 2 受容体 (C D 2 5) の増大によるその取込みおよび隔離に起因すると考えられる、血漿 I L - 2 レベルの低減は、その後における、I L - 2 の、拡大された T r e g プールへのアベイラビリティを低減しうる。患者内の用量漸増は、I L - 2 により誘導される、i n v i v o における T r e g の増強を最大化し、数が増大した、C D 2 5 発現が高い循環 T r e g に結合後の血漿 I L - 2 レベルの減退に起因するタキフィラキシーを回避すると考えられる。さらに、用量漸増時に、大きな T r e g プールが、I L - 2 の取込みおよび隔離に利用可能であるので、毒性 / D L T 率は、各患者内の逐次的な用量増大と共に低下すると考えられる。

10

20

30

40

50

【 0 3 3 5 】

上記で記載した通り、I L - 2 の 3 つの漸増用量が、各患者における M T D : 成人患者についての、 0.67×10^6 (用量レベル A)、 1.35×10^6 (用量レベル B)、および 2×10^6 I U / m² / 日 (用量レベル C)、ならびに小児患者についての、 0.33×10^6 (用量レベル A)、 0.67×10^6 (用量レベル B)、および 1×10^6 I U / m² / 日 (用量レベル C) を決定すると考えられる。各参加者の初期登録は、用量レベル A でなされる。成人および小児の各参加者には、D L T または重度の D L T 以外の A E の非存在下で、2 週目において (用量レベル B へと) および 4 週目において (用量レベル C へと) 用量漸増し、のべ 4 週間にわたり、M T D I L - 2 を持続する。患者が、任意の用量レベルにおいて、D L T を被る場合は、患者を研究から除外する。患者が、用量漸増時に、許容不可能な、I L - 2 関連の A E (D L T 以外の) を被る場合は、患者を、既に忍容された用量へと、漸減することができる。M T D は、各患者における、D L T の非存在下の最大用量レベルとして定義される。下記の表 1 1 は、多様な D L T 率下における、個別の用量漸増の確率を示す。例えば、個体についての、真であるが未知の D L T 率が、10% である場合、用量漸増の確率は、90% であり、これは、D L T 率に対する補完的確率である。

【 表 1 1 】

表 11 各対象における用量漸増の確率

各対象における真であるが未知の DLT 率	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5
用量漸増の確率	0.95	0.9	0.85	0.8	0.75	0.7	0.65	0.6	0.55	0.5

【 0 3 3 6 】

合計 20 例の患者 (成人患者 10 例および小児患者 10 例) を登録し、研究デザインの実行可能性について評価する。成人患者における I L - 2 についてのかつての研究では、 1×10^6 I U / m² / 日の I L - 2 を、M T D であると決定した。しかし、患者内用量漸増の本デザインでは、患者が被る毒性は小さく、したがって、M T D 用量レベルは、より高いと考えられる。20 例の患者中 15 例またはそれ超の患者が、用量レベル B または C を、彼らの M T D として明示する場合、本研究デザインは、実行可能であると考えられる。この決定規則によれば、真であるが未知の実行可能性率が 85% である場合に、研究デザインを実行可能であると結論付ける確率は、0.93 であり、実行可能性率が 80% である場合、0.8 であり、実行可能性率が 55% である場合、0.06 である。

【 0 3 3 7 】

以前の研究に基づくと、各コホート内の少なくとも 7 例の患者は、D L T を被らずにこれらの M T D を達成すると考えられ、真であるが未知の D L T 率が 0.2 である場合に、D L T を伴わずにこれらの M T D を完遂する、少なくとも 7 例の患者を観察する確率は、0.88 となり、D L T 率が 0.3 である場合、0.65 となる。相関研究では、組合せ

ならびに個別による、成人および小児患者についての、IL-2用量、血漿IL-2レベル、およびTregと臨床応答との関係を解析する。

【0338】

対象の性別は、包含または除外基準として使用しないものとし、マイノリティーの登録者数（accrual）に制限を設けない。2013年において、移植を受けた全ての患者の41%は女性であり、患者の約10%はマイノリティーであった。2013年の本発明者らによる移植プログラムにおいて自己報告された、この民族および性別に基づき、性別および人種（race）により規定される亜群内で予期される登録者数を、下記の表12にまとめる。

【表12】

表12

登録者数の目標			
民族類別	性別		
	女性	男性	合計
ヒスパニック系またはラテン系	0	+ 1	= 2
ヒスパニック系でもラテン系でもない	8	+ 11	= 18
民族類別:全ての対象の合計	8 (A1)	+ 12 (B1)	= 20
人種類別			
アメリカ先住民またはアラスカ原住民	0	+ 0	= 0
アジア系	0	+ 1	= 1
黒人またはアフリカ系アメリカ人	0	+ 1	= 1
ハワイ原住民または他の太平洋島嶼民	0	+ 0	= 0
白人	8	+ 10	= 20
人種類別:全ての対象の合計	8 (A2)	+ 12 (B2)	= 20

(A1 = A2)

(B1 = B2)

(C1 = C2)

【0339】

副次的評価項目は、8週目までの慢性GVHDの応答率、研究登録の1年後までの全生存および再発、ならびに8週間の処置期間中の免疫学的評価を含む。副次的評価項目は、記載およびグラフにより解析する。相関研究では、組合せならびに個別による、成人および小児患者についての、IL-2用量、血漿IL-2レベル、ならびにTregの増殖お

10

20

30

40

50

よび活性化と臨床応答との関係を探索する。

【0340】

(実施例3：調節性T細胞の投与と組み合わせた、代表的な低用量IL-2治療レジメン)

以下では、調節性T細胞の投与と組み合わせた低用量IL-2治療レジメンについての、代表的な非限定的実施形態を提示する。他の実施形態では、低用量IL-2治療レジメンを、実施例1および/または本明細書に記載されている方法であって、任意の実施例からの任意の組合せを含む方法による複数の可変用量によるIL-2治療レジメンで置き換えることができる。例えば、かつ、そうでないことが言明されない限りにおいて、実施例2による基準を、完全にまたは部分的に、下記の実施例3に記載される基準と共に使用することができる。

10

【0341】

低用量IL-2は、*in vivo*において、Tregを、優先的に増進しうるが、永続的臨床応答は、cGVHD患者のほんの50%である。さらに、HSC T後における悪性の再発を伴う患者における移植片対白血病(GVL)応答の増強を求める試験では、CD4+濃縮ドナーリンパ球注入(CliniMACSによるCD8+枯渇;用量:1kg当たりのCD4+細胞 $3 \sim 10 \times 10^7$ 個)に加えた、12週間の低用量IL-2(0.6×10^6 IU/m²/日)は、GVHDを誘導することなく、低用量IL-2単独またはCD4+濃縮細胞注入単独と比較して大きな、*in vivo*における、FOXP3+ Tregの拡大を誘導した(Zornら(2009年)、*Biol. Blood Marrow Transplant.*、15巻:382~388頁)(図8)。低用量IL-2と併用して、CD4について濃縮されたDLIを施された患者は、低用量IL-2単独を施された患者($p = 0.03$)、またはCD4について濃縮されたDLI単独を施された患者($p = 0.001$)と比較して大きな、*in vivo*におけるTregの拡大を示した(図8)。これらのCD4+ CD25+ T細胞は、正常な抑制性機能を提示し、CD4について濃縮されたDLIおよびIL-2による処置は、GVHDと関連しなかった。イタリアで、CD34で選択されたハプロタイプ一致HSC Tを受けた28例の患者についての試験では、移植前後における、ドナーTreg濃縮細胞の注入に続く、ドナーTconの注入は、移植後における免疫抑制の非存在下であっても、GVHDを防止した(Di Ianniら(2011年)、*Blood*、117巻:3921~3928頁)。

20

30

【0342】

本明細書に記載される結果に基づき、低用量IL-2と、養子Treg濃縮細胞療法とを組み合わせることにより、さらなる臨床的利益がもたらされると考えられる。最初の参加者には、ドナーTreg濃縮細胞の注入に加えて、低用量IL-2を施したが、いかなる病的作用も生じなかった。さらに、5つの独立の白血球アフェレーシスに由来するデータは、2ステップの、CliniMACSによるCD8/CD19共枯渇に続く、CD25+ Treg濃縮の実行可能性を確認する(表13)。6.5~9.7%のCD20+ B細胞、11.4~28.3%のCD8+ T細胞、および5.9~16.7%のCD4+ CD25+ CD127- Treg細胞を含む、生存総有核細胞(TNC) $1.6 \sim 4.07 \times 10^{10}$ 個による白血球アフェレーシス生成物から出発して、0~0.4%のCD20+ B細胞、0.01~1.2%のCD8+ T細胞、83.1~92%のCD4+ CD25+ Treg濃縮細胞、および72.8~93.9%のCD4+ CD25+ CD127- Treg細胞を含む、生存TNC $0.58 \sim 1.76 \times 10^8$ 個によるTreg濃縮生成物を達成した。カノニカルなFOXP3+ Tregは、生成物の41.3~69.6%を構成し、抑制についてのTreg:Tcon比もまた、1:2を上回った。

40

【表 1 3】

表13

白血球アフェレーシスの確認					
白血球アフェレーシス	#1	#2	#3	#4	#5
出発生成物					
生存率	100%	100%	100%	100%	99%
TNC	2.60E+10	2.97E+10	3.16E+10	1.60E+10	4.07E+10
総 CD3+ T 細胞	1.51E+10	1.28E+10	6.92E+09	7.92E+09	2.47E+10
1kg 当たりの CD3+ T 細胞(100kg のレシピエント)	1.51E+08	2.97E+08	3.16E+08	1.60E+08	4.07E+08
CD20+ B 細胞の%	6.50%	9.70%	6.90%	7.10%	8.40%
CD8+ T 細胞の%	28.30%	14.40%	11.40%	20.80%	23.10%
CD4+ CD25+ Treg 濃縮細胞の%	7.30%	12.80%	8.00%	11.90%	18.00%
CD4+ CD25+ CD127- Treg 細胞の%	5.9%	6.7%	16.7%	5.9%	11.4%
Treg について濃縮された生成物					
無菌性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
内毒素	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
生存率	98%	82%	100%	90%	83%
TNC	1.76E+08	5.85E+07	1.31E+08	6.51E+07	1.28E+08
TNC/kg (100kg のレシピエント)	1.76E+06	0.59E+06	1.31E+06	0.65E+06	1.28E+06
TNC/kg (60kg のレシピエント)	2.93E+06	0.98E+06	2.18E+06	1.09E+06	2.13E+06
CD20+ B 細胞の%	0.10%	0.40%	0.10%	0.30%	0%
CD8+ T 細胞の%	1.20%	0.01	0.20%	0.50%	0.10%
CD4+ CD25+ Treg 濃縮細胞の%	91.90%	91.50%	95.50%	83.10%	92%
CD4+ CD25+ CD127- Treg 細胞の%	93.10%	93.90%	72.80%	85.70%	88.70%

10

20

【 0 3 4 3】

以下の患者集団基準を使用する：1) 全身療法を必要とする慢性GVHD(全身療法を必要とする、広範性または限局性の慢性GVHD)を伴う参加者；2) 用量を 0.25 mg/kg/日(または同等量)とする、少なくとも4週間のプレドニゾンを含む、2つまたはそれ超の治療にも拘らず、活動性のcGVHD；3) 制御不良の活動性感染症を伴わないこと；および4) 悪性疾患の再発を伴わないこと。

【 0 3 4 4】

具体的な包含および除外基準については、下記で詳述する。

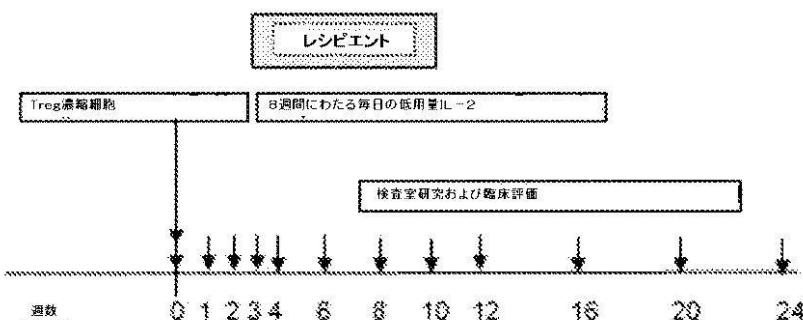
30

1) 参加者数：2～25；

2) 研究デザインおよび方法：ステロイド不応性慢性移植片対宿主病(cGVHD)における、調節性T細胞(Treg)について濃縮された細胞に加えた8週間の毎日の低用量インターロイキン2(IL-2)の、安全性および最大耐量レベル(MTD)を評価する。

3) フェーズ I

【化 3】



40

Treg 濃縮細胞の標的用量：

用量レベル A：1 kg 当たりの細胞 0.1×10^6 個 (開始用量レベル)

用量レベル B：1 kg 当たりの細胞 0.3×10^6 個

用量レベル C：1 kg 当たりの細胞 1×10^6 個

50

【0345】

安全性および有効性解析は、以下の通りである。主要評価項目は、Treg濃縮ドナー細胞の注入に、毎日の低用量SCIL-2 (1×10^6 U/m²/日)を加えた場合の毒性およびMTDである。副次的評価項目は、1) Treg濃縮注入に、8週間の低用量IL-2を加えた場合の実行可能性；2) Treg濃縮注入に、8週間の低用量IL-2を加えた場合の臨床応答；3) Treg濃縮注入に、8週間の低用量IL-2を加えた場合の免疫学的効果；および4) 臨床応答についての予測因子である。

【0346】

評価(8週間まで)は、以下の通りである：1) Treg濃縮細胞の注入の実行可能性についての評価；2) Treg濃縮細胞の注入による注入毒性についての評価；3) 悪性疾患と関連しないグレード3またはそれ超の血液毒性についての評価；4) GVHDと関連しないグレード3またはそれ超の非血液毒性についての評価；5) 重篤な感染症についての評価；6) 慢性GVHDの応答または進行についての評価；および7) 免疫学的影響についての評価。

10

【0347】

加えて、ベースラインおよび8週間のIL-2処置後の、ドナー由来のTreg濃縮細胞生成物中および研究患者における、TregおよびTcon集団についての、包括的なT細胞レパートリーの多様性を評価する。結果として得られる配列データを使用して、一連の患者試料にわたり、個々のT細胞クローンを追跡することができ、低用量IL-2療法中における、養子Treg細胞生成物に固有なT細胞クローンの、*in vivo*における拡大および生存の追跡が可能となる。TCRレパートリーが、TregとTconとの間で共有される程度、および、それが、Tregのホメオスタシスを再確立するためのパラメータとして、組合せ養子Treg細胞の注入に加えた低用量IL-2処置の後、どのように変化するかもまた、決定する。

20

【0348】

試料構成要素の単離および低温保存：単核細胞を単離するために、抗凝固処理された試料を、ハンクス平衡塩溶液(HBSS)で希釈し、Ficoll-Paque(商標)PLUS上で層状化し、次いで、 $170,000 \times g$ で20分間にわたり遠心分離した。遠心分離の後、ficollと培地との界面にある細胞を採取し、HBSS中で2回洗浄し、カウントする。クライオバイアルに、コード化されたCM番号でバーコード標識し、蒸気相の液体窒素中で保存し、場所情報を、Freezerworksにより記録する。血漿を保存するためには、抗凝固処理された一次試料を、穏やかにスピンさせ、血漿を除去してから、上記で記載した通り、細胞ペレットを、培地で希釈する。低温保存されない試料(例えば、フローサイトメトリーのための全血)が必要である場合、試料を、さらなる加工を伴わずに分配する。試料の出納は、検査室SOPに従って行う。二本鎖DNA(dsDNA)を、製造元の推奨プロトコールを使用する、Qiagen Blood MiniおよびMicroカラム(細胞量に応じて)を使用して、 $2.5 \times 10^4 \sim 10 \times 10^6$ 個の間の細胞から、TCRシーケンシングのために単離する。試料を、 $100 \mu L$ の溶出緩衝液へと溶出させる。溶出させたdsDNAは、製造元の指示に従う、Quant-iT(商標)PicoGreen(商標)試薬(Invitrogen)の添加、DNA検量線の作成、および蛍光マイクロプレートリーダー上の測定の後で定量化する。

30

40

【0349】

免疫学的方法：表現型解析：免疫再構成は、末梢血中の、規定されたリンパ球サブセットの数え上げにより評価する。15%のEDTAと共に回収された全血を解析する。蛍光色素コンジュゲート抗体(Beckman Coulter、BD Biosciences、Invitrogen、またはMiltenyi)を、各反応チューブに添加するの続き、 $100 \mu L$ の全血を添加する。10分間のインキュベーションの後、 $1 mL$ のBD FACSLyseを添加し、試料を、ボルテックスし、15分間にわたりインキュベートする。BD FACSCanto(登録商標)IIフローサイトメーターおよびF

50

ACSDiva (登録商標)ソフトウェアを使用して、抗体で標識された細胞を解析する。これらのアッセイは、回収から24時間以内の、新鮮な全血に対して日常的に行うが、また、低温保存されたPBM Cにも使用することができる。直接的にコンジュゲートさせた試薬および蛍光色素のパネルを、下記の表14に示す。各チューブ内の7~8色についての同時的な解析は、3チューブパネルによる、T、B、およびNL細胞中の異なるサブセットについての包括的な調査をもたらす。

【表14】

チューブ	サブセット	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	Pac Blue	Pac Orange
1	T細胞 /Treg	CD45RO	PD-1	CD127	CD25	CD62L	CD4	CD3	CD8
2	B細胞	BAFF-R	IgD	CD27	CD38	CD19	CD45	CD5	CD20
3	NK細胞	CD16	CD56		CD8	NKG2D	CD45	CD3	CD4
4	樹状細胞	CD123	CD141	CD11c	LINEAGE	CD86	CD45	CD14	HLA-DR

10

【0350】

20

400 μ Lの全血だけを使用し、各チューブ内の細胞200,000個について解析する。さらなるチューブを、この標準的なパネルに追加して、特異的なサブセットについてのより詳細な解析をもたらすこともでき、新規のサブセットのためのマーカーを追加することもできる。Ficoll-hypaqueの密度沈降による低温保存および融解と関連する変動性が消失するので、全血の使用は、各試料中の特異的な細胞の絶対数の正確な数え上げを容易とする。

【0351】

TregおよびTconのホメオスタシス：TregおよびTconサブセットについての解析では、既に関与された表現型および機能アッセイ(Matsuokaら(2010年)、J. Clin. Invest.、120巻：1479~1493頁)を活用する。マーカーについての表現型パネルを、下記の表15にまとめる。

30

【表15】

チューブ	V450	Pac Orange	APC-H7	PE-Cy7	APC	PerCP	PE	FITC
1	CD3	CD8	CD4	CD45RA	CD62L	FOXP3	CD31	Ki67
2	CD3	CD8	CD4	CD45RA	CD62L	FOXP3	CD95	BCL2

40

【0352】

これらのアッセイは、表現型的に十分に規定されたT細胞サブセットの、胸腺における発生、増殖、およびアポトーシス感受性を評価する定量的方法をもたらす。T細胞の新生(例えば、CD45RA+ CD31+)、増殖(例えば、Ki-67)、活性化(例えば、pSTAT5)、および生存(例えば、Bcl-2)についての顕著に異なる尺度に焦点を当てることで、これらのアッセイは、各T細胞集団のホメオスタシス均衡についての詳細な評価をもたらす。フローサイトメリーにより選別された細胞集団はまた、in vitroにおける機能アッセイ(例えば、Fas誘導アッセイを介するアポトーシス

50

抵抗性；CFSE希釈、チミジン組込み、またはIFN- γ アッセイを介するTconの阻害)にも利用可能である。同じ試料中のTregサブセットとTconサブセットとの内部交差比較は、一般的なin vivo環境に対する差次的な効果および応答を評価する、固有の方法をもたらす。規定された間隔を置いた結果の比較により、ある時間にわたる、ホメオスタシス均衡の変化が同定される。

【0353】

血漿サイトカインの測定：血漿は、1000 \times gで15分間にわたる全血遠心分離により単離し、リポジトリーアリコートで保存する。ELISAを使用して、多様な時点におけるホメオスタシスサイトカインレベルを測定する。結果は、フローサイトメトリー、機能アッセイ、および臨床アウトカムと関連させる。現在、市販の高感度で再現性の高いキット：Human IL-2 chemiluminescent ELISA (Pierce：型番84772)；Quantikine Immunoassay Human IL-7HS (R&D：型番HS750)；およびQuantiglo (登録商標) Chemiluminescent Immunoassay Human IL-15 (R&D：型番Q1500B)が使用されている。推奨される手順は、試料を、適切な標準希釈液および対照とともに二連で使用することを含む、以下の手順である。濃度が既知の3つの試料を、各96ウェル試験プレートに組み入れて、アッセイ間精度を評価する。Spectra 180プレートリーダー (Molecular Devices、Sunnyvale、CA)を使用して、アッセイ結果を測定する。

10

【0354】

TCR配列の解析：ベースラインおよび低用量IL-2後における、養子Treg濃縮細胞生成物および患者の一連のPBMC試料に由来する、CD3⁺CD4⁺CD25^{med-high}CD127^{low}TregおよびCD3⁺CD4⁺CD25^{neg-low}CD127^{med-high}Tconについて解析する。TregおよびTcon (各々>25,000個の細胞)を、上記の免疫表現型プロファイルに基づく細胞選別により精製し、各試料について、400~1200ngの抽出dsDNAをプレートに入れ (plate)、ImmunoSeq解析のために発送する。

20

【0355】

相関解析：探索的統計解析では、臨床変数 (例えば、cGVHD特徴および/または併用薬剤) またはある時間にわたり測定された免疫学的変数 (例えば、IL-2の前および後における、Tregカウント、Treg/Tcon比、Tregの拡大) と、処置応答との関連を決定する。

30

【0356】

参加者は、以下の適格性基準に従い選択する。

- 1) HLA 8抗原 (HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1) 中7~8抗原をマッチさせた同種造血幹細胞移植のレシピエント；
- 2) 参加者は、2つまたはそれ超の治療の使用にも拘らず、ステロイド不応性cGVHDを有さなければならない。ステロイド不応性cGVHDとは、0.25mg/kg/日 (または0.5mg/kgずつ隔日) で、少なくとも4週間にわたるプレドニゾンの使用 (または代替的なグルココルチコイドの同等の投与) にも拘らず、cGVHDの遷延性の徴候および症状 (表2および3) を有し、徴候および症状の完全な消失を伴わないことと規定される。全身療法を必要とする、広範性の慢性GVHDまたは限局性の慢性GVHDを伴う参加者は、適格である；
- 3) 登録前の4週間にわたる、安定用量のグルココルチコイド；
- 4) 登録前の4週間にわたり、他の免疫抑制医薬 (例えば、カルシニューリン阻害剤、シロリムス、ミコフェノール酸モフェチル) の追加または削減を伴わない。免疫抑制薬の用量は、その薬物の治療範囲に基づき調整することができる；
- 5) 患者年齢 18歳とする。<18歳の参加者におけるIL-2の使用についての投与または有害事象データは、現在入手可能ではないため、小児は、この研究から除外する；

40

50

6) E C O G パフォーマンスステータスを 0 ~ 2 とする (表 4) ;

7) 参加者は、規定される通りの十分な臓器機能を有さなければならない。a) 肝臓：肝機能不全が、推定される c G V H D の症状発現でない限りにおいて、肝機能が十分である (総ビリルビン < 2 . 0 m g / d l - ギルバート症候群を伴う参加者において許容される例外 ; A S T (S G O T) / A L T (S G P T) 2 × U L N) こと。L F T の異常を、c G V H D の唯一の症状発現として伴う参加者には、登録の前に、肝臓生検についての G V H D の記録が必要である。主治医が、L F T の異常を、肝臓 c G V H D と符合すると記録する場合は、他の臓器系に及ぶ活動性の c G V H D の文脈における L F T の異常もまた、許容することができ、この状況では、肝臓生検は、必須でなくなる ; b) 肺：肺機能不全が、慢性 G V H D に起因するとみなされない限りにおいて、F E V 1 予測値の 5 0 % または D L C O (H b) 予測値の 4 0 % であること ; c) 腎：血清クレアチニンが、施設の正常限界の上限未満であるか、またはクレアチニンレベルが施設の正常値を上回る参加者については、クレアチニンクリアランス 6 0 m L / 分 / 1 . 7 3 m ² であること ; d) 増殖因子または輸血を伴わずに、A N C > 1 0 0 0 / m m ³ および血小板 > 5 0 , 0 0 0 / m m ³ により示される十分な骨髄機能 ; および e) 心臓：登録前 6 カ月以内の心筋梗塞または N Y H A クラス I I I もしくは I V の心不全、制御不良の狭心症、重度の制御不良の心室性不整脈、あるいは急性虚血症または活動性伝導系の異常についての心電図によるエビデンスがないこと。研究への登録の前に、スクリーニング時における、任意の E C G 異常は、研究者が、医療上関与性ではないものとして記録しなければならないこと ;

8) I L - 2 の、発生しつつあるヒト胎児に対する効果は未知である。この理由で、かつ、化学療法剤は、催奇形性であることが公知であるため、出産の潜在的可能性のある女性および男性は、研究登録の前に、研究参加期間にわたり、十分な避妊 (産児制限のホルモンまたはバリア法 ; 禁欲) を使用することに同意しなければならない。女性が、本研究に参加している間に、妊娠するかまたは妊娠していることが疑われる場合、その女性は、自らの主治医に速やかに通知するものとする ; ならびに

9) 書面でのインフォームドコンセント文書を理解する能力およびこれに署名する意向。

【 0 3 5 7 】

参加者は、以下の除外基準に従い除外される : 1) 進行中のプレドニゾン要件 > 1 m g / k g / 日 (または同等量) ; 2) カルシニューリン阻害剤にシロリムスを加えた併用 (どちらかの薬剤単独は許容可能である) ; 3) 血栓性微小血管症、溶血性尿毒症症候群、または血栓性血小板減少性紫斑病の既往歴 ; 4) 過去 4 週間における、新規の慢性 G V H D 治療 (例えば、G l e e v e c、体外フォトフェレーシス、リツキシマブ、免疫抑制医薬) ; 5) 過去 4 週間における、低用量 I L - 2 療法 ; 6) 過去 1 0 0 日以内における、T 細胞標的化医薬または代替的な I L - 2 標的化医薬 (例えば、A T G、アレムツズマブ、パシリキシマブ、デニロイキンディフチトクス) への移植後曝露 ; 7) 過去 1 0 0 日以内における、ドナーリンパ球注入 ; 8) 活動性で悪性の再発 ; 9) 活動性で制御不良の感染症 ; 1 0) I L - 2 処置レジメンに適合することが不可能 ; 1 1) 臓器移植 (同種移植片) のレシピエント ; 1 2) 組合せ抗レトロウイルス治療中の H I V 陽性個体は、同種 H S C T の後で使用される薬剤との薬物動態相互作用の潜在的可能性のために、不適格であること。加えて、これらの個体は、致死性の感染症の危険性が増大している。適応の場合に組合せ抗レトロウイルス療法を施されている参加者においては、適切な研究が企図されている ; 1 3) 活動性で制御不良の B 型肝炎または C 型肝炎を伴う個体は、H S C T 後における、致死性の処置関連肝毒性の危険性が高いので、不適格であること ; 1 4) 主要研究者により承認されない場合の、登録前 4 週間以内における他の被験薬 ; および 1 5) 妊婦は、催奇形または墮胎作用の潜在的可能性のために、本研究から除外されること。母体の処置に続発して、乳児における有害事象の、未知であるが潜在的な危険性があるため、授乳は中断するべきである。

【 0 3 5 8 】

対象は、以下の処置レジメンに従い処置する。

ドナー白血球アフェレーシス：本研究のためのアフェレーシスは、通例の非改変型白血球アフェレーシスと比較して、ドナーに対する危険性の付加を伴わない。同じ元の造血幹細胞ドナーにアフェレーシスを施して、ドナーリンパ球を得る。可能な場合、これは、末梢静脈内アクセスを介して実施する。ドナーの評価およびアフェレーシスは、他の施設（国外の試験施設を含む）で実施しうるが、各ドナーの施設の標準操作手順に従う、適切な同意および医学的評価の完遂を必要とする。全てのドナーは、21 CFR 1271のPart Cに従い評価し、移植レシピエントおよびそれらのそれぞれのドナーについての法規に準拠して対応する。ドナーリンパ球は、単回のアフェレーシスで回収することが好ましい。アフェレーシスの後、生成物のアリコートに、ベースラインの細胞カウント、生存率を決定するように解析を施し、微生物学的/滅菌性検査を施す。生成物は、CMCFに従い、十分であれば、下記で詳述する通りに加工し、加工が完了して36時間以内に注入する。

10

【0359】

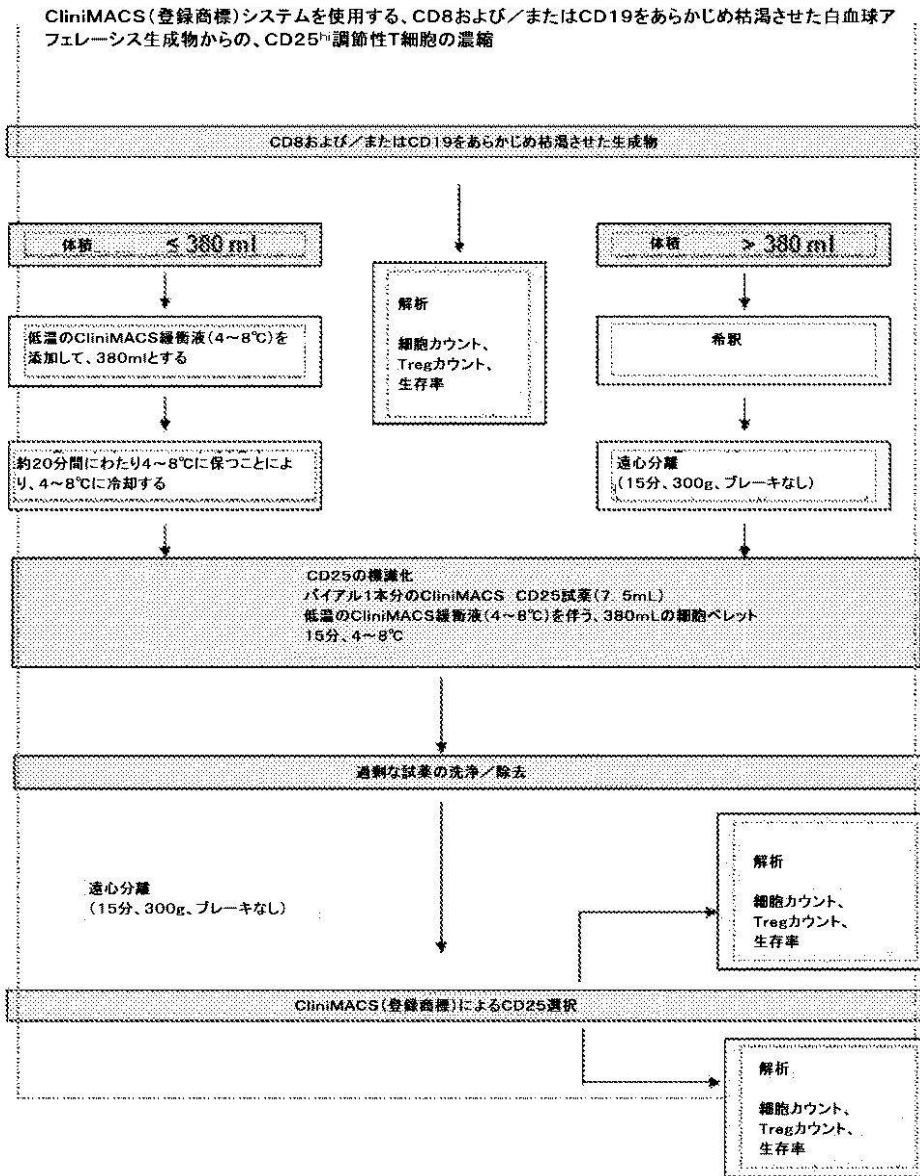
研究治療：Treg濃縮細胞生成物：ドナー白血球アフェレーシス生成物を受領したら、製造元の指示（Miltenyi Biotec）に従い、臨床グレードのCliniMACS試薬系を使用して、逐次的な2ステップのTreg細胞濃縮：i) CD8+/CD19+共枯渇（2.1枯渇プログラム、CliniMACS）に続く、ii) CD25+の陽性選択（3.1濃縮プログラム、CliniMACS）を施す。CliniMACS試薬系の調製および使用のための詳細なプロトコールは、CliniMACS User Manualに従う（表16）。例えば、対象のための、以前の幹細胞ドナーに、アフェレーシスを施して、対象のためのドナーリンパ球を得ることができる。生成物は、十分（1kg当たりのCD3+細胞の最小用量 3×10^7 個）であれば、下記で記載する通りに加工し、明示された生成物の有効期限以内に注入する。ドナー白血球アフェレーシス生成物を受領したら、製造元の指示（Miltenyi Biotec）に従い、臨床グレードのCliniMACS試薬系を使用して、CD8+/CD19+共枯渇に続く、CD25+の陽性選択を伴う、逐次的な2ステップによるTreg細胞濃縮を施す。加工の前およびTreg濃縮が完了した後に取り出された試料を使用して、細胞生存率を決定し、CD3+、CD4+、CD8+、CD25+、CD127+、およびFoxP3+細胞を数え上げる。生成物を、「Treg濃縮細胞」と称する。リリース基準は、細胞生存率 > 70%であり、グラム染色が陰性であること；生成物中のCD4+ CD25+細胞90%であること；およびFoxP3+細胞50%であることを含む。

20

30

【表 1 6】

表16



10

20

30

【0360】

細胞生成物の評価：試料は、加工の前およびTreg濃縮が完了した後に取り出す。加工の前および/または後に、これらを使用して、細胞生存率を決定し、CD3+、CD4+、CD8+、CD25+、CD127+、およびFoxP3+細胞(必要に応じて、組み合わせて、例えば、CD4+CD25+FoxP3+細胞)を数え上げる。また、グラム染色、内毒素、および滅菌性検査も、実施する。生成物を、「Treg濃縮細胞」と称する。リリース基準は、トリパンブルーによる細胞生存率 70%であり、グラム染色/内毒素が陰性であり、生成物中のCD4+CD25+細胞 70%であり、CD4+CD25+CD127-細胞 50%であること(表17)を含む。

40

【表 17 - 1】

表17

A. リリース基準についての、ClinMACSによる選択後/注入前検査

試料	実施した検査	検査施設	リリース基準
選択後/ 注入前	総細胞用量*	CMCF	用量 A:1kg 当たりの細胞 0.1×10^6 個 (開始レベル) 用量 B:1kg 当たりの細胞 0.3×10^6 個 用量 C:1kg 当たりの細胞 1×10^6 個
	細胞生存率	CMCF	トリパンプルーにより $\geq 70\%$
	グラム染色	CMCF	生物体なし
	内毒素	CMCF	< 5 EU/ml
	免疫表現型解析	CMCF	$\geq 70\%$ CD4+CD25+細胞
	免疫表現型解析	CMCF	$\geq 50\%$ CD25+CD127-細胞

* 標的用量であるが、より低い細胞用量の生成物もまた、注入することができる。

B. 記録のための注入後検査

試料	実施した検査	検査施設	基準
注入後			
	無菌性	CMCF	14 日間にわたり増殖は見られない

アッセイ	前加工	Tregについて濃縮された生成物	リリース基準
グラム染色		X	X
内毒素		X	X
総有核細胞	X	X	X*
免疫表現型解析	X	X	X*
生存率	X	X	X
無菌性	X	X	

* CD3、CD4、CD25、CD127カウントを決定するのに要請される

【0361】

1 kg 当たりの標的 Treg 濃縮細胞用量が、リリース基準ではないことに留意されたい。生成物は、1 kg 当たりの細胞用量が、必須の QC 試料が得られた後で利用可能な細胞の最大数において、標的を下回る場合であっても、注入される。

【0362】

Treg 濃縮細胞の用量：ドナー Treg 濃縮総有核細胞の規定された用量を、参加者の標的とする。初期登録は、標的用量レベル A である。後続のコホートは、下記のシエーマに従い用量漸増する。

【表 17 - 2】

* レシピエントの体重

コホート	Treg濃縮細胞の用量(生細胞/kg*)
用量レベルA(開始用量)	0.1 x 10 ⁶
用量レベルB	0.3 x 10 ⁶
用量レベルC	1 x 10 ⁶

【0363】

これは、フェーズIの用量設定デザインである：5例の参加者が、所与の用量レベルで登録される（初期の4例の参加者が登録された後、28日間の中断を必須とする）。28日目までにDLTを示す参加者が、5例中1例である場合は、用量漸増を行う。これが用量レベルCである場合は、この用量をMTDとする。コホート内の2例の参加者が、DLTを被る場合は、MTDを超えたと考える。これが用量レベルAである場合は、登録を停止する。これが用量レベルBである場合は、用量レベルAをMTDとする。これが用量レベルCである場合は、用量レベルBをMTDとする。次いで、毒性および有効性をさらに評価するために、仮のMTDで、さらに10例の参加者が登録される。

10

【0364】

Treg濃縮細胞の注入：CliniMACSによる細胞生成物は、リリース基準に合格するまで投与しない（表17）。リリース基準が満たされない場合は、生成物を注入せず、患者は、DLT評価について評価不可能ではないが、生成物は、実行可能性については評価可能である。適切なTreg濃縮生成物の生成についての実行可能性は、本明細書で記載される通りに決定する。

20

【0365】

リリース基準が満たされたら、生成物を、中心または末梢静脈カテーテルを介して、レシピエントに注入する。細胞は、静脈内カテーテルを介して、約5～10分間にわたり注入する。Tylenol 650mg POおよびBenadryl 25mg IVの前投薬が、注入前に通例である（しかし必要ではない）。注入終了後の約1時間にわたり、参加者を、注入反応の発生についてモニタリングする。注入される用量を超過する、Treg濃縮細胞のアリコート、表現型、機能、ならびに/またはDNA、RNA、およびタンパク質研究のために活用する。任意の残りのTreg濃縮細胞は、将来の品質管理における使用および相関解析のために、標準操作手順に従い低温保存する。

30

【0366】

インターロイキン2：Treg濃縮細胞の注入日から始めて、各参加者には、8週間にわたる自己投与として、毎日の皮下IL-2を施すのに続いて、4週間の中断を行う（本発明の方法に従う、複数の可変用量によるIL-2レジメンを適用する場合を除いて）。IL-2は、外来ベースで投与する。予測される毒性および潜在的危険性のほか、用量の変更については、実施例2に記載されている。

40

【0367】

プレドニゾン（または同等のステロイド）および他の薬剤は、用量の変更を伴わずに、IL-2との併用で持続する。プレドニゾンの漸減は、研究の初期の6週間中は許容されないが、その後、レスポナーにおいては、主治医の裁量（例えば、ステロイド毒性）で、低減することができる（NIHのcGVHD基準に従う応答の記録後において）。他の免疫抑制薬の漸減中の、臨床的に安定なcGVHDは、有効性のエビデンスと考えられ、他の免疫抑制治療の漸減中の、cGVHDの進行は、毒性または有効性の欠如のエビデンスと考えられないことに留意されたい。

【0368】

長期治療：研究期間（8週間のIL-2研究処置および4週間のIL-2の中止）を完了した後で、許容可能な毒性プロファイルで、臨床的利益（完全または部分応答のほか、

50

部分応答についてのNIH基準を満たさないわずかな応答)を享受する参加者には、主治医の裁量で、長期IL-2処置を持続することを許容する。参加者を、長期IL-2療法の6カ月後ごとに再評価して、IL-2療法の持続の根拠を記録する主治医の裁量で、IL-2療法を持続すべきかどうかを決定する。

【0369】

長期IL-2療法中の参加者は、フェーズIの毒性評価項目について(例えば、細胞用量漸増/漸減の目的で)評価不可能である。長期IL-2中における、他の免疫抑制医薬の漸減は、主治医の裁量下にある。長期治療を持続する参加者のために、応答を増強する他のcGVHD治療の追加を、主治医の裁量で許容する。IL-2に帰せられる毒性が生じた場合は、ガイドラインに従い、主治医の裁量で、用量の変更を許容する。長期IL-2療法中、参加者を、以下に提案されるスケジュール: 1) 4週間(±2週間)ごとの、IL-2の毒性および臨床的利益を評価するための、診療所来院および検査室検査(CBC、クレアチニン、ALT、AST、総ビリルビン); 2) 定量的血清免疫グロブリン; 血漿パンキング; およびさらなる単核細胞の保存を含む8週間(±2週間)ごとの免疫アッセイ; ならびに3) IL-2処置の開始から1年となるか、または参加者が、IL-2療法を停止する場合のいずれかが先に生じるまで、16週間(±4週間)ごとのcGVHD評価およびcGVHDの症状スコアシートで評価する。

10

【0370】

以下の評価は、全ての参加者について、処置の前2週間以内に実施する: 1) 病歴および患者の疾患の処置についての根拠(ステロイド用量を含む)についての記録; 2) バイタルサイン、体重、パフォーマンスステータスを含む身体検査; 3) cGVHD評価; 4) 出産の潜在的可能性がある女性についての妊娠検査; 5) 感染性疾患マーカーについての検査; 6) 肺機能検査(4週間前以内); 7) 血液学: 鑑別を伴う全血球計算(CBC); 8) 血清化学: グルコース、BUN、クレアチニン、尿酸、総ビリルビン、アルカリホスファターゼ、LDH、総タンパク質、アルブミン、AST、ALT、およびカルシウム; 9) 甲状腺機能検査(TSH、T4、遊離T4); 10) CMVウイルス負荷; ならびに11) 免疫学: 定量的血清免疫グロブリン; 血漿パンキング; およびさらなる単核細胞の保存。

20

【0371】

以下の評価が、cGVHDが特異的な臓器系に及ぶ参加者について、そうでないことが示されない限りにおいて、処置の前2週間以内に必要である: 1) 眼のcGVHDを伴う参加者のための(任意選択の)、シルマー試験を伴う眼検査; 2) 皮膚のcGVHDを伴う参加者のための皮膚評価; 3) 口腔のcGVHDを伴う参加者のための(任意選択の)口腔検査(±生検); および4) cGVHDと関連する拘縮または筋骨格病変を伴う個体のための、罹患関節についての屈曲評価。

30

【0372】

処置期間中(1、2、3、4、6、8週目の終了時)、IL-2の中止期間中(10、12週目の終了時)、および長期観察期間中(16、20、24週目の終了時)の評価は、1) 病歴および臨床検査; 2) 既往歴および臨床検査と同じ日に行われる毒性評価; 3) 血液学: 鑑別を伴うCBC; 4) 血清化学: グルコース、BUN、クレアチニン、尿酸、総ビリルビン、アルカリホスファターゼ、LDH、総タンパク質、アルブミン、AST、ALT、およびカルシウム; 5) CMVウイルス負荷; 6) 免疫学: 定量的免疫グロブリン; 血漿パンキング; およびさらなる単核細胞の保存; ならびに7) 甲状腺機能検査(TSH、T4、遊離T4)(8、16、24週目)を含む。

40

【0373】

cGVHDが特異的な臓器に及ぶ参加者については、以下の評価(cGVHDの症状スコアに加えた)が、そうでないことが示されない限りにおいて、8週間の研究処置の終了時およびステロイド漸減時に必要である(早期の場合): 1) ステロイド用量; 2) 眼のcGVHDを伴う参加者のための(任意選択の)、シルマー試験を伴う眼検査; 3) 皮膚のcGVHDを伴う参加者のための皮膚評価; 4) 口腔のcGVHDを伴う参加者のため

50

の（任意選択の）口腔検査（±生検）；5）cGVHDの肺症状発現を伴う参加者のための肺機能検査；および6）cGVHDと関連する拘縮または筋骨格病変を伴う個体のための、罹患関節についての屈曲評価。

【0374】

Treg濃縮細胞の注入についての有害事象のリスト：悪性疾患の再発を処置するための、非選択ドナーリンパ球注入は、Tconに媒介されるGVHD発赤と関連し、主に、骨髄に及ぶ著明な白血病/リンパ種の症例では、骨髄抑制と関連している。しかし、Tregは、Tconの主要な抑制因子であり、CliniMACSによるTreg濃縮生成物は、1：2のTreg：Tcon比であっても、*in vitro*において抑制性であり、活動性のGVHDも悪性疾患の再発も伴わないHSCTレシピエントにおいて、1kg当たり最大で細胞 4×10^6 個の注入の後で毒性は報告されていない（Di Ianniら（2011年）、*Blood*、117巻：3921～3928頁）。したがって、開始用量レベルを、1kg当たりの細胞 0.5×10^6 個とし、50%以上のCD4+ CD25+ CD127- Treg（抑制効果のある、1：2のTreg：Tcon比を上回る）を含有する、Treg濃縮生成物の注入は、安全であると考えられる。GVHDの進行および骨髄抑制をモニタリングして、活動性のcGVHDにおける、Treg濃縮細胞の注入の安全性を確認する。

10

【0375】

以下の表は、記録のためのデータの要約である。

【表 18】

表18

	IL-2 を施す2週間前以内	IL-2 による治療期間中(1、2、3、4、6週目の終了時) ^a	8週目の終了時 ^a	10、12週目の終了時 ^a	16、20、24週目の終了時 ^b
病歴	X	X	X	X	X
身体検査	X	X	X	X	X
毒性評価		X	X	X	X
cGVHD の症状スコア	X		X	X	
感染性疾患マーカー	X				
EKG	X				
妊娠検査 [¶]	X				
肺機能	X ^d		o		
皮膚評価	o		o		
口腔評価	o		o		
屈曲評価	o		o		
眼評価	o		o		
鑑別を伴う CBC	X	X*	X	X	X
血清化学	X	X*	X	X	X
免疫 ¹	X	X	X	X	X
ステロイド評価 ²	X		X		
CMV ウイルス負荷	X	X	X	X	X
甲状腺機能	X		X		X ^c
投薬日誌 ⁺		X	X		

X:要請される評価

o:これらの臓器系の臨床病変を伴う参加者に要請される

1 免疫学: 定量的免疫グロブリン;血漿バンキング;さらなる単核細胞の保存

2 全身ステロイドは、医療的に必要(例えば、ステロイド毒性)でない限りにおいて、8週目以前に漸減すべきではなく、早期に漸減する場合は、「8週目相当の」cGVHD評価に着手して、応答を記録する。

a 1、2、3、4、6、8、10、12週目の検査は、週末、休日などの前後のスケジュールの調整および運営上の柔軟性を可能とするように、±4日で実施する。

b 16、20、24週目の検査は、スケジュールの調整および運営上の柔軟性のために、±7日で実施する。長期IL-2を施される参加者については、さらなるフォローアップ要件について関与するプロトコル節も参照されたい。

c 16、24週目

d 検査は、スケジュール調整の柔軟性を可能とするように、最大で4週間前にスケジュールを定めることができる。

* また、CBC/手作業による鑑別、血清クレアチニン、およびLDHについての、さらなる検査室検査も、IL-2開始の4日(±1日)後に実施して、血栓性微小血管症と関連する、貧血、血小板減少症、分裂赤血球および/または腎機能不全について評価する。

¶ 出産の潜在的可能性がある女性のための検査である。

+ 完成させ、最初の8週間のIL-2については、少なくとも2週間ごとに診療所に戻し、長期IL-2については、少なくとも8週間ごとに戻す。

【0376】

毒性および応答の両方について評価する。Treg濃縮細胞の注入を施される参加者は、毒性について評価可能である。Treg濃縮細胞の注入に加えて、少なくとも6週間の

10

20

30

40

50

IL-2を施された参加者は、応答の欠如について評価可能であると考えられる。これらの参加者は、本明細書で言明される定義に従い分類される応答を示す。例えば、かつ、実施例2における定義に加えて、慢性GVHD症状スコアとは、確認された慢性GVHD症状スケールを使用した、参加者の自己報告によるcGVHDの症状および徴候を指す。自己報告される症状スケールは、ベースラインおよび8、10、12週目の終了時（および、必要な場合、8週目の前の、早期ステロイド漸減時）において得られる。慢性GVHDのためのステロイド使用とは、参加者のコルチコステロイドの総1日用量が、ベースラインおよび8週間のIL-2の終了時において記録されていることを指す。コルチコステロイドの毎日の代替的投与の場合、研究目的で、平均1日用量を記録する。免疫評価とは、参加者が、IL-2を開始する前、ならびに1、2、3、4、6、8、10、12、16、および24週目の終了時に実施される、免疫機能についての検査を受けることを指す。検査は、定量的免疫グロブリン、血漿パンキング、およびさらなる単核細胞の保存を含む。

【0377】

このフェーズI研究の主要評価項目は、 1×10^6 IU/m²/日の皮下IL-2と共に、全身療法を必要とするステロイド不応性慢性GVHDを有する参加者に施される、Treg濃縮細胞のMTDを決定することである。MTDは、8週間のIL2処置後に、DLTにより評価する。Treg濃縮細胞の3つの漸増用量が、MTD： 1 kg当たりの細胞 0.1×10^6 個（用量レベルA）； 1 kg当たりの細胞 0.3×10^6 個（用量レベルB）； 1 kg当たりの細胞 1×10^6 個（用量レベルC）を決定すると考えられる。文献では、 1 kg当たり最大でTreg濃縮細胞 4×10^6 個の用量は、良好に忍容されたが、本研究では、 1 kg当たりのTreg濃縮細胞 0.1×10^6 個を、初期の用量レベルとして、解析の緩衝域を設ける。リリース基準を満たす生成物を施される、評価可能な参加者5例のコホートが、各標的用量レベルに参入する（初期の参加者4例が登録された後に、28日間の中断を伴う）。DLTを発症せずに、研究からの早期除外を必要とする場合、参加者は、MTDの決定について評価不可能であると考えられる。追加の参加者を、特異的な用量コホートに登録して、研究から除外された、コホート内の任意の参加者の代役とする。参加者5例のコホート内で1DLTが観察される場合は、用量漸増を行う。これが用量レベルCである場合は、この用量をMTDとする。コホート内で2DLTが観察される場合は、MTDを超えたと考える。これが用量レベルAである場合は、登録を停止する。これが用量レベルBである場合は、用量レベルAをMTDとする。これが用量レベルCである場合は、用量レベルBをMTDとする。

【0378】

このデザインでは、真であるが未知のDLT率が、10%である場合、用量漸増の確率は、0.92であり；DLT率が20%である場合、0.74であり、DLT率が40%である場合、0.34である。下記の表19は、用量漸増の動作特性を示す。

【表19】

表19 動作特性

真であるが未知のDLT率	10%	20%	30%	40%	50%	60%
用量漸増の確率(5例において ≤ 1)	0.92	0.74	0.53	0.34	0.19	0.09

【0379】

MTDを確立したら、さらなる10例の評価可能な参加者を、MTDで処置する。10例の評価可能な参加者では、毒性についての90%の信頼区間の最大幅は、 $\pm 28\%$ 以内である。試料サイズは、被験用量レベルの数に応じて、評価可能な参加者約2~25例の範囲となる。

【0380】

副次的評価項目もまた、解析する。例えば、CliniMACS評価を実施する。CliniMACSデバイスを使用して、成功裏のTreg濃縮注入生成物を達成する実行可能性を評価する。白血球アフェレーシス生成物は、それが、細胞生存率70%であり、

微生物について陰性であることを含有する場合、CliniMACSによる選択の実行可能性の決定のために適格であると考えられる。注入されるCliniMACS生成物は、加工の後で、細胞生存率 70%であり、グラム染色/内毒素が陰性であり、CD4 + CD25 + 細胞 70%であり、CD4 + CD25 + CD127 - Treg 50%であることを含有し、MTD評価に適格である。CliniMACS系は、MTDの決定に適格な生成物率（実行可能率）が、80%またはそれ超である場合は、実行可能であると考えられ、50%またはそれ未満である場合は、実行不可能であると考えられる。最初の10例の生成物中、6またはそれ未満の生成物がこれらの基準を満たす場合は、実行不可能であると考えられる。逆に、最初の10例の生成物中 7例が基準を満たす場合は、研究を進める。この決定規則によれば、真であるが未知の実行可能性率が、50%である場合に、早期に停止させる確率は、0.83であり、実行可能性率が80%である場合、0.12である。標的とされる細胞用量レベルを満たすTreg濃縮生成物を製造する実行可能性もまた評価する。実際に達成される細胞用量が、標的とされる用量レベル未満である場合、投与される実際の細胞用量は、10例の患者による拡大コホートのために選出される、仮のMTDに情報をもたらす。

10

【0381】

副次的評価項目はまた、完全応答および部分応答、安定病態および進行性疾患のほか、8週間の低用量IL-2を加えた、Treg濃縮注入の免疫学的効果を描出する、簡素で記載的な概要的統計によりまとめられる臨床応答も含む。副次的評価項目は主に、記載およびグラフにより解析する。特に、8週間の低用量IL-2を加えた、Treg濃縮注入の、B細胞、NK細胞、または樹状細胞に対する免疫学的効果を、処置前と処置後との間の、細胞数およびサイトカイン産生の変化の両方との関係で特徴付ける。加えて、試料サイズが許容する場合、応答についての臨床予測因子（患者および移植関連の）および生物学的予測因子（例えば、Tregの数、Tconの数、Treg:Tcon比およびTreg機能）を探索する。

20

【0382】

また、応答をモニタリングする。少なくとも6週間のIL-2を施される参加者は、プロトコルによる処置からの大きな逸脱があるとしても、または不適格であるとしても、応答の欠如について評価可能である。各参加者には、以下の類別：1) NIH基準に従う完全cGVHD応答、2) NIH基準に従う部分的cGVHD応答、3) NIH基準に従う応答なし（安定病態を含む）、4) NIH基準に従う進行性cGVHD、5) 悪性疾患の再発、6) 毒性による早期の死、7) 他の原因のための早期の死、または9) 未知（評価不可能、不十分なデータ）のうちの1つを割り当てる。任意の慣例により、類別9は通例、臨床データベース中の任意の種類に関するデータについての「未知」の状態を指定する。

30

【0383】

毒性もまた、モニタリングする。Treg濃縮細胞生成物を施される全ての参加者は、毒性について評価可能である。cGVHDの進行（NIH基準に従う）は、DLTであると考えられる。かつての研究では、8週間のIL-2中に、主治医の判断に従い、さらなる治療またはステロイドの増大を必要とするような、cGVHDの進行を被る患者は見られなかった。参加者はまた、悪性疾患の再発および感染症についても評価する。

40

【0384】

（実施例4：体外フォトフェレーシス（ECP）と組み合わせた、代表的な低用量IL-2治療レジメン）

以下では、ECPと組み合わせた低用量IL-2治療レジメンについての、代表的な非限定的実施形態を提示する。他の実施形態では、低用量IL-2治療レジメンを、実施例1および/または本明細書に記載されている方法であって、任意の実施例からの任意の組合せを含む方法による複数の可変用量によるIL-2治療レジメンで置きかえることができる。例えば、かつ、そうでないことが言明されない限りにおいて、実施例2による基準を、完全にまたは部分的に、下記の実施例4に記載される基準と共に使用することができる。

50

【0385】

EC Pの最も一般的な適応は、同種H S C Tの後における、グルココルチコイド不応性c G V H Dである。急性G V H Dについてのマウスモデルにおける初期研究は、EC Pの治療機構が、従来型T細胞(T_co_n)により媒介される自己免疫応答および同種免疫応答を制御するように作用する、C D 4⁺ C D 2 5⁺ F O X P 3⁺ 調節性T細胞(T_re_g)に依存することを示す。しかし、EC P T_re_g仮説を裏付けるヒトデータは、ほとんど存在しない。これと並行して、グルココルチコイド不応性c G V H Dのための、低用量インターロイキン2(I L - 2)についてのヒト試験は、T_re_g数および機能の、i n v i v oにおける増大と同時に、臨床応答を示す。しかし、処置された患者の半数は、臨床応答を示さず、長期EC P期間中の免疫抑制剤の漸減は、緩徐であり、不完全なことが多く(D i g n a nら(2012年)、B r . J . H a e m a t o l .、58巻: 62~78頁; F l o w e r sら(2008年)、B l o o d、112巻: 2667~2674頁)。1) 定量的T_re_gおよびD Cサブセットデータについて報告する、2) 関与するサイトカイン変化について報告する、または3) これらの変化のうちのいずれかを、EC P用量またはリンパ球アポトーシスの程度と相関させる、EC P患者における研究は存在しない。EC Pおよび低用量I L - 2は両方とも、c G V H Dにおける、測定可能な臨床有効性を示す。

10

【0386】

本明細書で記載される結果に基づき、組合せ介入の戦略は、c G V H Dのほか、免疫応答の抑制が所望される他の状態も良好に抑制するために、T_re_gの拡大を有意にモジュレートすると考えられる。I L - 2は、i n v i t r oおよびi n v i v oの両方において、T_re_gに増殖および生存シグナルを送達する。

20

【0387】

実際、4例の対象は、不応性の皮膚のc G V H Dのために、本明細書で記載されるI L - 2およびEC Pを、既に施されていたが、副作用を示さなかった。4例全てが、3カ月で、皮膚の柔軟性の増大を伴う、客観的c G V H D応答を示し、4例全てが、I L - 2およびEC Pを持続することを選んだ。被験対象2例中2例が、単剤療法と比較して、I L - 2およびEC Pによるi n v i v oにおけるT_re_gの上昇を示したことは重要であった。I L - 2に対してP Rを示した患者1例が、長期I L - 2療法期間中にEC Pを開始したところ、I L - 2単独と比較して、c G V H D臨床応答が増強され、T_re_gは1.7倍に上昇した。EC Pに対する応答が不十分な別の患者では、低用量I L - 2の追加により、EC P単独と比較した、T_re_gの3.3倍の上昇と共に、c G V H Dの応答が誘導された。

30

【0388】

研究を、1~16週目における毎週2回のEC Pによる16週間の試験へと拡張し、8~16週目中において、 1×10^6 I U / m² / 日で投与される毎日の低用量I L - 2を逐次的に追加し、EC P処置を、c G V H Dに最適化することを目標とする。一部の実施形態では、研究は、1~12週目には、ステロイド不応性c G V H Dを伴う患者に、EC Pを施し、6~12週目には、低用量I L - 2を逐次的に追加する12週間の研究である。

40

【0389】

以下の患者集団基準を使用する: 1) 全身療法を必要とするc G V H Dを伴う患者。全身療法を必要とする、広範性c G V H Dまたは限局性c G V H Dを伴う患者は、適格である; および2) 0.25 mg / kg / 日(または同等量)の用量で、少なくとも4週間にわたるプレドニゾンに対する応答が不十分である。

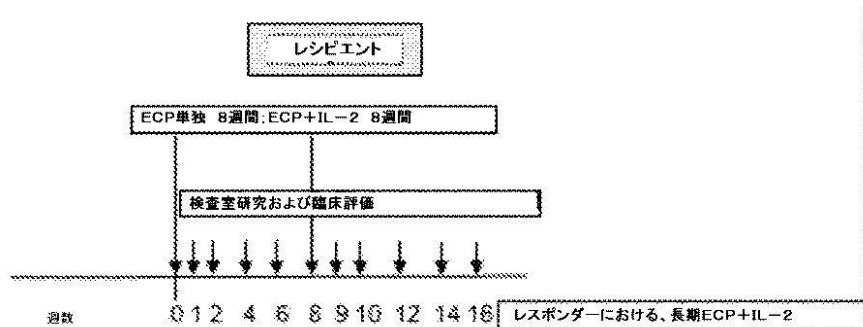
【0390】

具体的な包含および除外基準については、下記で詳述する。

- 1) 参加者数: 25~34例;
- 2) 研究デザインおよび方法:

【化4】

フェーズ II



10

【0391】

安全性および有効性解析は、以下の通りである。主要評価項目は、ステロイド不応性 cGVHD における、毎日の低用量 SC IL-2 を加えた ECP の全臨床応答率を決定することである。例えば、16 週目における全 cGVHD 応答率、ECP に追加された、8 週間毎日の IL-2 の毒性、低用量 IL-2 を加えた ECP の免疫学的効果、低用量 IL-2 を加えた ECP 中のプレドニゾンの使用、ならびに全生存および無進行生存、再発を伴わない死亡、ならびに研究登録の 1 年後における再発を評価することができる。副次的評価項目は、1) 低用量 SC IL-2 療法を加えた ECP の毒性を決定すること；2) 毎日の低用量 SC IL-2 を加えた ECP の免疫学的効果を評価すること；3) 低用量 IL-2 療法を加えた ECP を伴う、進行中のプレドニゾン使用を決定すること；ならびに 4) 全生存、無進行生存、再発を伴わない死亡、および低用量 IL-2 を加えた ECP を開始した 1 年後における再発を評価することである。

20

【0392】

参加者は、以下の適格性基準に従い選択する。

1) 骨髄破壊的または非骨髄破壊的前処置レジメンによる HLA 8 抗原中 7 ~ 8 抗原をマッチさせた、成人ドナーの同種幹細胞移植のレシピエント；

2) 参加者は、ステロイド不応性 cGVHD を有さなければならない。ステロイド不応性 cGVHD とは、0.25 mg/kg/日（または 0.5 mg/kg ずつ隔日）で、少なくとも 4 週間にわたるプレドニゾンの使用（または代替的なコルチコステロイドの同等の投与）にも拘らず、cGVHD の遷延性の徴候および症状（表 2 および 3）を有し、徴候および症状の完全な消失を伴わないことと規定される。全身療法を必要とする、広範性の慢性 GVHD または限局性の慢性 GVHD を伴う患者は、適格である；

30

3) 登録前の 4 週間にわたる、安定用量のコルチコステロイド；

4) 登録前の 4 週間にわたり、他の免疫抑制医薬（例えば、カルシニューリン阻害剤、シロリムス、ミコフェノール酸モフェチル）の追加または削減を伴わない。免疫抑制薬の用量は、その薬物の治療範囲に基づき調整することができる；

5) 患者年齢 18 歳とする。< 18 歳の参加者における IL-2 の使用についての投与または有害事象データは、現在入手可能ではないため、小児は、この研究から除外する；

40

6) 推定平均余命が 3 カ月より長いこと；

7) ECOG パフォーマンスステータスを 0 ~ 2 とする（表 4）；

8) 参加者は、規定される通りの十分な臓器機能を有さなければならない。a) 肝臓：肝機能不全が、推定される cGVHD の症状発現でない限りにおいて、肝機能が十分である（総ビリルビン < 2.0 mg/dl - ギルバート症候群を伴う患者において許容される例外；AST (SGOT) / ALT (SGPT) $2 \times \text{ULN}$) こと。LFT の異常を、cGVHD の唯一の症状発現として伴う患者には、登録の前に、肝臓生検についての GVHD の記録が必要である。主治医が、LFT の異常を、肝臓 cGVHD と符合すると記録する場合は、他の臓器系に及ぶ活動性の cGVHD の文脈における LFT の異常もまた、許容することができ、この状況では、肝臓生検は、必須でなくなる；b) 腎：血清クレア

50

チニンが、施設の正常限界以内であるか、またはクレアチニンレベルが施設の正常値を上回る参加者については、クレアチンクリアランス $60 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ であること； c) 増殖因子または輸血を伴わずに、 $\text{ANC} > 1000 / \text{mm}^3$ および血小板 $> 50,000 / \text{mm}^3$ により示される十分な骨髄機能； および d) 心臓：登録前6カ月以内の心筋梗塞またはNYHAクラスIIIもしくはIVの心不全、制御不良の狭心症、重度の制御不良の心室性不整脈、あるいは急性虚血症または活動性伝導系の異常についての心電図によるエビデンスがないこと。研究への登録の前に、スクリーニング時における、任意のECG異常は、研究者が、医療上関与性ではないものとして記録しなければならないこと；

9) IL-2の、発生しつつあるヒト胎児に対する効果は未知である。この理由で、かつ、化学療法剤は、催奇形性であることが公知であるため、出産の潜在的可能性のある女性および男性は、研究登録の前に、および研究参加期間にわたり、十分な避妊（産児制限のホルモンまたはバリア法；禁欲）を使用することに同意しなければならない。女性が、本研究に参加している間に、妊娠するかまたは妊娠していることが疑われる場合、その女性は、自らの主治医に速やかに通知するものとする；ならびに

10) 書面でのインフォームドコンセント文書を理解する能力およびこれに署名する意向。

【0393】

参加者は、以下の除外基準に従い除外される： 1) 進行中のプレドニゾン要件 $> 1 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ （または同等量）； 2) カルシニューリン阻害剤にシロリムスを加えた併用。どちらかの薬剤単独は許容可能である； 3) 血栓性微小血管症、溶血性尿毒症症候群、または血栓性血小板減少性紫斑病の既往歴； 4) 登録前4週間における、任意の新規の免疫抑制医薬への曝露； 5) 登録前4週間以内における、体外フォトフェレーシス（ECP）またはリツキシマブ療法； 6) ECPに対する任意の禁忌、すなわち、ヘパリンまたは8-MOPに対する禁忌； 7) 登録前100日以内における、任意の新規の免疫抑制医薬（例えば、アレムツズマブ）に対する移植後曝露； 8) 登録前100日以内におけるドナーリンパ球注入； 9) 活動性で悪性の再発； 10) 活動性で制御不良の感染症； 11) IL-2処置レジメンに適合することが不可能； 12) 制御不良の狭心症または症候性のうっ血性心不全（NYHAクラスIIIまたはIV；表9）； 13) 臓器移植（同種移植片）のレシピエント； 14) 組合せ抗レトロウイルス療法中のHIV陽性個体は、同種HSC Tの後で使用される薬剤との薬物動態相互作用の潜在的可能性のために、不適格であること。加えて、これらの個体は、致死性の感染症の危険性が増大している。適応の場合に組合せ抗レトロウイルス療法を施されている参加者においては、適切な研究が企図されている； 15) 活動性のB型肝炎またはC型肝炎を伴う個体は、HSC T後における、致死性の処置関連肝毒性の危険性が高いので、不適格であること； 16) 主要研究者により承認されない場合の、登録前4週間以内における他の被験薬； および17) 妊婦は、催奇形または墮胎作用の潜在的可能性のために、除外されること。母体の処置に続発して、乳児における有害事象の、未知であるが潜在的な危険性があるため、授乳は中断すべきである。

【0394】

対象は、以下の処置レジメンに従い処置する。

各研究参加者には、輸血薬についてのSOPに従い、標準治療である、毎週2回のECPを、16週間にわたり施す。略述すると、ECPは、Therakos UVAR XTSシステムにより実施する。加工される血液体積および8-MOPの投与は、製造元のガイドラインに従い、対象のヘマトクリットおよび血液体積により決定する。ECP再循環バッグからの500 μL のパフィーコートアリコートもまた、光活性化の前に回収し、WBCサブセットの絶対数について特徴付けることができる。ECPおよびIL-2を加えたECPの免疫学的影響についての詳細な評価は、末梢血中のTreg、Tcon、CD8、B、NK、およびDC細胞のサブセットであって、アポトーシス集団を含むサブセットに対して実施することができる。サイトカインは、各ECPサイクルの後で測定する

。ある時間にわたる、応答の、プレドニゾンの使用、全生存、無進行生存、再発を伴わない死亡、および再発についての解析を含む、免疫学的変数との関連もまた、決定する。アフレーシス担当医は、出血、血球減少症、および手順に対する非忍容性（すなわち、全身症状または心血管の不安定性）を含むECPに関する毒性について評価することができる。任意のECPまたはIL-2を加えたECPを施される参加者における処置毒性も、モニタリングする。以前のcGVHD治療の数の影響を含む、単変量解析などを使用して、応答についての予測因子もまた、決定する。

【0395】

臨床レスポナーは、長期IL-2療法を伴うかまたは伴わずに、16週目の後も、ECPを、標準治療として持続する。ECPの参加者が、8週目の前にさらなる治療を必要とするcGVHDの増悪を被る場合、研究PIとの相談の上で、早期に、低用量IL-2を開始することができる。8週目の後、参加者は、毎日の低用量SC IL-2（ 1×10^6 IU/m²/日）を、残りの8週間のECPにわたり、すなわち、8週目の終了時～16週目までの自己投与として開始する。IL-2は、外来ベースで投与することが典型的である。予測される毒性および潜在的危険性のほか、用量の改変については、実施例2に記載されている。プレドニゾン（または同等のステロイド）は、IL-2との併用で持続し、用量の改変を伴わない。参加者の利益になるとみなされる（例えば、ステロイド毒性）場合は、主治医の裁量で、プレドニゾンの漸減を許容する。他の免疫抑制医薬の漸減中の臨床的に安定なcGVHDは、IL-2の有効性のエビデンスと考えられ、他の免疫抑制治療の漸減中のcGVHDの進行は、IL-2の毒性または有効性の欠如のエビデンスと考えられないことに留意されたい。

10

20

【0396】

他の実施形態では、毎週2回ずつ12週間にわたるECPと、 1×10^6 IU/m²/日で、6～12週目中の6週間のIL-2とによる、1段階の単一アーム試験を、0.25/mg/kg/日の用量で、少なくとも4週間のプレドニゾンまたはその同等物に対する応答が不十分であり；総白血球カウント $1000/mm^3$ 、血小板 $25,000/mm^3$ であり；以前にECPまたはIL-2療法を受けていないcGVHD対象などの、cGVHD対象に投与する。

【0397】

長期治療：16週間の研究を完了した後で、許容可能な毒性プロファイルで、臨床的利益（完全または部分応答のほか、部分応答についてのNIH基準を満たさないわずかな応答）を享受する患者には、主治医の裁量で、長期IL-2処置を無期限に持続することを許容する。長期処置の再開は、正当な臨床上または運営上の理由のために、最大で2週間に限り遅延させることができる。処置の再開における、より長期の遅延は、主要研究者により承認されなければならない。長期IL-2中は、患者を、4週間ごとに再評価して、IL-2療法の持続の根拠を記録する主治医の裁量で、IL-2療法を持続すべきかどうかを決定する。

30

【0398】

長期IL-2についての毒性データは、進行中ベースで収集し、全ての処置に関するSAEは、主要研究者およびIRBに報告する。長期IL-2中における、他の免疫抑制医薬の漸減は、主治医の裁量下にある。IL-2に帰せられる毒性が生じた場合は、主治医の裁量で、本明細書に記載される用量の改変を許容する。

40

【0399】

長期IL-2療法中の患者について必要な評価は、以下を含む。1) 4週間（±2週間）ごとの、IL-2の毒性および臨床的利益を評価するための、地元の診療所または研究センターへの来院。必要な検査室検査は、鑑別を伴うCBCおよび血清化学（グルコース、BUN、クレアチニン、総ビリルビン、アルカリホスファターゼ、AST、ALT、カルシウム）である。2) 8週間（±4週間）ごとの研究センターにおける診療所への来院。必要な検査室検査（上記に加えた）は、定量的血清免疫グロブリン；血漿バンキング；およびさらなる単核細胞の保存を含む免疫アッセイである。

50

【0400】

以下の評価を、全ての参加者について、ECPの前2週間以内実施する：1) 病歴および患者の疾患の処置についての根拠（ステロイド用量を含む）についての記録；2) バイタルサイン、体重、パフォーマンスステータスを含む身体検査；3) cGVHD評価；4) 出産の潜在的可能性がある女性についての妊娠検査；5) 血液学：鑑別を伴う全血球計算（CBC）；6) 血清化学：グルコース、BUN、クレアチニン、尿酸、総ビリルビン、アルカリホスファターゼ、LDH、総タンパク質、アルブミン、AST、ALT、およびカルシウム；7) 甲状腺機能検査（TSH、T4、遊離T4）；8) CMVウイルス負荷；9) 定量的血清免疫グロブリン；ならびに10) 免疫学：血漿バンキングおよびさらなる単核細胞の保存。

10

【0401】

以下の評価が、cGVHDが特異的な臓器系に及ぶ患者について（指示がある場合を除き）ECPの前2週間以内に必要である：1) 眼のcGVHDを伴う患者のための（任意選択の）、シルマー試験を伴う眼検査；2) 皮膚のcGVHDを伴う患者のための皮膚評価（±生検）；3) 口腔のcGVHDを伴う患者のための（任意選択の）口腔検査（±生検）；4) cGVHDの肺症状発現を伴う患者のための肺機能検査（処置前の4週間以内～処置の1週間後）；および5) cGVHDと関連する拘縮または筋骨格病変を伴う個体のための、罹患関節についての屈曲評価。

【0402】

以下は、ECPおよびIL-2による処置期間中（1、2、4、6、8、9、10、12、14週目の終了時）、ならびに中止期間中（16週目の終了時）の評価である：1) 病歴および臨床検査（8および16週目におけるステロイド用量を含む）；2) 研究チームのメンバーによる投薬日誌の検討（IL-2処置と共に開始する）；3) 毒性評価は、既往歴および臨床検査と同じ日に行う；4) 血液学：鑑別を伴うCBC；5) 血清化学：グルコース、BUN、クレアチニン、尿酸、総ビリルビン、アルカリホスファターゼ、LDH、総タンパク質、アルブミン、AST、ALT、およびカルシウム；6) CMVウイルス負荷（または施設の慣行に従う）；7) 定量的血清免疫グロブリン（4、8、12、16週目）；8) 免疫学：血漿バンキングおよびさらなる単核細胞の保存（1、2、4、6、8、9、10、12、14、16週目）；ならびに9) 甲状腺機能検査（TSH、T4、遊離T4）（16週目）。

20

30

【0403】

以下は、cGVHDが特異的な臓器に及ぶ患者について（指示がある場合を除き）研究の8および16週目の終了時に（cGVHDの症状スコアに加えて）必要な評価である。1) cGVHD評価；2) 眼のcGVHDを伴う患者のための（任意選択の）、シルマー試験を伴う眼検査；3) 皮膚のcGVHDを伴う患者のための皮膚評価（±生検）；4) 口腔のcGVHDを伴う患者のための（任意選択の）口腔検査（±生検）；5) cGVHDの肺症状発現を伴う患者のための肺機能検査；および6) cGVHDと関連する拘縮または筋骨格病変を伴う個体のための、罹患関節についての屈曲評価。

【0404】

以下の表は、記録のためのデータの要約である。

40

【表 20】

表20

	2週間前 以内(ベー スライン)	治療期間中 (1、2、4、6、 8、9、10、 12、14週目の 終了時) ^a	16週目の 終了時 ^a	長期 IL- 2(4週間 ごと) ^c
病歴	X	X	X	X
身体検査	X	X	X	X
毒性評価		X	X	X
cGVHD の症状スコア	X	X ^b	X	X [#]
妊娠検査 [¶]	X			
肺機能	o	o ^b	o	o [#]
皮膚評価	o	o ^b	o	o [#]
口腔評価	o	o ^b	o	o [#]
屈曲評価	o	o ^b	o	o [#]
眼評価	o	o ^b	o	o [#]
鑑別を伴う CBC	X	X*	X	X
血清化学	X	X*	X	X
定量的免疫グロブリン	X	X ^d	X	X ^δ
免疫学 ¹	X	X	X	X ^δ
ステロイド評価 ²	X	X ^b	X	X ^δ
CMV ウイルス負荷	X	X	X	X
甲状腺機能	X		X	X ^δ
投薬日誌 ⁺		X	X	X

X:要請される評価

o:これらの臓器系の臨床病変を伴う患者に要請される(口腔および眼評価は任意選択である)。ベースライン肺機能検査は、スケジュール調整の柔軟性のために、処置開始の最大で4週間前~1週間後にスケジュールを定めることができる。

1 免疫学:血漿バンキング;さらなる単核細胞の保存。

2 全身ステロイドは、毒性、例えば、重度の高血糖症が見られない限りにおいて、漸減すべきではない(研究PIの認可を伴う)。

a 1、2、4、6、8、9、10、12、14週目の終了時における検査は、週末、休日などの前後のスケジュールの調整および運営上の柔軟性を可能とするように、±4日で実施する。

b 8週目は、ステロイド用量およびcGVHDの評価のためのものである。

c 長期治療中の検査は、患者の旅行、仕事、休日などの前後のスケジュールの調整および運営上の柔軟性を可能とするように、±2週間で実施する。

d 4、8、12週目

* また、CBC/手作業による鑑別、血清クレアチニン、およびLDHについての検査室検査も、IL-2開始の4±2日後に実施して、血栓性微小血管症と関連する、貧血、血小板減少症、分裂赤血球および/または腎機能不全について評価する。

δ 必須の研究センターによるフォローアップ時において、8週間(±4週間)ごと。

#必須の研究センターによるフォローアップ時の1年目において、16週間(±4週間)ごと。

¶ 出産の潜在的可能性がある女性のため。

+ 完成させ、研究によるIL-2による処置中、少なくとも2週間ごとに診療所に戻す。完成させ、長期IL-2については、少なくとも8週間ごとに診療所に戻す。

【0405】

毒性および応答の両方について評価する。少なくとも1つの用量のIL-2を施される参加者は、IL-2処置の毒性について評価可能である。少なくとも4週間のIL-2を

10

20

30

40

50

施され、それらの疾患について再評価された参加者は、IL-2にECP応答を加えた組合せについて評価可能であると考えられる。これらの参加者は、本明細書で提示され、下記で言明される定義に従い分類される応答を示す。例えば、かつ、実施例2における定義に加えて、慢性GVHD症状スコアとは、参加者が、確認された慢性GVHD症状スケールを使用して、cGVHDの症状および徴候について自己報告することを指す。自己報告される症状スケールは、ベースラインならびに8および16週目において得られる。慢性GVHDのためのステロイド使用とは、参加者のコルチコステロイドの総1日用量が、ベースラインならびに8および16週目において記録されていることを指す。コルチコステロイドの毎日の代替的投与の場合、研究目的で、平均1日用量を記録する。免疫評価とは、参加者が、ベースラインならびに1、2、4、6、8、9、10、12、14、および16週目に実施される、免疫機能についての検査を受けることを指す。検査は、血漿バンキングおよびさらなる単核細胞の保存を含む。定量的免疫グロブリンは、ベースラインならびに4、8、12、および16週目において調べる。

10

【0406】

ステロイド不応性慢性移植片対宿主病(cGVHD)を伴う患者において、6~12週目にわたる、毎日の低用量皮下(SC)インターロイキン2(IL-2)を追加した、12週間の体外フォトフェレーシス(ECP)の有効性を評価する、1段階のフェーズII試験では、主要評価項目は、12週の処置で評価される全応答である。プラセボと対比したECPについての無作為化フェーズ2試験(皮膚のcGVHDによる応答率は40%であり、皮膚以外のcGVHDによる応答率は33%である)(Flowersら(2008年)、Blood、112巻:2667~2674頁)に基づく、ECPを加えたIL-2は、全応答率が60%である場合は効果的であるが、40%以下の場合は無効である。このデザインによれば、真であるが未知の応答率が60%である場合に、処置を効果的であると結論付ける確率は、0.84であり、真の応答率が40%である場合、0.09である。同じ患者集団内の、かつてのフェーズ1 IL-2研究では、ベースラインTregカウントの中央値は、1 μ L当たりの細胞16.8個であった。34例の患者において、同様のベースラインTregカウントを仮定すると、有効サイズ(すなわち、その標準偏差で除した平均差)が1である場合、ECPの6週目における、Tregカウントの、1 μ L当たりの細胞33.6個への増大を検出する検出力は、>99%となり、有効サイズを0.6である場合、検出力は、90%となる。IL-2を加えたECPによる、Tregカウントに対する相乗効果もまた、考える。34例の患者のうち、30例が、12週目の処置を完了し、Tregが、6週目における33.6から、12週目における200へと上昇する場合、有効サイズを1とすると、この差異を検出する検出力は、>99%となり、有効サイズを0.6とすると、検出力は、87%となる。縦断的なデータ解析により、ある時間にわたるTregの増大を評価し、これが、ECP単独またはIL-2を加えたECPと関連するかどうかを決定する。免疫学的応答と臨床応答との関連付けも行う。

20

30

【0407】

本研究では、対象の性別を、包含または除外基準として使用せず、マイノリティーの登録者数に制限を設けない。2013年において、移植を受けた全ての患者の41%は女性であり、患者の約10%はマイノリティーであった。2013年の本発明者らによる移植プログラムにおいて自己報告された、この民族および性別に基づき、性別および人種により規定される亜群内で予期される登録者数を、下記の表21にまとめる。

40

【表 2 1】

表21

登録者数の目標				
民族類別	性別			
	女性		男性	合計
ヒスパニック系またはラテン系	1	+	1	= 2
ヒスパニック系でもラテン系でもない	9	+	14	= 23
民族類別:全ての対象の合計	10	(A1) +	15	(B1) = 25 (C1)
人種類別				
アメリカ先住民またはアラスカ原住民	0	+	0	= 0
アジア系	1	+	1	= 2
黒人またはアフリカ系アメリカ人	1	+	1	= 2
ハワイ原住民または他の太平洋島嶼民	0	+	0	=
白人	8	+	13	= 21
人種類別:全ての対象の合計	10	(A2) +	15	(B2) = 25 (C2)

10

20

【0408】

参照による組み込み

本明細書で言及される、全ての刊行物、特許、および特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが、具体的かつ個別に示された場合と同様に、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。利益相反の場合は、本明細書における任意の定義を含む本出願により処理する。

30

【0409】

また、ワールドワイドウェブ上の The Institute for Genomic Research (TIGR) および / またはワールドワイドウェブ上の the National Center for Biotechnology Information (NCBI) により維持されているデータベースなど、公表されているデータベースへの登録と対応する受託番号を参照する、任意のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列も、参照によりそれらの全体において組み込まれる。

【0410】

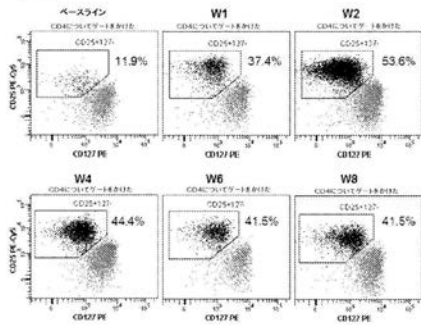
同等物

当業者は、慣用的な実験だけを使用して、本明細書に記載される、本発明の具体的な実施形態に対する多くの同等物を認識するか、またはこれらを確認することが可能であろう。このような同等物は、以下の特許請求の範囲により包含されることを意図する。

40

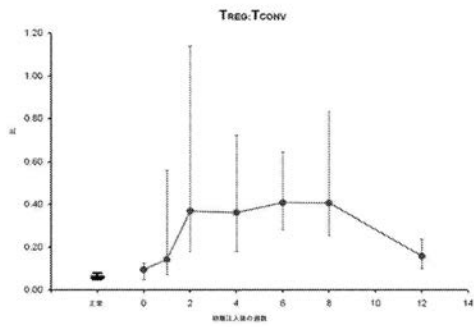
【 図 1 】

Figure 1



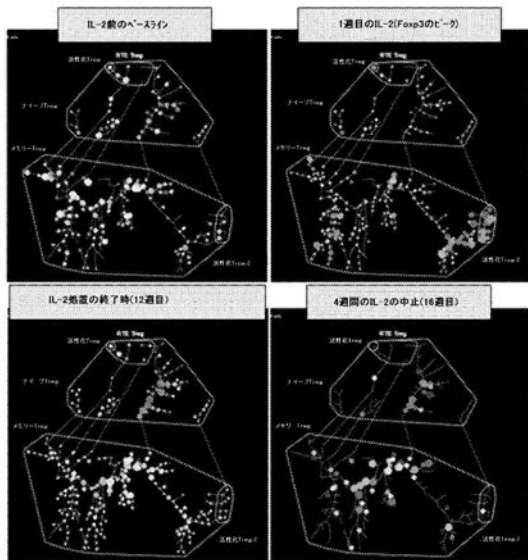
【 図 2 】

Figure 2



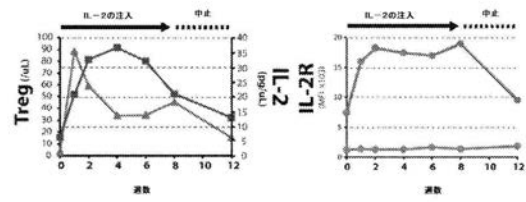
【 図 5 】

Figure 5



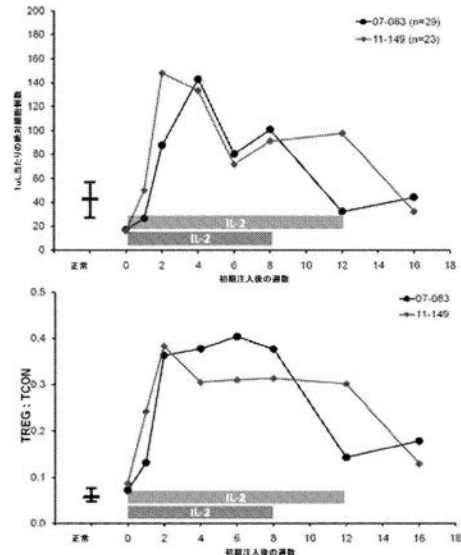
【 図 3 】

Figure 3



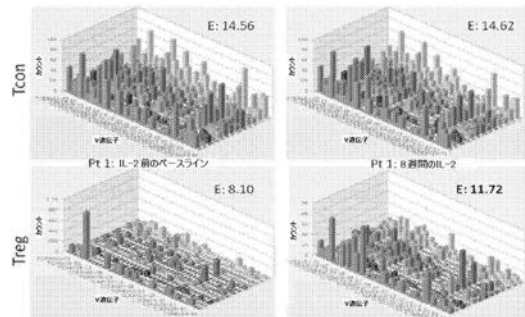
【 図 4 】

Figure 4



【 図 6 】

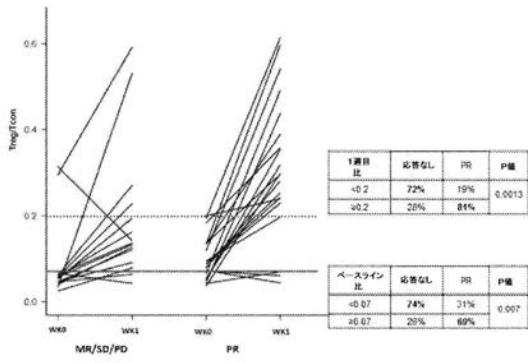
Figure 6



TCR レパトリーの多様性	cGVHD 患者 1	cGVHD 患者 2
ベースラインのCD4Tcon エントロピー	14.56	14.00
IL-2後の CD4Tcon エントロピー	14.62	13.27
ベースラインのCD4Treg エントロピー	8.10	9.49
IL-2後の CD4Treg エントロピー	11.72	11.56

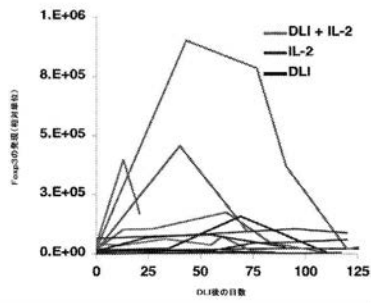
【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】

Figure 8



【 配列表 】

[2018500276000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US15/54466
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61P 29/00, 37/06; A61K 38/20 (2016.01) CPC - A61K 38/2013, 38/00, 38/12 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) IPC(8): A61P 37/08, 29/00, 37/06; A61K 38/20 CPC: A61K 38/2013, 38/00, 38/12 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) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google/Google Scholar; NCBI/PubMed; Dialog ProQuest; 'L-2,' patient, subject, regimen, 'T lymphocyte,' regulatory, effector, conventional, stratify, treat, administer		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/123361 A1 (ASSISTANCE PUBLIQUE – HOPITAUX DE PARIS, et al.); September 20, 2012; page 3, lines 15-25; page 12, lines 5-15; page 13, lines 5-10; page 22, lines 10-20	1-3, 37, 38, 40/37, 40/38
Y	US 8921530 B1 (SMITH, KA); July 26, 2005; column 9 lines 15-65	1-3
Y	US 2013/0071860 A1 (HALE, MB et al.); March 21, 2013; paragraphs [0007], [0010], [0218]	37, 38, 40/37, 40/38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 08 February 2016 (08.02.2016)		Date of mailing of the international search report 23 FEB 2016
Name and mailing address of the ISA/ 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 PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/54466

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/54466

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 4-36, 39
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 35/14 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/14	Z
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	A 6 1 K 35/15	A
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	A 6 1 K 35/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
	G 0 1 N 33/48	M
	G 0 1 N 33/53	Y

(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 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 コレス, ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 1 9, ロクスベリー, ハイランド ストリート 6 1

(72)発明者 ソイファー, ロバート ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 6 8, ワバン, アナワン ロード 2 6

(72)発明者 リッツ, ジェローム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 3 - 3 9 0 6, リンカーン, コナント ロード 7 1

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA25 AA40 CA18 GC22

4B063 QA01 QA19 QQ08 QR48 QR66 QS33 QX02

4C084 AA02 AA03 AA11 BA44 DA14 MA02 MA66 NA05 ZA021 ZA361

ZA591 ZA661 ZA891 ZA961 ZB051 ZB081 ZB131 ZB151 ZC351 ZC411

ZC751

4C087 AA01 AA02 BB37 CA03 CA04 MA02 MA66 NA05 ZA02 ZA36

ZA59 ZA66 ZA89 ZA96 ZB05 ZB08 ZB13 ZB15 ZC35 ZC41

ZC75

专利名称(译)	用于治疗免疫疾病的多种可变IL-2剂量方案		
公开(公告)号	JP2018500276A	公开(公告)日	2018-01-11
申请号	JP2017518533	申请日	2015-10-07
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	Dana Farber癌症研究所有限公司		
[标]发明人	コレスジョン ソイファー、ロバートジェイ リッツジェローム		
发明人	コレス, ジョン ソイファー, ロバート ジェイ. リッツ, ジェローム		
IPC分类号	A61K38/20 A61P43/00 A61P37/06 A61P9/00 A61P37/02 A61P25/00 A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/08 A61P11/06 A61P1/04 A61K41/00 A61K35/17 A61K35/14 A61K35/15 C12Q1/06 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/2013 A61K35/17 A61P37/06 G01N33/6893 G01N2800/52 A61K2300/00		
FI分类号	A61K38/20.ZNA A61P43/00.111 A61P37/06 A61P9/00 A61P37/02 A61P25/00 A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/08 A61P11/06 A61P1/04 A61K41/00 A61P43/00.121 A61K35/17.Z A61K35/14.Z A61K35/15.A A61K35/15.Z C12Q1/06 G01N33/48.M G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CA18 2G045/GC22 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063 /QQ08 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS33 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA11 4C084/BA44 4C084/DA14 4C084/MA02 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/ZA021 4C084/ZA361 4C084 /ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB051 4C084/ZB081 4C084/ZB131 4C084 /ZB151 4C084/ZC351 4C084/ZC411 4C084/ZC751 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087 /CA03 4C087/CA04 4C087/MA02 4C087/MA66 4C087/NA05 4C087/ZA02 4C087/ZA36 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZB05 4C087/ZB08 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087 /ZC35 4C087/ZC41 4C087/ZC75		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/061952 2014-10-09 US		
其他公开文献	JP2018500276A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明部分基于鉴定使用多种可变IL-2剂量来鉴定, 评估, 预防和治疗免疫紊乱的方法。在一个方面, 该方法中,) 增加了血浆IL-2的水平在受试者, 在受试者中, 调节性T淋巴细胞 (Treg细胞) 的比例的常规T淋巴细胞 (TCON) (调节性T细胞: TCON) 包括向所述受试者施用引导方案, 所述方案包括以增加至少一种以下剂量的量向所述受试者连续施用白细胞介素2 (IL-2) b) 接着, 高的量大于诱导方案剂量, i) 的血浆IL-2水平的目标, 进一步升高, ii) 的Treg, 比率TCON, 进一步增加时, IL-2并且向受试者施用至少一种维持方案, 其包括向受试者持续施用维持剂量, 由此治疗受试者。

Figure 4

