

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-543801

(P2023-543801A)

(43)公表日 令和5年10月18日(2023.10.18)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	Z N A 4 C 0 7 6
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 0 7 K 14/195	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/005 (2006.01)	C 0 7 K 14/005	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全121頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-519066(P2023-519066)	(71)出願人	520116920
(86)(22)出願日	令和3年9月24日(2021.9.24)		エピバックス、インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年5月24日(2023.5.24)		EpiVax, Inc.
(86)国際出願番号	PCT/US2021/052017		アメリカ合衆国 02909 ロードアイ
(87)国際公開番号	WO2022/067076		ランド、プロビデンス、バレー ストリ
(87)国際公開日	令和4年3月31日(2022.3.31)		ート 188、スウィート 424
(31)優先権主張番号	63/083,392		188 Valley Street,
(32)優先日	令和2年9月25日(2020.9.25)		Suite 424, Providen
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ce, Rhode Island 02
			909, United States
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100114890
			弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラ
			インハルト
		(74)代理人	100098501
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レトロインベルソ制御性T細胞エピートープ

(57)【要約】

本開示は、レトロインベルソTレグトップ化合物および組成物ならびにその調製方法およびその使用を提供する。

FIG. 1

Example Epitope									
Accession: In-house - Sequence: BA306-318									
Pos	AA Sequence	Pos	Score	Z score	Pos	Score	Z score	Pos	Score
306	PRVYQVLS	314	1.34	1.40					
307	RAVYQVLS	315							
308	YVYQVLS	316	1.33	1.38	317	1.35	1.38	318	1.38
309	YVYQVLS	317							
310	YVYQVLS	318							

Z score indicates the potential of a 9 mer form to bind to a given HLA allele. The strength of the score is indicated by the blue shading as shown below:

Orange/Redden Outlined	Z score in Top 1%	Z score in Top 5%	Z score in Top 10%	remaining scores outlined
------------------------	-------------------	-------------------	--------------------	---------------------------

Assessments performed: 40 Deviation from Expectation: 17.62

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有するポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、ポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸から本質的になるポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、ポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸からなるポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、ポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有するポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、ポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 5】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸から本質的になるポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、ポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 6】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸からなるポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、ポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 7】

請求項 4 から 6 までのいずれか 1 項記載の核酸を含むベクター。

【請求項 8】

請求項 7 記載のベクターを含む細胞。

【請求項 9】

免疫応答を抑制する必要がある被験体において免疫応答を抑制する方法であって、前記方法は、配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列

10

20

30

40

50

、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するポリペプチドであって、配列番号：1～29および42～107および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、ポリペプチドの治療的有効量を前記被験体に投与することを含む、方法。

【請求項10】

前記免疫応答は、少なくとも1つの治療性タンパク質による少なくとも1つ以上の治療的処置による処置、ワクチンによる処置または少なくとも1つの抗原による処置の結果である、請求項9記載の方法。

10

【請求項11】

配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107の前記ポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29および42～107および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドを、単離された樹状細胞にエクスピボで投与し、前記樹状細胞を前記被験体に再導入する、請求項9記載の方法。

【請求項12】

配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29および42～107および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、1つ以上の抗原提示細胞を制御性表現型にシフトさせる、請求項9記載の方法。

20

【請求項13】

配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29および42～107および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、1つ以上の樹状細胞を制御性表現型にシフトさせる、請求項9記載の方法。

30

【請求項14】

前記制御性表現型は、前記樹状細胞または他の抗原提示細胞内でのCD11cおよびHLA-DR発現の減少により特徴付けられる、請求項13記載の方法。

【請求項15】

配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29および42～107および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、1つ以上のT細胞を制御性表現型にシフトさせる、請求項9記載の方法。

40

【請求項16】

配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～2

50

9 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、1 つ以上の CD4⁺T 細胞を制御性表現型にエピソードシフトさせる、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、1 つ以上の CD8⁺T 細胞を制御性表現型にシフトさせる、請求項 15 記載の方法。

10

【請求項 18】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、1 つ以上の B 細胞を制御性表現型にシフトさせる、請求項 15 記載の方法。

20

【請求項 19】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ 制御性 T 細胞を活性化する、請求項 9 記載の方法。

【請求項 20】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、CD4⁺T 細胞の活性化を抑制する、請求項 9 記載の方法。

30

【請求項 21】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、CD4⁺ および／または CD8⁺T 細胞の活性化または増殖を抑制する、請求項 9 記載の方法。

40

【請求項 22】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、B 細胞の活性化または増殖

50

を抑制する、請求項 9 記載の方法。

【請求項 2 3】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有する前記ポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、前記ポリペプチドの投与が、先天性免疫応答、適応性免疫応答、エフェクター T 細胞応答、メモリー T 細胞応答、ヘルパー T 細胞応答、B 細胞応答、 η κ T 細胞応答、またはこれらの任意の組合せからなる群から選択される免疫応答を抑制する、請求項 9 記載の方法。

10

【請求項 2 4】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有するポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、ポリペプチド、および 1 つ以上の免疫刺激性 T 細胞エピトープポリペプチドの有効量を有する組成物であって、前記免疫刺激性 T 細胞エピトープポリペプチドにより活性化される免疫応答を抑制する、組成物。

20

【請求項 2 5】

前記 1 つ以上の免疫刺激性 T 細胞エピトープポリペプチドは、1 つ以上の治療性タンパク質、ワクチンによる処置または少なくとも 1 つの抗原による処置である、請求項 2 4 記載の組成物。

【請求項 2 6】

配列番号：1～29 および 42～107 からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意に比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有するポリペプチドであって、配列番号：1～29 および 42～107 のアミノ酸、および場合によりそれらの延長部の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、ポリペプチドを有する医薬組成物。

30

【請求項 2 7】

前記ポリペプチドは、配列番号：1 または配列番号：16 の前記アミノ酸配列を有する、請求項 2 6 記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

請求項 2 6 記載の医薬組成物および製剤学的に許容可能な担体または付形剤。

【請求項 2 9】

請求項 2 6 記載の組成物の治療的有效量を被験体に投与することを有する、制御性 T 細胞を刺激する必要がある被験体において制御性 T 細胞を刺激する方法。

40

【請求項 3 0】

請求項 2 6 記載の組成物の治療的有效量を被験体に投与することを有する、免疫応答を抑制する必要がある被験体において免疫応答を抑制する方法。

【請求項 3 1】

請求項 2 6 記載の組成物の治療的有效量を被験体に投与することを有する、抗原特異的免疫応答を抑制する必要がある被験体において抗原特異的免疫応答を抑制する方法。

【請求項 3 2】

前記被験体は、アレルギー、自己免疫疾患、移植関連障害、酵素もしくはタンパク質欠乏障害、止血障害、癌、不妊症；およびウイルス、細菌もしくは寄生虫感染または血液凝固障害を患う、請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 3】

50

前記免疫応答は、少なくとも1つの治療性タンパク質による処置、ワクチンによる処置、および少なくとも1つの抗原による処置からなる群から選択される1つ以上の治療的処置の結果である、請求項31記載の方法。

【請求項34】

前記医薬組成物の投与は、1つ以上の抗原提示細胞を制御性表現型にシフトさせる、請求項31記載の方法。

【請求項35】

前記医薬組成物の投与は、1つ以上の樹状細胞を制御性表現型にシフトさせる、請求項31記載の方法。

【請求項36】

前記制御性表現型は、前記樹状細胞または他の抗原提示細胞内でのCD11cおよびHLA-DR発現の減少により特徴付けられる、請求項35記載の方法。

【請求項37】

免疫応答を抑制する必要がある被験体において免疫応答を抑制する方法であって、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するポリペプチドであって、配列番号：1～29および42～107、および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、ポリペプチドを有する組成物の治療的有効量を被験体に投与することを含む、方法。

【請求項38】

前記組成物の投与は、CD4⁺／CD25⁺／FoxP3⁺制御性T細胞を活性化する、請求項37記載の方法。

【請求項39】

前記組成物の投与は、CD4⁺エフェクターT細胞の活性化を抑制する、請求項38記載の方法。

【請求項40】

前記組成物の投与は、CD4⁺および／またはCD8⁺T細胞の活性化または増殖を抑制する、請求項38記載の方法。

【請求項41】

前記組成物の投与は、B細胞の活性化または増殖を抑制する、請求項38記載の方法。

【請求項42】

前記被験体は、アレルギー、自己免疫疾患、移植関連障害、酵素もしくはタンパク質欠乏障害、または血液凝固障害を患う、請求項38記載の方法。

【請求項43】

前記免疫応答は、少なくとも1つの治療性タンパク質による処置、ワクチンによる処置、および少なくとも1つの抗原による処置からなる群から選択される1つ以上の治療的処置の結果である、請求項38記載の方法。

【請求項44】

請求項26記載の組成物を有する、被験体において免疫応答を抑制するためのキット。

【請求項45】

有効量の抗原またはアレルゲンをさらに有する、請求項44記載のキット。

【請求項46】

患者の制御性T細胞の集団を増殖させる方法であって、

(a) 被験体から得られた生物学的サンプルを準備すること；および

(b) 前記生物学的サンプルから制御性T細胞を単離し；増殖した制御性T細胞組成物を得るために前記T制御性細胞が数を増やす条件下で、単離された前記制御性T細胞を請求項26記載の組成物の有効量と接触させ、それにより前記生物学的サンプル中の前記制御性T細胞を増殖させること；および

10

20

30

40

50

(c) 増加した数の前記制御性T細胞を前記患者に戻すことを有する、方法。

【請求項47】

生物学的サンプル中の制御性T細胞を刺激する方法であって、

(a) 被験体から得られた生物学的サンプルを準備すること；

(b) 前記生物学的サンプルから制御性T細胞を単離し；1つ以上の生物学的機能を変更するためにT制御性細胞を刺激する条件下で、単離された前記制御性T細胞を請求項26記載の組成物の有効量と接触させ、それにより前記生物学的サンプル中の前記制御性T細胞を刺激すること

を有する、方法。

10

【請求項48】

前記ポリペプチドは、特異的標的抗原に対する免疫応答の低減に使用するために、前記標的抗原と共有結合しているか、非共有結合しているか、または混合している、請求項26記載の医薬組成物。

【請求項49】

抑制効果が、ナチュラルT_{Reg}または適応性T_{Reg}または前記ナチュラルT_{Reg}のウイルス相同体によって媒介される、請求項48記載の医薬組成物。

【請求項50】

エフェクターT細胞、ヘルパーT細胞またはB細胞のいずれかが、前記ポリペプチドの抑制効果を受ける、請求項49記載の医薬組成物。

20

【請求項51】

異種ポリペプチドに連結されたレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチドを有するポリペプチド組成物であって、前記レトロインベルソT細胞エピトープポリペプチドは、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸からなり、配列番号：1～29および42～107、および場合によりこれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、ポリペプチド組成物。

【請求項52】

前記レトロインベルソT細胞ポリペプチドは、前記異種ポリペプチドのN末端に融合されている、請求項51記載のポリペプチド組成物。

30

【請求項53】

前記レトロインベルソT細胞ポリペプチドは、前記異種ポリペプチドのC末端に融合されている、請求項51記載のポリペプチド組成物。

【請求項54】

前記異種ポリペプチドは、生物学的活性分子を有し、前記生物学的活性分子は、免疫原性分子、T細胞エピトープ、ウイルスタンパク質、および細菌タンパク質からなる群から選択される、請求項51記載のポリペプチド組成物。

【請求項55】

前記異種ポリペプチドは、前記レトロインベルソT細胞ポリペプチドと作動的に連結されている、請求項51記載のポリペプチド組成物。

40

【請求項56】

被験体において免疫応答を抑制するための制御性T細胞を誘導する方法であって、前記被験体に治療的有效量のポリペプチド組成物を投与することを有し、前記ポリペプチド組成物は、異種ポリペプチドに連結されたレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチドを有し、前記レトロインベルソT細胞エピトープポリペプチドは、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的

50

アミノ酸からなり、配列番号：１～２９および４２～１０７、および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、Ｄ型アミノ酸配置である、方法。

【請求項５７】

前記レトロインベルソＴ細胞ポリペプチドは、前記異種ポリペプチドのＮ末端に融合されている、請求項５６記載の方法。

【請求項５８】

前記レトロインベルソＴ細胞ポリペプチドは、前記異種ポリペプチドのＣ末端に融合されている、請求項５６記載の方法。

【請求項５９】

前記異種ポリペプチドは、生物学的活性分子を有し、前記生物学的活性分子は、免疫原性分子、Ｔ細胞エпитープ、ウイルスタンパク質、および細菌タンパク質からなる群から選択される、請求項５６記載の方法。

【請求項６０】

前記ポリペプチド組成物は、有効量の１つ以上の抗原および／またはアレルゲンをさらに有する、請求項５６記載の方法。

【請求項６１】

前記免疫抑制効果は、ナチュラル制御性Ｔ細胞により媒介される、請求項５６記載の方法。

【請求項６２】

前記免疫抑制効果は、適応性制御性Ｔ細胞により媒介される、請求項５６記載の方法。

【請求項６３】

前記ポリペプチド組成物は、エフェクターＴ細胞応答を抑制する、請求項５６記載の方法。

【請求項６４】

前記ポリペプチド組成物は、ヘルパーＴ細胞応答を抑制する、請求項５６記載の方法。

【請求項６５】

前記ポリペプチド組成物は、Ｂ細胞応答を抑制する、請求項５６記載の方法。

【請求項６６】

前記ポリペプチド組成物は、エフェクターＴ細胞のサイトカイン分泌を抑制する、請求項６３記載の方法。

【請求項６７】

前記ポリペプチドエピトープ組成物は、ヘルパーＴ細胞のサイトカイン分泌を抑制する、請求項６４記載の方法。

【請求項６８】

前記ポリペプチドは、配列番号：１のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：１のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、Ｄ型アミノ酸配置であるか、または配列番号：１６のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：１６のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、Ｄ型アミノ酸配置である、請求項１から３までのいずれか１項記載のポリペプチド。

【請求項６９】

ポリペプチドをコードする前記核酸は、配列番号：１のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：１のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、Ｄ型アミノ酸配置であるか、または配列番号：１６のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：１６のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、Ｄ型アミノ酸配置である、請求項４から６までのいずれか１項記載の核酸。

【請求項７０】

前記ポリペプチドは、配列番号：１のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：１のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、Ｄ型アミノ酸配置であるか、または配列番号：１６のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：１６のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、Ｄ型アミノ酸配置である

10

20

30

40

50

、請求項 9 から 23 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 71】

前記ポリペプチドは、配列番号：1 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：1 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置であるか、または配列番号：16 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：16 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、請求項 24 または 25 記載の組成物。

【請求項 72】

前記ポリペプチドは、配列番号：1 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：1 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置であるか、または配列番号：16 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：16 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、請求項 26 から 28 までおよび 48 から 50 までのいずれか 1 項記載の医薬組成物。

10

【請求項 73】

前記ポリペプチドは、配列番号：1 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：1 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置であるか、または配列番号：16 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：16 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、請求項 29 から 36 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 74】

前記ポリペプチドは、配列番号：1 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：1 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置であるか、または配列番号：16 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：16 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、請求項 37 から 43 までのいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 75】

前記ポリペプチドは、配列番号：1 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：1 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置であるか、または配列番号：16 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：16 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、請求項 44 または 45 記載のキット。

30

【請求項 76】

前記ポリペプチドは、配列番号：1 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：1 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置であるか、または配列番号：16 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：16 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、請求項 46 記載の方法。

【請求項 77】

前記ポリペプチドは、配列番号：1 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：1 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置であるか、または配列番号：16 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：16 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、請求項 47 記載の方法。

40

【請求項 78】

前記ポリペプチドは、配列番号：1 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：1 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置であるか、または配列番号：16 のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：16 のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、請求項 51 から 55 までのいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 79】

50

前記ポリペプチドは、配列番号：1のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：1のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であるか、または配列番号：16のアミノ酸配列および／またはその断片およびその変異体を有し、配列番号：16のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、請求項56から67までのいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年9月25日に出願された米国仮特許出願第63／083,392号明細書に依拠しかつその優先権を主張し、その全体の内容は参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、EFS-Webを介してASCIIフォーマットで提出された配列表を含み、参照により全体として本明細書に組み込まれる。2021年9月13日の作成された前記ASCIIコピーは、EPV 0022PCT Sequence Listing_WorkFile.txtの名称で、サイズは86KBである。

【0003】

分野

本開示は、一般に、新規クラスのレトロインベルソ制御性T細胞エピトープ（「レトロインベルソTレギトープ」と言われる）に関する。本開示は、レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物ならびにその調製方法およびその使用を提供する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるか、または本質的にそれらからなる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド（これは、本明細書では、「Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ」、「レトロインベルソTレギトープ」、または「レトロインベルソ制御性T細胞エピトープポリペプチド」と言われてよい）；本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチド；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルスまたは細胞；本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上を含み、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除いて、D型アミノ酸配置である。

【0004】

背景

自己抗原または外来抗原に対する寛容を人為的に誘導することは、自己免疫、移植、アレルギーおよび他の疾患についての治療の目標である。自己由来および非自己由来の治療性タンパク質を標的とする免疫応答は、しばしば、臨床効果を制限する。治療性タンパク質組成物に対する寛容を誘導する免疫調節治療は、抗薬物抗体（ADA）の形成を低減し、臨床的転帰を改善することがある。最近まで、治療的寛容を誘導することは、広範囲にわたる免疫細胞枯渇療法に頼っていた。これらの広範囲にわたるアプローチは、一般的に免疫系を弱め、多くの被験体を日和見感染、自己免疫攻撃および癌に対して無防備なままにしている。この分野では、免疫寛容の誘導に対して攻撃性が少なくかつより標的を絞ったアプローチが必要とされている。

【0005】

免疫寛容は、抗原提示細胞（APC）、T細胞、B細胞、サイトカイン、ケモカイン、

および表面受容体の間の複雑な相互作用により調節される。初期の自己／非自己識別は、新生児発育間に、髄質上皮細胞が未成熟T細胞に特異的な自己タンパク質エピトープを発現する胸腺中で生じる。高親和性で自己抗原を認識するT細胞は除去されるが、中程度の親和性を有する自己反応性T細胞は、時には除去を回避され、いわゆる「ナチュラル」制御性T細胞（T_{Reg}）細胞に変換されることがある。これらのナチュラルT_{Reg}細胞は、末梢に運ばれ、潜在的な自己免疫応答を制御するために役立つ。

【0006】

寛容の第2の形態は、末梢で発生する。この場合、活性化されたT細胞は、IL-10、TGF-βおよびCCL19のような特定の免疫抑制サイトカインおよびケモカインの作用を通して「適応性」T_{Reg}表現型に変換される。これらの「適応性」T_{Reg}細胞についての可能な役割は、侵入病原体の好結果のクリアランスに引き続く免疫応答の減衰、アレルギー反応により引き起こされる過度な炎症の制御、低レベル感染もしくは慢性感染により引き起こされる過度な炎症の制御、または有益な共生細菌を標的とする炎症応答の場合による制御を含む。

【0007】

天然に生じるT_{Reg}（ナチュラルT_{Reg}および適応性T_{Reg}の両方を含む）は、末梢における免疫調節の重要な構成要素である。例えば、ナチュラルT_{Reg}のそのTCRを通じた活性化の際に、ナチュラルT_{Reg}は、免疫調節サイトカインおよびケモカインを発現する。活性化されたナチュラルT_{Reg}は、接触依存性および非依存性のメカニズムを通して近くのエフェクターT細胞を抑制することがある。さらに、限定されるものではないが、IL-10およびTGF-βを含む、細胞により放出されたサイトカインは、抗原特異的適応性T_{Reg}の誘導が可能である。広範囲な努力にもかかわらず、ナチュラルT_{Reg}の抗原特異性、およびさらに重要なことに、臨床的に有意な体積で循環するナチュラルT_{Reg}の抗原特異性は、幾つかの例外を除いて未だに不明である。

【0008】

レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ（「レトロインベルソTレギトープ」）を含む制御性T細胞エピトープ（「Tレギトープ」）、このようなレトロインベルソTレギトープを含む組成物、およびその調製および使用に関する方法の継続的な設計および同定が、この分野で必要とされている。

【0009】

概要

本開示の目的は、新規の、治療性レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物、ならびに例えば体内の免疫応答を抑制するため、またはより具体的には医学的症状を処置するために治療薬を投与することにより引き起こされる体内の免疫応答を抑制するためのその使用を提供することである。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド（このポリペプチドは、本明細書では、「T_{Reg}活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ」、「レトロインベルソTレギトープ」、または「レトロインベルソ制御性T細胞エピトープポリペプチド」と言われてよい）、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除いて、D型アミノ酸配置である；本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチド；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルスまたは細胞；本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物、および例えば体内の免疫応答を抑制するためまたはより具体的には医学的症状を処置するために治療薬を投与することにより引き起こされる体内の免疫応答を抑制するためのその使用の1

10

20

30

40

50

つ以上を含む。

【0010】

本明細書に開示されたレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の使用を通して天然に生じるT_{Reg}（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む）の選択的係合および活性化は、不所望な免疫応答の存在により目立った任意の疾患または症状の処置のための手段として治療的価値がある。このような不所望な免疫応答の例は、次のようなものを含む：自己免疫疾患、例えば1型糖尿病、MS、狼瘡、RA；移植関連疾患、例えば移植片対宿主疾患（GVHD）および宿主対移植片疾患（HVGD）；アレルギー反応；生物製剤、例えばモノクローナル抗体の免疫拒絶；代替タンパク質を標的とした免疫応答の管理；治療性毒素、例えばボツリヌス毒素を標的とした免疫応答の管理；および急性または慢性を問わず感染症に対する免疫反応の管理。

10

【0011】

態様では、本開示は、天然に生じるT_{Reg}（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む）、および特別な態様では、末梢での外来および自己タンパク質に対する免疫応答を既に制御する細胞（既存のまたはナチュラルT_{Reg}）の機能を利用する。態様では、本開示は、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物を提供し、このような組成物は、例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するポリペプチド、ここで、本明細書に開示された配列番号1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除いて、D型アミノ酸配置である；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、または細胞；本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細書に開示された医薬組成物および調製物の1つ以上を有する。T_{Reg}活性化制御性T細胞エピトープは、以後、「a」または「the」「Tregitope」または「Tregitopes」と言われてよい。態様では、本開示のTレギトープ化合物または組成物は、特異的標的抗原と共有結合しているか、非共有結合しているか、または混合した形のいずれかであってよい。

20

30

【0012】

態様では、本開示は、配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる配列および／またはそれらの断片およびそれらの変異体を有するレトロインベルソポリペプチドに関する。「から本質的になる」の語句は、本開示によるレトロインベルソポリペプチドが、配列番号：1～29および42～107のいずれかによる配列またはそれらの変異体に加えて、レトロインベルソポリペプチドのいずれかの末端に存在しかつ／またはMHCリガンドとして機能するレトロインベルソの部分形成するのに必要でなくかつTレギトープとしての機能にとってレトロインベルソポリペプチドの活性を実質的に損なうことがないことを提供する側鎖に存在してよい付加的アミノ酸または残基を含むことを意味することを意図する。本開示のレトロインベルソポリペプチドは、単離され、合成されかつ／または組み換えられていてよく、グリコシル化、付加的化学基等のような転写後修飾を有してよい。態様では、レトロインベルソポリペプチドまたはポリペプチドは、中性（非荷電）または塩の形のいずれかであることができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでいてもよい。所定の態様では、レトロインベルソポリペプチドは、N末端アセチル基および／またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。

40

【0013】

態様では、本開示は、配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107の

50

ポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加
アミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチドに関し、ここで、配列番号：1～29お
よび42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、
グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。態様では、本開示は、配列番号：1～29お
よび42～107のアミノ酸配列を有する1つ以上のペプチドまたはポリペプチドを有す
るか、それらからなるか、またはそれらから本質的になるコアアミノ酸配列、ならびに場
合により、このコアアミノ酸配列のC末端および／またはN末端の1～12のアミノ酸の
延長部を有するレトロインベルソポリペプチドに関し、これらのフランキングアミノ酸の
全体数は、1～12、1～3、2～4、3～6、1～10、1～8、1～6、2～12、
2～10、2～8、2～6、3～12、3～10、3～8、3～6、4～12、4～10
、4～8、4～6、5～12、5～10、5～8、5～6、6～12、6～10、6～8
、7～12、7～10、7～8、8～12、8～10、9～12、9～10、または10
～12であり、このフランキングアミノ酸は、C末端およびN末端に任意の比率で分配さ
れていることができ（例えば、全てのフランキングアミノ酸は、一方の末端に付加されて
いることができるか、このアミノ酸は、両方の末端に等しくまたは任意の他の比率で付加
されていることができ）、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それ
らの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であ
る。態様では、本開示は、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列を有す
る1つ以上のペプチドまたはポリペプチドを有するか、それらからなるか、またはそれら
から本質的になるコア配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、場合
により、C末端および／またはN末端の1～12のアミノ酸の延長部を有するレトロイン
ベルソポリペプチドに関し、このフランキングアミノ酸の全体数は、1～12、1～3、
2～4、3～6、1～10、1～8、1～6、2～12、2～10、2～8、2～6、3
～12、3～10、3～8、3～6、4～12、4～10、4～8、4～6、5～12、
5～10、5～8、5～6、6～12、6～10、6～8、7～12、7～10、7～8
、8～12、8～10、9～12、9～10、または10～12であり、フランキングア
ミノ酸は、C末端およびN末端に任意の比率で分配されていることができ（例えば、全て
のフランキングアミノ酸は、一方の末端に付加されていることができるか、このアミノ酸
は、両方の末端に等しくまたは任意の他の比率で付加されていることができ）、配列番号
：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ
酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であるが、フランキングアミノ酸を有す
るポリペプチドは、前記フランキングアミノ酸を有しない前記レトロインベルソポリペ
チドコア配列と同じHLA分子に結合することが依然として可能である（すなわち、MH
C結合傾向を保存する）。態様では、フランキングアミノ酸を有する前記レトロインベル
ソポリペプチドは、前記フランキングアミノ酸を有しない前記レトロインベルソポリペ
チドコア配列と同じHLA分子に結合し（すなわち、MH C結合傾向を保存し）かつそれ
と同じTCR特異性を保存することが依然として可能である。態様では、フランキングア
ミノ酸を有する前記ポリペプチドは、前記フランキングアミノ酸を有しない前記ポリペ
チドコア配列と同じHLA分子と結合し（すなわち、MH C結合傾向を保存し）、かつ／
またはそれと同じTCR特異性を保存し、かつ／またはTレギトープ活性を保存すること
が依然として可能である。態様では、本明細書に記載された前記フランキングアミノ酸配
列は、MH C安定化領域として機能してよい。比較的長いペプチドの使用は、患者細胞に
よる内因性プロセッシングを可能にしてよく、より効率的な抗原提示およびT細胞応答の誘
導を引き起こしてよい。態様では、このペプチドまたはポリペプチドは、中性（非荷電）
または塩の形のいずれかであることができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化の
ような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。所定の態様では、Tレギトープは、n末
端アセチル基および／またはc末端アミノ基でキャップされていることができる。

【0014】

態様では、本開示は、配列番号：1～29および42～107のいずれか1つ（および
／またはそれらの断片）に少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%の

10

20

30

40

50

相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドに関し、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。態様では、前記相同ポリペプチドは、依然として、同じHLA分子と結合し（すなわちMHC結合傾向を保存し）、かつ／または同じTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存することが可能である。

【0015】

態様では、本開示は、付加的ペプチドまたはポリペプチドに連結された、融合された、または互いに接合された（例えば、フレーム内で融合された、化学的に連結された、または他の方法で結合された）本開示のレトロインベルソポリペプチドの1つ以上を有するコンカテマーポリペプチドまたはペプチド（例えば、限定されるものではないが、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列（および／またはそれらの断片またはそれらの変異体）を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になり、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）に関する。このような付加的ペプチドまたはポリペプチドは、本開示のポリペプチドまたはペプチド（例えば本開示の1つ以上のレトロインベルソポリペプチド）の1つ以上であってよい、または関心のある付加的ペプチドまたはポリペプチドであってよい。態様では、コンカテマーペプチドは、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上の本開示のペプチドまたはポリペプチドから構成されている。別の態様では、コンカテマーペプチドまたはポリペプチドは、1000以上、1000以下、900以下、500以下、100以下、75以下、50以下、40以下、30以下、20以下、または10以下のペプチドエピトープを含む。さらに別の実施形態では、コンカテマーペプチドは、3～100、5～100、10～100、15～100、20～100、25～100、30～100、35～100、40～100、45～100、50～100、55～100、60～100、65～100、70～100、75～100、80～100、90～100、5～50、10～50、15～50、20～50、25～50、30～50、35～50、40～50、45～50、100～150、100～200、100～300、100～400、100～500、50～500、50～800、50～1,000、または100～1,000の、連結された、融合された、または互いに接合された本開示のペプチドまたはポリペプチドを有する。コンカテマーポリペプチドの各々のペプチドまたはポリペプチドは、場合により、それらのN末端および／またはC末端に隣接する、場合により切断感受性部位であってもよい1つ以上のリンカーを有してよい。このようなコンカテマーペプチドにおいて、ペプチドエピトープの2つ以上は、その間に切断感受性部位を有してよい。あるいは、ペプチドエピトープの2つ以上は、互いに直接または切断感受性部位ではないリンカーを介して接続されていてよい。上述のコンカテマーペプチドまたはポリペプチドの態様では、コンカテマーペプチドまたはポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられてよい。態様では、コンカテマーペプチドまたはポリペプチドは、中性（非荷電）または塩の形で存在することができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。所定の態様では、コンカテマーポリペプチドは、N末端アセチル基および／またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。

【0016】

態様では、本開示の1つ以上のレトロインベルソポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になり、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸

を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるレトロインベルソポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）は、異種ポリペプチドに接合されるか、それと連結され（例えば、フレーム内に融合される、化学的に連結される、または他の方法で結合される）、かつ／またはその中に挿入されていてよい。態様では、本開示の1つ以上のペプチドまたはポリペプチドは、全体として異種ポリペプチドと接合されるか、それと連結され（例えば、フレーム内に融合される、化学的に連結される、または他の方法で結合される）、かつ／またはその中に挿入されていてよいが、これは、異種ポリペプチドのフランキングアミノ酸と一緒に、接合された、連結された（例えば、フレーム内に融合された、化学的に連結された、または他の方法で結合された）、かつ／または挿入されたアミノ酸配列から構成されていてよい。態様では、本開示は、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有する配列および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有する（態様では、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）ポリペプチドに関し、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、配列番号：1～29および42～107の前記の1つ以上は、天然でポリペプチド中に含まれず、かつ／または配列番号：1～29および42～107の前記の1つ以上は、その天然の位置でポリペプチド内に配置されていない。

10

20

【0017】

上述ポリペプチドの態様では、ポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい。態様では、このペプチドまたはポリペプチドは、中性（非荷電）または塩の形のいずれかであることができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。上述のポリペプチドの態様では、ポリペプチドは「エンドキャップ」されていることができ、これは、本明細書で使用される場合、キャップを形成するように末端での化学基の取り付けにより、N末端および／またはC末端で修飾されたペプチドを指す。ペプチドエンドキャップ修飾のために適した基の例は、例えば、Green et al., 「Protective Groups in Organic Chemistry」, (Wiley, 2nd ed. 1991)およびHarrison et al., 「Compendium of Synthetic Organic Methods」, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996)に見ることができ、これらは、参照により全体として本明細書に組み込まれる。態様では、ペプチドは、N末端でのアセチル化またはC末端でのアミド化またはN末端でのアセチル化とC末端でのアミド化の両方によりエンドキャップされていることができる。

30

【0018】

態様では、本開示は、本開示の1つ以上のレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、またはコンカテマーペプチドを有するキメラまたは融合ポリペプチド組成物（これは態様では、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）に関する。態様では、本開示のキメラまたは融合ポリペプチド組成物は、異種ポリペプチドと接合されたか、これらと連結された（例えば、フレーム内で融合された、化学的に連結された、または他の方法で結合された）、かつ／またはこの中に挿入された、本開示の1つ以上のレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、またはコンカテマーペプチドを有する。態様では、本開示の1つ以上のレトロインベルソポリペプチドは、異種ポリペプチド中に挿入されていてよく、異種ポリペプチドのC末端に（当分野で公知であるリンカーを使用するかまたは使用せずに）付加されていてよく、かつ／または異種ポリペプチドのN末端に（当分野で公知であるリンカーを使用してまたは使用せずに）付加されていてよい。上記キメラまたは融合ポリペプチド組成物の態様では、本開示の1つ以上のレトロインベルソポリペプチドは、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる配列、および／またはそれらの断片およ

40

50

びそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチド（態様では、ポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）のN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有し、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。キメラまたは融合ポリペプチド組成物の態様では、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチド（態様では、ポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）のN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸は、全体として異種ポリペプチドと接合されたか、それと連結され（例えば、フレーム内で融合された、化学的に連結された、または他の方法で結合された）、かつ／またはその中に挿入されていてよいが、これは、異種ポリペプチドのフランキングアミノ酸と一緒に、接合された、連結された（例えば、フレーム内で融合された、化学的に連結された、または他の方法で結合された）、かつ／または挿入されたアミノ酸配列から構成されていてよく、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。態様では、本開示のキメラまたは融合ポリペプチド組成物は、ポリペプチドを含み、前記ポリペプチドは、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有する配列および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチド（態様では、ポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）のN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有し、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、配列番号：1～29および42～107の前記1つ以上は、天然ではポリペプチド内に含まれていない。態様では、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチド（態様では、ポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）のN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸は、ポリペプチドに接合されているか、それに連結されている（例えば、フレーム内で融合されている、化学的に連結されている、または他の方法で結合されている）、かつ／またはその中に挿入されていることができ、ここで、本開示の配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。本開示のキメラまたは融合ポリペプチド組成物の態様では、異種ポリペプチドまたはポリペプチドは、生物学的活性分子を有する。態様では、生物学的活性分子は、免疫原性分子、T細胞エпитープ、ウイルスタンパク質、および細菌タンパク質からなる群から選択される。態様では、本開示のTレギトープの1つ以上は、小分子、薬物、または薬物断片に接合されるかまたは連結され（例えば、フレーム内に融合され、化学的に連結され、または他の方法で結合され）ていることができる。上述のキメラまたは融合ポリペプチド組成物の態様では、キメラまたは融合ポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい。態様では、このキメラまたは融合ポリペプチドは、中性（非荷電）または塩の形のいずれかであることができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。

【0019】

態様では、本開示は、態様では、単離され、合成され、または組み換えられていてよい、本明細書に開示された1つ以上のレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、および／またはキメラもしくは融合ポリペプチドをコードする核酸（例えば、DNA、例えばcDNA、またはRNA、例えばmRNA）に関する。核酸の態様では、1つ以上のレトロインベルソポリペプチド、ポリペプチド、またはキメラもしくは融

10

20

30

40

50

合ポリペプチド組成物は、本明細書に開示された配列番号：１～２９および４２～１０７の１つ以上を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：１～２９および４２～１０７のポリペプチドのＮ末端および／またはＣ末端に任意の比率で分配された１～１２の付加的アミノ酸を有し、ここで、配列番号：１～２９および４２～１０７（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、Ｄ型アミノ酸配置である。態様では、本開示は、本明細書に記載された核酸を有する発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、または細胞に関する。態様では、本開示は、記載されたベクターを有する細胞またはワクチンに関する。態様では、本開示は、本開示のベクターを有する細胞に関する。

10

【００２０】

態様では、本開示は、本明細書に開示されたレトロインベルソＴレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含めた本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞の１つ以上）および製剤学的に許容可能な担体、付形剤、および／またはアジュバントを有する医薬組成物または調製物に関する。別の態様は、医薬組成物に関し、この医薬組成物は、本明細書に開示された１つ以上のレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、および／またはキメラもしくは融合ポリペプチドをコードする１つ以上の核酸、および製剤学的に許容可能な担体、付形剤、および／またはアジュバントを有する。態様では、前記レトロインベルソペプチドまたはポリペプチドをコードする１つ以上の核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはｍＲＮＡである。上述の医薬組成物の態様では、この組成物は、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、または少なくとも１０００の、これらの間の全ての値または範囲を含めた、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、および／またはコンカテマーペプチドを有する。

20

30

【００２１】

態様では、本開示は、被験体に治療的有効量の本開示のレトロインベルソＴレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、またはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含めた、本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の１つ以上）を投与することによる、制御性Ｔ細胞（態様では、ナチュラルＴ_{Reg}および／または適応性Ｔ_{Reg}を含めた天然に生じるＴ_{Reg}）の刺激、誘導、および／または増殖が必要な被験体内で制御性Ｔ細胞を刺激する、誘導する、かつ／または増殖させる方法および／または免疫応答の抑制が必要な被験体内で免疫応答を抑制する方法に関する。態様では、被験体はヒトである。

40

【００２２】

態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソＴレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロイン

50

ペルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含めた、本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上）を投与することを有する、医学的症状の治療または予防が必要な被験体内で医学的症状を治療または予防する方法に関する。態様では、医学的症状は、アレルギー、自己免疫疾患、移植関連障害、移植片対宿主疾患、血液凝固障害、酵素もしくはタンパク質欠損障害、止血障害、癌、不妊症；およびウイルス、細菌もしくは寄生虫感染症からなる群から選択される。他の態様では、医学的症状は、血友病A、B、またはCである。態様では、被験体はヒトである。

【0023】

態様では、本開示は、被験体に治療的有効量の本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、またはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含めた、本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上）を投与することによる、免疫応答の抑制が必要な被験体内で免疫応答を抑制するために、制御性T細胞（例えば、天然に生じるT_{Reg}（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含める））を刺激する、誘導する、かつ／または増殖させる方法に関する。態様では、免疫応答は、少なくとも1つの治療性タンパク質による1つ以上の治療性処置、ワクチンによる処置、または少なくとも1つの抗原による処置の結果である。別の態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の投与が、1つ以上の抗原提示細胞を制御性表現型にシフトさせ、1つ以上の樹状細胞を制御性表現型にシフトさせ、樹状細胞または他の抗原提示細胞内でのCD11cおよびHLA-DR発現を低減する。

【0024】

態様では、本開示は、（a）被験体から生物学的サンプルを準備するステップ；および（b）生物学的サンプルから制御性T細胞を単離するステップ；（c）増殖した制御性T細胞組成物を得るためにT制御性細胞が数を増やす条件下で、単離された制御性T細胞を本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、またはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含む、本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上）の有効量と接触させ、それにより生物学的サンプル中の制御性T細胞を増殖させるステップ、およびさらに、（d）処置が必要な患者に、サンプルを戻すステップを有する、制御性T細胞の集団を増殖させる方法に関する。

【0025】

態様では、本開示は、（a）被験体から生物学的サンプルを準備するステップ（b）生物学的サンプルから制御性T細胞を単離するステップ；（c）1つ以上の生物学的機能を変更するためにT制御性細胞を刺激する条件下で、単離された制御性T細胞を本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含めた、本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上）の有効量と接触させ、それにより生物学的サンプル中の制御性T

10

20

30

40

50

細胞を刺激するステップ；およびさらに、（d）処置が必要な患者に細胞を戻すステップを有する、生物学的サンプル中の制御性T細胞を刺激する方法に関する。

【0026】

態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含めた、本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上）の治療的有効量を投与するステップを有する、被験体内の免疫応答を抑圧／抑制する方法に関し、ここで、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物が免疫応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、先天的免疫応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、適応性免疫応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、エフェクターT細胞応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、メモリーT細胞応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、ヘルパーT細胞応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、B細胞応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、n k T（ナチュラルキラーT細胞）応答を抑圧／抑制する。別の態様では、本開示のTレギトープ化合物または組成物の投与が、1つ以上の抗原提示細胞を制御性表現型にシフトさせ、1つ以上の樹状細胞を制御性表現型にシフトさせ、樹状細胞または他の抗原提示細胞内でのCD11cおよびHLA-DR発現を低減する。

10

20

【0027】

態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、またはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含めた、本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上）の治療的有効量を投与することにより、被験体内の免疫応答、特に抗原特異的免疫応答を抑制する方法に関し、ここで、前記レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物が、天然に生じるT_{Reg}（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む、かつ態様では、CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺制御性T細胞を含む）を活性化するかまたはCD4⁺T細胞の活性化、CD4⁺および／またはCD8⁺T細胞の増殖を抑制する、かつ／またはB細胞またはn k T細胞の活性化または増殖を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、特異的標的抗原と共有結合しているか、非共有結合しているか、または混合した形のいずれかであってよい。態様では、特異的標的抗原と共有結合しているか、非共有結合しているか、または混合した形である本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の投与は、標的抗原に対する免疫応答を減少させる結果となる。

30

40

【0028】

態様では、標的抗原は、自己タンパク質またはタンパク質断片であってよい。態様では、標的抗原は、アレルゲンであってよい。態様では、標的抗原は、同種異系タンパク質またはタンパク質断片であってよい。態様では、標的抗原は、生物製剤またはその断片であってよい。態様では、抑制効果は、ナチュラルT_{Reg}により媒介される。態様では、抑制効果は、適応性T_{Reg}によって媒介される。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチ

50

ド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、またはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含めた、本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上）中に含まれる1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、エフェクターT細胞応答を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、先天性免疫応答を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、適応性免疫応答を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、ヘルパーT細胞応答を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、メモリーT細胞応答を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、B細胞応答を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、n k T細胞応答を抑制する。

10

【0029】

態様では、本開示は、医学的症状を予防または治療するための、特に、被験体内の免疫応答を抑制するためのキットに関し、ここで、キットは、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチドまたはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；本明細書に開示されたレトロインベルソペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、またはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含めた、本明細書に開示された核酸；本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、細胞；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上）を有する。態様では、キットは、抗原またはアレルゲンまたは治療薬、例えば代替タンパク質またはペプチドの有効量をさらに有してよい。

20

【0030】

さらに、本開示は、免疫原性を低減するかつ／またはポリペプチドまたはサプリメント、（またはその断片）が治療性タンパク質として機能する場合に特に有用であってよいポリペプチドの寛容原性を増大する方法に関する。態様では、前記方法は、本開示の1つ以上のレトロインベルソポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になり、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になるレトロインベルソポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を前記ポリペプチド中に挿入するステップを有する。態様では、前記ポリペプチド中に挿入された1つ以上のレトロインベルソポリペプチドは、前記ポリペプチドに対する抗原特異的免疫応答を抑制することができる。態様では、前記1つ以上のレトロインベルソポリペプチドは、前記ポリペプチドに融合されるかまたはその内部に挿入されていてよい（例えば、限定されるものではないが、部位特異的突然変異誘発または他の組換え技術）。態様では、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドの前記ポリペプチド中への前記挿入は、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドのアミノ酸の幾つかまたは全ての挿入およびレトロインベルソアミノ酸の挿入部位での1つ以上のアミノ酸の除去を含む。態様では、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドの前記ポリペプチド中への前記挿入は、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドを含むための前記ポリペプチドの配列の突然変異を有する（例えば、限定されるもので

30

40

50

はないが、部位特異的突然変異誘発または他の組換え技術による1つ以上の点突然変異の前記ポリペプチドまたはその断片内への導入)。態様では、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドの前記ポリペプチド中への前記挿入は、前記ポリペプチドの以前の免疫原性が低下し、新たな配列の寛容原性が向上するように1つ以上のレトロインベルソ制御性T細胞エピトープ配列を導入することになる。態様では、レトロインベルソアミノ酸の挿入部位での前記付加された1つ以上のアミノ酸の数は、前記ポリペプチドの配列から欠失したアミノ酸の数に対応する必要はない。態様では、1つ以上の制御性T細胞エピトープの治療性タンパク質または代替タンパク質／サプリメント（またはその断片）中への前記挿入は、治療性タンパク質または代替タンパク質／サプリメント（またはその断片）の免疫原性を低減する結果となる。

10

【図面の簡単な説明】

【0031】

本開示は、以下の図面を参照してより良好に理解することができる。

【図1】無差別のインフルエンザエピトープのEpiBarおよびEpiMatrix分析を含む免疫原性インフルエンザHAペプチドの例を示す図である。

【図2A】開示された破傷風トキソイド（TT）アッセイにおいて高度に活性化された制御性T細胞およびエフェクターCD4+T細胞のために使用されるゲーティング戦略を示す図である。

【図2B】開示された破傷風トキソイド（TT）アッセイにおいて高度に活性化された制御性T細胞およびエフェクターCD4+T細胞のために使用されるゲーティング戦略を示す図である。

20

【図2C】開示された破傷風トキソイド（TT）アッセイにおいて高度に活性化された制御性T細胞およびエフェクターCD4+T細胞のために使用されるゲーティング戦略を示す図である。

【図3】HLA DRB1 *0101、*0301、*0401、*0401、*0701、*1101、*1301および*1501について2つのペプチドとそのそれぞれのレトロインベルソ対応部との間の結合における比較を示す図である。

【図4】ラベリングおよび標識付け処理についてのタイムライン、ならびに破傷風トキソイドに対する応答を評価するため、引き続くフローサイトメトリーにおいてゲーティングするための特性マーカーと共に、TTBSA（破傷風トキソイドバイスタンダーアッセイ）についてのアウトラインを示す図である。

30

【図5】年齢、性別およびそのHLAハプロタイプについてのその2つの対立遺伝子を含むPBMCドナーの背景を示す図である。

【図6】TT暴露後のCD4+細胞に関する増加するTレギトープ投与量の効果を示す図である。

【図7A】CD4+T細胞増殖に関するTレギトープ（配列番号：114）とそのレトロインベルソ対応部（配列番号：16）との間の比較を示す図である。

【図7B】CD4+T細胞増殖に関するTレギトープ（配列番号：114）とそのレトロインベルソ対応部（配列番号：16）との間の比較を示す図である。

【図8A】CD4+T細胞増殖に関するTレギトープ（配列番号：115）とそのレトロインベルソ対応部（配列番号：100）との間の比較を示す図である。

40

【図8B】CD4+T細胞増殖に関するTレギトープ（配列番号：115）とそのレトロインベルソ対応部（配列番号：100）との間の比較を示す図である。

【0032】

図1は、無差別のインフルエンザエピトープのEpiBarおよびEpiMatrix分析を含む免疫原性インフルエンザHAペプチドの例を示す。このインフルエンザHAペプチドは、EpiMatrixで8つの全ての対立遺伝子について極めて高いスコアを付け、18のクラスタースコアを有する。10のクラスタースコアが、有意であると見なされる。帯状のEpiBarパターンは、無差別のエピトープの特徴を示す。結果は、PRYVKQNTL（配列番号：35）、RYVKQNTLK（配列番号：36）、YVKQ

50

N T L K L（配列番号 37）、V K Q N T L K L A（配列番号：38）および K Q N T L K L A T（配列番号：39）について示す。Zスコアは、所与の H L A 対立遺伝子に結合する 9 量体フレームの能力を示す。上位 5 % の中の全てのスコアは、「hits（ヒット）」と見なされるが、10 % 未満の非ヒット（non hits）（*）は、簡素化のために図 1 では隠されている。

【0033】

図 2 A～C は、開示された破傷風トキソイド（T T）アッセイにおいて高度に活性化された制御性 T 細胞およびエフェクター C D 4 + T 細胞のために使用されるゲーティング戦略を示す。図 2 A に示すように、細胞をまず、凝集体および死細胞を除去するためにゲーティングし、生細胞を、C D 4 + T 細胞についてゲーティングし、引き続く全ての分析は、この集団に関して行う。次いで、C D 4 + T 細胞を、高められた C D 2 5、F o x P 3、および低い C F S E（増殖）についてゲーティングする（図 2 B）。図 2 B は、T T を添加しない代表的アッセイ（左側）と、0.5 μ g / m l の T T を用いた代表的アッセイ（右側）の予測結果を示す。図 2 C は、このようなアッセイの代表的予測結果を示し、増殖および活性化 C D 4 + T 細胞集団が、高度に相関していると予想されることを示す。

10

【0034】

図 3 は、H L A D R B 1 * 0 1 0 1、* 0 3 0 1、* 0 4 0 1、* 0 4 0 1、* 0 7 0 1、* 1 1 0 1、* 1 3 0 1 および * 1 5 0 1 について 2 つのペプチドとそのそれぞれのレトロインベルソ対応部との間の結合における比較を示す。得られた I C 5 0 値は、レトロインベルソペプチド（配列番号：16 および 100）が、その L 型アミノ酸対応部（配列番号：114 および 115）に対して同等の親和性を有することを示す。

20

【0035】

図 4 は、ラベリングおよび標識付け処理についてのタイムライン、ならびに破傷風トキソイドに対する応答を評価するため、引き続くフローサイトメトリーにおいてゲーティングするための特性マーカーと共に、T T B S A（破傷風トキソイドバイスタンダーアッセイ）についてのアウトラインを示す。

【0036】

図 5 は、年齢、性別およびその H L A ハプロタイプについてのその 2 つの対立遺伝子を含む 4 人の P B M C ドナーの背景を示す。

【0037】

図 6 は、T T 暴露後の C D 4 + 細胞に関する増加する T レギトープ投与量の効果を示す。T レギトープ投与量が増大するにつれて、C D 4 + 細胞増殖に対する T T の効果は減少する。

30

【0038】

図 7 A～7 B は、C D 4 + T 細胞増殖に関する T レギトープ（配列番号：114）とそのレトロインベルソ対応部（配列番号：16）との間の比較を示す。図 7 A は、生データ比較を示す。図 7 B は、T T だけで処理した細胞における 100 % 活性化に対する標準化との比較を示す。

【0039】

図 8 A～8 B は、C D 4 + T 細胞増殖に関する T レギトープ（配列番号：115）とそのレトロインベルソ対応部（配列番号：100）との間の比較を示す。図 8 A は、生データ比較を示す。図 8 B は、T T だけで処理した細胞における 100 % 活性化に対する標準化との比較を示す。

40

【0040】

発明の詳細な説明

全般

適応免疫カスケードは、可溶性タンパク質抗原が、抗原提示細胞（A P C）に取り込まれ、クラス II 抗原提示経路を介して進行する場合に始まる。クラス II 提示経路中のタンパク質抗原は、小胞体中に見られる多様なプロテアーゼにより分解される。生じるタンパク質断片の幾つかは、クラス II M H C 分子と結合する。ペプチド負荷 M H C 分子は

50

、細胞表面に輸送され、そこでこの分子はCD4+T細胞により調べられる。MHC分子と結合し、APCと循環T細胞との間の細胞間の相互作用を媒介することができるペプチド断片は、T細胞エピトープと言われる。CD4+T細胞によるこれらのペプチド-MHC複合体の認識は、応答するT細胞の表現型および局所的サイトカイン／ケモカイン環境に基づいて、免疫活性化応答か免疫抑制応答のいずれかを引き起こすことができる。一般に、MHC／ペプチド複合体とTエフェクター細胞のT細胞受容体（TCR）との間の係合は、活性化を引き起こし、炎症誘発性サイトカイン、例えばIL-4、およびIFN- γ の引き続く分泌を引き起こす。一方で、ナチュラルT制御性細胞（T_{Reg}）の活性化は、とりわけ免疫抑制サイトカインIL-10およびTGF- β の発現を引き起こす（Shevach E, (2002), Nat Rev Immunol, 2(6):389-400）。これらのサイトカインは、近くのエフェクターT細胞に直接作用し、幾つかの場合では、アレルギーまたはアポトーシスを引き起こす。他の場合では、制御性サイトカインおよびケモカインは、エフェクターT細胞を、T制御性表現型に変換し、このプロセスを、本明細書では、「誘導性」または「適応性」の寛容という。MHC分子への結合が可能でありかつ循環する天然に生じるT_{Reg}（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む）の係合および／または活性化が可能であるT細胞エピトープは、「Tレギトープ」と言われる。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープは、多様なMHC対立遺伝子および多様なTCRに結合することが可能なエピトープであるT細胞エピトープクラスターである。

10

20

【0041】

初期の自己／非自己識別は、新生児発育間に、皮質および髄質上皮細胞が未成熟T細胞に特異的な自己タンパク質エピトープを発現する胸腺中で生じる。高親和性で自己抗原を認識するT細胞は除去されるが、中程度の親和性を有する自己反応性T細胞は、時には除去を回避し、いわゆるナチュラル制御性T細胞（T_{Reg}）細胞に変換することができる。これらのナチュラルT_{Reg}細胞は、末梢に運ばれ、潜在的な自己免疫応答を制御するために役立つ。ナチュラル制御性T細胞は、免疫制御および自己寛容の重要な構成要素である。

【0042】

自己寛容は、T細胞、B細胞、サイトカインおよび表面受容体の間の複雑な相互作用により制御される。T制御性免疫応答は、タンパク質抗原（自己または外来のいずれか）に対するTエフェクター免疫応答を相殺する。自己反応性Tエフェクター細胞の数または機能を増大させるか、またはT制御性細胞の数または機能を減少させることのいずれかによる自己反応性サイドの側へのバランスの傾きが、自己免疫として現れる。

30

【0043】

寛容の第2の形態は末梢で生じ、ここでは成熟T細胞は、通常ではバイスタンダーT制御性細胞により供給されるIL-10およびTGF- β の存在でそのT細胞受容体を介して活性化される際に「適応性」T_{Reg}表現型に変換される。これらの「適応性」T_{Reg}細胞についての可能な役割は、侵入病原体の好結果のクリアランスに引き続く免疫応答の減衰、アレルギー反応により引き起こされる過度な炎症の制御、低レベル感染もしくは慢性感染により引き起こされる過度な炎症の制御、または有益な共生細菌およびウイルスを標的とする炎症応答の場合による制御を含む。「適応性」T_{Reg}は、体細胞超変異を受けたヒト抗体を標的とする免疫応答の抑制において役割を果たしてもよい（Chaudhry A et al., (2011), Immunity, 34(4):566-78）。

40

【0044】

T_{Reg}細胞は、B細胞寛容でも役立つ。B細胞は、その細胞表面に単一の低親和性Fc受容体、Fc γ RIIBを発現する（Ravetch JV et al., (1986), Science, 234(4777):718-25）。この受容体は、その細胞質ドメイン内に免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ配列（ITIM）を含む。免疫複合体によるFc γ RIIBとB細胞受容体（BCR）の同時ライゲーションは、ITIMのチロシンリン酸化を引き起こすように作用し、イノシトールホスファターゼ、SHIPの動員を引き起こし、MAPキナーゼ

50

の活性化で干渉することによりBCRにより引き起こされる増殖を阻害し、細胞膜からのブルトン型チロシンキナーゼ (Btk) の解離により食作用をブロックし、細胞内へのカルシウム流入を阻害する。FcγRIIBは、ITIMとは無関係にアポトーシスを誘導することもできる。ICによるFcRIIBのホモ凝集の際に、Btkと細胞膜との会合が高められ、それによりアポトーシス応答が引き起こされる (Pearse R, et al., (1999), Immunity, 10(6):753-60)。FcγRIIBの発現は、極めて多様でかつサイトカイン依存性である。活性化されたTh2およびTreg細胞により発現されるIL-4およびIL-10は、相乗的に作用して、FcγRIIB発現を高めることが示されている (Joshi T et al., (2006), Mol Immunol., 43(7):839-50)、よって、体液性応答の抑制に役立つ。

10

【0045】

TレグトープまたはレトロインベルソTレグトープ特異的Treg細胞を利用して、不所望な免疫応答を抑制し、共伝達されたタンパク質に対する適合性Tregを誘導することも可能である。この発見は、移植、タンパク質治療、アレルギー、慢性感染症、自己免疫およびワクチン設計のための治療レジメンおよび抗原特異的療法の設計に対して影響を有する。本開示のレトロインベルソTレグトープ化合物または組成物 (例えば、本明細書に開示された配列番号: 1~29および42~107の1つ以上を有するか、これらからなるかまたはこれらから本質的になる配列 (および/またはそれらの断片およびそれらの変異体)、ならびに場合により、配列番号: 1~29および42~107のポリペプチドのN末端および/またはC末端に任意の比率で分配された1~12の付加のアミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド (本明細書では「Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ」、「レトロインベルソTレグトープ」、または「レトロインベルソ制御性T細胞エピトープポリペプチド」と言われてよい)、ここで、本明細書に開示された配列番号: 1~29および42~107 (および態様では、それらの場合による延長部) のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である; 本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチドおよびコンカテマーポリペプチド; 本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、または細胞; 本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物; および/または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上を含める) を含むTレグトープまたはレトロインベルソに関連する薬物、タンパク質、またはアレルゲンの投与は、エフェクター免疫応答を抑制することができる。本開示のレトロインベルソTレグトープ化合物および組成物を含むレトロインベルソTレグトープは、免疫系を寛容に向けて意図的に操作するために使用することができる。

20

30

【0046】

本開示のレトロインベルソTレグトープ化合物および組成物は、制御性T細胞の選択的係合および活性化において有用である。特定の天然に生じるTreg (態様では、ナチュラルTregおよび/または適応性Tregを含める) は、係合し、活性化し、かつ/または適合して、全身性および限定的な両方の疾患特異的な状況で不所望な免疫応答を抑制することができる。

【0047】

本開示のレトロインベルソTレグトープ化合物および組成物は、多様な不所望な免疫応答を抑制するために使用することができる。その最も簡単な形態では、本開示のレトロインベルソTレグトープ化合物および組成物の全身性の適用は、例えば、MSフレアアップ、アレルギー反応、移植反応、または感染の制御不能応答のような激しい自己免疫反応を制御するために有用な汎用免疫抑制剤として使用することができる。例えば限定されるものではないが、リウマチ性関節炎 (RA) に冒された関節に局所的に適用するより制御された適用では、本開示のレトロインベルソTレグトープ化合物および組成物は、局所的な自己免疫応答を抑制するために使用することができる。本開示のレトロインベルソTレグトープ化合物および組成物と特定の他のTセルエピトープとの融合、結合または混合により達成されてよい標的適用では、レトロインベルソTレグトープ化合物および組成物は、

40

50

免疫系のバランスをそのままに残して、融合された、結合された、または混合されたT細胞エпитープに対する高度に特異的な免疫応答を抑制することができる。例えば、インスリンのような自己免疫抗原、ブラジルナッツ抗原のようなアレルゲン、または抗体（これは、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE分子またはそれらの抗原特異的抗体断片（限定されるものではないが、Fab、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、単ドメイン抗体、閉鎖構造多重特異性抗体、ジスルフィド連結scFv、ダイアボディを含める）であることができる）のような抗原性タンパク質または代替酵素に融合した本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の輸送によって、免疫系は、例えば天然に生じるTreg（態様では、ナチュラルTregおよび／または適応性Tregを含める）を誘導しかつ／または応答するエフェクターT細胞の表現型を適応性制御性T細胞の表現型へ変換することにより、共輸送された抗原を「寛容」するように訓練することができる。

10

【0048】

態様では、有用であるために、本開示のレトロインベルソTレギトープは、真のT細胞エпитープ（すなわち、MHC分子とTCRとの両方に結合することが可能である）であるべきである。態様では、レトロインベルソTレギトープは、治療効果を有するための十分な大きさの制御性T細胞の既存の集団に関する。多様なMHC対立遺伝子および多様なTCRに結合することが可能なエпитープであるT細胞エпитープクラスターは、この後者の資格を満たすための鍵である。

【0049】

20

本開示の処置は、次の利点を提供する：

1. 本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物を用いた処置は、高度に抗原特異的である（例えば、レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物による処置は、例えば、対応する天然に生じるTreg集団（態様では、ナチュラルTregおよび／または適応性Tregを含める）を、高度に抗原特異的に、増殖させるかつ／または刺激することができる）；

2. 患者を長期間にわたり頻繁に高用量の抗体調製剤で処置する際に、現在の抗原特異的療法と比較した場合、効率的でかつ高価すぎない治療レジメンであり；かつ

3. 高用量療法による寛容の誘導が処置された患者において免疫寛容を誘導できない場合の第2の防衛ラインである。

30

【0050】

態様では、本開示は、自己免疫応答を経験している患者に安全に投与される本開示の治療性レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるかまたはこれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加のアミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド（これは、本明細書では、「Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エпитープ」、「レトロインベルソTレギトープ」、または「レトロインベルソ制御性T細胞エпитープポリペプチド」と言われてよい）、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除いて、本明細書に開示されたD型アミノ酸配置である；本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチド；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルスまたは細胞；本明細書に開示されたキメラまたは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上を含む）に関する。

40

【0051】

態様では、本開示は、以下のレトロインベルソTレギトープ（ここで、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）、それらの断片、それらの変異体、それらの変異体の断片の1つ以上を含むが、前記断

50

片および／または変異体は、MHC結合傾向および／またはTCR特異性および／または制御性T細胞刺激もしくは抑制活性を保存する、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物に関する：

HKSPVTVVSSLSYLGSSQLVAK（配列番号：1）；

HKSPVTVVSS（配列番号：2）；

KSPVTVVSS（配列番号：3）；

SPVTVVSSSL（配列番号：4）；

PVTVVSSSL（配列番号：5）；

VTVVSSLSY（配列番号：6）；

TVVSSLSYL（配列番号：7）；

VVSSLSYLG（配列番号：8）；

VSSLSYLG（配列番号：9）；

SSLSYLGSS（配列番号：10）；

LSYLGSSQL（配列番号：11）；

LSYLGSSQL（配列番号：12）；

SYLGSSQLV（配列番号：13）；

YLGSSQLVA（配列番号：14）；

LGSSQLVAK（配列番号：15）；

DQHLVTLVSVVTTYTSNYQEE（配列番号：16）；

DQHLVTLVSS（配列番号：17）；

QHLVTLVSV（配列番号：18）；

HLVTLVSVV（配列番号：19）；

LVTLVSVVT（配列番号：20）；

VTLVSVVTY（配列番号：21）；

TLVSVVTYT（配列番号：22）；

LVSVVTYTTS（配列番号：23）；

VSVVTYTTSN（配列番号：24）；

SVVTYTTSNY（配列番号：25）；

SVVTYTTSNY（配列番号：26）；

VVTYTTSNYQ（配列番号：27）；

VTYTTSNYQE（配列番号：28）；

TYTTSNYQEE（配列番号：29）；

FTFGSAACSLRLSGGPQVLGG（配列番号：42）；

FTFGSAACSL（配列番号：43）；

TFGSAACSL（配列番号：44）；

FGSAACSLR（配列番号：45）；

GSAACSLRL（配列番号：46）；

SAACSLRLS（配列番号：47）；

AACSLRLSG（配列番号：48）；

ACSLRLSGG（配列番号：49）；

CSLRLSGGP（配列番号：50）；

SLRLSGGPQ（配列番号：51）；

RLRLSGGPQV（配列番号：52）；

RLSGGPQVL（配列番号：53）；

LSGGPQVLG（配列番号：54）；

SGGPQVLGG（配列番号：55）；

VWELGKGPAQRVWHM（配列番号：56）；

VWELGKGPA（配列番号：57）；

WELGKGPAQ（配列番号：58）；

ELGKGPAQR（配列番号：59）；

10

20

30

40

50

L G K G P A Q R V (配列番号: 60) ;
 G K G P A Q R V W (配列番号: 61) ;
 K G P A Q R V W H (配列番号: 62) ;
 G P A Q R V W H M (配列番号: 63) ;
 D E P Q L S S I T L T F D T G (配列番号: 64) ;
 D E P Q L S S I T (配列番号: 65) ;
 E P Q L S S I T L (配列番号: 66) ;
 P Q L S S I T L T (配列番号: 67) ;
 Q L S S I T L T F (配列番号: 68) ;
 L S S I T L T F D (配列番号: 69) ;
 S S I T L T F D T (配列番号: 70) ;
 S I T L T F D T G (配列番号: 71) ;
 H K A T D E A R L S N M Q L Y L T K (配列番号: 72) ;
 H K A T D E A R L (配列番号: 73) ;
 K A T D E A R L S (配列番号: 74) ;
 A T D E A R L S N (配列番号: 75) ;
 T D E A R L S N M (配列番号: 76) ;
 D E A R L S N M Q (配列番号: 77) ;
 E A R L S N M Q L (配列番号: 78) ;
 A R L S N M Q L Y (配列番号: 79) ;
 R L S N M Q L Y L (配列番号: 80) ;
 L S N M Q L Y L T (配列番号: 81) ;
 S N M Q L Y L T K (配列番号: 82) ;
 S N G S Q L A N D V K W Q V K A E R P Y F N N L (配列番号: 83) ;
 S N G S Q L A N D (配列番号: 84) ;
 N G S Q L A N D V (配列番号: 85) ;
 G S Q L A N D V K (配列番号: 86) ;
 S Q L A N D V K W (配列番号: 87) ;
 Q L A N D V K W Q (配列番号: 88) ;
 L A N D V K W Q V (配列番号: 89) ;
 A N D V K W Q V K (配列番号: 90) ;
 N D V K W Q V K A (配列番号: 91) ;
 D V K W Q V K A E (配列番号: 92) ;
 V K W Q V K A E R (配列番号: 93) ;
 K W Q V K A E R P (配列番号: 94) ;
 W Q V K A E R P Y (配列番号: 95) ;
 Q V K A E R P Y F (配列番号: 96) ;
 V K A E R P Y F N (配列番号: 97) ;
 K A E R P Y F N N (配列番号: 98) ;
 A E R P Y F N N L (配列番号: 99) ;
 K G Y I F S H G T F H I T L I (配列番号: 100) ;
 K G Y I F S H G T (配列番号: 101) ;
 G Y I F S H G T F (配列番号: 102) ;
 Y I F S H G T F H (配列番号: 103) ;
 I F S H G T F H I (配列番号: 104) ;
 F S H G T F H I T (配列番号: 105) ;
 S H G T F H I T L (配列番号: 106) ; および
 H G T F H I T L I (配列番号: 107) 。

【0052】

別の態様では、本開示は、本明細書に開示された配列番号: 108 ~ 115 に記載され

10

20

30

40

50

た配列およびそれらの 9 量体、10 量体および／または断片および変異体、および場合により、配列番号 108～115 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を含む、本明細書に記載されたポリペプチドについての非レトロインベルソフォーマットをさらに含むことが認識される。他の態様では、本明細書に開示されたレトロインベルソペプチドは、本明細書に開示された配列番号：108～115 の任意の 1 つ以上およびそれらの 9 量体、10 量体および／または断片および変異体、および場合により、配列番号：108～115 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸と任意に組み合わせて使用することができる。他の態様では、本明細書で開示された配列番号：108～115 の任意の 1 つ以上およびそれらの 9 量体、10 量体および／または断片および変異体、および場合により、配列番号：108～115 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸は、配列番号：1～29 および 42～115 の任意の 1 つ以上を有するコンカテマー中に組み込まれていることができる。

10

20

30

40

50

【0053】

定義

本発明の理解をさらに容易にするために、幾つかの用語および語句を以下に定義する：他に定義がない限り、本明細書で使用される全ての用語（技術用語および科学用語を含む）は、本開示が属する分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。一般に使用される辞書において定義されているような用語は、関連する技術および本開示の文脈におけるその意味と一貫する意味を有するものと解釈されるべきであり、かつ本明細書に明確に定義されていない限り、理想化されたまたは過度に形式的な意味に解釈されるべきではないことがさらに理解される。

【0054】

本明細書で提供される範囲は、範囲内の値の全ての略記であると理解される。例えば、1～25 の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 からなる群から任意の数、数の組合せ、または部分範囲、ならびに、例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、および 1.9 のような、前述の整数の間に介在する全ての小数値を含むことが理解される。部分範囲に関しては、範囲のいずれかの端点から延びる「入れ子の部分範囲」が特に想定される。例えば、1～25 の例示的範囲の入れ子の部分範囲は、一方向で 1～5、1～10、1～15、および 1～20 を含んでよく、または反対方向で 25～20、25～15、25～10、および 25～5 を含んでよい。

【0055】

本明細書で使用される場合、「生物学的サンプル」の用語は、生物からの組織、細胞、または分泌物の任意のサンプルを指す。

【0056】

本明細書で使用される場合、「移植」の用語は、ある被験体からの「移植体」または「移植片」と言われる細胞、組織、または臓器を採取し、それまたはそれらを（通常では）異なる被験体に設置するプロセスを指す。移植体を提供する被験体を「ドナー」と言い、移植体を受ける被験体を「レシピエント」と言う。同じ種の 2 つの遺伝的に異なる被験体の間で移植された臓器または移植片は、「同種移植片」と言われる。異なる種の被験体の間で移植された移植片は、「異種移植片」と言われる。

【0057】

本明細書で使用される場合、「医学的症状」の用語は、限定されるものではないが、治療および／または予防が望ましい、1 つ以上の身体的および／または心理的症状として現れる任意の状態または疾患を含み、かつ以前におよび新たに同定された疾患または他の障害を含む。

【0058】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」の用語は、リンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、および上述の細胞または肝臓により産生された可溶性高分子（抗体、サイトカイン、および補体を含む）の協調作用を指し、これは、癌細胞、転移性腫瘍細胞、悪性黒色腫、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織を、または自己免疫または病理学的炎症の場合には、正常なヒト細胞または組織に対する選択的損傷、それらの破壊、または人体からのそれらの排除を引き起こす。態様では、免疫応答は、測定可能な細胞障害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答（例えば、免疫原性ポリペプチドを発現するウイルスに対する）または例えば抗体生産のような測定可能なＢ細胞応答（例えば、免疫原性ポリペプチドに対する）を含む。通常の技術者は、ペプチド、ポリペプチド、または関連する組成物に対する免疫応答が生成されるかどうかを決定するための多様なアッセイを知っている。多様なＢリンパ球およびＴリンパ球アッセイ、例えばＥＬＩＳＡ、細胞障害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）アッセイ、例えばクロム放出アッセイ、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を用いる増殖アッセイ、四量体アッセイ、およびサイトカイン産生アッセイは、周知である。Benjamini et al. (1991)を参照、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【００５９】

本明細書で使用される場合、本開示のレトロインベルソＴレギトープ化合物および組成物（例えば、レトロインベルソポリペプチド（本明細書では、本明細書に開示された配列番号：１～２９および４２～１０７の１つ以上を有するか、これらからなるかまたはこれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：１～２９および４２～１０７のポリペプチドのＮ末端および／またはＣ末端に任意の比率で分配された１～１２の付加的アミノ酸を有する「Ｔｒｅｇ活性化レトロインベルソ制御性Ｔ細胞エピトープ」、「レトロインベルソＴレギトープ」または「レトロインベルソ制御性Ｔ細胞エピトープポリペプチド」と言われてよい）、ここで、本明細書に開示された配列番号：１～２９および４２～１０７（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、Ｄ型アミノ酸配置である；本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチドおよびコンカテマーポリペプチド；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、または細胞；本明細書に開示されたキメラまたは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の１つ以上を含む）を含む組成物の「有効量」、「治療的有效量」等の用語は、所望の治療効果および／または予防効果を達成するために十分な量、例えば、治療している疾患に関連する症状の予防、またはその軽減を引き起こす量である。被験体に投与される本開示の組成物の量は、疾患の種類および重症度および個人の特性、例えば一般的健康状態、年齢、性別、体重および薬物に対する寛容に依存する。これは、疾患の程度、重症度および種類にも依存する。当業者は、これらの要因および他の要因に依存して適切な用量を決定することもできる。本発明の組成物は、互いに組み合わせるかまたは１つ以上の付加的治療性化合物と組み合わせ投与することもできる。

【００６０】

本明細書で使用される場合、「制御性Ｔ細胞」、「Ｔｒｅｇ」等の用語は、細胞間接触の誘導および制限的サイトカイン産生を含む多様な異なるメカニズムによる、ＣＤ４＋および／またはＣＤ８＋エフェクターＴ細胞（Ｔｅｆｆ）誘導、増殖、および／またはサイトカイン産生の抑制またはダウンレギュレーションを含む免疫エリクター機能を抑制するＴ細胞の部分集団を意味する。態様では、ＣＤ４＋Ｔｒｅｇは、限定されるものではないが、ＣＤ４、ＣＤ２５、およびＦｏｘＰ３を含む所定の細胞表面マーカーの存在により特徴付けられる。態様では、活性化の際に、ＣＤ４＋制御性Ｔ細胞は、限定されるものではないが、ＩＬ－１０および／またはＴＧＦβを含む免疫制御性サイトカインまたはケモカインを分泌する。ＣＤ４＋Ｔｒｅｇは、限定されるものではないが、グランザイムＢおよびパーフォリンを含むエフェクター分子の活性化の際の発現により特徴付けられる標的細胞の直接的殺傷により免疫抑制効果を発揮してもよい。態様では、ＣＤ８＋Ｔｒｅｇは、限定されるものではないが、ＣＤ８、ＣＤ２５、および活性化の際には、ＦｏｘＰ３を含

む所定の細胞表面マーカーの存在により特徴付けられる。態様では、活性化の際に、制御性CD8+T細胞は、限定されるものではないが、IFN γ 、IL-10、および／またはTGF β を含む免疫抑制サイトカインおよびケモカインを分泌する。態様では、CD8+Tregは、限定されるものではないが、グランザイムBおよびパーフォリンを含むエフェクター分子の活性化の際の発現により特徴付けられる、標的細胞の直接的殺傷により免疫抑制効果を発揮してもよい。

【0061】

本明細書で使用される場合、「T細胞エピトープ」の用語は、長さが7～30のアミノ酸であり、ヒト白血球抗体（HLA）分子と特異的に結合しかつ特異的T細胞受容体（TCR）と相互作用することが可能であるMHCリガンドまたはタンパク質決定基を意味する。本明細書で使用される場合、T細胞に係合することが知られているかまたは確定している（例えば、予測されている）T細胞エピトープとの文脈で、「係合する」、「係合」等の用語は、MHC分子（例えば、ヒト白血球抗原（HLA）分子）に結合する場合、T細胞エピトープは、T細胞のTCRと相互作用して、T細胞を活性化することが可能であることを意味する。一般に、T細胞エピトープは、線状であり、特異的な三次元の特性を示さない。T細胞エピトープは、変性溶媒の存在により影響を受けない。T細胞エピトープと相互作用する能力は、インシリコ法により予測することができる（De Groot AS et al., (1997), AIDS Res Hum Retroviruses, 13(7):539-41; Schafer JR et al., (1998), Vaccine, 16(19):1880-4; De Groot AS et al., (2001), Vaccine, 19(31):4385-95; De Groot AR et al., (2003), Vaccine, 21(27-30):4486-504、これらの全ては、参照により全体として本明細書に組み込まれる）。

【0062】

本明細書で使用される場合、「T細胞エピトープクラスター」の用語は、約4～約40のMHC結合モチーフを含むポリペプチドを指す。特別な実施形態では、T細胞エピトープクラスターは、約5～約35のMHC結合モチーフ、約8～約30のMHC結合モチーフ、約10～20のMHC結合モチーフを含む。

【0063】

「制御性T細胞エピトープ」（「Tレギトープ」）の用語は、寛容原性応答を引き起こし（Weber CA et al., (2009), Adv Drug Deliv, 61(11):965-76）、MHC分子との結合、および係合および／または循環する天然に生じるTreg（態様では、ナチュラルTregおよび／または適応性Tregを含む）を活性化することが可能である「T細胞エピトープ」を指す。態様では、活性化の際に、CD4+制御性T細胞は、限定されるものではないが、IL-10および／またはTGF- β および／またはTNF- α を含む免疫抑制サイトカインまたはケモカインを分泌する。CD4+Tregは、限定されるものではないが、グランザイムBおよびパーフォリンを含むエフェクター分子の活性化の際の発現により特徴付けられる、標的細胞の直接的殺傷により免疫抑制効果を発揮してもよい。態様では、活性化の際に、制御性CD8+T細胞は、限定されるものではないが、IFN γ 、IL-10、および／またはTGF β を含む免疫抑制サイトカインおよびケモカインを分泌する。態様では、CD8+Tregは、限定されるものではないが、グランザイムBおよび／またはパーフォリンを含むエフェクター分子の活性化の際の発現により特徴付けられる、標的細胞の直接的殺傷により免疫抑制効果を発揮してもよい。態様では、本開示のTレギトープは、多様なMHC対立遺伝子および多様なTCRに結合することが可能なエピトープであるT細胞エピトープクラスターである。本明細書で使用されるレトロインベルソポリペプチド（これは、本明細書では「Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ」、「レトロインベルソTレギトープ」、または「レトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド」と言われてよい）は、設計されたTレギトープに基づく反対の配列でD型アミノ酸から構成されたペプチドを意味し、延長される場合、親ペプチドと同じ側鎖トポロジーであるが、アミドペプチド結合は反転していることが想定される。

【0064】

本明細書で使用される場合、「免疫刺激性レトロインベルソ T 細胞エピトープポリペプチド」の用語は、免疫応答、例えば体液性の、T 細胞に基づく、または先天性の免疫応答を誘導することが可能であるレトロインベルソ T 細胞エピトープポリペプチドを指す。

【0065】

本明細書で使用される場合、「B 細胞エピトープ」の用語は、抗体に特異的に結合することが可能であるタンパク質決定基を意味する。B 細胞エピトープは、通常では、アミノ酸または糖側鎖のような分子の化学的に活性の表面基からなり、通常では、特異的三次元構造の特性、ならびに特異的電荷特性を有する。立体配座的および非立体配座的エピトープは、変性溶媒の存在で、前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないという点で区別される。

10

【0066】

本明細書で使用される場合の「被験体」の用語は、免疫応答が誘発される任意の生存している生物を指す。被験体の用語は、制限されるものではないが、ヒト、非ヒトの霊長類、例えばチンパンジーおよび他の類人猿およびサル種；家畜、例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ；家禽、例えばイヌおよびネコ；齧歯類、例えばマウス、ラットおよびモルモット等を含む実験動物等を含む。この用語は、特定の年齢または性別を示すものではない。よって、成熟したおよび新生の被験体、ならびに胎仔が、オスまたはメスを問わず、カバーされることを意図している。

【0067】

本明細書で使用される場合、「主要組織適合性複合体 (MHC)」、「MHC 分子」、「MHC タンパク質」または「HLA タンパク質」の用語は、意味として、特に、タンパク質抗原のタンパク質分解切断から生じるペプチドを結合し、潜在的 T 細胞エピトープを表し、それを細胞表面に運び、そこで特異的細胞、特に細胞障害性 T リンパ球または T ヘルパー細胞に提示することができるタンパク質であると理解される。ゲノム中の主要組織適合性複合体は、細胞表面に発現する遺伝子産物が、内因性および／または外来の抗原を結合および提示するため、ひいては免疫学的プロセスの制御のために重要である遺伝子領域を有する。主要組織適合性複合体は、異なるタンパク質をコードする 2 つの遺伝子群、つまり MHC クラス I の分子と MHC クラス II の分子とに分類される。2 つの MHC クラスの分子は、異なる抗原源に特化されている。MHC クラス I の分子は、内因的に合成された抗原、例えばウイルスタンパク質および腫瘍抗原を提示する。MHC クラス II の分子は、外来源に由来するタンパク質抗原、例えば細菌産物を提示する。2 つの MHC クラスの細胞生物学および発現パターンは、これらの異なる役割に適応する。クラス I の MHC 分子は、重鎖と軽鎖とからなり、約 8 ～ 11 のアミノ酸のペプチドと結合できるが、このペプチドが適切な結合モチーフを有する場合、通常では 9 または 10 のアミノ酸のペプチドに結合でき、細胞障害性 T リンパ球にこれを提示することができる。クラス I の MHC 分子により結合されたペプチドは、内因性タンパク質抗原に由来する。クラス I の MHC 分子の重鎖は、好ましくは HLA-A、HLA-B または HLA-C 単量体であり、軽鎖は、 β -2-ミクログロブリンである。クラス II の MHC 分子は、 α 鎖および β 鎖からなり、このペプチドが適切な結合モチーフを有する場合、約 12 ～ 25 のアミノ酸のペプチドと結合でき、T ヘルパー細胞にこれを提示することができる。クラス II の MHC 分子により結合されたペプチドは、通常では、細胞外の外来タンパク質抗原に由来する。 α 鎖および β 鎖は、特に、HLA-DR、HLA-DQ および HLA-DP 単量体である。

20

30

40

【0068】

本明細書で使用される場合、「MHC リガンド」の用語は、1 つ以上の特異的 MHC 対立遺伝子に結合することが可能であるポリペプチドを意味する。「HLA リガンド」の用語は、「MHC リガンド」の用語と交換可能である。表面に MHC / リガンド複合体を発現する細胞は、「抗原提示細胞」(APC)と言われる。同様に、本明細書で使用される場合、「MHC 結合ペプチド」の用語は、MHC クラス I および／または MHC クラス II 分子に結合するペプチドを指す。MHC クラス I / ペプチド複合体の場合に、結合する

50

ペプチドは、典型的には、8～10のアミノ酸長であるが、より長いペプチドまたはより短いペプチドも有効であってよい。MHCクラスII／ペプチド複合体の場合に、結合するペプチドは、典型的には10～25のアミノ酸長、特に13～18のアミノ酸長であるが、より長いペプチドおよびより短いペプチドも有効であってよい。

【0069】

本明細書で使用される場合、「T細胞受容体」または「TCR」の用語は、APCの表面に提示されるMHC／リガンド複合体の特別なレパートリーに係合することが可能であるT細胞により発現されたタンパク質複合体を指す。

【0070】

本明細書で使用される場合、「MHC結合モチーフ」の用語は、特別なMHC対立遺伝子への結合が予想されるタンパク質配列中のアミノ酸パターンを指す。

【0071】

本明細書で使用される場合、「EpiBar（商標）」の用語は、少なくとも4つの異なるHLA対立遺伝子への反応が予想される9量体ペプチドを指す。

【0072】

本明細書で使用される場合、「ネイティブFc」の用語は、単量体の形態であるか多量体の形態であるかを問わず、全体の抗体の消化から生じる非抗原結合性断片の配列を含む分子または配列を指し、この中へ、ペプチド配列は、ループ領域への挿入または置換により付加されてよい。ネイティブFcのオリジナルの免疫グロブリン源は、好ましくはヒト起源であり、免疫グロブリンのいずれかであってよいが、IgG1およびIgG2が好ましい。ネイティブFcは、共有結合（すなわちジスルフィド結合）および非共有結合により二量体または多量体の形態に連結されてよい単量体ポリペプチドから構成される。ネイティブFc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、IgG、IgA、IgE）またはサブクラス（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgGA2）に依存して1～4の範囲である。ネイティブFcの1つの例は、IgGのパイン消化から生じるジスルフィド結合した二量体である（Ellison et al. (1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9参照）。本明細書で使用される場合の「ネイティブFc」の用語は、単量体、二量体、および多量体の形態を総称する。

【0073】

本明細書で使用される場合、「免疫シナプス」の用語は、所与のT細胞エピトープと細胞表面MHC複合体およびTCRの両方との同時係合により形成されるタンパク質複合体を意味する。

【0074】

「ポリペプチド」の用語は、アミノ酸のポリマーを指し、特定の長さを指すものではない；よって、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質は、ポリペプチドの定義に含まれる。レトロインベルソペプチドは、その親L-配列の逆の順序で組み立てられたD型アミノ酸（グリシンを除く）からなる。本明細書で使用される場合、ポリペプチド（これは、レトロインベルソポリペプチドであることができるかまたは本開示のレトロインベルソポリペプチドを含むことができる）は、これが実質的に細胞材料を含まない場合、組換え細胞および非組換え細胞から単離された場合、または化学的前駆体または他の化学物質を含まない場合、化学的に合成された場合、「単離」または「精製」されたと言われる。本開示のポリペプチド（例えば、態様では、単離され、合成されまたは組み換えられていてよい、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するか、それらからなるか、またはそれらから実質的になるレトロインベルソポリペプチドまたはその変異体およびその断片、ここで、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）は、しかしながら、細胞内では通常では会合されない他のポリペプチド（例えば、異種ポリペプチド）に接合、連結またはその中に挿入されていることができ、それで

10

20

30

40

50

も「単離」または「精製」されていることができる。本開示の1つ以上のレトロインベルソTレギトープに関して本明細書で使用される場合、「異種ポリペプチド」の用語は、1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、異種ポリペプチドに対して異種であるか、または異種ポリペプチド内に天然では含まれないことを意味することを意図する。例えば、本開示の1つ以上のレトロインベルソTレギトープ（および／または1つ以上の他のTレギトープ、例えば、米国特許第7,884,184号明細書に開示された付加的IgG由来のTレギトープ、これは参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）は、異種ポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、異種モノクローナル抗体）に連結（例えば、フレーム内に融合、化学的連結、または別の方法で結合）および／または異種ポリペプチド内に挿入されていることができる。さらに、本開示の1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、別のポリペプチドに接合、連結またはその中に挿入されていることができ、本開示の前記1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、天然ではポリペプチド中に含まれず、かつ／または本開示の前記1つ以上のTレギトープは、ポリペプチド中にその天然の位置には配置されていない。例えば、態様では、1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、米国特許第7,442,778号明細書および／または米国特許第7,750,128号明細書（これらの両方は、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）に開示されたFcドメイン内に挿入されていてよい。例えば、態様では、1つ以上のTレギトープは、米国特許第7,442,778号明細書、米国特許第7,645,861号明細書、米国特許第7,655,764号明細書、米国特許第7,655,765号明細書、および／または米国特許第7,750,128号明細書（これらのいずれもが、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）に開示されたFcドメイン内に挿入されていてよい。またFcドメイン内のアミノ酸を置換してよい。態様では、1つ以上のTレギトープは、米国特許第8,008,453号明細書、米国特許第9,114,175号明細書、および／または米国特許第10,188,740号明細書（これらのいずれもが、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）に開示されたFcドメイン内の1つ以上の内部抱合部位に共有結合されていてよい。ポリペプチドが組換えにより産生されている場合、このポリペプチドは、実質的に、培養基を実質的に含まないこともでき、例えば、培養基は、ポリペプチド調製物の体積の約20%未満、約10%未満、または約5%未満を表す。

【0075】

本明細書で使用される場合、「コンカテマー」ペプチドまたはポリペプチドは、一緒に連結された一連の少なくとも2つのペプチドまたはポリペプチドを指す。このような連結は、一列に続くビスのデザインを形成してよい。態様では、コンカテマーポリペプチドのペプチドまたはポリペプチドの各々は、場合により、1つ以上のリンカー、および別の態様では、中性のリンカーにより隔てられていてよい。「リンカー」の用語は、2つのペプチドドメイン、例えばエピトープまたはワクチン配列の間に付加され、前記ペプチドドメインを接続するペプチドを指してよい。態様では、リンカー配列は、本開示の各々1つ以上の同定されたペプチド間の立体障害を低減するために使用され、十分に翻訳され、かつ本開示の各々1つ以上の同定されたポリペプチドのプロセッシングを支持または可能にする。態様では、リンカーは、免疫原性配列要素を僅かに有するかまたは有するべきでない。態様では、コンカテマーポリペプチドの各々のペプチドまたはポリペプチドは、場合により、1つ以上のリンカーを有してよく、このリンカーは、場合により、そのN末端および／またはC末端に隣接する切断感受性部位であってよい。このようなコンカテマーペプチドにおいて、ペプチドの2つ以上は、これらの間に切断感受性部位を有していてよい。あるいは、ペプチドの2つ以上は、互いに直接接続されるかまたは切断感受性部位ではないリンカーによって接続されていてよい。

【0076】

本明細書で使用される場合、「製剤学的に許容可能」の用語は、連邦政府もしくは州政府の規制機関により認可されたもしくは認可可能であるか、またはヒトを含めた動物における使用について米国薬局方もしくは他の一般的に認められた薬局方に列挙されているこ

とを指す。

【0077】

本明細書で使用される場合、「製剤学的に許容可能な付形剤、担体、または希釈剤」等の用語は、薬剤と一緒に被験体に投与することができ、その薬剤の薬理学的活性を破壊せず、かつ薬剤の治療的量を運ぶために十分な用量で投与する場合に非毒性である付形剤、担体、または希釈剤を指す。

【0078】

本明細書で使用される場合、「遊離チオール」は、場合によりポリペプチドおよび／またはペプチド中のアミノ酸のチオール側鎖を指し、チオールは、スルフヒドリル基を含む。例えば、遊離チオールは、分子内または分子間ジスルフィド結合を介して他のアミノ酸の側鎖と結合していない。

10

【0079】

本明細書で使用される場合、「官能基」は、修飾された治療性ペプチド上の反応基が反応して共有結合を形成する、可動性および固定化タンパク質を含む血液成分上の基である。官能基は、エステル反応基に結合するためのヒドロキシル基、マレイミド、イミダートおよびチオエステル基に結合するためのチオール基、反応基上の活性化されたカルボニル、ホスホリルまたはその他のアシル基に結合するためのアミノ基を含んでよい。

【0080】

本明細書で使用される場合、「血液成分」は、固定化されていてもまたは可動性であってもよい。固定化血液成分は、非可動性血液成分であり、組織、膜受容体、間質タンパク質、フィブリンタンパク質、コラーゲン、血小板、内皮細胞、上皮細胞およびそれらに関連する膜および膜性受容体、身体の体細胞、骨格および平滑筋細胞、神経成分、骨細胞および破骨細胞、および全ての身体組織、特に循環系およびリンパ系と関連する身体組織を含む。可動性血液成分は、長期間、一般に、5分、より通常では1分を超えない期間、固定された位置に存在しない血液成分である。このような血液成分は、膜結合性ではなく、血液中に長期間存在し、少なくとも $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最小濃度で存在する。可動性血液成分は、血清アルブミン、トランスフェリン、フェリチンおよび免疫グロブリン、例えばIgMおよびIgGを含む。可動性血液成分の半減期は、少なくとも約12時間であってよい。

20

【0081】

本明細書で使用される場合、「専用コンピュータプログラム」の用語は、特定の目的を満たすように；典型的には、生データの特定のセットを分析し、特定の科学的疑問に答えるように設計されたコンピュータプログラムを指す。

30

【0082】

本明細書で使用される場合、「zスコア」の用語は、要素が平均からどのくらい標準偏差しているかを示す。zスコアは、次の式から計算することができる。 $z = (X - \mu) / \sigma$ 、式中、zは、zスコアであり、Xは、要素の値であり、 μ は、母平均であり、 σ は、標準偏差である。

【0083】

本明細書で使用される場合、単数形の「a」、「an」および「the」は、内容が明らかに別のことを示さない限り、「少なくとも1つ」を含む複数形を含むことを意図する。「または」は、「および／または」もしくは「かつ／または」を意味する。本明細書で使用される場合、「および／または」および「1つ以上」の用語は、関連する列挙された項目の任意のおよび全ての組合せを含む。例えば、「本開示の配列番号：1～29および42～107の1つ以上」に関する「1つ以上」の用語は、配列番号：1～29および42～107の任意のおよび全ての組合せを含む。「またはその組合せ」の用語は、前述の要素の少なくとも1つを含む組合せを意味する。

40

【0084】

以下の略語および／または頭文字は、本出願全体で使用される：

A P C 抗原提示細胞

50

C E F サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、インフルエンザウイルス
 C F S E 染料 カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル染料
 D M S O ジメチルスルホキシド
 D R 抗体 抗原 D 関連抗体
 E L I S A 酵素結合免疫吸着剤検定法
 F A C S 蛍光標識式細胞分取
 F m o c 9-フルオロニルメトキシカルボニル
 F V ヒト凝固因子 V
 F V I I I ヒト凝固因子 V I I I
 H L A ヒト白血球抗原
 H P L C 高速液体クロマトグラフィー
 I V I G 静脈内精製免疫グロブリン G 抗体
 M F I 平均蛍光指数
 M H C 主要組織適合性複合体
 P B M C 末梢血単核細胞
 P I 増殖指数
 R P M I ロズウェルパーク記念研究所培地
 T e f f エフェクター T 細胞
 T R e g 制御性 T 細胞
 T T 破傷風トキソイド
 U V 紫外線

10

20

本明細書で使用される場合、「変異体」ポリペプチド（変異体レトロインベルソ T レギトープを含む）は、アミノ酸配列において、1つ以上の置換、欠失、挿入、反転、融合、および切断またはこれらのいずれかの組合せにより異なることができる。態様では、変異体レトロインベルソ T レギトープは、アミノ酸配列において、1つ以上の置換、欠失、挿入、反転、融合、および切断またはこれらのいずれかの組合せにより異なることができるが、前記変異体は、M H C 結合傾向および／または T C R 特異性、および／または制御性 T 細胞刺激または抑制活性を保存するものとする。

【0085】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、限定されるものではないが、以下の：モノクローナルまたはポリクローナル；マウス、ヒト、またはヒト化；単一特異的または二重特異的；グリコシル化；F c 修飾；抗体薬物抱合体；異なるクラスまたはサブクラスの抗体、例えば I g G（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4）、I g M、I g E、または I g A；および／または抗体断片またはその誘導体（例えば、F a b、s c F v、ダイアボディ、s d A b、またはタンデム s c c F v）の1つ以上を含む多様な形態を取ることができる。

30

【0086】

本開示はまた、本開示のレトロインベルソ T レギトープのポリペプチド断片を含む。本開示はまた、本明細書に記載されたレトロインベルソ T レギトープの変異体の断片を包含するが、前記断片および／または変異体は、少なくとも部分的に、M H C 結合傾向および／または T C R 特異性および／または制御性 T 細胞刺激または抑制活性を保存するものとする。

40

【0087】

本開示はまた、キメラまたは誘導ポリペプチド（これは、態様では、単離され、合成され、または組み換えられてよい）を提供し、本開示のレトロインベルソ T レギトープの1つ以上は、その一部である。態様では、キメラまたは融合ポリペプチド組成物は、異種ポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、I g G、I g M、I g A、I g D または I g E 分子またはそれらの抗原特異的抗体断片（限定されるものではないが、F a b、F（a b'）₂、F v、ジスルフィド連結 F v、s c F v、単ドメイン抗体、閉鎖構造多重特異的抗体、ジスルフィド連結 s c f v、ダイアボディを含む））と連結された

50

、本開示の1つ以上のレトロインベルソポリペプチド（T_re_g活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）を有する。前述のように、「異種ポリペプチド」の用語は、本明細書に開示された1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、異種ポリペプチドに対して異種であるか、または天然では異種ポリペプチド中に含まれないことを意味することを意図する。態様では、1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、異種ポリペプチド中に（例えば、突然変異誘発または他のこの分野で公知の方法により）挿入されてよく、異種ポリペプチドのC末端に（この分野で公知のリンカーを使用してまたは使用せずに）付加されてよく、かつ／またはN末端に（この分野で公知のリンカーを使用してまたは使用せずに）付加されてよい。態様では、1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、
10 米国特許第7,442,778号明細書、米国特許第7,645,861号明細書、米国特許第7,655,764号明細書、米国特許第7,655,765号明細書、および／または米国特許第7,750,128号明細書（これらの各々は、参照によりその全体として本願明細書に組み込まれる）に開示されたFcドメイン内に挿入されてよい。またはFcドメイン内のアミノ酸を置換してよい。例えば、突然変異誘発によるタンパク質操作は、部位特異的突然変異誘発技術、またはこの分野で公知の他の突然変異誘発技術を使用して行うことができる（例えば、James A. Brannigan and Anthony J. Wilkinso
n., 2002, Protein engineering 20 years on. Nature Reviews Molecular C
ell Biology 3, 964-970; Turanli-Yildiz B. et al., 2012, Protein Engineeri
ng Methods and Applications, intechopen.com参照、これらは、参照によりそ
20 の全体として本明細書に組み込まれる）。態様では、キメラまたは融合ポリペプチドは、異種ペプチドに作動的に連結された本開示の1つ以上のレトロインベルソTレギトープを有する。「作動的に連結された」とは、ポリペプチド（例えば、本開示の1つ以上のT_re_g活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）と異種タンパク質が、フレーム内で融合しているかまたは化学的連結しているかまたは別の方法で結合していることを示す。例えば、態様では、1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、米国特許第8,008,453号明細書、米国特許第9,114,175号明細書および／または米国特許第10,188,740号明細書（これらの各々は、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）に開示されたFcドメイン中の1つ以上の内部抱合部位に共有結合され
30 てよい。態様では、単離され、合成され、または組み換えられたキメラまたは融合ポリペプチド組成物は、ポリペプチドを有し、前記ポリペプチドは、本開示のレトロインベルソTレギトープの1つ以上を有する配列を有し、前記1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、ポリペプチド中のその天然の位置には配置されていない。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープの1つ以上は、ポリペプチドに接合、連結（例えば、フレーム内に融合、化学的連結、または他の方法により結合）、かつ／またはポリペプチドに挿入されていることができる。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープの1つ以上は、小分子、薬物、または薬物断片、例えば、限定されるものではないが、定義されたHLAに対して高い親和性で結合する薬物または薬物断片に接合または連結（例えば、フ
40 レーム内に融合、化学的連結、または他の方法で結合）されていることができる。

【0088】

「単離された」ポリペプチド（例えば、単離されたT_re_g活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）は、それを発現するように変更された細胞（組換え体）から精製されるか、または公知のタンパク質／ペプチド合成法を用いて合成されることができる。例として、ペプチドは、Krieger et al, 「Affinity purification of synthetic peptides.」 PNAS 73:3160-3164 (1976)に記載された手順を使用して配列決定されていることができる。一実施形態では、レトロインベルソTレギトープ、または本開示のレトロインベルソTレギトープを有するポリペプチドまたは組成物は、組換えDNAまたはRNA技術により産生される。例えば、レトロインベルソTレギトープをコードする

10

20

30

40

50

核酸分子を、発現ベクター中にクローニングし、発現ベクターを宿主細胞中へ導入し、ポリペプチドを宿主細胞中で発現させる。次いで、レトロインベルソTレギトープを、標準的なタンパク質精製技術を用いた適切な精製スキームにより細胞から単離することができる。

【0089】

本開示の目的のために、本開示のレトロインベルソTレギトープおよびペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、またはキメラもしくは融合ポリペプチドは、例えば、非天然に生じるアミノ酸、アミノ酸類似体、および模倣物を含むことができるが、前記Tレギトープは、少なくとも部分的に、MHC結合傾向および／またはTCR特異性および／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存するものとする。本開示の目的のために、本開示のペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、またはキメラもしくは融合ポリペプチドは、例えば、天然に生じるアミノ酸の修飾された形、例えばD型立体異性体、非天然に生じるアミノ酸；アミノ酸類似体；および模倣物を含むことができる。

10

【0090】

本明細書に記載されたものと類似または同等の任意の方法および材料を、本開示の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料を記載する。本開示の他の特徴、対象、および利点は、本明細書および特許請求の範囲から明らかになる。本明細書および添付された特許請求の範囲において、単数形は、文脈が明らかに他のことを述べていない限り、複数の指示対象を含む。他に定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に引用された全ての参考文献は、個々の刊行物、特許、または特許出願の各々が、全ての目的のために参照によりその全体として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程度に、参照によりその全体としてかつ全ての目的のために本明細書に組み込まれる。

20

【0091】

ポリペプチド、コンカテマーポリペプチド、およびキメラまたは融合ポリペプチド
態様では、本開示は、一般に、新規クラスのレトロインベルソ制御性T細胞エピトープ（態様では、「レトロインベルソTレギトープ」と言われる）に関する。本開示は、態様では、例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるかまたはこれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片および変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的なアミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド（これは、本明細書では、「Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ」、「レトロインベルソTレギトープ」、または「レトロインベルソ制御性T細胞エピトープポリペプチド」と言われてよい）、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除いて、本明細書に開示されたD型アミノ酸配置である；本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチドおよびコンカテマーポリペプチド；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルスまたは細胞；本明細書に開示されたキメラまたは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上を含む、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物を提供する。

30

40

【0092】

一態様では、本開示は、「レトロインベルソTレギトープ」と言われるレトロインベルソT細胞エピトープ（これは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）の新規クラスを提供する。本開示のレトロインベルソTレギトープは、そのソースタンパク質の公知の変異体の間で高度に保存された（例えば、公知の変異体の10%超に存在する）Tレギトープに基づき設計されている。本開示のレトロインベルソTレギトープは、E p i M a t r i x（商標）分析により同定された少なくとも1つの推定T細胞エピトープ

50

に基づき設計されたレトロインベルソペプチドを有する。EpiMatrix（商標）は、推定T細胞エピトープの存在についてタンパク質配列をスクリーニングするために使用されるEpiVax（Providence, Rhode Island）により開発された独自のコンピュータアルゴリズムである。入力シーケンスは、各フレームが、最後のフレームと8アミノ酸がオーバーラップする重複する9量体フレームに分解される。次いで、得られたフレームの各々は、8つの共通クラスII HLA対立遺伝子（DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*0801、DRB1*1101、DRB1*1301、およびDRB1*1501）のパネルに関する予測の結合親和性についてスコア付けされる。生スコアは、ランダムに生成されたペプチドの大きなサンプルのスコアに対して標準化される。得られた「Z」スコアが報告される。態様において、1.64を超過する対立遺伝子特異的EpiMatrix（商標）Zスコア（理論的には任意の所与のサンプルの上位5%）を有する任意の9量体ペプチドは、推定T細胞エピトープと見なされる。

10

【0093】

推定T細胞エピトープのクラスターを含むペプチドは、インビトロおよびインビボアッセイでの検証で陽性と判断される可能性が高くなる。最初のEpiMatrix（商標）分析の結果は、Clustimer（商標）アルゴリズムとして公知の第2の独自のアルゴリズムを使用して推定T細胞エピトープ「クラスター」の存在についてさらにスクリーニングされる。Clustimer（商標）アルゴリズムは、統計的に異常の多数の推定T細胞エピトープを含む任意の所与のアミノ酸配列内に含まれるサブ領域を同定する。典型的なT細胞エピトープ「クラスター」は、長さが約9から約30のアミノ酸までの範囲であり、多数の対立遺伝子に対しかつ多数の9量体フレームにわたりその親和性を考慮して、概して約4から約40までの推定T細胞エピトープを含むことができる。同定された各エピトープクラスターの総EpiMatrix（商標）スコアは、推定T細胞エピトープのスコアを合計し、候補エピトープクラスターの長さと同じ長さのランダムに生成されたクラスターの予想スコアに基づく補正係数を減算することにより計算される。+10を超過するEpiMatrix（商標）クラスタースコアは、優位であると見なされる。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープは、T細胞エピトープクラスターとして公知のパターンを形成する幾つかの推定T細胞エピトープを含む同定されたTレギトープに基づき設計されたレトロインベルソペプチドを有する。

20

30

【0094】

最も反応性のT細胞エピトープクラスターの多くは、「EpiBar（商標）」と言われる特徴を含む。前述のように、EpiBar（商標）は、少なくとも4つの異なるHLA対立遺伝子に反応することが予想される単一の9量体フレームである。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープは、1つ以上のEpiBar（商標）有することができる同定されたTレギトープに基づき設計されたレトロインベルソペプチドを有する。

【0095】

JanusMatrixシステム（EpiVax, Providence, Rhode Island）は、宿主プロテオームとの交差保存のためのペプチド配列をスクリーニングするために有用である。JanusMatrixは、ペプチドクラスターと宿主ゲノムまたはプロテオームとの間の交差反応の能力を、それらの推定MHCリガンド中のTCRに向かう残基の保存に基づき予測するアルゴリズムである。JanusMatrixアルゴリズムは、最初に所与のタンパク質配列内に含まれる全ての予測エピトープを考慮し、各予測エピトープを、それを構成するアグレートとエピトープとに分ける。次いで、各配列を、宿主タンパク質のデータベースに対してスクリーニングする。互換性のMHCに向かうアグレート（すなわち、入力ペプチドとその宿主対応物の両方のアグレートは、同じMHC対立遺伝子に結合することが予測される）と、正確に同じTCRに向かうエピトープとを有するペプチドが戻される。JanusMatrix相同性スコアは、免疫寛容に対する偏りを示唆する。治療性タンパク質の場合には、自己由来のヒトエピトープと治療におけるエピトープの間の交差保存は、このような候補がヒト免疫系により寛容されるという見込みを高

40

50

めてよい。ワクチンの場合には、ヒトエピトープと抗原エピトープとの間の交差保存は、このような候補が免疫カモフラージュを利用し、それにより、免疫応答を回避し、無効なワクチンについて調製することを示してよい。ホストが、例えばヒトである場合、ペプチドクラスターは、それらの推定HLAリガンド中のTCRに向かう残基の保存に基づき、ヒトゲノムおよびプロテオームに対してスクリーニングされる。次いで、ペプチドは、JanusMatrix相溶性スコアを用いてスコア付けされる。態様では、3.0より高いJanusMatrixスコアを有するペプチドは、高い寛容性を示し、よって、本開示の極めて有用なTレギトープであってよい。

【0096】

態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープは、少なくとも1つの、好ましくは2つ以上の共通のHLAクラスII分子と、少なくとも中程度の親和性（例えば、態様で、可溶性HLA分子に基づくHLA結合アッセイで、 $<1000\mu\text{M IC}_{50}$ 、 $<500\mu\text{M IC}_{50}$ 、 $<400\mu\text{M IC}_{50}$ 、 $<300\mu\text{M IC}_{50}$ 、または $<200\mu\text{M IC}_{50}$ ）で結合する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープは、HLAの少なくとも1つ、および他の態様では、2つ以上の対立遺伝子の文脈で、APCによる細胞表面に提示されることが可能である。この文脈で、レトロインベルソTレギトープ-HLA複合体は、レトロインベルソTレギトープ-HLA複合体に対して特異的でありかつ正常な対照被験体内を循環するTCRを有する天然に生じるT_{Reg}（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含める）により認識されることができる。態様では、レトロインベルソTレギトープ-HLA複合体の認識は、活性化されかつ制御性サイトカインおよびケモカインを分泌する整合する制御性T細胞を引き起こすことができる。

【0097】

態様では、本開示は、配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）を有するレトロインベルソポリペプチドに関する。「から本質的になる」の語句は、本開示によるレトロインベルソポリペプチドが、配列番号：1～29および42～107のいずれかによる配列またはその変異体に加えて、レトロインベルソペプチドのいずれかの末端に存在してよく、かつ／またはレトロインベルソペプチドのMHCリガンドとして機能する部分を形成するために必要ではなくかつTレギトープとしての機能にとってレトロインベルソペプチドの活性を実質的に損なうことがないことを提供する側鎖に存在してよい付加的アミノ酸または残基を含む（例えば、制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する）ことを意味することを意図する。態様では、ペプチドまたはポリペプチドは、中性（非荷電）または塩の形のいずれかであることができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。所定の態様では、レトロインベルソTレギトープは、N末端アセチル基および／またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、以下のレトロインベルソTレギトープ（ならびにそれらの断片、それらの変異体、そのような変異体の断片、ただし、前記断片および／または変異体は、MHC結合傾向および／またはTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する）の1つ以上を含む：

HKSPVTVVSSLSYLGSSQLVAK（配列番号：1）；

HKSPVTVVS（配列番号：2）；

KSPVTVVSS（配列番号：3）；

SPVTVVSSSL（配列番号：4）；

PVTVVSSLS（配列番号：5）；

VTVVSSLSY（配列番号：6）；

TVVSSLSYL（配列番号：7）；

VVSSLSYLG（配列番号：8）；

VSSLSYLG（配列番号：9）；

10

20

30

40

50

S S L S Y L G S S (配列番号: 10) ;
 S L S Y L G S S Q (配列番号: 11) ;
 L S Y L G S S Q L (配列番号: 12) ;
 S Y L G S S Q L V (配列番号: 13) ;
 Y L G S S Q L V A (配列番号: 14) ;
 L G S S Q L V A K (配列番号: 15) ;
 D Q H L V T L V S V V T Y T S N Y Q E E (配列番号: 16) ;
 D Q H L V T L V S (配列番号: 17) ;
 Q H L V T L V S V (配列番号: 18) ;
 H L V T L V S V V (配列番号: 19) ;
 L V T L V S V V T (配列番号: 20) ;
 V T L V S V V T Y (配列番号: 21) ;
 T L V S V V T Y T (配列番号: 22) ;
 L V S V V T Y T S (配列番号: 23) ;
 V S V V T Y T S N (配列番号: 24) ;
 S V V T Y T S N Y (配列番号: 25) ;
 S V V T Y T S N Y (配列番号: 26) ;
 V V T Y T S N Y Q (配列番号: 27) ;
 V T Y T S N Y Q E (配列番号: 28) ;
 T Y T S N Y Q E E (配列番号: 29) ;
 F T F G S A A C S L R L S G G P Q V L G G (配列番号: 42) ;
 F T F G S A A C S (配列番号: 43) ;
 T F G S A A C S L (配列番号: 44) ;
 F G S A A C S L R (配列番号: 45) ;
 G S A A C S L R L (配列番号: 46) ;
 S A A C S L R L S (配列番号: 47) ;
 A A C S L R L S G (配列番号: 48) ;
 A C S L R L S G G (配列番号: 49) ;
 C S L R L S G G P (配列番号: 50) ;
 S L R L S G G P Q (配列番号: 51) ;
 L R L S G G P Q V (配列番号: 52) ;
 R L S G G P Q V L (配列番号: 53) ;
 L S G G P Q V L G (配列番号: 54) ;
 S G G P Q V L G G (配列番号: 55) ;
 V W E L G K G P A Q R V W H M (配列番号: 56) ;
 V W E L G K G P A (配列番号: 57) ;
 W E L G K G P A Q (配列番号: 58) ;
 E L G K G P A Q R (配列番号: 59) ;
 L G K G P A Q R V (配列番号: 60) ;
 G K G P A Q R V W (配列番号: 61) ;
 K G P A Q R V W H (配列番号: 62) ;
 G P A Q R V W H M (配列番号: 63) ;
 D E P Q L S S I T L T F D T G (配列番号: 64) ;
 D E P Q L S S I T (配列番号: 65) ;
 E P Q L S S I T L (配列番号: 66) ;
 P Q L S S I T L T (配列番号: 67) ;
 Q L S S I T L T F (配列番号: 68) ;
 L S S I T L T F D (配列番号: 69) ;
 S S I T L T F D T (配列番号: 70) ;
 S I T L T F D T G (配列番号: 71) ;

10

20

30

40

50

HKATDEARLSNMQLYLT K (配列番号：72) ;
 HKATDEARL (配列番号：73) ;
 KATDEARLS (配列番号：74) ;
 ATDEARLSN (配列番号：75) ;
 TDEARLSNM (配列番号：76) ;
 DEARLSNMQ (配列番号：77) ;
 EARLSNMQL (配列番号：78) ;
 ARLSNMQLY (配列番号：79) ;
 RLSNMQLYL (配列番号：80) ;
 LSNMQLYLT (配列番号：81) ;
 SNMQLYLT K (配列番号：82) ;
 SNGSQLANDVKWQVKAERP YFNNL (配列番号：83) ;
 SNGSQLAND (配列番号：84) ;
 NGSQLANDV (配列番号：85) ;
 GSQLANDVK (配列番号：86) ;
 SQLANDVKW (配列番号：87) ;
 QLANDVKWQ (配列番号：88) ;
 LANDVKWQV (配列番号：89) ;
 ANDVKWQVK (配列番号：90) ;
 NDVKWQVKA (配列番号：91) ;
 DVKWQVKA E (配列番号：92) ;
 VKWQVKAER (配列番号：93) ;
 KWQVKAERP (配列番号：94) ;
 WQVKAERP Y (配列番号：95) ;
 QVKAERP YF (配列番号：96) ;
 VKAERP YFN (配列番号：97) ;
 KAERP YFNN (配列番号：98) ;
 AERP YFNNL (配列番号：99) ;
 KGYIFSHGTFHITLI (配列番号：100) ;
 KGYIFSHGT (配列番号：101) ;
 GYIFSHGTF (配列番号：102) ;
 YIFSHGTFH (配列番号：103) ;
 IFSHGTFHI (配列番号：104) ;
 FSHGTFHIT (配列番号：105) ;
 SHGTFHITL (配列番号：106) ; および
 HGTTFHITLI (配列番号：107) 。

【0098】

態様では、本開示は、配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるかまたはそれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチドに関し、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。態様では、本開示は、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列を有する1つ以上のペプチドまたはポリペプチドを有するか、これらからなるかまたはこれらから本質的になるコアアミノ酸配列、ならびに場合により、このコアアミノ酸配列のC末端および／またはN末端の1～12のアミノ酸の延長部を有するレトロインベルソポリペプチドに関し、これらのフランキングアミノ酸の全体数は、1～12、1～3、2～4、3～6、1～10、1～8、1～6、2～12、2～10、2～8、2～6、3～12、3～10、3～8、3～6、4～12、4～10、4

～8、4～6、5～12、5～10、5～8、5～6、6～12、6～10、6～8、7～12、7～10、7～8、8～12、8～10、9～12、9～10、または10～12であり、このフランキングアミノ酸は、C末端およびN末端に任意の比率で分配されていることができ（例えば、全てのフランキングアミノ酸は、一方の末端に付加されていることができるか、またはアミノ酸は、両方の末端に等しくまたは任意の他の比率で付加されていることができる）、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。態様では、本開示は、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列を有する1つ以上のペプチドまたはポリペプチドを有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるコア配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、C末端および／またはN末端の1～12のアミノ酸の延長部を有するレトロインベルソポリペプチドに関し、これらのフランキングアミノ酸の全体数は、1～12、1～3、2～4、3～6、1～10、1～8、1～6、2～12、2～10、2～8、2～6、3～12、3～10、3～8、3～6、4～12、4～10、4～8、4～6、5～12、5～10、5～8、5～6、6～12、6～10、6～8、7～12、7～10、7～8、8～12、8～10、9～12、9～10、または10～12であり、フランキングアミノ酸は、C末端およびN末端に任意の比率で分配されていることができ（例えば、全てのフランキングアミノ酸は、一方の末端に付加されていることができるか、またはアミノ酸は、両方の末端に等しくまたは任意の他の比率で付加されていることができる）、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であるが、フランキングアミノ酸を有するポリペプチドは、前記フランキングアミノ酸を有しない前記レトロインベルソポリペプチドコア配列と同じHLA分子に結合することが依然として可能である（すなわち、MHC結合傾向を保存する）。態様では、フランキングアミノ酸を有する前記レトロインベルソポリペプチドは、前記フランキングアミノ酸を有しない前記レトロインベルソポリペプチドコア配列と同じHLA分子と結合することが依然として可能であり（すなわちHMC結合傾向を保存し）かつ／または同じTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する。態様では、前記フランキングアミノ酸配列は、天然に生じるタンパク質（例えば、IgGに見られるが、フランキングアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）において、その中に含まれるペプチドまたはポリペプチドにフランキングする配列でもある。態様では、本明細書に記載された前記フランキングアミノ酸配列は、MHC安定化領域として機能してよい。比較的長いペプチドの使用は、患者細胞による内因性プロセッシングを可能にしてよく、より効率的な抗原提示およびT細胞応答の誘導を引き起こしてよい。態様では、このペプチドまたはポリペプチドは、中性（非荷電）または塩の形のいずれかであることができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。所定の態様では、Tレギトープは、N末端アセチル基および／またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。

【0099】

態様では、本開示は、配列番号：1～29および42～107のいずれか1つ（および／またはそれらの断片）に少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドに関し、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。態様では、前記相同ポリペプチドは、依然として、同じHLA分子と結合し（すなわちMHC結合傾向を保存し）、かつ／または同じTCR特異性を維持し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存することが可能である。

【0100】

態様では、本開示は、付加的ペプチドまたはポリペプチドに連結、融合、または互いに接合（例えば、フレーム内で融合、化学的に連結、または他の方法で結合）された本開示のレトロインベルソポリペプチドまたはペプチドの1つ以上（例えば、限定されるもので

10

20

30

40

50

はないが、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列（および／またはそれらの断片またはそれらの変異体）を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になり、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加のアミノ酸を有するペプチドまたはポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を有するコンカテマーポリペプチドまたはペプチドに関する。このような付加的ペプチドまたはポリペプチドは、本開示のレトロインベルソポリペプチドの1つ以上であってよい、または関心のある付加的ペプチドまたはポリペプチドであってよい。態様では、コンカテマーペプチドは、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上の本開示のペプチドまたはポリペプチドから構成されている。別の態様では、コンカテマーペプチドまたはポリペプチドは、1000以上、1000以下、900以下、500以下、100以下、75以下、50以下、40以下、30以下、20以下、または100以下のペプチドエピトープを含む。さらに別の実施形態では、コンカテマーペプチドは、3～100、5～100、10～100、15～100、20～100、25～100、30～100、35～100、40～100、45～100、50～100、55～100、60～100、65～100、70～100、75～100、80～100、90～100、5～50、10～50、15～50、20～50、25～50、30～50、35～50、40～50、45～50、100～150、100～200、100～300、100～400、100～500、50～500、50～800、50～1,000、または100～1,000の、連結された、融合された、または互いに接合された本開示のペプチドまたはポリペプチドを有する。コンカテマーポリペプチドの各々のペプチドまたはポリペプチドは、場合により、それらのNおよび／またはC末端に隣接する、場合により切断感受性部位であってもよい1つ以上のリンカーを有してよい。AA Y切断モチーフまたはC末端要素のN末端に含まれてよいポリGSリンカーを含む、このような適切なリンカーおよび切断感受性部位は、当分野で公知である。このようなコンカテマーペプチドにおいて、ペプチドエピトープの2つ以上は、それらの間に切断感受性部位を有してよい。あるいは、ペプチドエピトープの2つ以上は、互いに直接または切断感受性部位ではないリンカーを介して接続されていてよい。態様では、このようなリンカーは、抗原的に中性であり、リンカーは、好ましくは、線状に整列された9のアミノ酸のペプチジル主鎖の長さより短い。態様では、リンカー長さは、線状に整列された2～8のアミノ酸のペプチジル主鎖の長さである。態様では、スペーサーは、増強ハイブリッドペプチドの他の別個の要素に対して任意の空間的に別個の方法で水素結合することはできない。

10

20

30

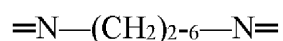
40

50

【0101】

態様では、かつ抗原的に中性のリンカー要素に関して、アミノ酸の代わりに、多様な化学基が、リンカーとして組み込まれていてよい。例は、米国特許第5,910,300号明細書に記載され、この内容は、参照により本明細書に組み込まれる。態様では、リンカーは、ヘテロ原子により最適に中断された脂肪族鎖、例えばC₂～C₆アルキレン、または

【化1】



から構成されていてよい。あるいは、スペーサーは、例えば、場合により、ヘテロ原子、例えばO、N、またはSにより中断されている、疎水性、親油性、脂肪族およびアリアル脂肪族配列の交番単位から構成されていてよい。スペーサーのこのような構成要素は、好ましくは、以下のクラスの化合物から選択される：ステロール、アルキルアルコール、多様なアルキル官能基を有するポリグリセリド、アルキルフェノール、アルキルアミン、アミド、疎水性ポリオキシアルキレン等。他の例は、疎水性ポリ無水物、ポリオルトエステ

ル、ポリホスファゼン、ポリヒドロキシ酸、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシ酪酸である。リンカーは、酸素原子により分離された、繰り返す短い脂肪族鎖、例えば、ポリプロピレン、イソプロピレン、ブチレン、イソブチレン、ペンタメチレン等を含んでいてもよい。

【0102】

可能なリンカーにおいて使用することができる付加的ペプチジル配列は、米国特許第5,856,456号明細書に記載されており、この内容は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、リンカーは化学基を有しており、化学基は切断を受けるその中に組み込まれている。制限することなしに、このような化学基は、プロテアーゼ、化学基、または触媒作用モノクローナル抗体により触媒切断されるように設計されている。プロテアーゼ感受性化学基の場合では、トリプシン標的（カチオン性側鎖を有する2つのアミノ酸）、キモトリプシン標的（疎水性側鎖を有する）、およびカテプシン感受性（B、DまたはS）が好ましい。「トリプシン標的」の用語は、本明細書では、トリプシンおよびトリプシン様酵素により認識されるアミノ酸の配列を説明するために使用される。「キモトリプシン標的」の用語は、本明細書では、キモトリプシンおよびキモトリプシン様酵素により認識されるアミノ酸の配列を説明するために使用される。さらに、触媒作用モノクローナル抗体の化学的標的、および他の化学的に切断される基は、一般にペプチド合成、酵素触媒作用、および有機化学の当業者に周知であり、慣例の実験的方法を用いて、ハイブリッド構造に設計しかつ合成することができる。

【0103】

態様では、本開示のレトロインベルソコンカテマーポリペプチドは、EpiAssemblerシステム（EpiVax）を使用して製造される。EpiAssemblerシステムは、重複するエピトープを免疫原性コンセンサス配列（ICS）に組み立てるために有用である。EpiAssemblerは、病原体と集団有効範囲との間のバランスを最適化するアルゴリズムである。EpiAssemblerは、高い免疫原性コンセンサス配列を形成するために、ConservatrixおよびEpiMatrixにより製造された配列からの情報を使用する。

【0104】

上述のレトロインベルソコンカテマーペプチドまたはポリペプチドの態様では、コンカテマーペプチドまたはポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられてよい。態様では、コンカテマーペプチドまたはポリペプチドは、中性（非荷電）または塩の形で存在することができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。所定の態様では、コンカテマーポリペプチドは、N末端アセチル基および／またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。

【0105】

本明細書で使用される場合、2つのポリペプチド（またはポリペプチドの領域）は、アミノ酸配列が、少なくとも約45～55%、典型的には少なくとも約70～75%、より典型的には少なくとも80～85%、より典型的には約90%超、およびより典型的には95%超相同または同一である場合、実質的に相同または同一である。2つのアミノ酸配列、または2つの核酸配列の百分率で示す相同性または同一性を決定するために、これらの配列は、最適な比較目的で整列される（例えば、一方のポリペプチドまたは核酸分子の配列中にギャップを導入して、他方のポリペプチドまたは核酸分子と最適に整列させることができる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。一方の配列中の位置が、他方の配列中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められている場合、これらの分子は、その位置で相同である。この分野で公知のように、2つの配列の間の百分率で示す同一性は、2つの配列の最適な整列のために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れて、配列により共有される同一位置の数の関数である。ポリペプチドについての配列相同性は、典型的には、配列分析ソフトウェアを用いて測定される。本明細書で使用される場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」

と等しい。態様では、2つの配列の間の百分率で示す相同性は、配列により共有される同一位置の数の関数である（例えば、百分率で示す相同性は、同一位置の数／位置の総数×100に等しい）。

【0106】

態様では、本開示はまた、比較的低い程度の同一性を有するが、本開示のポリペプチド（例えば、配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるか、またはそれらから実質的になる配列（および／またはそれらの断片またはそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するポリペプチド；および本明細書に開示されたコンカテマーペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）により行われる同じ機能の1つ以上を行うために十分な類似性を有するポリペプチドを含む。類似性は、保存されたアミノ酸置換によって決定される。このような置換は、ポリペプチド中の所与のアミノ酸を、同様の特徴の別のアミノ酸に置換するものである。保存的置換は、表現型的にサイレントである可能性がある。典型的には、保存的置換と見なされるのは、脂肪族アミノ酸のAla、Val、Leu、Met、およびIleの中で1つずつの置き換え（本開示のレトロインベルソペプチドについてのD型アミノ酸配置を含む）；ヒドロキシル残基のSerおよびThrの取り換え、酸性残基のAspおよびGluの交換、アミド残基のAsnとGlnとの間の置換、塩基性残基のHis、LysおよびArgの交換および芳香族残基のTrp、PheおよびTyrの置き換えである。どのアミノ酸変化が、表現型的にサイレントである可能性があるかに関する手引きは、(Bowie JU et al., (1990), Science, 247(4948):130610、これは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる)に見られる。

【0107】

態様では、変異体ポリペプチドは、アミノ酸配列において1つ以上の置換、欠失、挿入、反転、融合、および切断またはこれらのいずれかの組合せにより異なることができる。変異体ポリペプチドは、完全に機能することができる（例えば、MHC結合傾向および／またはTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する）か、または1つ以上の活性において機能が欠失していることができる。完全に機能性の変異体は、典型的には、保存的変異または重要でない残基または重要でない領域内での変異を含むだけであり；この場合、典型的には、MHC結合を提供するMHC接触残基は保存される。機能性の変異体は、機能において変化がないかまたは重要でない変化を引き起こす同様のアミノ酸の置換を含むこともできる（例えば、MHC結合傾向および／またはTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する）。あるいは、このような置換は、ある程度、機能にポジティブまたはネガティブな影響を及ぼすことができる。非機能的な変異体は、典型的には、1つ以上の非保存的なアミノ酸置換、欠失、挿入、反転、または切断、または重要な残基もしくは重要な領域；この場合、典型的にはTCR接触残基での置換、挿入、反転、または欠失を含む。態様では、変異体および／または相同ポリペプチドは、本開示の所望の制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する。あるいは、このような置換は、ある程度、機能にポジティブまたはネガティブな影響を及ぼすことができる。非機能的な変異体は、典型的には、1つ以上の非保存的なアミノ酸置換、欠失、挿入、反転、または切断、または重要な残基もしくは重要な領域；この場合、典型的にはTCR接触残基での置換、挿入、反転、または欠失を含む。態様では、配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列（またはコア配列）（および／またはそれらの断片またはそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチドの機能的な変異体は、1つ以上の保存的置換を含んでよく、かつ態様では、本開示のポリペプチドの機能にとって必須であるとは考

えられないアミノ酸残基で（例えば、MHC結合傾向および／またはTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存することを含む機能にとって必須であると考えられるアミノ酸残基による）1つ以上の非保存的置換を含んでよく、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配列である。例えば、態様では、配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列（またはコア配列）（および／またはそれらの断片またはそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有する変異体レトロインベルソポリペプチド、または本明細書に開示されたコンカテマーペプチドは、HLA結合が保存されることを条件として、1つ以上のHLA接触残基において1つ以上の保存的置換（および態様では、非保存的置換）を含んでよく、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。MHC結合アッセイは、この分野で周知である。態様では、このようなアッセイは、この分野で公知の結合アッセイを用いて、インビトロ結合アッセイにおけるMHCクラスIおよびクラスII対立遺伝子に関する結合親和性の試験を含んでよい。例は、例えば、米国特許第7,884,184号明細書またはPCT/US2020/020089に開示された可溶性結合アッセイを含み、これらの両方は、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる。さらに、態様では、配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる配列（またはコア配列）（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有する完全に機能的な変異体ポリペプチドは、1つ以上の重要な残基または領域、例えばTCR接触残基で突然変異を含まず、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。

10

20

30

40

50

【0108】

態様では、MHCクラスII分子と結合する9量体の同定されたエピトープ（これは、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上（および／またはそれらの断片またはそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸の9量体の断片または本明細書に開示されたコンカテマーペプチドの9量体の断片であってよく、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）についてのTCR結合エピトープ（これは、TCR結合残基、TCRに向かうエピトープ、TCRに向かう残基、またはTCR接触部とすることができる）は、アミノ末端から数えて、同定されたエピトープの2、3、5、7、および8位であり、MHCクラスII分子に結合する9量体の同定されたエピトープについてのMHC結合アグレートープ（これは、MHC接触部、MHCに向かう残基、MHC結合残基、またはMHC結合面とすることができる）は、アミノ末端から数えて、1、4、6、および9位にある。

【0109】

態様では、MHCクラスI分子に結合する9量体の同定されたエピトープ（これは、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上（および／またはそれらの断片またはそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸の9量体の断片または本明細書に開示されたコンカテマーペプチドの9量体の断片であってよく、ここで、配列番号：1～29および42～107（およ

び態様では、それらの場合による延長部)のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である)についてのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、同定されたエピトープの4、5、6、7、および8位にあり、MHCクラスI分子に結合する9量体の同定されたエピトープについてのMHC結合アグレトープは、アミノ末端から数えて、1、2、3、および9位にある。

【0110】

態様では、MHCクラスI分子に結合する10量体の同定されたエピトープ(これは、本明細書に開示された配列番号:1~29および42~107の1つ以上(および/またはそれらの断片またはそれらの変異体)、ならびに場合により、配列番号:1~29および42~107のポリペプチドのN末端および/またはC末端に任意の比率で分配された1~12の付加的アミノ酸の10量体の断片であってよく、ここで、配列番号:1~29および42~107(および態様では、それらの場合による延長部)のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、または本明細書に開示されたコンカテマーペプチドの10量体断片、または配列番号:1~29および42~107の1つ以上の9量体を含む10量体のペプチドであってよく、ここで、配列番号:1~29および42~107(および態様では、それらの場合による延長部)のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である)についてのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、同定されたエピトープの4、5、6、7、8、および9位にあり、MHCクラスI分子に結合する10量体の同定されたエピトープについてのMHC結合アグレトープは、アミノ末端から数えて、1、2、3、9、および10位にある。

【0111】

態様では、MHCクラスII分子と結合する9量体の同定されたエピトープ(これは、本明細書に開示された配列番号:1~29および42~107の1つ以上(および/またはそれらの断片またはこれらの変異体)、ならびに場合により、配列番号:1~29および42~107のポリペプチドのN末端および/またはC末端に任意の割合で分配された1~12の付加的アミノ酸の9量体の断片であってよく、ここで、配列番号:1~29および42~107(および態様では、それらの場合による延長部)のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、または本明細書に開示されたコンカテマーペプチドの9量体の断片であってよい)についてのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、同定されたエピトープの2、3、5、7、および8位(例えば、限定されるものではないが、3、5、7および8位;2、5、7、および8位;2、3、5、および7位等)の残基の任意の組合せにあり、9量体の同定されたエピトープについてのMHC結合アグレトープは、TCRに向かう残基に対する相補的な面である。

【0112】

態様では、MHCクラスI分子と結合する9量体の同定されたエピトープ(これは、本明細書に開示された配列番号:1~29および42~107の1つ以上(および/またはそれらの断片またはそれらの変異体)、ならびに場合により、配列番号:1~29および42~107のポリペプチドのN末端および/またはC末端に任意の比率で分配された1~12の付加的アミノ酸の9量体の断片であってよく、ここで、配列番号:1~29および42~107(および態様では、それらの場合による延長部)のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、または本明細書に開示されたコンカテマーペプチドの9量体の断片であってよい)についてTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、同定されたエピトープの4、5、6、7、および8位;1、4、5、6、7および8位;または1、3、4、5、6、7、および8位にあり、9量体の同定されたエピトープについてのMHC結合アグレトープは、TCRに向かう残基に対する相補的な面である。

【0113】

態様では、MHCクラスI分子と結合する10量体の同定されたエピトープ(これは、本明細書に開示された配列番号:1~29および42~107の1つ以上(および/またはそれらの断片またはこれらの変異体)、ならびに場合により、配列番号:1~29およ

び42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸の10量体の断片であってよく、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、または本明細書に開示されたコンカテマーポリペプチドの10量体断片、または配列番号：1～29および42～107の1つ以上の9量体を含む10量体のペプチドであってよく、ここで配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）についてのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、同定されたエピトープの1、3、4、5、6、7、8、および9位の残基の任意の組合せにあり、10量体の同定されたエピトープについてのMHC結合アグレトープは、TCRに向かう残基に対する相補的面である。

10

【0114】

上記に基づいて、1つ以上の9量体および／または10量体のエピトープが、比較的長いポリペプチド内に含まれ、1つ以上のクラスIまたはクラスIIのMHC分子に結合することが予測され、天然に生じる配列中で互いに狭く近接して生じる態様（例えば、結合する9量体および／または10量体の各ペアの1位が、例えば、互いに3つのアミノ酸内にある）では、このようなエピトープは、エピトープクラスターを形成するために組み合わせられてよいことが理解されるであろう。所与のクラスターにおいて、任意の所与のアミノ酸は、所与の9量体のエピトープまたは10量体のエピトープに関して、MHCに向いていてよく、他の9量体のエピトープに関して、TCRに向いていてよい。

【0115】

態様では、本開示はまた、本開示のレトロインベルソポリペプチドおよびコンカテマーポリペプチドの断片を含む。態様では、本開示はまた、本開示のレトロインベルソポリペプチドおよび本明細書に記載されたコンカテマーポリペプチドの変異体の断片を包含する。態様では、本明細書に使用される場合、断片は、少なくとも約9の連続するアミノ酸を有する。態様では、本開示はまた、本明細書に記載されたT細胞エピトープの変異体の断片を包含する。有用な断片（および本明細書に記載されたレトロインベルソポリペプチドおよびコンカテマーポリペプチドの変異体の断片）は、生物学的活性、特に、MHC結合傾向および／またはTCR特異性の1つ以上を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存することを含む。生物学的活性の断片は、例えば、長さが約9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100以上のアミノ酸であり、その間の任意の値または範囲を含める。断片は、離散していることができる（他のアミノ酸またはポリペプチドに融合されていない）か、またはより大きなポリペプチド内にあることができる。幾つかの断片は、単一のより大きなポリペプチド内に含まれることができる。態様では、宿主中での発現のために設計された断片は、ポリペプチド断片のアミノ末端に融合した異種のプレポリペプチドおよびプロポリペプチド領域および断片のカルボキシル末端に融合した付加的領域を有することができる。

30

【0116】

態様では、本開示のレトロインベルソポリペプチドおよび本開示のコンカテマーポリペプチドは、対立遺伝子または配列変異体（「突然変異体」）またはその類似体を含むことができるか、または化学修飾（例えば、PEG化、グリコシル化）を含むことができる。態様では、突然変異体は、同じ機能、特にMHC結合傾向および／またはTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する。態様では、突然変異体は、MHC分子への結合を向上するために提供することができる。態様では、突然変異体は、TCRへの結合の向上を引き起こすことができる。他の例では、突然変異体は、MHC分子および／またはTCRに対する結合の低減を引き起こすことができる。また、結合するが、TCRを介したシグナリングを許容しない突然変異体も考慮される。

40

【0117】

本開示のレトロインベルソポリペプチドを製造する方法は、分子を含む多様な要素の性質に依存して広範囲に変えられる。例えば、単離されたポリペプチドは、それを発現する

50

ように変更された細胞（組換え体）から精製するか、または公知のタンパク質合成方法を使用して合成することができる。合成手順は、単純であり、高い収率を提供し、かつ高度に精製された安定な生成物を可能にするように選択されてよい。例えば、本開示のポリペプチドは、本明細書に開示された核酸から、または標準的な分子生物学的技術、例えば組換え技術、突然変異誘発、またはこの分野で公知の他の方法の使用により製造することができる。単離されたポリペプチドは、これを自然に発現する細胞から精製するか、これを発現するように変更された細胞（組換え体）から精製するか、または公知のタンパク質合成技術を用いて合成することができる。態様では、本開示のポリペプチドは、組換えDNAまたはRNA技術により製造される。態様では、本開示のポリペプチドは、適切な宿主細胞中での本開示の組換え核酸の発現により製造することができる。例えば、ポリペプチドをコードする核酸分子を、発現カセットまたは発現ベクター中にクローニングし、発現カセットまたは発現ベクターを宿主細胞中へ導入し、ポリペプチドを宿主細胞中で発現させる。次いで、ポリペプチドを、標準的なタンパク質精製技術を用いた適切な精製スキームにより細胞から単離することができる。あるいは、ポリペプチドは、プロテアーゼ消化および精製のようなエクスピボ手順の組合せにより製造することができる。さらに、本開示のポリペプチドは、部位特異的突然変異誘発技術、またはこの分野で公知の他の突然変異誘発技術を使用して製造することができる。（例えば、James A. BranniganおよびAnthony J. Wilkinson, 2002, Protein engineering 20 years on. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 964-970; Turanli-Yildiz B. et al., 2012, Protein Engineering Methods and Applications, intechopen.com参照、これらは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）。

10

20

【0118】

態様では、本開示の1つ以上のレトロインベルソポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるレトロインベルソポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）は、異種ポリペプチドに接合、連結（例えば、フレーム内に融合、化学的に連結、または他の方法で結合）され、かつ／またはその中に挿入されていてよい。態様では、本開示の1つ以上のレトロインベルソペプチドまたはポリペプチドは、全体として異種ポリペプチドと接合、連結（例えば、フレーム内に融合、化学的に連結、または他の方法で結合）され、かつ／またはその中に挿入されていてよいが、これは、異種ポリペプチドのフランキングアミノ酸と一緒に、接合、連結（例えば、フレーム内に融合、化学的に連結、または他の方法で結合）された、かつ／または挿入されたアミノ酸配列から構成されていてよい。態様では、このペプチドまたはポリペプチドは、中性（非荷電）または塩の形のいずれかであることができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。所定の態様では、ペプチドまたはポリペプチドは、N末端アセチル基および／またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。

30

40

【0119】

態様では、ポリペプチド（これは、単離され、合成され、かつ／または組み換えられていてよい）は、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチド（態様では、このポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）のN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有し、異種ポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、異種抗体（これは、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE分子またはそれらの抗原特異的抗体断片（限定されるものではないが、Fab、F(ab')

50

2、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、単ドメイン抗体、閉鎖構造多重特異性抗体、ジスルフィド連結scFv、ダイアボディを含める))に接合、連結(例えば、フレーム内に融合、化学的に連結、または他の方法で結合)され、かつ/または異種ポリペプチド内へ挿入され、ここで、配列番号:1~29および42~107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である(態様では、配列番号:1~29および42~107の断片を含むが、前記断片および/または変異体は、MHC結合傾向および/またはTCR特異性を保存するものとする)。前述のように、本開示の1つ以上のレトロインベルソトレギトープに関して、「異種ポリペプチド」の用語は、本開示の1つ以上のレトロインベルソトレギトープが、異種ポリペプチドに対して異種であるか、または異種ポリペプチド内に天然では含まれないことを意味することを意図する。態様では、本開示のレトロインベルソポリペプチド(Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソトレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド)の1つ以上は、異種ポリペプチド中に(例えば、組換え技術、突然変異誘発、またはこの分野で公知の別の方法により)挿入されてよく、異種ポリペプチドのC末端に(この分野で公知のリンカーを使用してまたは使用せずに)付加されてよく、かつ/または異種ポリペプチドのN末端に(この分野で公知のリンカーを使用してまたは使用せずに)付加されてよい。例えば、突然変異誘発によるタンパク質操作は、部位特異的突然変異誘発技術、またはこの分野で公知の別の突然変異誘発技術を使用して行うことができる(例えば、James A. BranniganおよびAnthony J. Wilkinson., 2002, Protein engineering 20 years on. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 964-970; Turanli-Yildiz B. et al., 2012, Protein Engineering Methods and Applications, intechopen.com参照、これらは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる)。さらに、本開示のポリペプチドは、Krieger et al, 「Affinity purification of synthetic peptides.」 PNAS 73:3160-3164 (1976)に記載された手順を用いて製造することができ、これは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる。態様では、1つ以上のレトロインベルソトレギトープは、米国特許第7,442,778号明細書、米国特許第7,645,861号明細書、米国特許第7,655,764号明細書、米国特許第7,655,765号明細書、および/または米国特許第7,750,128号明細書(これらの各々は、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる)に開示されたFcドメイン内に挿入されてよい。またはFcドメイン内のアミノ酸が置き換えられてよい。

10

20

30

【0120】

態様では、本開示は、本明細書に開示された配列番号:1~29および42~107の1つ以上および/またはそれらの断片およびそれらの変異体を有する配列、ならびに場合により、配列番号:1~29および42~107のポリペプチドのN末端および/またはC末端に任意の比率で分配された1~12の付加的アミノ酸を有する(態様では、単離され、合成され、または組み換えられてよい)ポリペプチドに関し、ここで、配列番号:1~29および42~107(および態様では、その場合による延長部)のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、配列番号:1~29および42~107の前記の1つ以上は、天然でポリペプチド中に含まれず、かつ/または配列番号:1~29および42~107の前記の1つ以上は、その天然の位置でポリペプチド内に配置されていない。上述ポリペプチドの態様では、ポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられてよい。態様では、このペプチドまたはポリペプチドは、中性(非荷電)または塩の形のいずれかであることができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。所定の態様では、ペプチドまたはポリペプチドは、N末端アセチル基および/またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。

40

【0121】

態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、米国特許第7,442,778号明細書、米国特許第7,645,861号明細書、米国特許第7,

50

655, 764号明細書、米国特許第7, 655, 765号明細書、および／または米国特許第7, 750, 128号明細書（これらの各々は、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）に開示されたFcドメイン内に内部配列として組み込まれた本明細書に開示された1つ以上のレトロインベルソトレギトープポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列（および／またはそれらの断片またはそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるペプチドまたはポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を有する。このような内部配列は、挿入により（すなわち、既存のFcドメイン内のアミノ酸の間に）または既存のFcドメイン内のアミノ酸の置換（すなわち、既存のFcドメイン内のアミノ酸を除去しかつペプチドアミノ酸を付加する）により付加されてよい。後者の場合、付加されるペプチドアミノ酸の数は、既存のFcドメインから除去されたアミノ酸の数に対応する必要はなく；例えば、態様では、組成物は、ネイティブFcドメインから除去された1～21のアミノ酸の配列で、9～15のアミノ酸の付加された内部配列を有してよい。態様では、1つ以上のトレギトープは、米国特許第7, 442, 778号明細書、米国特許第7, 645, 861号明細書、米国特許第7, 655, 764号明細書、米国特許第7, 655, 765号明細書、および／または米国特許第7, 750, 128号明細書に開示されたFcドメイン中の1つ以上の有利な内部部位に挿入または置換（例えば、完全な置換または部分的な置換）されている。

10

20

【0122】

態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、修飾されたトレギトープペプチドを作製するために、トレギトープペプチドに反応基を取り付けることにより修飾された本明細書に記載されたレトロインベルソトレギトープポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列（および／またはそれらの断片またはそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるペプチドまたはポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸である）を有し、修飾されたトレギトープペプチドの反応基は、血液成分上の反応性官能基との結合を形成することが可能であり、トレギトープペプチドの反応基と血液成分上の反応性官能基との間の結合を形成する際に、米国特許第6, 849, 714号明細書、米国特許第6, 887, 470号明細書、米国特許第7, 256, 253号明細書、および米国特許第7, 307, 148号明細書（これらの各々は、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）に記載されているように、トレギトープ-血液成分抱合体が形成される。態様では、レトロインベルソトレギトープ-血液成分抱合体中のレトロインベルソトレギトープは、そのオリジナルの生物学的活性の全てまたはほとんどを保存する。態様では、1つ以上の修飾されたトレギトープペプチドの反応基と血液成分との間に形成される結合は、共有結合である。態様では、レトロインベルソトレギトープペプチド配列は、配列番号：1～29および42～107、ならびに場合により配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸から無関係に選択され、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）。

30

40

【0123】

レトロインベルソトレギトープ-血液成分抱合体は、インビボでトレギトープを有する修飾されたポリペプチドの半減期を延長し、レトロインベルソトレギトープを有する修飾されたポリペプチドを急速なタンパク質分解性の分解から保護し、トレギトープを有する

50

修飾されたポリペプチドを循環からの急速なクリアランスおよび／または急速な腎臓排泄から保護し、被験体の体内全体にレトロインベルソＴレギトープー血液成分抱合体を広く分配することを可能にし、レトロインベルソＴレギトープを有する修飾されたポリペプチドを適切な免疫細胞（例えばマクロファージおよびＡＰＣ）へ輸送することを支援し、レトロインベルソＴレギトープを有する修飾されたポリペプチドを所定の免疫細胞（例えばマクロファージおよびＡＰＣ）のエンドサイトーシス経路によりプロセッシングすることを可能にし、かつ／またはＴレギトープを有する修飾されたポリペプチドが前記免疫細胞により抗体として提示されることを支援することができる。

【０１２４】

態様では、レトロインベルソＴレギトープー血液成分抱合体は、担体タンパク質（例えば、アルブミン）として作用する血液成分を有し、さらに、修飾されたポリペプチド、１つ以上のレトロインベルソＴレギトープを有する前記修飾されたポリペプチドを有する。修飾されたポリペプチドは、ポリペプチドに取り付けられた反応基を有し、反応基は、血液成分上の反応性官能基との結合（例えば、共有結合）を形成することを可能にする。レトロインベルソＴレギトープー血液成分抱合体は、米国特許第６，８４９，７１４号明細書、米国特許第６，８８７，４７０号明細書、米国特許第７，２５６，２５３号明細書、および米国特許第７，３０７，１４８号明細書（参照によりこれらの全体として本明細書に組み込まれる）に開示されたように、修飾されたポリペプチドを作製するために、ポリペプチドに反応基を取り付けることにより、Ｔレギトープを有するポリペプチドを修飾し、次いで、修飾されたポリペプチドの反応基と血液成分上の反応性官能基との間の結合を形成することにより形成されてよい。上述のレトロインベルソＴレギトープー血液成分抱合体およびレトロインベルソＴレギトープを有する修飾されたポリペプチドの態様では、レトロインベルソＴレギトープー血液成分抱合体およびレトロインベルソＴレギトープを有する修飾されたポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい。

【０１２５】

態様では、レトロインベルソＴレギトープー血液成分抱合体の血液成分は、米国特許第６，８４９，７１４号明細書、米国特許第６，８８７，４７０号明細書、米国特許第７，２５６，２５３号明細書、および米国特許第７，３０７，１４８号明細書に開示されたように、固定化または可動性のいずれかであってよい。固定化血液成分は、非可動性血液成分であり、組織、膜受容体、間質タンパク質、フィブリンタンパク質、コラーゲン、血小板、内皮細胞、上皮細胞およびそれらに関連する膜および膜性受容体、身体の体細胞、骨格および平滑筋細胞、神経成分、骨細胞および破骨細胞、および全ての身体組織、特に循環系およびリンパ系と関連する身体組織を含む。可動性血液成分は、長期間、一般に、５分、より通常では１分を超えない期間、固定された位置に存在しない血液成分である。このような血液成分は、膜結合性ではなく、血液中に長期間存在し、少なくとも０．１μg／m lの最小濃度で存在する。可動性血液成分は、血清アルブミン、トランスフェリン、フェリチンおよび免疫グロブリン、例えばＩg MおよびＩg Gを含む。可動性血液成分の半減期は、少なくとも約１２時間である。

【０１２６】

レトロインベルソＴレギトープー血液成分抱合体の態様では、血液成分は、アルブミン、例えば血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、組換えアルブミン、および組換えヒト血清アルブミンである。アルブミンは、Ｔレギトープーアルブミン抱合体を、適切な細胞、例えばマクロファージおよびＡＰＣ内に運び込むFc新生児結合ドメインを含むため、好ましい血液成分である。さらに、アルブミンは、アミノ酸３４でシステイン（Cys 34）（ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列におけるアミノ酸の位置）を含み、約５のpKaを有する遊離チオールを含み、これが、アルブミンの好ましい反応性官能基として機能してよい。アルブミンのCys 34は、マレイミドプロピオンアミド（MPA）と安定したチオエステル結合を形成することが可能であり、これは、修飾されたレトロインベルソＴレギトープペプチドの好ましい反応基である。

【0127】

態様では、レトロインベルソトレギトープー血液成分抱合体の血液成分上のまたは本開示の修飾されたポリペプチドと抱合体を形成することが可能な血液成分上の反応性官能基は、可動性のまたは固定化されたタンパク質を含む血液成分上の基であり、この基と、修飾された治療性ペプチド上の反応基が反応して、共有結合を形成する。米国特許第6,849,714号明細書、米国特許第6,887,470号明細書、米国特許第7,256,253号明細書、および米国特許第7,307,148号明細書に開示されたように、このような官能基は、通常では、エステル反応基と結合するためのヒドロキシル基、マレイミド、イミダートおよびチオエステル基と結合するためのチオール基；反応基上の活性化されたカルボニル、ホスホリルまたは任意の他のアシル基と結合するためのアミノ基を含む。態様では、血液成分の反応性官能基は、アミノ基、ヒドロキシル基、またはチオール基である。態様では、血液成分の反応性官能基は、ポリペプチドおよび／またはタンパク質中のアミノ酸の側基の構成要素であり、反応性官能基は、ポリペプチドおよび／またはタンパク質の表面の近傍にある。態様では、血液成分の反応性官能基は、タンパク様の血液成分の遊離システイン残基のチオール基である。態様では、反応性官能基は、セリンアルブミンのアミノ酸34のシステイン(Cys³⁴)の遊離チオール基である。態様では、血液成分の反応性官能基は、生理学的環境、例えば血漿中で約5のpKaを有するチオールである。態様では、血液成分の反応性官能基は、生理学的環境、例えば血漿中で約5.5のpKaを有するチオールである。態様では、血液成分の反応性官能基は、生理学的環境、例えば血漿中で3〜7のpKaを有するチオールである。態様では、血液成分の反応性官能基は、チオラートアニオンである。態様では、反応性官能基は、セリンアルブミンのアミノ酸34のシステイン(Cys³⁴)のチオラートアニオンである。

10

20

【0128】

態様では、レトロインベルソトレギトープー血液成分抱合体の修飾されたポリペプチドおよびレトロインベルソトレギトープー血液成分抱合体を形成するために使用される修飾されたポリペプチドは、ポリペプチドに取り付けられている反応基を有し、この反応基は、血液成分上の反応性官能基と結合（例えば、共有結合）を形成することが可能である。態様では、反応基は、これと共有結合を形成するために、血液成分上のアミノ基、ヒドロキシル基、またはチオール基と反応することが可能である。態様では、反応基は、修飾されたポリペプチドが血液成分に結合する場合、修飾されたペプチドが親化合物の活性の実質的部分を保存するような位置に配置されている。態様では、反応基は、スクシンイミジルまたはマレイミド基であってよい。態様では、反応基は、修飾されるべきポリペプチドのアミノ酸の治療的活性が低い領域中に位置するアミノ酸に取り付けられてよい。態様では、反応基は、修飾されたポリペプチドのアミノ末端アミノ酸に取り付けられる。態様では、反応基は、修飾されたポリペプチドのカルボキシ末端アミノ酸に取り付けられる。態様では、反応基は、修飾されたポリペプチドのアミノ末端アミノ酸とカルボキシ末端アミノ酸の間に位置するアミノ酸に取り付けられる。態様では、反応基は、連結基を介して、または場合により連結基を使用せずに、（修飾されるべき）ポリペプチドに取り付けられてよい。さらに、1つ以上の付加アミノ酸（例えば、1つ以上のリジン）は、反応基の取り付けを促進するために、ポリペプチドに付加されてよい。連結基は、1つ以上のレトロインベルソトレギトープを有するポリペプチドに対して血液成分の反応基が連結または接続する化学基である。連結基は、1つ以上のアルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、アルキニル基またはアルキル基により置換されたアミノ基、シクロアルキル基、多環式基、アリール基、ポリアリール基、置換されたアリール基、複素環式基、および置換された複素環式基を有してよい。連結基は、ポリエトキシアミノ酸、例えばAEA（（2-アミノ）エトキシ酢酸）または好ましい連結基のAEEA（[2-（2-アミノ）エトキシ]エトキシ酢酸）を有してもよい。態様では、連結基は、ポリエチレングリコールリンカー（例えば、限定されるものではないが、PEG2またはPEG12）を有してよい。

30

40

【0129】

理解されるべきであるように、修飾されたポリペプチドは、血液成分との抱合がインビ

50

ボで生じるようにインビボに投与されてよい、または最初にインビトロで血液成分と抱合させ、生じたペプチダーゼ安定化ポリペプチドをインビボで投与してよい。さらに、米国特許第6,849,714号明細書、米国特許第6,887,470号明細書、米国特許第7,256,253号明細書、および米国特許第7,307,148号明細書に開示されているように、ペプチダーゼ安定化ポリペプチドは、修飾ペプチドの反応基と血液成分の官能基との間で、リンカー基によってまたはリンカー基なしで形成される共有結合を介して血液成分と抱合された修飾されたポリペプチドである。このような反応は、好ましくは、マレイミド連結で修飾されたポリペプチド（例えば、GMBS、MPAまたは他のマレイミドから調製される）の、可動性血液タンパク質、例えば血清アルブミンまたはIgG上のチオール基に対する共有結合により確立される。ペプチダーゼ安定化ポリペプチドは、安定化されていないペプチドよりも、インビボでペプチダーゼの存在でより安定である。ペプチダーゼ安定化治療性ペプチドは、一般に、同一配列の安定化されていないペプチドと比較して、少なくとも10～50%の延長された半減期を有する。ペプチダーゼ安定化は、血清または血液中の修飾されていない治療用ペプチドの半減期を、血清または血液中の修飾された対応する治療性ペプチドの半減期と比較することにより決定される。半減期は、修飾されたかつ修飾されていないペプチドの投与後の血清または血液を採取し、ペプチドの活性を決定することにより決定される。活性の決定に加えて、治療性ペプチドの長さが測定されてもよい。

10

【0130】

態様では、レトロインベルソトレギトープー血液成分抱合体の修飾されたポリペプチドおよびレトロインベルソトレギトープー血液成分抱合体を形成するために使用された修飾されたポリペプチドは、本明細書に開示された1つ以上のレトロインベルソトレギトープを有する。態様では、修飾されたポリペプチドの1つ以上のレトロインベルソトレギトープは、本明細書に本質的に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上（ここで、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）（およびそれらの断片およびそれらの変異体）を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列を有する。態様では、修飾されたポリペプチドの1つ以上のレトロインベルソトレギトープは、場合により、1つ以上のリンカーを有してよく、このリンカーは、場合により、そのNおよび／またはC末端に隣接する切断感受性部位であってよい。このような修飾されたポリペプチドにおいて、レトロインベルソトレギトープの2つ以上は、それらの間に切断感受性部位を有してよい。あるいは、レトロインベルソトレギトープの2つ以上は、互いに直接接続されるか、または切断感受性部位ではないリンカーによって接続されていてよい。態様では、修飾されたポリペプチドは、1つ以上のレトロインベルソトレギトープを有し、かつ／またはその中に含まれるレトロインベルソトレギトープは、中性（非荷電）または塩の形のいずれかであることができ、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化のような修飾を含まなくてもまたは含んでもよい。所定の態様では、1つ以上のトレギトープペプチドまたはポリペプチドを有する修飾されたポリペプチドは、N末端アセチル基および／またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。態様では、修飾されたポリペプチド中に含まれる1つ以上のトレギトープは、N末端アセチル基および／またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。

20

30

40

【0131】

態様において、修飾されたレトロインベルソトレギトープとレトロインベルソトレギトープー血液成分抱合体を形成する血液成分は、アルブミンである。態様では、血液成分の反応性官能基は、アミノ基、ヒドロキシル基、またはチオール基である。態様では、血液成分の反応性官能基は、ポリペプチドおよび／またはタンパク質中のアミノ酸の側基の構成要素であり、反応性官能基は、ポリペプチドおよび／またはタンパク質の表面の近傍にある。態様では、血液成分の反応性官能基は、タンパク様の血液成分の遊離システイン残基のチオール基である。態様では、反応性官能基は、セリンアルブミンのアミノ酸34のシステイン（Cys³⁴）の遊離チオール基である。態様では、血液成分の反応性官能基

50

は、生理学的環境、例えば血漿中で約5のpKaを有するチオールである。態様では、血液成分の反応性官能基は、生理学的環境、例えば血漿中で約5.5のpKaを有するチオールである。態様では、血液成分の反応性官能基は、生理学的環境、例えば血漿中で3~7のpKaを有するチオールである。態様では、血液成分の反応性官能基は、チオラートアニオンである。態様では、反応性官能基は、セリンアルブミンのアミノ酸34のシステイン(Cys³⁴)のチオラートアニオンである。

【0132】

態様では、修飾されたレトロインベルソトレギトープペプチドの反応基は、弱い求電子体である。態様では、修飾されたレトロインベルソトレギトープペプチドの反応基は、チオールに対して選択的な求電子体である。好ましい実施形態では、修飾されたレトロインベルソトレギトープペプチドを作製するためにレトロインベルソトレギトープに取り付けられた反応基は、マレイミドである。態様では、反応基は、マレイミドプロピオン酸である。好ましい実施形態では、修飾されたレトロインベルソトレギトープペプチドの取り付けられた反応基は、マレイミドであり、血液成分は、アルブミンであり、アルブミン上の反応性官能基は、アルブミンのCys³⁴の遊離チオールまたはチオラートアニオンである。修飾されたレトロインベルソトレギトープペプチドの反応基がマレイミドであり、血液成分がアルブミンであり、アルブミンの反応性官能基がアルブミンのCys³⁴の遊離チオールまたはチオラートアニオンである場合、マレイミド基とスルフヒドリルとの間に、生理学的条件下で切断することができない安定なチオエステル連結が形成される。態様では、修飾されたレトロインベルソトレギトープペプチドは、リンカーを含み、反応基は、リンカーによってレトロインベルソトレギトープペプチドに取り付けられる。態様では、修飾されたレトロインベルソトレギトープペプチドは、血液成分に対して、1:1のモル比で結合する。

【0133】

本開示の修飾されたレトロインベルソトレギトープペプチドを製造する方法は、分子を有する多様な構成要素の性質に依存して、広く変化する。合成手順は、単純であり、高い収率を提供し、かつ高度に精製された安定な生成物を可能にするように選択されてよい。通常では、反応基は、例えば、カルボキシル基を用いて、最後の段階として生成され、活性エステルの形成のためのエステル化は、合成の最後のステップである。

【0134】

態様では、本開示は、米国特許第6,849,714号明細書、米国特許第6,887,470号明細書、米国特許第7,256,253号明細書、および米国特許第7,307,148号明細書に開示された修飾されたレトロインベルソトレギトープペプチドを合成する方法にも関する。態様では、この方法は、以下のステップを有する。第1のステップでは、ポリペプチドの1つ以上のレトロインベルソトレギトープ配列は、本質的に、本明細書に開示されている通りであることができる。第2のステップでは、ポリペプチドがシステインを含んでいない場合、ポリペプチドは、カルボキシ末端アミノ酸から合成されてよく、反応基は、カルボキシ末端アミノ鎖に付加される。あるいは、末端リジン（または1つ以上のリジン）は、カルボキシ末端アミノ酸に付加されてよく、反応基は、末端リジンに付加される。第3のステップでは、ポリペプチドは、1つだけのシステインを含む場合、システインは、反応基をポリペプチドの治療的活性が低い領域内のアミノ酸に付加する前に、保護基と反応させる。第4のステップでは、ポリペプチドがジスルフィド架橋として2つのシステインを含む場合、2つのシステインは酸化され、反応基は、ポリペプチドのアミノ末端アミノ酸に付加されるか、カルボキシ末端アミノ酸に付加されるか、カルボキシ末端アミノ酸とアミノ末端アミノ酸の間に位置するアミノ酸に付加される。第5のステップでは、ポリペプチドがジスルフィド架橋として2つより多いシステインを含む場合、システインは、ジスルフィド架橋において順番に酸化され、ペプチドは、カルボキシ末端アミノ酸に反応基を付加する前に精製される。

【0135】

態様では、本開示は、レトロインベルソトレギトープ-血液成分抱合体を合成する方法

にも関する。第1のステップでは、反応性マレイミドプロピオンアミド(MPA)は、修飾されたポリペプチドを生成するために、1つ以上のレトロインベルソトレギトープを有するポリペプチド上のN末端リシンを介して付加される。態様では、1つ以上のリシンは、ポリペプチドのN末端に存在し、場合により、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107(ここで、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である)(およびそれらの断片およびそれらの変異体)の群から選択されるレトロインベルソトレギトープ配列のN末端に存在する。場合により、ポリエチレングリコールリンカー、例えばPEG2またはPEG12は、1つ以上のリシンと、レトロインベルソトレギトープ配列との間に、またはレトロインベルソトレギトープ配列のN末端に存在する。態様では、リソソーム切断部位、場合により例えば(N末端からC末端に向かって連続して)バリンおよびシトルリンからなるカテプシンB部位は、PEG2またはPEG12基とレトロインベルソトレギトープ配列との間に存在する。リソソーム切断部位(例えばカテプシンB部位)は、リソソームプロテアーゼ部位を提供するために導入されてよく、レトロインベルソトレギトープをリソソーム区画内へ放出することを可能にする。態様では、リソソーム切断部位(例えばカテプシンB部位)は、リソソームプロテアーゼ部位を提供するために存在し、レトロインベルソトレギトープを細胞内へ、好ましくは初期エンドソーム内へ放出することを可能にする。好ましい実施形態では、リソソーム切断部位(例えばカテプシンB部位)は、リソソームプロテアーゼ部位を提供するために存在し、レトロインベルソトレギトープを細胞内へ、例えば膜封入小胞(例えば初期エンドソーム、後期エンドソーム、またはリソソーム)内へ放出することを可能にし、それにより、レトロインベルソトレギトープは、抗原提示のためにプロセッシングされてよい。態様では、レトロインベルソトレギトープは、免疫細胞、例えばマクロファージまたは抗原提示細胞によって抗原として提示され、好ましくはMHCクラスII抗原として提示される。態様では、リソソーム切断部位、例えば、場合により、(N末端からC末端に向かって連続して)バリンおよびシトルリンからなるカテプシンB部位は、PEG2基とレトロインベルソトレギトープ配列との間、および/または1つ以上のレトロインベルソトレギトープの間に存在する。態様では、1つ以上のレトロインベルソトレギトープは、構築物上に、場合によりリンカーよりもC末端の近くに存在してよい。態様では、1つ以上のリソソーム切断部位は、複数のレトロインベルソトレギトープの間に存在する(例えば、単一のリソソーム切断部位は、2つのレトロインベルソトレギトープを分離するか、または一方のリソソーム切断部位は、第1のレトロインベルソトレギトープと第2のレトロインベルソトレギトープとの間に存在し、他方のリソソーム切断部位は、第2のレトロインベルソトレギトープと第3のレトロインベルソトレギトープとの間に存在する等)。態様では、ノルロイシン(Nle)残基は、例えば、質量分析による評価のために、最終的なレトロインベルソトレギトープ-血液成分抱合体に組み込まれたレトロインベルソトレギトープペプチドの量を定量化する手段として、C末端に存在する。態様では、ポリペプチドのC末端は、C末端アミノ基でキャップされる。第2のステップでは、マレイミドに基づく化学を使用して、修飾されたポリペプチドを血液成分と、好ましくは血清アルブミンと、1:1のモル比で共有結合により連結する。第2のステップは、以下のおよび本開示の実施例にさらに記載されるように、インビボまたはエキスビボで実施されてよい。

【0136】

態様では、レトロインベルソトレギトープ-血液成分抱合体の形成は、インビボで存在する場合、ペプチダーゼによる急速な分解、循環からの急速なクリアランス、および/または急速な腎臓排泄から、レトロインベルソトレギトープを保護する。態様では、レトロインベルソトレギトープ-血液成分抱合体の形成は、インビボでのレトロインベルソトレギトープの半減期を有意に延長する。態様では、レトロインベルソトレギトープ-血液成分抱合体の形成は、被験体の身体全体でのレトロインベルソトレギトープ-血液成分抱合体の広範囲な分配を可能にする。態様では、レトロインベルソトレギトープ-血液成分抱合体は、被験体の血漿中に存在する場合、血液脳関門を越えない。態様では、レトロイン

10

20

30

40

50

ベルソ T レギトープー血液成分抱合体は、適切な免疫細胞、例えばマクロファージおよび／または抗原提示細胞（A P C）へのレトロインベルソ T レギトープの輸送を支援する。態様では、レトロインベルソ T レギトープを、適切な免疫細胞、例えばマクロファージおよび／または A P C へ輸送する際に、レトロインベルソ T レギトープは、膜結合小胞、好ましくはエンドサイトーシス経路中の小胞、例えば初期エンドソーム、後期エンドソーム、またはリソソーム内へ包含される。態様では、レトロインベルソ T レギトープは、適切な免疫細胞、例えばマクロファージおよび／または A P C によりプロセッシングされると、M H C クラス I I 抗原として提示される。

【0137】

態様では、T レギトープー血液成分抱合体中のレトロインベルソ T レギトープは、インビボで 12 時間までの血漿半減期を有する。態様では、レトロインベルソ T レギトープー血液成分抱合体中のレトロインベルソ T レギトープは、インビボで 1 日までの血漿半減期を有する。態様では、レトロインベルソ T レギトープー血液成分抱合体中のレトロインベルソ T レギトープは、インビボで 40～48 時間までの血漿半減期を有する。態様では、レトロインベルソ T レギトープー血液成分抱合体中のレトロインベルソ T レギトープは、インビボで 60 時間までの血漿半減期を有する。態様では、レトロインベルソ T レギトープー血液成分抱合体中のレトロインベルソ T レギトープは、インビボで 15 日までの血漿半減期を有する。

【0138】

態様では、1 つ以上のレトロインベルソ T レギトープを有する修飾されたポリペプチドは、被験体に投与され、投与の際に、修飾されたポリペプチドは、インビボで、循環血液成分の反応性官能基と反応する。態様では、ペプチドは、ヒト被験体に投与され、血液成分は、ヒトアルブミン、好ましくはヒト被験体の循環アルブミンである。

【0139】

態様では、T レギトープー血液成分抱合体を形成するために使用される修飾されたレトロインベルソポリペプチドは、エクスピボで、血液成分上の反応性官能基との結合を形成することが可能であり、修飾されたポリペプチドの反応基と血液成分上の反応性官能基との間の結合を形成する際に、米国特許第 6, 849, 714 号明細書、米国特許第 6, 887, 470 号明細書、米国特許第 7, 256, 253 号明細書、および米国特許第 7, 307, 148 号明細書に開示されているように、レトロインベルソ T レギトープー血液成分抱合体が形成される。態様では、本明細書に開示された修飾されたポリペプチドは、身体の外側で血液成分の反応性官能基に共有結合するように構成される。態様では、血液成分はアルブミンである。態様では、血液成分は、組換えアルブミン、ヒト組換えアルブミン、およびゲノム由来のアルブミンの群から選択される。

【0140】

態様では、本開示は、米国特許第 6, 849, 714 号明細書、米国特許第 6, 887, 470 号明細書、米国特許第 7, 256, 253 号明細書、および米国特許第 7, 307, 148 号明細書に開示された修飾されたレトロインベルソ T レギトープペプチドおよびレトロインベルソ T レギトープー血液成分抱合体をエクスピボで合成する方法にも関する。態様では、本明細書に開示された修飾されたレトロインベルソポリペプチドは、ヒト血清アルブミンを含む血液、血清または生理食塩水に添加され、修飾された治療性ペプチドと血液成分との間の共有結合形成を可能にする。態様では、本明細書に開示された 1 つ以上の T レトロインベルソレギトープを含むレトロインベルソポリペプチドは、マレイミドで修飾され、これは、生理食塩水中の血清アルブミンと反応する。態様では、修飾されたポリペプチドが血液成分と反応して、レトロインベルソ T レギトープー血液成分抱合体が形成されるとすぐに、この抱合体を被験体に投与してよい。態様では、修飾されたポリペプチドが血液成分と反応して、抱合体を形成した後であるが、この抱合体が被験体に投与される前に、抱合体は、反応混合物中の抱合されていない血液成分から分離されてよい。態様では、抱合体は、非荷電マトリックスに固定化された疎水性リガンドとの疎水性相互作用の変化する強度に基づいて物質を分離することにより、反応混合物中の抱合されて

10

20

30

40

50

いない血液成分から分離されてよい。態様では、非荷電マトリックスは、疎水性固体支持体であってよく、支持体は、疎水性樹脂、例えば、限定されるものではないが、オクチルセファロース、フェニルセファロースおよびブチルセファロースを含むカラムを有する。態様では、この技術は、開始緩衝液中の中程度に高い濃度（約1 M）の塩を用いて実施されてよい（塩促進吸着）。溶出は、塩濃度の線状のまたは段階的な低減によって達成される。リガンドの種類、置換の程度、pHおよび吸着段階で使用する塩の種類および濃度は、HICマトリックス（疎水性相互作用クロマトグラフィーマトリックス）の全体の性能（例えば、選択性および能力）に重大な影響を及ぼす。

【0141】

溶媒は、HIC（疎水性相互作用クロマトグラフィ）における能力および選択性に影響する最も重要なパラメータの1つである。一般に、吸着プロセスは、脱着プロセスよりも選択性である。したがって、pH、溶媒の種類、塩の種類および塩の濃度に関連して開始緩衝液を最適化することが重要である。多様な「塩析」塩のサンプルへの添加は、HICにおけるリガンドタンパク質相互作用を促進する。塩の濃度が増大すると、結合タンパク質の量が、タンパク質の沈殿点まで増加する。塩の種類ごとに、疎水性相互作用を促進するその能力が異なる。

【0142】

塩析効果が増大すると、疎水性相互作用は強化され、カオトロピック効果が増大すると、疎水性相互作用は弱まる。高い塩析効果を有する塩の例は、より大きな塩析効果からより小さな塩析効果の順で、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 I^- 、および SCN^- を含む。高いカオトロピック効果を有する塩の例は、より大きなカオトロピック効果からより小さなカオトロピック効果の順で、 NH_4^+ 、 Rb^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cs^+ 、 Li^+ 、 Mg^{2+} 、および Ba^{2+} を含む。HICのために最も一般的に使用される塩は、硫酸アンモニウム（ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）、硫酸ナトリウム（ $(\text{Na})_2\text{SO}_4$ ）、硫酸マグネシウム（ MgSO_4 ）、塩化ナトリウム（ NaCl ）、塩化カリウム（ KCl ）、および酢酸アンモニウム（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）である。

【0143】

HIC吸着剤に結合するタンパク質は、「塩析」塩の中程度～高い濃度により促進され、これらのほとんどは、ネイティブ球状タンパク質から優先的に排除されるため、すなわち塩とタンパク質表面との間の相互作用は熱力学的に不都合であるため、タンパク質構造に関して安定化する影響を及ぼす。塩濃度は、リガンドタンパク質相互作用を支援するために十分な高さ（例えば、500～1000 mM）であるが、サンプル中のタンパク質の沈殿が生じるより低くあるべきである。アルブミンの場合では、塩濃度は、3 M（モル／リットル）未満に保つべきである。塩析の原理メカニズムは、塩により引き起こされる、水の表面張力の増大からなる（Melander and Horvath, 1977）。よって、コンパクトな構造は、比較的小さなタンパク質－溶液界面領域に対応するため、エネルギー的により有利となる。これらの条件下で、例えば SO_4^{2-} 、 PO_4^{2-} または CH_3COO^- と任意の対イオンから構築される緩衝液では、これらの塩は、抱合されていないアルブミン（例えば、メルカプトアルブミンおよびシステインでキャップされたアルブミン）とは異なる方法で、本明細書に記載された本質的に全ての抱合されたアルブミンに関して塩析効果を示し、よって、抱合されたアルブミンと抱合されていないアルブミンとの間で一貫したクロマトグラフィ分離を可能にする。よって、塩の比較的低い濃度は、リガンドと抱合されていないアルブミンとの間の相互作用よりも、リガンドと抱合されたアルブミンとの間の相互作用を促進するために必要である。このクロマトグラフィ分離は、（a）アルブミン（例えば、ヒト、マウス、ラット等）の配列、（b）アルブミンの供給源（すなわち、血漿由来または組換え）、（c）抱合された修飾されたTレグトップの分子量、（d）分子構造内の反応基の位置、（e）ペプチド配列または分子の化学構造、および（f）抱合された分子の三次元構造（例えば、線状構造対ループ構造）とは本質的に無関係である。

10

20

30

40

50

【0144】

態様では、水性緩衝液の塩は、十分な塩析効果を有する。態様では、十分な塩析効果を提供するために、塩は、リン酸塩、硫酸塩および酢酸塩であってよい。態様では、緩衝液のカチオンの選択は、限定されるものではないが、 NH_4^+ 、 Rb^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cs^+ 、 Li^+ 、 Mg^{2+} および Ba^{2+} からなる群から選択することができる。態様では、水性緩衝液は、リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウムおよびリン酸マグネシウムの群から選択されてよい。態様では、緩衝液のpHは、3.0と9.0の間であり、より好ましくは6.0と8.0の間であり、さらにより好ましくは、pHは7.0である。態様では、緩衝液および疎水性固体支持体は、室温（約25℃）または4℃またはその間である。

10

【0145】

態様では、本開示は、キメラまたは融合ポリペプチド組成物も提供する。態様では、本開示は、単離され、合成され、または組み換えられたキメラまたは融合ポリペプチド組成物を提供し、ここで、本開示のレトロインベルソTレギトープの1つ以上は、その一部である。態様では、キメラまたは融合ポリペプチド組成物は、異種ポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、異種抗体（これは、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE分子またはそれらの抗原特異性抗体断片（限定されるものではないが、Fab、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、単一ドメイン抗体、閉鎖構造多重特異性抗体、ジスルフィド連結scFv、ダイアボディを含む）ことができる））に接合された、それに連結（例えば、フレーム内に融合、化学的連結、または他の方法で結合）された、かつ／または異種ペプチド内に挿入された本開示の1つ以上のレトロインベルソポリペプチドを有する。前述のように、本開示の1つ以上のレトロインベルソTレギトープに関して、「異種ポリペプチド」の用語は、本開示の1つ以上のレトロインベルソTレギトープが、異種ポリペプチドに対して異種であるか、または異種ペプチド内に天然では含まれないことを意味することを意図する。態様では、本開示のポリペプチド（Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）の1つ以上は、異種ポリペプチド中に（例えば、組換え技術、突然変異誘発、またはこの分野で公知の別の方法により）挿入されてよく、異種ポリペプチドのC末端に（この分野で公知のリンカーを使用してまたは使用せずに）付加されてよく、かつ／または異種ポリペプチドのN末端に（この分野で公知のリンカーを使用してまたは使用せずに）付加されてよい。例えば、突然変異誘発によるタンパク質操作は、部位特異的突然変異誘発技術、またはこの分野で公知の他の突然変異誘発技術を使用して行うことができる（例えば、James A. Brannigan and Anthony J. Wilkinson, 2002, Protein engineering 20 years on. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 964-970; Turanli-Yildiz B. et al., 2012, Protein Engineering Methods and Applications, intechopen.com参照、これらは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）。さらに、本開示のポリペプチドは、Krieger et al, 「Affinity purification of synthetic peptides.」 PNAS 73:3160-3164 (1976)に記載された手順を用いて製造することができ、これは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる。態様では、1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、米国特許第7,442,778号明細書、米国特許第7,645,861号明細書、米国特許第7,655,764号明細書、米国特許7,655,765号明細書、および／または米国特許第7,750,128号明細書（これらの各々は、参照によりその全体として本願明細書に組み込まれる）に開示されたFcドメインに挿入されてよい。態様では、キメラまたは融合ポリペプチドは、異種ポリペプチドに作動的に連結された本開示のポリペプチド（Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）の1つ以上を有する。「作動的に連結された」とは、本開示のポリペプチド（Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）の1つ以上と異種ポリペプチドが、

20

30

40

50

フレーム内で融合しているかまたは化学的連結しているかまたは別の方法で結合していることを示す。

【0146】

上記の単離された、合成された、または組み換えられたキメラまたは融合ポリペプチド組成物の態様では、本開示の1つ以上のポリペプチド（T_{reg}活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）は、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチド（態様では、ポリペプチドは、単離されたか、合成されたか、または組み換えられていてよい）のN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有し、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。キメラまたは融合ポリペプチド組成物の態様では、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上および／またはその断片およびその変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチド（態様では、ポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）のN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸は、全体として異種ポリペプチドと接合されたか、それと連結され（例えば、フレーム内で融合された、化学的に連結された、または他の方法で結合された）、かつ／またはその中に挿入されていてよいが、これは、異種ポリペプチドのフランキングアミノ酸と一緒に、接合された、連結された（例えば、フレーム内で融合された、化学的に連結された、または他の方法で結合された）、かつ／または挿入されたアミノ酸配列から構成されていてよく、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。

【0147】

態様では、キメラまたは融合ポリペプチド組成物は、ポリペプチドを有し、前記ポリペプチドは、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有する配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有し、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、配列番号：1～29および42～107の前記1つ以上は、天然ではポリペプチド中に含まれずかつ／または配列番号：1～29および42～107の前記1つ以上は、ポリペプチド中のその天然の位置には配置されていない。態様では、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸は、ポリペプチドに接合されているか、それに連結されている（例えば、フレーム内で融合されている、化学的に連結されている、または他の方法で結合されている）、かつ／またはその中に挿入されていることができ、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。

【0148】

態様では、キメラまたは融合ポリペプチド組成物は、レトロインベルソTレギトープと実施的に相同でないアミノ酸配列を有する異種ポリペプチドに作動的に連結された本開示のレトロインベルソTレギトープの1つ以上を有する。態様では、キメラまたは融合ポリペプチドは、レトロインベルソTレギトープ自体の機能に影響を与えない。例えば、融合ポリペプチドは、レトロインベルソTレギトープ配列がGST配列のC末端に融合されているGST融合ポリペプチドであることができる。他の種類の融合ポリペプチドは、限定されるものではないが、酵素融合ポリペプチド、例えば、ベクターガラクトシダーゼ融合

体、酵母二重ハイブリッドGAL融合体、ポリ-His融合体およびIg融合体を含む。このような融合ポリペプチド、特にポリ-His融合体またはアフィニティタグ融合体は、組換えポリペプチドの精製を容易にすることができる。所定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、ポリペプチドの発現および／または分泌は、異種シグナル配列を使用することにより増大させることができる。したがって、態様では、キメラまたは融合ポリペプチドは、そのN末端に異種シグナル配列を含む。上述のキメラまたは融合ポリペプチド組成物の態様では、異種ポリペプチドまたはポリペプチドは、生物学的活性分子を有する。態様では、生物学的活性分子は、免疫原性分子、T細胞エпитープ、ウイルスタンパク質、および細菌タンパク質からなる群から選択される。

【0149】

態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有する配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の割合で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）の1つ以上は、小分子、薬物、または薬物断片に接合または連結（例えば、フレーム内に融合、化学的連結、または他の方法で結合）されることができる。例えば、1つ以上のレトロインベルソトレギトープは、定義されたHLAに高い親和性で結合する薬物または薬物断片に、接合または連結（例えば、フレーム内に融合、化学的連結、または他の方法で結合）されていることができる。上述のキメラまたは融合ポリペプチド組成物の態様では、キメラまたは融合ポリペプチド組成物は、組み換えられ、単離され、かつ／または合成されていることができる。上述のキメラまたは融合ポリペプチド組成物の態様では、ポリペプチドは、N末端でのアセチル化またはC末端でのアミド化またはN末端でのアセチル化とC末端でのアミド化の両方によりエンドキャップされていることができる。

【0150】

キメラまたは融合ポリペプチド組成物は、この分野で公知の標準的な組換えDNAまたはRNA技術により製造することができる。例えば、本開示のポリペプチドは、Krieger et al, 「Affinity purification of synthetic peptides.」 PNAS 73:3160-3164 (1976)に記載された手順を用いて製造することができ、これは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる。さらに、例として、異なるポリペプチド配列をコードするDNAまたはRNA断片を、従来の技術に従って、フレーム内に一緒に連結されている。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動化されたDNAシンセサイザーを含む従来の技術により合成することができる。あるいは、核酸断片のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅は、アンカープライマーを使用して実施することができ、このアンカープライマーは、2つの連続する核酸断片の間で相補的な突出部を生じさせ、これを引き続きアニーリングし、かつ再増幅して、キメラ核酸配列を生成することができる（Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, (2ND, 1992)、FM Asubel et al. (eds), Green Publication Associates, New York, NY (Publ), ISBN: 9780471566355、これは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）。さらに、本開示の1つ以上のレトロインベルソトレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列および／またはそれらの断片またはそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有する1つ以上のポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）は、組換え技術、合成重合技術、突然変異誘発、またはこの分野で公知の他の標準的技術により、異種ポリペプチド

10

20

30

40

50

内へ挿入されるかまたはポリペプチドの非天然に生じる位置内へ挿入されることができる。例えば、突然変異誘発によるタンパク質操作は、部位特異的突然変異誘発技術、またはこの分野で公知の他の突然変異誘発技術を使用して行うことができる（例えば、James A. Brannigan and Anthony J. Wilkinson., 2002, Protein engineering 20 years on. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 964-970 ; Turanli-Yildiz B. et al., 2012, Protein Engineering Methods and Applications, intechopen.com参照、これらは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）。態様では、1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、米国特許第7,442,778号明細書および／または米国特許第7,750,128号明細書（これらの両方は、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）に開示されたFcドメイン内に挿入されてよい。

10

【0151】

さらに、既に融合基（例えばGSTタンパク質）をコードする多くの発現ベクターが市場で入手可能である。本発明のレトロインベルソTレギトープをコードする核酸分子は、融合基が少なくとも1つのレトロインベルソTレギトープとフレーム内で連結されるように、発現ベクター中にクローニングすることができる。

【0152】

態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的美ノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド（これは、本明細書では、「Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ」、「レトロインベルソTレギトープ」、または「レトロインベルソ制御性T細胞エピトープポリペプチド」と言われてよい）、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除いて、D型アミノ酸配置である；本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチド；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、または細胞；本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上を含む）は、均一になるまで精製されるかまたは部分的に精製されることができる。しかしながら、レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物が均一になるまで精製されていない調製物も有用であることは理解される。かなりの量の他の化合物の存在でも、この調製物は、レトロインベルソTレギトープの所望の作用を可能にすることが特に重要である。よって、本開示は、多様な程度の純度を包含する。一実施形態では、「細胞材料を実質的に含まない」の用語は、約30%（乾燥質量で）未満の他のタンパク質（例えば、混入タンパク質）、約20%未満の他のタンパク質、約10%未満の他のタンパク質、約5%未満の他のタンパク質、約4%未満の他のタンパク質、約3%未満の他のタンパク質、約2%未満の他のタンパク質、約1%未満の他のタンパク質、またはその間の任意の値もしくは範囲を有するレトロインベルソTレギトープの調製物を含む。

20

30

40

【0153】

態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから実質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的美ノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である；本明細書に開示されたレトロインベ

50

ルソポリペプチドを含むポリペプチド；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、または細胞；本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上を含む）は、組換えにより製造され、前記レトロインベルソトレギトープ化合物または組成物は、培養基を実質的に不含であることもでき、例えば、培養基は、レトロインベルソトレギトープ、前記レトロインベルソトレギトープを含むポリペプチド、核酸、またはキメラもしくは融合ポリペプチド調製物の体積の約20%未満、約10%未満、または約5%未満を示す。「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」の用語は、レトロインベルソトレギトープ合成またはレトロインベルソトレギトープ組成物合成に関係する化学的前駆体または他の化学物質から単離されたポリペプチド、核酸、またはキメラもしくは融合ポリペプチドの調製物を含む。「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」の用語は、例えば、約30%（乾燥質量で）未満の化学的前駆体または他の化学物質、約20%未満の化学的前駆体または他の化学物質、約10%未満の化学的前駆体または他の化学物質、約5%未満の化学的前駆体または他の化学物質、約4%未満の化学的前駆体または他の化学物質、約3%未満の化学的前駆体または他の化学物質、約2%未満の化学的前駆体または他の化学物質、または約1%未満の化学的前駆体または他の化学物質を有する、前記レトロインベルソトレギトープ、核酸、またはキメラもしくは融合ポリペプチドを有するレトロインベルソトレギトープポリペプチドの調製物を含むことができる。

10

20

30

40

【0154】

態様では、本開示は、レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ化合物および組成物（例えば、本明細書に開示されたペプチドまたはポリペプチド；本明細書に開示されたコンカテマーペプチド；本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物（これらは態様では、単離され、合成され、かつ／または組み換えられてよい）の1つ以上を含む）の製剤学的に許容可能な塩も含む。「製剤学的に許容可能な塩」は、製剤学的に許容可能でありかつ親ペプチドまたはポリペプチド（例えば、本明細書に開示されたペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、および／またはキメラもしくは融合ポリペプチド）の所望の薬理学的活性を有する塩を意味する。本明細書で使用される場合、「製剤学的に許容可能な塩」は、本開示のポリペプチド、コンカテマーポリペプチド、および／またはキメラもしくは融合ポリペプチドの誘導体を指し、このような化合物は、その酸性塩または塩基性塩を生成することにより修飾される。製剤学的に許容可能な塩の例は、限定されるものではないが、塩基性残基、例えばアミンの無機酸塩もしくは有機酸塩、酸性残基、例えばカルボン酸のアルカリ塩または有機塩等を含む。製剤学的に許容可能な塩は、例えば、無毒性の無機酸もしくは有機酸から形成された親化合物の慣用の無毒性の塩または第四級アンモニウム塩を含む。例えば、このような慣用の無毒性の塩は、限定されるものではないが、2-アセトキシ安息香酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、酢酸、アスコルビン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、重炭酸、炭酸、クエン酸、エデト酸、エタンジカルボン酸、1,2-エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、グリコリルアルサニル（glycollyarsanilic）酸、ヘキシルレゾルシン酸、ヒドラバム（hydrabamic）酸、臭化水素酸、塩酸、ヨウ化水素酸、ヒドロキシマレイン酸、ヒドロキシナフトエ酸、イセチオン酸、乳酸、ラクチオン酸、ラウリルスルホン酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ナブシル酸、硝酸、シュウ酸、パモ酸、パントテン酸、フェニル酢酸、リン酸、ポリガラクトン酸、プロピオン酸、サリチル酸、ステアリン酸、塩基性酢酸、コハク酸、スルファミン酸、スルファニル酸、硫酸、タンニン酸、酒石酸、トルエンスルホン酸、および一般的に生じるアミン酸、例えば、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、アルギニン等から選択される無機酸もしくは有機酸から誘導される塩を含む。

50

【0155】

核酸

態様では、本開示は、本明細書で開示された本開示の1つ以上のポリペプチド、コンカ

50

テマーペプチド、および／またはキメラもしくは融合ポリペプチドを完全にまたは部分的にコードする核酸（例えば、DNA（例えば、限定されるものではないが、cDNA）およびRNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA））、ベクター、ウイルス、またはそれらのハイブリッド（これらの全ては、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）も提供する。本開示の1つ以上のポリペプチドまたは本開示のキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸の態様では、1つ以上のポリペプチドまたは組換えキメラもしくは融合ポリペプチド組成物は、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有し、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。態様では、核酸は、発現カセット、プラスミド、および発現ベクター、または組換えウイルスをさらに含むかまたはその中に含まれていて、場合により、核酸、または発現カセット、プラスミド、発現ベクター、または組換えウイルスは、細胞、場合によりヒト細胞または非ヒト細胞中に含まれていて、場合により細胞は、核酸、または発現カセット、プラスミド、発現ベクター、または組換えウイルスにより形質転換されている。態様では、細胞は、例えば本開示のポリペプチド（Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）；本明細書に開示された単離された、合成されたまたは組み換えられた核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、または組換えウイルス；および／または本明細書に開示された単離された、合成された、または組み換えられたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物の1つ以上を含むように、形質導入されるか、形質移入されるかまたは他の方法で操作される。態様では、細胞は、哺乳動物細胞、細菌細胞、昆虫細胞、または酵母細胞であることができる。態様では、本開示の核酸分子は、ベクター中に挿入され、例えば、発現ベクターまたは遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターは、例えば静脈内注射、局所的投与（米国特許第5,328,470号明細書）によりまたは定位的注射（Chen S H et al., (1994), Proc Natl Acad Sci USA, 91(8):3054-7、これらは、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）により被験体に届けることができる。同様に、本開示の核酸分子は、プラスミド内に挿入することができる。遺伝子治療ベクターの医薬調製物は、許容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターを含むことができるか、または遺伝子輸送媒体が埋め込まれた徐放性マトリックスを有することができる。あるいは、完全な遺伝子輸送ベクターを、組換え細胞、例えばレトロウイルスベクターから無損傷で産生することができる場合、医薬調製物は、遺伝子輸送システムを製造する1つ以上の細胞を含むことができる。このような医薬組成物は、投与用の説明書と共に、容器、パック、またはディスペンサー内に含まれていることができる。

10

20

30

40

50

【0156】

本開示の少なくとも1つのポリペプチド（Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）および／または本開示のキメラもしくは融合ポリペプチドの全体または一部をコードする上述の核酸（例えば、DNA、RNA、ベクター、ウイルス、またはそれらのハイブリッド）の態様では、核酸は、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるポリペプチドの1つ以上をコードし、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。態様では、本開示は、本開示の1つ以上のポリペプチド（Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピト

ープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エプトープポリペプチド)または本開示のキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする本開示の核酸、例えば、限定されるものではないが、本明細書に開示された配列番号: 1~29および42~107の1つ以上および/またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号: 1から29および42~107のポリペプチドのN末端および/またはC末端に任意の比率で分配された1~12の付加的アミノ酸を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる少なくとも1つの制御性T細胞エプトープをコードする核酸(DNAまたはRNA)を有するベクターに関し、ここで、配列番号: 1~29および42~107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。態様では、本開示は、本開示のベクターを有する細胞に関する。態様では、細胞は、哺乳動物細胞、細菌細胞、昆虫細胞、または酵母細胞であることができる。

10

【0157】

本開示の核酸は、一本鎖または二本鎖のDNA(限定されるものではないがcDNAを含む)またはRNA(限定されるものではないがmRNAを含む)であってよい。核酸は、典型的には、DNAまたはRNA(mRNAを含む)である。核酸は、この分野で周知の技術、例えば、免疫原性ポリペプチドをコードする配列の合成、またはクローニング、または増幅;細胞膜アドレッシング配列をコードする配列の合成、またはクローニング、または増幅;配列のライゲーションおよび適切なベクターおよび細胞内でのそのクローニング/増幅により生成されてよい。本明細書に記載された1つ以上のペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、および/またはキメラもしくは融合ポリペプチドを全部または部分的にコードする、本明細書に提供される核酸(RNA、DNA、ベクター、ウイルスまたはこれらのハイブリッドのいずれか)は、多様な供給源から単離され、遺伝子操作され、増幅され、合成により生成され、かつ/または組換え的に発現/生成することができる。これらの核酸から生成された組換えポリペプチドは、個別に単離されるかまたはクローニングされ、所望の活性について試験することができる。任意の組換え発現系を使用することができ、例えば、インビトロ、細菌、真菌、哺乳動物、酵母、昆虫または植物細胞の発現系が含まれる。態様では、本明細書に提供される核酸は、周知の化学合成技術によりインビトロで合成される(例えば、Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105: 661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7 886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; 米国特許第4, 458, 066号明細書に記載されている、これらの全ては、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる)。さらに、本明細書に提供された核酸の操作のための技術、例えば、サブクローニング、ラベリングプローブ(例えば、クレノウポリメラーゼを用いたランダムプライマーラベリング、ニックトランスレーション、増幅)、配列決定、ハイブリダイゼーション等は、科学文献および特許文献に十分に記載されている(例えば、Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993)参照、これらの全ては、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる)。

20

30

40

【0158】

本開示の別の目的は、本明細書に記載された1つ以上のペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、および/またはキメラもしくは融合ポリペプチドをコードする核酸分子に関する。核酸は、本明細書に記載された1つ以上のペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、および/またはキメラもしくは融合ポリペプチドを、インビトロまたはインビボで生成するため、または表面上にポリペプチドを発現する細胞を生成するため、

50

または活性剤が核酸であるかまたは核酸を含むベクターであるワクチンを生成するために使用されてよい。核酸は、例えば、一本鎖および／または二本鎖のいずれかのDNA、cDNA、PNA、CNA、RNA、またはこの分野で公知のポリヌクレオチドの天然のまたは安定化された形態であってよい。

【0159】

前述のように、本開示による核酸分子は、核酸分子自体、例えば裸の核酸分子；プラスミド、ベクター；ウイルスまたは原核生物もしくは真核生物由来の宿主細胞等の形態で提供されてよい。ベクターは、本発明の核酸分子を含む発現ベクターを含む。ポリペプチドを発現することが可能である発現ベクターは、調製することができる。異なる細胞型についての発現ベクターは、この分野で周知であり、過度な実験なしに選択することができる。一般に、（例えば、cDNA、またはRNA、mRNAを含む）は、発現ベクター、例えばプラスミド内へ、発現のために適切な向きでかつ正しい読み枠に挿入される。必要な場合に、DNA（例えば、cDNA、またはRNA、mRNAを含む）は、所望の宿主（例えば、細菌）により認識される適切な転写制御性および翻訳制御性の調節ヌクレオチド配列に連結されてよいが、このような調節は、一般に、発現ベクターにおいて利用可能である。次いで、ベクターは、標準技術を用いてクローニングのための宿主細菌内に導入される。本発明のベクターは、例えば、転写プロモーター、および／または転写ターミネーターを有してよく、プロモーターは、核酸分子と作動的に連結されていて、核酸分子は、転写ターミネーターと作動的に連結されている。本開示の1つ以上のペプチドまたはポリペプチドは、単一の発現ベクターによりコードされていてよい。このような核酸分子は、例えばDNA／RNAワクチンの形態で、インビボで、ペプチド／ポリペプチドを必要とする被験体に輸送するための輸送媒体として作用してよい。

【0160】

態様では、ベクターは、先に定義された核酸を有するウイルスベクターであってよい。ウイルスベクターは、多様な種類のウイルス、例えば、豚痘、鶏痘、仮性狂犬病、オーエスキーウイルス、サルモネラ、ワクシニアウイルス、BHV（ウシヘルペスウイルス）、HVT（トルコヘルペスウイルス）、アデノウイルス、TGEV（伝染性胃腸炎コロナウイルス）、エリスロウイルス、およびSIV（サル免疫不全症候群ウイルス）から誘導されてよい。他の発現システムおよびベクター、例えば酵母細胞中で複製および／または統合されるプラスミドも、同様に使用されてよい。

【0161】

本開示は、本開示のペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、および／またはキメラもしくは融合ポリペプチドを準備する方法にも関し、この方法は、核酸の発現に適した条件下で先に定義された核酸またはベクターを含む宿主細胞を培養し、ポリペプチドを回収するステップを有する。先に示すように、タンパク質およびペプチドは、この分野で自公知の技術によって精製されてよい。

【0162】

態様では、本開示のレトロインベルソトレグトープ化合物または組成物（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド（これは、本明細書では、「Treg活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ」、「レトロインベルソトレグトープ」、または「レトロインベルソ制御性T細胞エピトープポリペプチド」と言われてよい）、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除いて、D型アミノ酸配置である；本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチド；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、または細胞；本明細書に開示されたキメラまたは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細

書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上を含む)は、抗原、アレルゲン、または治療性タンパク質との混合物の形で組み合わせられる。このような組成物は、寛容の誘導が必要な被験体に、抗原、アレルゲン、または治療性タンパク質に対して寛容を誘導する方法において有用であり、抗原、アレルゲン、または治療性タンパク質との混合物の局所的輸送は、被験体内での抗体またはアレルゲンに対して増大する寛容を引き起こし、適切な付形剤と一緒に輸送され、抗原、アレルゲン、または治療性タンパク質に対する寛容が誘導される。この組合せは、共有結合または非共有結合した本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物と共に投与されてよい、またはこれらは、混合物として、または分枝したまたは化学的連結された調製物として投与されてよい。このような組成物は、抗原、アレルゲン、または治療性タンパク質に対して寛容を誘導する方法において有用である。例えば、このような組成物は、このような組成物を必要とする被験体において有用であり、抗原またはアレルゲンまたは治療性タンパク質との混合物の局所的輸送は、被験体内での抗原またはアレルゲンまたは治療性タンパク質に対して増大する寛容を引き起こし、適切な付形剤と共に輸送され、抗原またはアレルゲンまたは治療性タンパク質に対する寛容を誘導する。この組合せは、共有結合または非共有結合した本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物と共に投与されてよく、または混合物として投与されてよい。

10

【0163】

医薬組成物および調製物

態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物(例えば、本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチド;本明細書に開示されたコンカテマーペプチド;本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物;本明細書に開示されたペプチド、ポリペプチド、コンカテマーペプチド、またはキメラもしくは融合ポリペプチド組成物をコードする核酸を含む本明細書に開示された核酸;本明細書に開示された発現カセット、プラスミド、発現ベクター、および組換えウイルス、または細胞の1つ以上を含む;以後「本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物」と言う)は、医薬組成物または調製物中に含まれていてよい。態様では、医薬組成物または調製物は、一般に、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物または組成物および製剤学的に許容可能な担体および/または付形剤を有する。態様では、前記医薬組成物は、投与に適している。製剤学的に許容可能な担体および/または付形剤は、投与される特別な組成物によりならびに組成物を投与するために使用される特別な方法により、部分的に決定される。したがって、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物を投与するための医薬組成物の多様な種類の適切な調製剤が存在する(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, (18TH Ed, 1990), Mack Publishing Co., Easton, PA Publ参照)。態様では、医薬組成物は、一般に、滅菌で、実質的に等張で、かつ米国食品医薬品局の全ての医薬品最適製造基準(GMP)に完全に準拠して調製される。

20

30

【0164】

「製剤学的に許容可能」、「生理学的に許容可能」およびその文法上の変化形の用語は、これらが、組成物、担体、付形剤、および試薬を指す場合、交換可能に使用され、これらの材料は、組成物の投与を妨げる程度の不所望な生理学的効果を生じることなしに被験体に対してまたは被験体に関して投与することが可能であることを表す。例えば、「製剤学的に許容可能な付形剤」は、例えば、一般に、安全で、無毒で、望ましい医薬組成物を調製する際に有用である付形剤を意味し、獣医学的用途のためならびにヒト医薬用途のために許容可能である付形剤を含む。このような付形剤は、固体、液体、半固体であるか、またはエアロゾル組成物の場合には、気体であることができる。当業者は、本開示の特別なレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物について、投与の適切なタイミング、順序および用量を決定することができる。本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物の用量は、治療されるべき動物(例えば、ヒト)の種類、種族、年齢、サイズ、治療履歴、および健康状態、ならびに投与経路、例えば、皮下、皮内、経口、筋肉内または静脈内投与に依存する。本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組

40

50

成物は、一回量としてまたは繰り返し用量で投与することができる。本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、単独で投与することができるか、または1つ以上の他の組成物、例えば他のブタ免疫原性組成物またはワクチン組成物と同時に投与するかまたは順次に投与することができる。組成物が異なる時間に投与される場合、投与は、時間的に別々でもまたは重複してもよい。

【0165】

製剤学的に許容可能な担体、付形剤または希釈剤の例は、限定されるものではないが、脱塩水または蒸留水；食塩水；植物性油、例えばピーナッツ油、落花生油、サフラワー油、オリーブ油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、またはココナッツ油；シリコーン油、ポリシロキサン、例えばメチルポリシロキサン、フェニルポリシロキサンおよびメチルフェニルポリシロキサンを含める；揮発性シリコーン；鉱物油、例えば軽質流動パラフィン油、または重質流動パラフィン油；スクアラン；セルロース誘導体、例えばメチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース；低級アルカノール、例えばエタノールまたはイソプロパノール；低級アラルカノール；低級ポリアルキレングリコールまたは低級アルキレングリコール、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコールまたはグリセリン；脂肪酸エステル、例えばパルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピルまたはオレイン酸エチル；ポリビニルピロリドン；寒天；カラギナン；トラガカン

10

20

【0166】

態様では、このような担体または希釈剤の好ましい例は、限定されるものではないが、水、食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンを含む。リボソームおよび非水性輸送媒体、例えば不揮発性油も使用することができる。製剤学的活性物質のためのこのような媒体および化合物の使用は、この分野で周知である。任意の慣用の媒体または化合物が、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物と配合禁忌である場合を除き、先に記載されたように、組成物中でのその使用が考えられる。補足的活性化合物も、組成物中へ組み込まれることができる。

30

【0167】

アジュバントの例は、限定されるものではないが、水中油エマルション、水酸化アルミニウム（ミョウバン）、免疫刺激性複合体、非イオン性ブロックポリマーまたはコポリマー、サイトカイン（例えば、IL-1、IL-2、IL-7、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 等）、サポニン、モノホスホリルリポドA（MLA）、ムラミルジペプチド（MDP）等を含む。他の適切なアジュバントは、例えば、硫酸アルミニウムカリウム、大腸菌（*Escherichia coli*）から単離された易熱性または熱安定性エンテロトキシン、コレラトキシンまたはそのBサブユニット、ジフテリアトキシン、テタヌストキシン、百日咳トキシン、フロインド不完全または完全アジュバント等を含む。トキシンに基づくアジュバント、例えばジフテリアトキシン、テタヌストキシンおよび百日咳トキシンは、使用の前に、例えばホルムアルデヒドで処理することにより不活性化されてよい。別のアジュバントは、限定されるものではないが、poly-ICLC、1018 ISS、アルミニウム塩、Amplivax、AS 15、BCG、CP-870, 893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、Imiquimod、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCO MATRTX、Juvlmmune、LipoVac、MF59、monophosphoryl lipid A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA 51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PE

40

50

PTEL、ベクターシステム、PLGA微小粒子、resiquimod、SRL172、ピロソームおよび他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGF trap、R848、ベータグルカン、Pam3Cys、およびAquila's QS21 stimulationを含んでよい。本明細書に開示された医薬組成物またはワクチンの態様では、アジュバントは、poly-ICLCを有する。TLR9アゴニストCpGおよび合成二本鎖RNA(dsRNA)TLR3リガンドpoly-ICLCは、現在の臨床開発における最も有望なワクチンアジュバントの2つである。前臨床研究では、poly-ICLCは、LPSおよびCpGと比べた場合、最も強いTLRアジュバントであると思われる。これは、炎症誘発性サイトカインの誘導およびIL-10刺激の欠如、ならびにDCにおける高レベルの共刺激分子の維持によると思われる。poly-ICLCは、ポリリジンおよびカルボキシメチルセルロースの添加により熱変性および血清ヌクレアーゼによる加水分解に対して安定化された平均長さが約5000ヌクレオチドのpoly I鎖およびpoly C鎖からなる合成的に生成された二本鎖RNAである。この化合物は、TLR3およびMDA5のRNAヘリカーゼドメインを活性化し、この2つは、PAMPファミリーのメンバーであり、DCおよびナチュラルキラー(NK)細胞の活性化およびI型インターフェロン、サイトカイン、およびケモカインの混合産生を引き起こす。

10

【0168】

凍結乾燥安定剤の例は、例えば、炭水化物、例えばソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、デキストランまたはグルコース、タンパク質、例えばアルブミンまたはカゼイン、およびそれらの誘導体であってよい。

20

【0169】

態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物または組成物は、その意図する投与経路に適合するように製剤化される。本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、腸管外、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、皮内、経皮、直腸、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、鼻腔内；腔；筋肉内経路によりまたは吸入薬として投与することができる。態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、沈着物が堆積された特別な組織内へ直接注射することができる、例えば頭蓋内注射。別の態様では、筋肉注射または静脈内注入は、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物のために使用されてよい。幾つかの方法では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、頭蓋内へ直接注射される。幾つかの方法では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、徐放性組成物またはデバイスとして、例えば、限定されるものではないが、Medipad(商標)デバイスとして投与される。態様では、本開示のレトロインベルソT細胞エпитープ化合物および組成物は、例えば市販の無針高圧デバイス、例えばPulse NeedleFree技術(Pulse 50TM Micro Dose Injection System, Pulse NeedleFree Systems; Lenexa, KS, USA)を用いることにより皮内で投与される。態様では、前記市販の無針高圧デバイス(例えば、Pulse NeedleFree技術)は、以下の利点の1つ以上を付与する：非侵襲性、組織外傷の低減、痛みの低減、被験体内に組成物を堆積させるために皮層内での小さな開口部の必要性(例えば、微細な皮膚開口部だけを必要とする)、組成物の即時分散、組成物のより良好な吸収、組成物に対するより大きな皮膚暴露、および／または鋭利物による損傷のリスクの軽減。

30

40

【0170】

態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、場合により、本明細書に記載された多様な医学的症状の処置において、少なくとも部分的に有効である他の薬剤と組み合わせて投与することができる。例えば、被験体の中央神経系中への投与の場合では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、脳関門を通じた本発明の薬剤の通過を増大させる他の薬剤と共に投与することもできる。

【0171】

態様では、腸管外、皮内、または皮下適用のために使用する溶液または懸濁液は、限定されるものではないが、以下の成分を含むことができる：滅菌希釈剤、例えば注射用水、

50

食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌性化合物、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート化合物、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）；緩衝剤、例えばアセタート、シトラートまたはホスファート、および張性を調節するための化合物、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロース。pHは、酸または塩基、例えば塩酸または水酸化ナトリウムで調節されることができる。付形剤の例は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、水、エタノール、DMSO、グリコール、プロピレン、乾燥脱脂乳等を含むことができる。組成物はまた、pH干渉試薬、および湿潤剤または乳化剤を含むことができる。

10

【0172】

態様では、腸管外調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは多数回投与バイアル内に封入することができる。

【0173】

態様では、注射可能な使用のために適した医薬組成物または調製物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および滅菌注射用溶液または分散液を即座に調製するための滅菌粉末を含む。静脈内投与のために、適切な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor ELTM（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）を含む。全ての場において、組成物は、滅菌であり、容易に注射可能で存在する程度に流動性であるべきである。これは、製造および貯蔵の条件下で安定であり、微生物、例えば細菌および真菌の汚染活動に対して保護される。態様では、レトロインベルソトレギトープ調製物は、凝集体、断片、分解生成物および翻訳後修飾を含んでいてよく、これらの不純物がHLAに結合し、同族のT細胞と同じTCR面を提示する限り、純粋なレトロインベルソトレギトープと同様の様式で機能することが予想される。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリコール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、およびこれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒体であることができる。適切な流動性は、例えば、コーティング、例えばレシチンの使用によるか、分散液の場合に必要な粒子サイズの維持によるか、界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の活動の予防は、多様な抗菌性および抗真菌性化合物、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等により達成することができる。多くの場合では、これは、組成物中に等張化合物、例えば、糖類、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射組成物の延長された吸収は、組成物中に吸収を遅らせる化合物、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含ませることによりもたすことができる。

20

30

【0174】

態様では、滅菌注射溶液は、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物を必要量で、先に列挙された成分の1つまたは組合せを有する適切な溶媒中に組み込み、必要な場合に、濾過により滅菌することにより調製することができる。一般に、分散液は、結合剤を、基本的な分散媒体および先に列挙されたものからの必要な他の成分を含む滅菌輸送媒体に組み込むことにより調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合では、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、予め滅菌濾過されたその溶液から活性成分と任意付加的な所望の成分との粉末が得られる。さらに、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、活性成分の持続的または拍動的な放出を可能にする方法で調製することができるデポー注射または植込み調製物の形態で投与することができる。

40

【0175】

態様では、経口組成物は一般に、不活性希釈剤または食用担体を含み、ゼラチンカプセル内に封入するか、錠剤に圧縮することができる。態様では、経口治療投与の目的で、結合剤は、付形剤と混合し、錠剤、トローチ剤またはカプセル剤の形態で使用することができる。経口組成物は、マウスウォッシュとしての使用のための液体担体を使用して調製す

50

ることもでき、液体担体中の化合物は、経口で適用され、すすがれるか、吐き出されるかまたは飲み込まれる。製剤学的に許容可能な結合化合物、および／またはアジュバント材料は、組成物の一部として含まれていることができる。態様では、錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤等は、以下の成分のいずれか、または同様の性質の化合物を含むことができる：結合剤、例えば微結晶セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチン；付形剤、例えばデンプンまたはラクトース、崩壊性化合物、例えばアルギン酸、Primogelまたはコーンスターチ；潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムまたはSterotes；滑剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素；甘味化合物、例えばスクロースまたはサッカリン；または香料化合物、例えばペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジ香料。

【0176】

吸入による投与のために、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、適切な噴射剤、例えばガス、例えば二酸化炭素、または噴霧器を含む加圧容器またはディスペンサーからエアロゾルスプレーの形態で噴射することができる。

【0177】

態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の全身性投与は、経粘膜的または経皮的手段により行うこともできる。経粘膜または経皮投与について、透過されるべきバリアに適した浸透剤が、調製剤中に使用される。このような浸透剤は、概してこの分野で周知であり、例えば、経粘膜投与について、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、点鼻スプレーまたは坐剤を用いることで達成することができる。経皮投与について、レトロインベルソTレギトープは、軟膏剤、軟膏、ゲル、またはクリーム中に製剤化されてよく、この分野で周知の局所的または経皮パッチ技術により適用されてよい。

【0178】

態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、坐剤（例えば、慣用の坐剤基剤、例えばココアバターおよび他のグリセリドを用いて）または直腸輸送のための持続性浣腸剤の形態に調製することもできる。

【0179】

態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物を身体からの急速な排出に対して保護する担体、例えば、インプラントおよびマイクロカプセル化デリバリーシステムを含む制御性放出調製剤を用いて調製される。生分解性、生体適合性ポリマーは、例えば、エチレンビニルアセタート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を使用することができる。このような調製剤の調製方法は、当業者には明らかである。材料はまた、例えばAlza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc.から商業的に得ることもできる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染細胞を標的とするリポソームを含む）も、製剤学的に許容可能な担体として使用することができる。これらは、当業者に公知の方法により調製することができる（米国特許第4,522,811号明細書、これは、参照によりこの全体として本明細書に組み込まれる）。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、所望な部位でのレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の徐放を可能にするバイオポリマー固体支持体内に埋め込むかまたはそれに連結することができる。

【0180】

態様では、これは、投与の容易性および用量の均一性のための用量単位形態で経口または腸管外組成物を製剤化するために特に有利である。本明細書で使用される用量単位形態は、処置される被験体のための単位用量として適した物理学的に個別の単位を指し、各単位は、必要な製剤学的担体との関連で所望の治療効果を生じるように計算された予定量の結合剤を含む。本開示の用量単位形態についての詳細は、結合剤の固有の特性および達成されるべき特別な治療効果、および被験体の処置のためのレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の配合の技術における固有の制限により指定されかつこれに直接依存する。

10

20

30

40

50

【0181】

態様では、本明細書に開示された1つ以上のポリペプチド（例えば、態様では、単離されるか、合成されるか、または組み換えられてよい T r e g 活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド）は、Tレギトープを有する単離された樹状細胞（DC）のエキスビボでパルスングし、引き続き、パルスされた細胞を患者に再注入することにより患者に投与することもできる。これらは、当業者に公知の方法により調製することができる（Butterfield, (2013), Front Immunol, 4:454 and Dissanayake et al., (2014), PLoS One, 9(3)1-10）。これらの再注入は、上述の方法および組成物により投与されてよい。

10

【0182】

本明細書に記載された医薬組成物の態様では、組成物は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19または少なくとも20の本開示のレトロインベルソペプチドまたはポリペプチド（コンカテマーポリペプチドを含む）またはこのようなレトロインベルソペプチドまたはポリペプチド（コンカテマーポリペプチドを含む）をコードする核酸を有してよい。例えば、態様では、医薬組成物は、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるアミノ酸配列および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸；本明細書に開示されたコンカテマーペプチド；および本明細書に開示されたペプチド、ポリペプチド、またはコンカテマーペプチド、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体をコードする核酸（例えば、RNA、mRNA、DNA、cDNA）を有する1つ以上のペプチドまたはポリペプチドを有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20のレトロインベルソペプチドまたはポリペプチド（40までのペプチドまたはポリペプチドを含む）を有することができ、それらの間の任意の値または範囲が含まれ、ここで、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である。

20

30

【0183】

態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物（本明細書で開示された医薬組成物または調製物を含む）は、抗原、アレルゲン、または治療性タンパク質と混合した形で組み合わせられる。このような組成物は、寛容の誘導が必要な被験体に、抗原、アレルゲン、または治療性タンパク質に対して寛容を誘導する方法において有用であり、抗原、アレルゲン、または治療性タンパク質との混合物の局所的輸送は、被験体内での抗体またはアレルゲンに対して増大する寛容を引き起こし、適切な付形剤と一緒に輸送され、抗原、アレルゲン、または治療性タンパク質に対する寛容が誘導される。この組合せは、共有結合または非共有結合した本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物と共に投与されてよく、またはこれらは、混合物として、または分枝したまたは化学的連結された調製物として投与されてよい。このような組成物は、抗原またはアレルゲンまたは治療性タンパク質に対する寛容を誘導する方法において有用である。例えば、このような組成物は、このような組成物を必要とする被験体において有用であり、抗原またはアレルゲンまたは治療性タンパク質との混合物の局所的輸送は、被験体内での抗原またはアレルゲンまたは治療性タンパク質に対して増大する寛容を引き起こし、適切な付形剤と共に輸送され、抗原またはアレルゲンまたは治療性タンパク質に対する寛容を誘

40

50

導する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、T細胞依存的に治療性血液凝固タンパク質に対する免疫応答を抑制する目的で、治療性血液凝固タンパク質と組み合わせられる。この組合せは、共有結合または非共有結合した本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物と投与されてよい、または混合物として投与されてよい。このような組成物は、治療性血液凝固タンパク質に対する寛容が必要な被験体内で、治療性血液凝固タンパク質に対する寛容を誘導する方法において有用であり、治療性血液凝固タンパク質との混合物の局所的輸送は、被験体内の治療性血液凝固タンパク質に対する増大する寛容を引き起こし、適切な付形剤と共に輸送され、治療性血液凝固タンパク質に対する寛容を誘導する。

【0184】

レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物の使用方法

本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の1つ以上を有するか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である；本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチド；本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、または細胞；本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物；および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上を含む）を用いた制御性T細胞の刺激は、対応する天然に生じるT_{Reg}集団（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む）を刺激するか、誘導するかまたは増殖させ、態様では、次のサイトカインおよびケモカイン：IL-10、IL-35、TGF-β、TNF-αおよびMCP1の1つ以上の増大する分泌を引き起こすことができる。制御性サイトカインおよびケモカインのこの増大する分泌は、制御性T細胞の顕著な特徴である。態様では、刺激は、対応する天然に生じるT_{Reg}集団（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む）によるIL-2Rαの増大する発現およびエフェクターT細胞へのIL-2の剥奪を引き起こすことができる。他の態様では、刺激は、対応する天然に生じるT_{Reg}集団（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む）による増大するパーフォリングランザイムを引き起こすことができ、このようなT_{Reg}集団がTエフェクター細胞または他の免疫刺激細胞を殺傷することを可能にする。さらに他の態様では、このような刺激は、対応する天然に生じるT_{Reg}集団（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む）による免疫抑制アデノシンの生成を引き起こすことができる。別の態様では、このような刺激は、樹状細胞上の共刺激分子に結合およびこれを除去し、樹状細胞機能の阻害を引き起こす対応する天然に生じるT_{Reg}集団（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む）を引き起こすことができる。さらに、態様では、このような刺激は、対応する天然に生じるT_{Reg}集団（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む）により、樹状細胞および他の細胞集団、例えば限定されるものではないが、内皮細胞上のチェックポイント分子のT_{Reg}誘導アップレギュレーションを引き起こすことができる。付加的態様では、このような刺激は、B制御性細胞のT_{Reg}刺激を引き起こすことができる。B制御性細胞（「B-reg」）は、CD1d、CD5の発現およびIL-10の分泌により特徴付けられる抗炎症効果の原因となる細胞である。B-regは、Tim-1の発現により確認され、Tim-1ライゲーションにより誘導されて、寛容を促進することができる。B-regの能力は、多くの刺激因子、例えば toll 様受容体、CD40リガンド等により駆動されることが示された。しかしながら、B-regの完全な特性決定は、進行中である。B-regはまた、高レベルのCD25、CD86、およびTGF-βを発現する。制御性T細胞による制御性サイト

10

20

30

40

50

カインおよびケモカインの増大する分泌、ならびに上述の他の活性は、制御性T細胞の顕著な特徴である。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物により活性化された制御性T細胞は、CD4+CD25+FOXP3表現型を表してよい。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物により活性化された制御性T細胞は、CD4+CD25+Foxp3+表現型を表してよい。本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物により活性化された制御性T細胞は、低減された抗原特異性Th1-またはTh2-関連サイトカインレベル、主にINF-γ、IL-4、およびIL-5により、かつCFSE希釈および／または細胞溶解活性により測定されるような抗原特異性Tエフェクター細胞の低減された増殖および／またはエフェクター機能により測定されるエクスピボでのTエフェクター免疫応答を直接抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物により活性化される制御性T細胞は、低減された抗原特異性Th1-またはTh2-関連サイトカインレベル（Elisaアッセイにより測定）、低減された抗原特異性Tエフェクター細胞レベル（Elispotアッセイにより測定）、低減された細胞溶解活性、および／またはタンパク質抗原に関する低減された抗体価により測定されるインピボでのTエフェクター免疫応答を直接抑制する。

10

【0185】

態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物により活性化されたナチュラル制御性T細胞は、適応性TReg細胞の発生を刺激する。態様では、抗原の存在で末梢T細胞を本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物と一緒に共培養することは、抗原特異性CD4+／CD25+T細胞の増殖を引き起こし、これらの細胞内でFoxp3遺伝子またはFoxp3タンパク質の発現をアップレギュレーションし、インピボで抗原特異性Tエフェクター細胞の活性化を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、T制御性1型（Tr1）細胞の活性化および／または増殖を引き起こしてよい。Tr1細胞は、幾つかの免疫介在疾患において強力な免疫抑制能力を有する（Roncarolo and Battaglia, 2007, Nat Rev Immunol 7, 585-598; Roncarolo et al., 2011, Immunol Rev 241, 145-163; Pot et al., 2011, Semin Immunol 23, 202-208）。高レベルのIL-10の分泌、およびグランザイムBを介した骨髄性抗原提示細胞（APC）の殺傷は、Tr1媒介抑制の主要なメカニズムである（Groux et al., 1997, Nature 389, 737-742; Magnani et al., 2011 Eur J Immunol 41, 1652-1662）。Tr1細胞は、その独自のサイトカインプロファイルおよび制御性機能によりTヘルパー（TH）1、TH2、およびTH17細胞とは区別される。Tr1細胞は、それぞれTH2およびTH17細胞の顕著な特徴のサイトカインであるIL-4およびIL-17よりも高レベルのIL-10を分泌することが示された。Tr1細胞は、低レベルのIL-2を分泌することもでき、局所的サイトカイン環境に依存して、共に重要なTH1サイトカインである多様なレベルのIFN-γを産生することができる（Roncarolo et al., 2011, Immunol Rev 241, 145-163）。FOXP3は、この発現が低く、活性化の際に一時的であるため、Tr1細胞に対するバイオマーカーではない。IL-10産生Tr1細胞は、ICOS（Haringer et al., 2009, J Exp Med 206, 1009-1017）およびPD-1（Akdis et al., 2004, J Exp Med 199, 1567-1575）を発現するが、これらのマーカーは特異的ではない（Maynard et al., 2007, Nat Immunol 8, 931-941）。超後期活性抗原（VLA）-2のα2インテグリンサブユニットであるCD49aは、IL-10産生T細胞のためのマーカーとして提案された（Charbonnier et al., 2006, J Immunol 177, 3806-3813）；しかしながらこれは、ヒトTH17細胞によっても発現される（Boisvert et al., 2010, Eur J Immunol 40, 2710-2719）。さらに、マウスCD49b⁺T細胞は、IL-10を分泌するが（Charbonnier et al., 2006, J Immunol 177, 3806-3813）、炎症誘発性サイトカインも分泌する（Kassiotis et al., 2006, J Immunol 177, 968-975）。MHCクラスII分子に高親和性で結合するCD4相同体であるリンパ球活性化遺伝子-3（LAG-3）は、マウスIL-10

20

30

40

50

産生 $CD4^+$ T細胞により発現されるが (Okamura et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106, 13974-13979)、活性化されたエフェクター T細胞 (Workman and Vignali, 2005, J Immunol 174, 688-695; Bettini et al., 2011, J Immunol 187, 3493-3498; Bruniquel et al., 1998, Immunogenetics 48, 116-124; Lee et al., 2012, Nat Immunol 13, 991-999) および $FOXP3^+$ 制御性 T細胞 (Treg) (Camisaschi et al., 2010, J Immunol 184, 6545-6551) によっても発現される。最近ではヒト $Tr1$ 細胞が $CD226$ (DNAM-1) を発現することが示され、これは、骨髄性 APC の特異的な殺傷に関与する (Magnani et al., 2011 Eur J Immunol 41, 1652-1662)。他の態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、 $TGF-\beta$ 分泌 $Th3$ 細胞、制御性 NK T細胞、制御性 $CD8^+$ T細胞、ダブルネガティブ制御性 T細胞の活性化および／または増殖を引き起こしてよい。「 $Th3$ 細胞」は、次の表現型 $CD4^+ FoxP3^+$ を有し、活性化の際に高レベルの $TGF-\beta$ 、多量の $IL-4$ および $IL-10$ の分泌が可能であり、 $IFN-\gamma$ または $IL-2$ を分泌しない細胞を指す。これらの細胞は、 $TGF-\beta$ 由来である。「制御性 NK T細胞」は、静止時に次の表現型 $CD161^+ CD56^+ CD16^+$ および $V\alpha 24 / V\beta 11$ TCR を有する細胞を指す。「制御性 $CD8^+$ T細胞」は、静止時に次の表現型 $CD8^+ CD122^+$ を有し、活性化の際に高レベルの $IL-10$ の分泌が可能である細胞を指す。「ダブルネガティブ制御性 T細胞」は、静止時に次の表現型 $TCR\alpha\beta^+ CD4^- CD8^-$ を有する細胞を指す。

10

20

【0186】

態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、モノクローナル抗体、タンパク質治療薬、自己免疫応答を促進する自己抗原、アレルゲン、移植組織に対する免疫応答の制御のため、かつ寛容が好ましい転帰である他の適用において有用である。

【0187】

態様では、本開示のレトロインベルソトレギトープは、MHCクラスII分子に結合し、MHCクラスII分子との関連でTCRに係合しかつ／または天然に生じるTreg (態様では、ナチュラルTregおよび／または適応性Tregを含む) を活性化することができる。

【0188】

免疫応答の抑制を必要とする被験体中の免疫応答の抑制。態様では、本開示は、制御性 T細胞 (態様では、天然で生じるTreg、ナチュラルTregおよび／または適合性Tregを含む) の刺激、誘導、および／または増殖が必要な被験体にかつ／または免疫応答の抑制が必要な被験体に、治療的有効量の本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物 (例えば、本明細書に開示された配列番号: 1~29 および 42~107 の1つ以上を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる配列 (および／またはそれらの断片およびそれらの変異体)、ならびに場合により、配列番号: 1~29 および 42~107 のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1~12の付加的アミノ酸を有するレトロインベルソポリペプチド、ここで、本明細書に開示された配列番号: 1~29 および 42~107 (および態様では、それらの場合による延長物) のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である; 本明細書に開示されたレトロインベルソポリペプチドを含むポリペプチド; 本明細書に開示された核酸、発現カセット、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、または細胞; 本明細書に開示されたキメラもしくは融合ポリペプチド組成物; および／または本明細書に開示された医薬組成物または調製物の1つ以上を含む) を被験体に投与することにより制御性 T細胞を刺激する、誘導する、かつ／または増殖させる方法および／または免疫応答を抑制する方法に関する。

30

40

【0189】

態様では、本開示は、免疫応答の抑制を必要とする被験体内の免疫応答を抑制するために、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物の治療的有効量を被験体

50

に投与することにより、制御性T細胞（例えば、天然に生じるT_{Reg}（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含む））を刺激／誘導する、かつ／または増殖させる方法に関する。態様では、免疫応答は、少なくとも1つの治療性タンパク質による1つ以上の治療的処置、ワクチンによる処置（特にワクチン接種により有害事象が発生した状況において）、または少なくとも1つの抗原による処置の結果である。別の態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の投与は、1つ以上の抗原提示細胞を制御性表現型にシフトさせ、1つ以上の樹状細胞を制御性表現型にシフトさせ、樹状細胞または他の抗原提示細胞内でのCD11cおよびHLA-DR発現を低減する。

【0190】

態様では、本開示は、治療的に有効量の本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物を投与するステップを有する、被験体内での免疫応答を抑圧／抑制する方法に関し、このレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、免疫応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、先天的免疫応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、適応性免疫応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、エフェクターT細胞応答（例えば、エフェクトCD8⁺T細胞）を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、メモリーT細胞応答（例えば、CD4⁺および／またはCD8⁺メモリーT細胞応答）を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、ヘルパーT細胞応答（例えば、CD4⁺ヘルパーT細胞応答）を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、B細胞応答を抑圧／抑制する。態様では、レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、nkT細胞応答を抑圧／抑制する。

【0191】

態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の治療有効量の投与により、被験体内の免疫応答、特に抗原特異的免疫応答を抑制する方法に関し、前記レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、天然に生じるT_{Reg}（態様では、天然のT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含み、かつ態様では、CD4⁺／CD25⁺／FoxP3⁺制御性T細胞）を活性化するか、またはCD4⁺T細胞の活性化、CD4⁺および／またはCD8⁺T細胞の増殖を抑制し、かつ／またはβ細胞もしくはnkT細胞の活性化または増殖を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物は、特異的標的抗原と共有結合しているか、非共有結合しているか、または混合した形のいずれかであってよい。特別な態様では、例えば、ポリペプチド（T_{Reg}活性化レトロインベルソ制御性T細胞エピトープ、レトロインベルソTレギトープ、またはレトロインベルソT細胞エピトープポリペプチド、これらは、態様では、単離され、合成され、または組み換えられていてよい）および／または本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物のキメラもしくは融合ポリペプチド組成物の1つ以上は、特異的標的抗原と共有結合、非共有結合、または混合した形のいずれかであってよい。態様では、特異的標的抗原と共有結合しているか、非共有結合しているか、または混合した形である本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の投与は、標的抗原に対する免疫応答の低減を引き起こす。

【0192】

態様では、標的抗原は、自己タンパク質またはタンパク質断片であってよい。態様では、標的抗原は、アレルゲンであってよい。態様では、標的抗原は、同種異系タンパク質またはタンパク質断片であってよい。態様では、標的抗原は、生物製剤またはその断片であってよい。態様では、抑制効果は、ナチュラルT_{Reg}により媒介される。態様では、抑制効果は、適応性T_{Reg}によって媒介される。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物中に含まれる1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、エフェクターT細胞応答を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、先天性免疫応答を

10

20

30

40

50

抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、適応性免疫応答を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、エフェクターT細胞応答（例えば、エフェクトCD8+T細胞）を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、メモリーT細胞応答（例えば、CD4+および／またはCD8+メモリーT細胞応答）を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、ヘルパーT細胞応答（例えば、CD4+ヘルパーT細胞応答）を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の1つ以上のTレギトープは、β細胞応答を抑制する。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の1つ以上のレトロインベルソTレギトープは、nkT細胞応答を抑制する。

10

【0193】

小分子治療薬の設計。一態様では、本開示は、小分子治療薬を設計する目的で本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物を使用する方法を提供する。一態様では、レトロインベルソTレギトープ特異的T細胞は、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で小分子混合物のプールおよび自己樹状細胞（DC）を用いて2週間間隔で3回刺激され、引き続き異種DCおよび抗原で刺激する。T細胞（ 1.25×10^5 ）およびDC（ 0.25×10^5 ）を、丸底の96ウェルプレート中にウェルごとに添加する。T細胞培地は、500mlのRPMI培地1640に、50mlのFCS（HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT）、ペニシリン、およびストレプトマイシン（GIBCO Laboratories, Gaithersburg, MD）；20mMのヘペス（GIBCO）；および4mlの1N NaOH溶液を補充することにより作製されてよい。IL-2濃度は、最初に0.1nMおよび引き続く刺激のラウンドの間に徐々に1nMまで増加する。T細胞クローンは、 0.6×10^5 のエプスタイン-バーウイルス形質転換B細胞（100グレイ）およびフィーダー細胞として 1.3×10^5 の異種末梢血単核細胞（33グレイ）および2nMのIL-2を含む培地中で $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のDifco（商標）フィトヘマグルチニン（Bacterius Ltd, Houston, TX）を使用することによる限界希釈により誘導される。Tレギトープ特異的T細胞を刺激する小分子プールを、次いで、個別の分子として試験する。

20

【0194】

T細胞受容体のクローニング。態様では、本開示は、T細胞受容体をクローニングする目的で、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物を使用する方法を提供する。レトロインベルソTレギトープ特異的T細胞のクローニングは、当業者に公知の技術により行うことができる。例えば、単離されたPBMCは、20% HSAを含む $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のRPMI培地でレトロインベルソTレギトープで刺激される。IL-2は、開始5日目から隔日で添加される（最終濃度10U/ml）。T細胞は11または12日目に四量体プールで染色される。各プールについて、 $2\sim 3\times 10^5$ の細胞を、0.5mgのPE標識四量体と一緒に50mlの培養基（10mg/ml）中で37℃で1～2時間インキュベートし、次いで、抗CD4-FITC（BD PharMingen, San Diego, CA）を用いて室温で15分間染色する。細胞を洗浄し、Becton Dickinson FACSCaliburフローサイトメーター（Becton Dickinson, San Jose, CA）で分析する。対応する単一ペプチドで負荷された四量体を、陽性染色を示すそのプールについて生成し、14または15日目に分析を行う。特別な四量体について陽性である細胞を、同日または翌日に、Becton Dickinson FACSVantage（San Jose, CA）を使用することにより、96ウェルのU底プレート内へ単一細胞選別する。選別された細胞を、24時間後に添加された2.5mg/mlのPHAおよび10U/mlのIL-2を有するフィーダーとしてウェル当たり $1.5\sim 3\times 10^5$ の比類のない、照射された（5000rad）PBMCと一緒に増殖させる。クローニングされたT細胞の特異性は、四量体（同族ペプチドまたはコントロールペプチドで負荷される、HA307-319）を用いる染色および10mg/mlの特異的ペプチド（Novak EJ et al., J Immunol, 166(11):6665-70）

30

40

50

を用いるT細胞増殖アッセイにより確認した。態様では、全体のRNAを、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, DE)を用いて、先に記載されたように生成されたTレギトープ特異的T細胞系統から抽出する。1マイクログラムの全体のRNAを使用して、a GeneRacer (登録商標) キット (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いるcDNA末端の急速増幅(RACE)法により、TCR cDNAをクローニングする。一本鎖cDNAを合成する前に、5' RACE GeneRacer (登録商標) キットの取扱説明書に従って、RNAを脱リン酸し、脱キャップし、RNAオリゴヌクレオチドとライゲーションする。SuperScript II RT (登録商標) (Life Technologies Corp, Carlsbad, CA) およびGeneRacer (登録商標) Oligo-dTは、一本鎖cDNAへのRNAオリゴ連結mRNAの逆転写のために使用される。5' RACEは、5' プライマーとしてGeneRacer 10 (登録商標) 5' (GeneRacer (登録商標) キット) および3' プライマーとして遺伝子特異的プライマーTCRCAR (5' -GTT AAC TAG TTC AGC TGG ACC ACA GCC GCA GC-3' ; 配列番号: 32) またはTCRCB1R (5' -CGG GTT AAC TAG TTC AGA AAT CCT TTC TCT TGA CCA TGG C-3' ; 配列番号: 33)、またはTCRCB2 (5' -CTA GCC TCT TGA ATC CTT TCT CTT G-3' ; 配列番号: 34)を、それぞれTCR α 、 β 1、または β 2鎖のために使用することにより実施する。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産物を、pCR2.1 TOPOベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA)内へクローニングし、次いで、One Shot TOP10コンピテント大腸菌 (Invitrogen, Carlsbad, CA)内へ形質転換する。プラスミドDNAは、TCR α 、 β 1、および β 2鎖についての各構築物からの96の個別のクローンから調製される。全プラスミドの全長インサートを配列決定して、 $v\alpha/v\beta$ 使用を決定する(Zhao Y et al., (2006), J Immunother, 29(4):398-406、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる)。

【0195】

医学的症状を予防または治療する方法。態様では、本開示は、例えば、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物を投与するステップおよび前記投与するステップにより被験体中で医学的症状を予防または治療するステップを有する被験体中の1つ以上の医学的症状を予防または治療する方法に関する。医学的症状は、例えば、原発性免疫不全症；免疫介在性血小板減少症、川崎病、20歳を超える患者における造血幹細胞移植、慢性B細胞リンパ急性白血病、および小児HIV1型感染症であることができる。具体的な例は、以下のものを含む：(血液学)再生不良性貧血、純赤血球無形成症、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、自己免疫性溶血性貧血、新生児溶血性疾患、後天性第VIEI因子阻害症、後天性フォン・ウィルブランド病、免疫媒介性好中球減少症、血小板輸血に対する不応症、新生児同種免疫／自己免疫血小板減少症、輸血後紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒症症候群；感染症、固形臓器移植、手術、外傷、火傷、およびHIV感染症；(神経学)てんかんおよび小児難治性ギランバレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、重症筋無力症、ランバート・イートン筋無力症症候群、多病巣性運動神経障害、多発性硬化症；(産科学)再発性妊娠喪失症；(呼吸器科)喘息、慢性胸部症状、リウマチ、関節リウマチ(成人および若年性)、全身性エリトマトーデス、全身性血管炎、皮膚筋炎、多発性筋炎、封入体筋炎、ウェゲナー肉芽腫症；(その他)副腎白質ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、ベーチェット症候群、急性心筋症、慢性疲労症候群、先天性心臓ブロック、嚢胞性線維症、自己免疫性水疱性皮膚病、真性糖尿病、急性突発性自律神経失調症、急性散在性脳脊髄炎、内毒素血漿、溶血性輸血反応、血球貪食症候群、急性リンパ芽球性白血病、下部運動ニューロン症候群、多発性骨髄腫、ヒトT細胞リンパ球増殖性ウイルス-1関連脊髄症、腎炎症候群、膜性腎症、ネフローゼ症候群、甲状腺眼症、オブソクローヌス-ミオクローヌス、再発性中耳炎、腫瘍随伴性小脳変性症、異常蛋白血症性神経障害、パルボウイルス感染症(全般)、多発性神経障害、臓器肥大症、内分泌障害、M蛋白、および皮膚変化(POEMS)症候群、進行性腰仙神経叢症、ライム神経根炎、ラムッセン症候群、ライター症候群、急性腎不全、血小板減少症(非免疫性)、連鎖球菌中毒性ショック症候群、ブドウ膜炎およびフォクト・小柳・原田症候群。

【0196】

特別な実施形態では、本発明は、例えば、アレルギー、自己免疫疾患、移植関連障害、例えば移植片対宿主病、酵素またはタンパク質欠乏障害、止血障害（例えば、血友病A、BまたはC）、癌（特に腫瘍関連自己免疫）、不妊症、または感染症（ウイルス、細菌、または寄生虫）を治療する方法に関する。本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、有害事象を低減するため、または同時投与される化合物の有効性を高めるために、医学的症状を有する被験体の治療のために用いられる他のタンパク質または化合物と共に使用することができる。

【0197】

アレルギーに対する適用。アレルギー特異的制御性T細胞は、アレルギーおよび喘息の発症を制御する重要な役割がある。天然に生じるT_{Reg}（態様では、ナチュラルT_{Reg}および／または適応性T_{Reg}を含み、かつ態様では、CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺制御性T細胞を含む）は、アレルギー疾患に影響を与える不適切な免疫応答を阻害することが示されている。最近の多くの研究は、制御性T細胞が、動物モデルだけでなく、ヒトでも、罹病しやすい個人におけるTヘルパー2型バイアス免疫応答の過剰発達を制御する重要な役割があることを示している。最近の研究は、T_{Reg}が、TGF-βおよびIL-10の分泌によるT細胞同時刺激を抑制することを示し、アレルギー疾患の制御におけるT_{Reg}の重要な役割を示唆している。ナチュラルまたは適応性制御性T細胞の欠陥的増殖は、アレルギーの発症を引き起こし、アレルゲン特異的T_{Reg}を誘導する治療は、アレルギーおよび喘息のための治療的処置を提供する。喘息の予防および治療の両方に対する1つの戦略は、T_{Reg}の誘導である。動物は、Th1またはT_{Reg}応答を引き起こす免疫刺激によって喘息の発症を防ぐことができる。したがって、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、アレルギーおよび／または喘息の予防または治療のための方法において有用である。このように、態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物または組成物の治療的有效量を投与するステップ、および前記投与するステップにより被験体内のアレルギーおよび／または喘息を予防または治療するステップを有する、被験体内のアレルギーおよび／または喘息を予防または治療する方法に関する。

【0198】

移植に対する適用。本開示のレトロインベルソトレギトープ化合物および組成物は、ドナー細胞に対する免疫応答を特にダウンレギュレーションする細胞の発生を促進することにより、移植プロセスの間に寛容を誘導するために有用である。臓器特異的自己免疫を治療するためのAg特異的T_{Reg}細胞の誘導は、一般化された免疫抑制を回避する重要な治療的開発である。骨髄移植のマウスモデルにおいて、T_{Reg}は、ドナー骨髄移植を促進し、有益な移植片対腫瘍の免疫学的効果を損なうことなしに、移植片対宿主病の発生および重症度を低減する。これらの知見は、マウスおよびヒトにおけるT_{Reg}が、表現型および機能特性を共有しているという観察と一致して、ヒト造血細胞移植と関連する合併症を軽減するため、これらの細胞の使用において活発な研究を引き起こした。T_{Reg}およびエフェクターT細胞の不均衡が移植片対宿主病の発症に寄与するが、免疫制御のメカニズム、特にT_{Reg}の非自己認識特性、他の免疫細胞へのその影響および相互作用、ならびにそれらの抑制活性部位は、十分に解明されていない。

【0199】

ヒトおよび実験動物モデルの両方から蓄積された証拠は、移植片対宿主病（GVHD）の発症におけるT_{Reg}の関与を示唆している。T_{Reg}がGVHDを、移植片対腫瘍（CVT）活性から分離できるという証明は、GVHD効果に関する不利益な結果なしにGVHDを軽減するために、その免疫抑制能力を操作できることを示唆する。抑制能力を有する多様なTリンパ球が報告されているにもかかわらず、2つの最も特徴付けられたサブセットは、自然に生じる胸腺内で生成されたT_{Reg}（ナチュラルT_{Reg}）および末梢で生成された誘導可能なT_{Reg}（誘導可能なT_{Reg}）である。したがって、本開示のTレギトープ化合物および組成物は、移植プロセスの間に寛容を誘導する方法において有用

である。このように、態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の治療的有効量を投与するステップおよび前記投与するステップにより被験体内に移植プロセスの間に寛容を誘導するステップを有する、被験体内に移植プロセスの間に寛容を誘導する方法に関する。

【0200】

寛容化剤としておよび自己免疫に対する適用。態様では、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、免疫原性化合物（タンパク質治療薬）に対する寛容化剤として使用することができる（Weber CA et al., (2009), Adv Drug Deliv, 61(11):965-76）。この発見は、タンパク質治療薬の設計に影響を有する。よって、免疫原性化合物（例えば、タンパク質治療薬、例えば、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、自己サイトカイン、または外来タンパク質）を、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物と共に投与することは、有害なTエフェクター免疫応答を抑制する。インビボで、T_{Reg}は、樹状細胞を介して作用して、自己反応性T細胞活性化を制限し、こうして、その分化およびエフェクター機能の獲得を妨げる。活性化された病原性細胞の供給を制限することにより、T_{Reg}は、自己免疫疾患の進行を予防するかまたは遅らせる。しかしながら、この防御メカニズムは、恐らくT_{Reg}細胞の不足および／または長い疾病経過にわたるT_{Reg}耐性病原性T細胞の発生および蓄積のために、自己免疫単独では不十分であると思われる。よって、これらの患者内での自己寛容の回復は、進行する組織損傷を制御するために向上した能力を有するT_{Reg}の注入と一緒に病原性T細胞のパーズが必要であってよい。臓器特異性自己免疫症状、例えば甲状腺炎およびインスリン依存性糖尿病は、この寛容メカニズムの崩壊に起因するとされている（Mudd PA et al., (2006), Scand J Immunol, 64(3):211-8）。したがって、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、自己免疫の予防または治療のための方法において有用である。このように、態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の治療的有効量を投与するステップ、および前記投与するステップにより被験体内の自己免疫を予防または治療するステップを有する、被験体内の自己免疫を予防または治療する方法に関する。

【0201】

糖尿病に対する適用。1型（若年性）糖尿病は、インスリン産生膵臓ベータ細胞の破壊から生じる臓器特異的自己免疫疾患である。非糖尿病では、膵島細胞抗原特異的T細胞は、胸腺の発達時に欠失されるかまたは膵島細胞抗原に対するエフェクター応答を積極的に抑制するT制御性細胞に変換される。若年性糖尿病および若年性糖尿病のNODマウスモデルでは、これらの寛容メカニズムが失われる。これらの不存在では、膵島細胞抗原は、ヒト白血球抗原（HLA）クラスIおよびII分子により提示され、CD8（+）およびCD4（+）自己反応性T細胞によって認識される。これらの自己反応性細胞による膵島細胞の破壊は、ついにはグルコース不寛容を引き起こす。Tレギトープと膵島細胞抗原の同時投与は、天然に生じるT制御性細胞の活性化および存在する抗原特異的エフェクターT細胞の制御性表現型への変換を引き起こす。このように、有害な自己免疫応答は、抗原特異的適応寛容の誘導を引き起こすように向け直される。抗原特異的寛容の誘導による自己エピトープに対する自己免疫応答の調節は、進行するベータ細胞破壊を予防することができる。したがって、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、糖尿病の予防または治療のための方法において有用である。このように、態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の治療的有効量を投与するステップ、および前記投与するステップにより被験体内の糖尿病を予防または治療するステップを有する、被験体内の糖尿病を予防または治療する方法に関する。

【0202】

B型肝炎（HBV）感染に対する適用。慢性HBVは、通常では、後天性（母体胎児伝染による）であるか、成人における急性HBV感染の希な転帰であることができる。慢性B型肝炎（CH-B）の急性増悪は、B型肝炎コアおよびe抗原（HBcAg／HBeAg）に対する増加する細胞毒性T細胞応答を伴う。最近の研究では、SYFPEITHI

10

20

30

40

50

THI T細胞エピトープマッピングシステムを、HBcAgおよびHbeAgからのMHCクラスII制限エピトープペプチドの予測のために使用した(Feng IC et al., (2007), J Biomed Sci, 14(1):43-57)。ハイスコアペプチドを用いるMHCクラスII四量体を構築し、TregおよびCTL頻度の測定のために使用した。この結果は、HBcAgに対して特異的なTreg細胞が、HBcAgペプチド特異的細胞毒性T細胞における増加を伴う増悪の間に減少することを示した。寛容期の間に、FOXp3発現Treg細胞クローンが同定された。これらのデータは、HbcAg Treg T細胞の減少が、慢性B型肝炎ウイルス感染の自然史に関する自発的増悪の原因であることを示唆している。したがって、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、慢性B型肝炎ウイルス感染の予防または治療のための方法において有用である。このように、態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の治療的有効量を投与するステップ、および前記投与するステップにより被験体内の前記ウイルス感染を予防または治療するステップを有する、被験体内のウイルス感染(例えばHBV感染)を予防または治療する方法に関する。

10

20

30

40

50

【0203】

SLEに対する適用。全身性エリトマトーデス(SLE)またはシェーグレン症候群において役割があるTregエピトープは定義されている。このペプチドは、スプライセオームタンパク質の残基131~151(RIHMVYSKRSGKPRGYAFIEY; 配列番号: 30)を包含する。可溶性HLAクラスII分子との結合アッセイおよび分子モデリング実験は、このエピトープが無差別エピトープとして挙動し、ヒトDR分子のラージパネルに結合することを示す。正常なT細胞および非ループス自己免疫患者からのT細胞とは対照的に、ランダムに選択されたループス患者の40%からのPBMは、ペプチド131~151に対する応答において増殖するT細胞を含む。リガンドの変更は、T細胞応答を変化させ、このペプチドに対して応答するT細胞の幾つかの集団が存在することを示唆し、その中にTreg細胞が含まれてよい。T制御性エピトープは、シェーグレン症候群でも定義されている。したがって、配列番号: 30と組み合わせて投与される本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、SLEの予防または治療のための方法において有用である。このように、態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の治療的有効量を、配列番号: 30と組み合わせて投与するステップ、および前記投与するステップにより被験体内のSLEを予防または治療するステップを有する、被験体内のSLEを予防または治療する方法に関する。

【0204】

自己免疫性甲状腺炎に対する適用。自己免疫性甲状腺炎は、自己甲状腺ペルオキシダーゼおよび/またはチログロブリンに対して抗体が生じる際に起こる症状であり、甲状腺内の小胞の漸次の破壊が生じる。HLA DR5は、この疾患と密接に関連する。したがって、甲状腺ペルオキシダーゼおよび/またはチログロブリンTSHRまたはその部分と組み合わせて投与される本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、自己免疫性甲状腺炎の予防または治療のための方法において有用である。このように、態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の治療的有効量を、甲状腺ペルオキシダーゼおよび/またはチログロブリンTSHRまたはその部分と組み合わせて投与するステップ、および前記投与するステップにより被験体内の自己免疫性甲状腺炎を予防または治療するステップを有する、被験体内の自己免疫性甲状腺炎を予防または治療する方法に関する。他の態様では、TSHRまたは他のグレース病抗原またはその部分と組み合わせて投与される本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物および組成物は、グレース病の予防または治療のための方法において有用である。グレース病は、甲状腺機能亢進、または甲状腺からのホルモンの異常に強い放出を引き起こす自己甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR)に対する抗体により特徴付けられる自己免疫疾患である。幾つかの遺伝的要因は、グレース病に対する罹病性に影響を及ぼすことができる。女性は、男性よりもこの疾患にはるかにかかりやすく;白人およびアジア人集団は、黒人集団よりもリスクが高く、HLA DRB1-0301は、この疾患に密接に

関連している。このように、態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の治療の有効量を、TSHRまたは他のグレース病抗体またはその部分と組み合わせて投与するステップ、および前記投与するステップにより被験体内のグレース病を予防または治療するステップを有する、被験体内のグレース病を予防または治療する方法に関する。

【0205】

レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物を用いるT制御性細胞のエキスピボ増殖および／または刺激。態様では、本開示は、制御性T細胞の増殖のためのエキスピボ法を提供する。一実施形態では、本発明は、(a)被験体から生物学的サンプルを準備するステップ；(b)生物学的サンプルから制御性T細胞を単離し；T制御性細胞が大量に増加して、増殖した制御性T細胞が得られ、それにより生物学的サンプル中で制御性T細胞が増殖する条件下で、単離された制御性T細胞を本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の有効量と接触させるステップを有する生物学的サンプル中の制御性T細胞を増殖させる方法を提供する。態様では、この方法は、増殖した制御性T細胞を被験体に投与するステップをさらに有する。態様では、増殖した制御性T細胞が投与される被験体は、例えば、増殖したTレギトープの自己移植により、元の生物学的サンプルを採取したのと同じ個体である(Ruitenber g JJ et al., (2006), BMC Immunol, 7: 11)。

【0206】

態様では、本開示は、(a)被験体から生物学的サンプルを準備するステップ；(b)生物学的サンプルから制御性T細胞を単離し；T制御性細胞が刺激されて1つ以上の生物学的機能が変化し、それにより生物学的サンプル中で制御性T細胞が刺激される条件下で、単離された制御性T細胞を本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の有効量と接触させるステップを有する生物学的サンプル中で制御性T細胞を刺激するエキスピボ法を提供する。態様では、この方法は、刺激された制御性T細胞を被験体に投与するステップをさらに有する。態様では、刺激された制御性T細胞が投与される被験体は、例えば、増殖したT制御性細胞の自己移植により、元の生物学的サンプルを採取したのと同じ個体である。

【0207】

レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物を用いた抗原提示細胞のエキスピボパルシング。態様では、本開示は、(a)被験体から生物学的サンプルを準備するステップ；(b)生物学的サンプルから抗原提示細胞を単離し；抗原提示細胞が刺激されて、1つ以上の生物学的機能(例えば、Tレギトープを提示しかつ／または寛容原性にするために抗原提示細胞を歪める)(これは、態様では、このような寛容原性状態を誘導するために抗原提示細胞のサイトカイン処理をさらに含むことができる)が変化し、それにより、生物学的サンプル中で抗原提示細胞を刺激する条件下で、単離された抗原提示細胞を本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の有効量と接触させるステップを有する、生物学的サンプル中の抗原提示細胞(例えば、樹状細胞、マクロファージ等)のためのエキスピボ法を提供する。態様では、この方法は、刺激された抗原提示細胞を被験体に投与するステップをさらに含む。態様では、刺激された抗原提示細胞が投与される被験体は、例えば、刺激された抗原提示細胞の自己移植により、元の生物学的サンプルを採取したのと同じ個体である。

【0208】

レトロインベルソTレギトープ化合物および組成物のインビトロ使用。態様では、本開示は、本開示のレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の、インビトロ研究および実験モデルにおける制御性T細胞機能の研究における試薬としての使用を提供する。

【0209】

免疫工学の方法。さらに、本開示は、免疫原性を低減する方法および／またはポリペプチドまたはサプリメント、(またはその断片)が治療性タンパク質として機能する場合に特に有用であってよいポリペプチドの寛容原性を増加する方法に関する。態様では、前記

方法は、本開示の1つ以上のレトロインベルソポリペプチド（例えば、限定されるものではないが、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるレトロインベルソポリペプチド、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を前記ポリペプチド中に挿入するステップを有する。態様では、前記ポリペプチド中に挿入された1つ以上のレトロインベルソポリペプチドは、前記ポリペプチドに対する抗原特異的免疫応答を抑制することができる。態様では、前記1つ以上のレトロインベルソポリペプチドは、前記ポリペプチドに融合されるかまたは前記ポリペプチド中の内部に挿入されていてよい（例えば、限定されるものではないが、部位特異的突然変異誘発または他の組換え技術）。態様では、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドの前記ポリペプチド中への前記挿入は、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドのアミノ酸の幾つかまたは全ての挿入およびレトロインベルソアミノ酸の挿入部位での1つ以上のアミノ酸の除去を含む。態様では、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドの前記ポリペプチド中への前記挿入は、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドを含むための前記ポリペプチドの配列の突然変異を有する（例えば、限定されるものではないが、部位特異的突然変異誘発または他の組換え技術による前記ポリペプチドまたはその断片内への1つ以上の点突然変異の導入）。態様では、1つ以上のレトロインベルソポリペプチドの前記ポリペプチド中への前記挿入は、前記ポリペプチドの以前の免疫原性が低下し、新たな配列の寛容原性が向上するように1つ以上のレトロインベルソ制御性T細胞エピートープ配列を導入する。態様では、レトロインベルソアミノ酸の挿入部位での前記付加された1つ以上のアミノ酸の数は、前記ポリペプチドの配列から欠失されたアミノ酸の数に対応する必要はない。態様では、1つ以上の制御性T細胞エピートープの治療性タンパク質または代替タンパク質／サプリメント（またはその断片）中への前記挿入は、治療性タンパク質または代替タンパク質／サプリメント（またはその断片）の免疫原性の低減を引き起こす。

10

20

30

40

50

【0210】

キット。本明細書に記載された方法は、例えば本開示の少なくとも1つのレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物を有するプリパッケージキットを利用することにより実施することができ、これは、例えば、本明細書に記載された医学的症状の徴候または家族歴を示す被験体を処置するために臨床設定において便利に使用することができる。一実施形態では、キットは、本明細書に記載された医学的症状の徴候または家族歴を示す被験体を処置するために、本開示の少なくとも1つのレトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の使用のための取扱説明書をさらに有する。

【0211】

態様

第1の態様は、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸からなるポリペプチドにおいて、配列番号：1～29および42～107、および場合によりその延長部のアミノ酸の各々が、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、ポリペプチドに関する。

【0212】

第2の態様は、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸から本質的になるポリペプチドにおいて、配列番号：1～29および42～107、および場合によりその延長部のアミノ酸の各々が、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、ポリペプチドに関する。

【0213】

第3の態様は、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するポリペプチドにおいて、配列番号：1～29および42～107、および場合によりその延長部のアミノ酸の各々が、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、ポリペプチドに関する。

【0214】

第4の態様は、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列の前記変異体または断片、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸は、MHC結合傾向およびTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存し、配列番号：1～29および42～107、および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、態様1から3までのいずれか1つ記載のポリペプチドに関する。

【0215】

第5の態様は、配列番号：1～29および42～107のいずれか1つに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%の相同性を有するアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸からなるポリペプチドにおいて、配列番号1～29および42～107、および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、前記ポリペプチドは、MHC結合傾向および同じTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する、ポリペプチドに関する。

【0216】

第6の態様は、配列番号：1～29および42～107のいずれか1つに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%の相同性を有するアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸から本質的になるポリペプチドにおいて、配列番号1～29および42～107、および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、前記ポリペプチドは、MHC結合傾向および同じTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する、ポリペプチドに関する。

【0217】

第7の態様は、配列番号：1～29および42～107のいずれか1つに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%の相同性を有するアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するポリペプチドにおいて、配列番号1～29および42～107、および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置であり、前記ポリペプチドは、MHC結合傾向および同じTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する、ポリペプチドに関する。

【0218】

第8の態様は、態様1から7までのいずれか1つ記載のポリペプチドにおいて、前記ポリペプチドは、ポリペプチドと比較して1つ以上の保存的置換を有する、ポリペプチドに関する。

10

20

30

40

50

【0219】

第9の態様は、前記ポリペプチドが、MHC結合傾向およびTCR特異性を保存し、かつ／または制御性T細胞刺激または抑制活性を保存する、態様8記載のポリペプチドに関する。

【0220】

第10の態様は、異種ポリペプチドに連結された1つ以上のレトロインベルソT細胞エпитープポリペプチドを有するポリペプチド組成物において、レトロインベルソT細胞エпитープポリペプチドは、態様1から9までのいずれか1つ記載のポリペプチドである、ポリペプチド組成物に関する。

【0221】

第11の態様は、レトロインベルソT細胞エпитープポリペプチドは、異種ポリペプチドのN末端に連結されている、態様10記載のポリペプチド組成物に関する。

【0222】

第12の態様は、レトロインベルソT細胞エпитープポリペプチドは、異種ポリペプチドのC末端に連結されている、態様10から11までのいずれか1つ記載のポリペプチド組成物に関する。

【0223】

第13の態様は、異種ポリペプチドが生物学的活性分子を有し、生物学的活性分子は、免疫原性分子、T細胞エпитープ、ウイルスタンパク質、および細菌タンパク質からなる群から選択される、態様10から12までのいずれか1つ記載のポリペプチド組成物に関する。

【0224】

第14の態様は、異種ポリペプチドが、レトロインベルソT細胞エпитープポリペプチドに作動的に連結されている、態様10から13までのいずれか1つ記載のポリペプチド組成物に関する。

【0225】

第15の態様は、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸からなるポリペプチドをコードする核酸において、配列番号：1～29および42～107、および場合によりそれらの延長物のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、核酸に関する。

【0226】

第16の態様は、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸から本質的になるポリペプチドをコードする核酸において、配列番号：1～29および42～107、および場合によりそれらの延長物のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、核酸に関する。

【0227】

第17の態様は、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸を有するポリペプチドをコードする核酸において、配列番号：1～29および42～107、および場合によりそれらの延長物のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である、核酸に関する。

【0228】

第18の態様は、配列番号：1～29および42～107からなる群から選択されるアミノ酸配列、および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、

10

20

30

40

50

配列番号 1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸を有するポリペプチドをコードする核酸の前記断片または変異体は、制御性 T 細胞刺激または抑制活性を保存するポリペプチドをコードし、配列番号：1～29 および 42～107、および場合によりそれらの延長部のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である、態様 15 から 17 までのいずれか 1 つ記載の核酸に関する。

【0229】

第 19 の態様は、態様 15 から 18 のいずれか 1 つ記載の核酸を有するプラスミドに関する。

【0230】

第 20 の態様は、態様 15 から 18 までのいずれか 1 つ記載の核酸を有するベクターに関する。

【0231】

第 21 の態様は、態様 1 から 14 までのいずれか 1 つ記載のポリペプチド、および製剤学的に許容可能な担体および／または付形剤を有する医薬組成物に関する。

【0232】

第 22 の態様は、態様 15 から 18 までのいずれか 1 つ記載の核酸、および製剤学的に許容可能な担体および／または付形剤を有する医薬組成物に関する。

【0233】

第 23 の態様は、態様 19 記載のプラスミド、および製剤学的に許容可能な担体および／または付形剤を有する医薬組成物に関する。

【0234】

第 24 の態様は、態様 20 記載のベクター、および製剤学的に許容可能な担体および／または付形剤を有する医薬組成物に関する。

【0235】

第 25 の態様は、態様 1 から 14 までのいずれか 1 つ記載のポリペプチド、態様 15 から 18 までのいずれか 1 つ記載の核酸、態様 19 記載のプラスミド、態様 20 記載のベクター、または態様 21 から 24 までのいずれか 1 つ記載の医薬組成物の 1 つ以上の治療的有効量を被験体に投与するステップを有する、免疫応答の抑制を必要とする被験体内の免疫応答を抑制する方法に関する。

【0236】

第 26 の態様は、態様 1 から 14 までのいずれか 1 つ記載のポリペプチド、態様 15 から 18 までのいずれか 1 つ記載の核酸、態様 19 記載のプラスミド、態様 20 記載のベクター、または態様 21 から 24 までのいずれか 1 つ記載の医薬組成物の 1 つ以上の治療的有効量を被験体に投与するステップを有する、被験体内で免疫応答を抑制するために制御性 T 細胞を誘導する方法に関する。

【0237】

第 27 の態様は、態様 1 から 14 までのいずれか 1 つ記載のポリペプチド、態様 15 から 18 までのいずれか 1 つ記載の核酸、態様 19 記載のプラスミド、態様 20 記載のベクター、または態様 21 から 24 までのいずれか 1 つ記載の医薬組成物の 1 つ以上の治療的有効量を被験体に投与するステップを有する、制御性 T 細胞の刺激を必要とする被験体内の制御性 T 細胞を刺激する方法に関する。

【0238】

第 28 の態様は、態様 1 から 14 までのいずれか 1 つ記載のポリペプチド、態様 15 から 18 までのいずれか 1 つ記載の核酸、態様 19 記載のプラスミド、態様 20 記載のベクター、または態様 21 から 24 までのいずれか 1 つ記載の医薬組成物の 1 つ以上の治療的有効量を被験体に投与するステップを有する、抗原特異的免疫応答の抑制を必要とする被験体内の抗原特異的免疫応答を抑制する方法に関する。

【0239】

第 29 の態様は、レトロインベルソ T レギトープ化合物または組成物の投与が、C D 4

10

20

30

40

50

+ / CD 25 + / Fox P 3 + 制御性 T 細胞を活性化する、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0240】

第 30 の態様は、レトロインベルソ T レギトープ化合物または組成物の投与が、CD 4 + T 細胞の活性化を抑制する、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0241】

第 31 の態様は、レトロインベルソ T レギトープ化合物または組成物の投与が、CD 4 + エフェクター T 細胞および / または CD 8 + エフェクター T 細胞の活性化または増殖を抑制する、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0242】

第 32 の態様は、T レギトープ組成物の投与が、B 細胞の活性化または増殖を抑制する、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0243】

第 33 の態様は、被験体が、アレルギー、自己免疫疾患、移植関連障害、酵素もしくはタンパク質欠乏障害、または血液凝固障害を患う、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0244】

第 34 の態様は、免疫応答が、少なくとも 1 つの治療性タンパク質による処置、ワクチンによる処置、および少なくとも 1 つの抗原による処置からなる群から選択される 1 つ以上の治療的処置の結果である、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0245】

第 35 の態様は、製剤学的レトロインベルソ T レギトープ化合物または組成物の投与が、1 つ以上の抗原提示細胞を制御性表現型にシフトさせる、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0246】

第 36 の態様は、製剤学的レトロインベルソ T レギトープ化合物または組成物の投与が、1 つ以上の樹状細胞を制御性表現型にシフトさせる、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0247】

第 37 の態様は、製剤学的レトロインベルソ T レギトープ化合物または組成物の投与が、1 つ以上の樹状細胞を制御性表現型にシフトさせる、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0248】

第 38 の態様は、制御性表現型が、前記樹状細胞または他の抗原提示細胞内での CD 11c および HLA-DR 発現の減少により特徴付けられる、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0249】

第 39 の態様は、製剤学的レトロインベルソ T レギトープ化合物または組成物の投与が、1 つ以上の T 細胞を制御性表現型にシフトさせる、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0250】

第 40 の態様は、製剤学的レトロインベルソ T レギトープ化合物または組成物の投与が、1 つ以上の CD 4 + T 細胞を制御性表現型にシフトさせる、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

【0251】

第 41 の態様は、製剤学的レトロインベルソ T レギトープ化合物または組成物の投与が、1 つ以上の CD 8 + T 細胞を制御性表現型にシフトさせる、態様 25 から 28 までのいずれか 1 つ記載の方法に関する。

10

20

30

40

50

【0252】

第42の態様は、製剤学的レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物の投与が、1つ以上のB細胞を制御性表現型にシフトさせる、態様25から28までのいずれか1つ記載の方法に関する。

【0253】

第43の態様は、

(a) 被験体から得られた生物学的サンプルを準備するステップ；および

(b) 生物学的サンプルから制御性T細胞を単離し；増殖した制御性T細胞組成物を得るためにT制御性細胞が数を増やす条件下で、単離された制御性T細胞を、態様1から14までのいずれか1つ記載のポリペプチド、態様15から18までのいずれか1つ記載の核酸、態様19記載のプラスミド、態様20記載のベクター、または態様21から24までのいずれか1つ記載の医薬組成物の1つ以上の有効量と接触させ、それにより生物学的サンプル中の制御性T細胞を増殖させるステップ；および

(c) 前記増加した数の制御性T細胞を前記患者に戻すステップを有する、患者の制御性T細胞の集団を増殖させる方法に関する。

【0254】

第44の態様は、

(a) 被験体から得られた生物学的サンプルを準備するステップ；

(b) 生物学的サンプルから制御性T細胞を単離し；1つ以上の生物学的機能を変更するためにT制御性細胞が刺激される条件下で、単離された制御性T細胞を、態様1から14までのいずれか1つ記載のポリペプチド、態様15から18までのいずれか1つ記載の核酸、態様19記載のプラスミド、態様20記載のベクター、または態様21から24までのいずれか1つ記載の医薬組成物の1つ以上の有効量と接触させ、それにより生物学的サンプル中の制御性T細胞を刺激するステップ

を有する、生物学的サンプル中の制御性T細胞を刺激する方法に関する。

【0255】

実施例

以下の実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されない。本開示に照らして、特許請求の範囲内の多数の実施形態は、当業者には明らかである。所定の実施例は、本開示の特別なTレギトープに関連するが、実施例および方法は、本開示の任意のTレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107のアミノ酸配列（および／またはそれらの断片およびそれらの変異体）、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12のアミノ酸を有する、これらからなる、またはこれらから本質的になる1つ以上のポリペプチド、ここで、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）にとって使用することができることが理解される。

【0256】

(1) レトロインベルソTレギトープ化合物または組成物のインシリコ同定

T細胞は、MHC（主要組織適合性複合体）クラスII分子に関連する抗原提示細胞（APC）により提示されるエピトープを特異的に認識する。これらのTヘルパーTエピトープは、MHCクラスII結合溝内にフィットする7～30の連続するアミノ酸を有する線状配列として表すことができる。多くのコンピュータアルゴリズムが開発され、多様な起源のタンパク質分子内のクラスIIエピトープを検出するために使用される（De Groot AS et al., (1997), AIDS Res Hum Retroviruses, 13(7):539-41; Schafer JR et al., (1998), Vaccine, 16(19):1880-4; De Groot AS et al., (2001), Vaccine, 19(31):4385-95; De Groot AS et al., (2003), Vaccine, 21(27-30):4486-504）。Tヘルパーエピトープのこれらの「インシリコ」予測は、ワクチンの設計のため、かつ治療性タンパク質、すなわち、抗体ベースの薬物、Fc融合タンパク質、

抗凝固薬、血液因子、骨形成タンパク質、人工タンパク質骨格、酵素、成長因子、ホルモン、インターフェロン、インターロイキン、および血栓溶解薬の脱免疫のために好結果で適用される (Dimitrov DS, (2012), Methods Mol Biol, 899:1-26)。

【0257】

EpiMatrix (商標) システム (EpiVax, Providence, Rhode Island) は、クラス I およびクラス II の HLA リガンドおよび T 細胞エピトープを予測するために有用なコンピュータプログラムにコード化された予測アルゴリズムのセットである。EpiMatrix (商標) システムは、特別なアミノ酸 (20) と HLA 分子内の結合位置 (9) との間の相互作用をモデル化するために、 20×9 の係数行列を使用する。任意の所与の入力タンパク質内に存在する推定 T 細胞エピトープを同定するために、EpiMatrix (商標) システムはまず、入力タンパク質を、各フレームが最後の 8 つのアミノ酸で重複する重複する 9 量体フレームのセットに分解する。次いで、各フレームを、ヒト HLA 分子の 1 つ以上の一般的な対立遺伝子に対して予測された親和性についてスコア付けする：典型的には DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*0801、DBR1*1101、DBR1*1301、および DRB1*1501 (Mack et al., (2013), Tiss Antig, 81(4):194-203)。簡単に言えば、任意の所与の 9 量体ペプチド特異的アミノ酸コード (20 の天然に生じるアミノ酸のそれぞれ 1 つ) および相対的結合位置 (1~9) について、予測行列から係数を選択するために使用される。個々の係数は、Sturniolo (Sturniolo T et al., 1999, Nat Biotechnol, 17(6):555-61) により最初に開発されたポケットプロファイル法と同様であるが、同一ではない独自の方法を用いて導き出される。次いで、個々の係数を合計して、生スコアを生成する。その後 EpiMatrix (商標) 生スコアを、ランダムに生成されたペプチド配列の極めて大きなセットから導き出されたスコア分布に関して正規化する。得られる「Z」スコアは、正規分布し、対立遺伝子に対して直接比較可能である。

【0258】

EpiMatrix (商標) ペプチドスコアリング。EpiMatrix (商標) 「Z」スケールで 1.64 超のスコアの任意のペプチド (任意の所与のペプチドセットのほぼ上位 5%) は、予測された MHC 分子に結合する十分な可能性を有すると判断された。スケールで 2.32 超のスコアのペプチド (上位 1%) は、結合する可能性が極めて高く；ほとんどの公開された T 細胞エピトープは、このスコア範囲内にある。以前の研究は、EpiMatrix (商標) が、公開された MHC リガンドおよび T 細胞エピトープを正確に予測することも証明される。

【0259】

無差別 T 細胞エピトープクラスターの同定。潜在的 T 細胞エピトープは、タンパク質配列全体にランダムに分布されておらず、その代わりに「クラスター」になる傾向がある。T 細胞エピトープ「クラスター」は、長さが 9~約 30 のアミノ酸の範囲であり、複数の対立遺伝子に対するかつ複数のフレームにわたる親和性を考慮して、概して 4~40 の結合モチーフが含まれる。エピトープマッピングに引き続き、EpiMatrix (商標) アルゴリズムにより生成された結果のセットを、Clustimer (商標) として公知の独自のアルゴリズムを用いることにより、T 細胞エピトープクラスターおよび EpiBar (商標) の存在についてスクリーニングする。簡単に言えば、分析された各 9 量体ペプチドの EpiMatrix (商標) スコアを集計し、統計的に導き出された閾値に対して照合した。次いで、高いスコアの 9 量体を、一度に 1 アミノ酸延長する。次いで、延長された配列のスコアを再集計し、修正された閾値と比較する。このプロセスを、提案された延長がもはやクラスターの全体のスコアを改善しなくなるまで繰り返す。本研究において同定された T レギトープを、Clustimer (商標) アルゴリズムにより、T 細胞エピトープクラスターとして同定した。これらは、MHC 結合および T 細胞反応性について高い可能性を示す、有意な数の推定 T 細胞エピトープおよび EpiBar (商標) を含む。

10

20

30

40

50

【0260】

例1. Tレギトープ化合物または組成物の同定

前述の方法を用いるインシリコ分析の例示的結果を、無差別インフルエンザエピトープの図1に示す。

【0261】

図1は、無差別のインフルエンザエピトープのEpiBarおよびEpiMatrix分析を含む免疫原性インフルエンザHAペプチドの例を示す。このインフルエンザHAペプチドは、EpiMatrixで8つの全ての対立遺伝子について極めて高いスコアを付け、18のクラスタースコアを有する。10のクラスタースコアは、有意であると見なされる。帯状のEpiBarパターンは、無差別のエピトープの特徴を示す。結果は、PRYVKQNTL（配列番号：35）、RYVKQNTLK（配列番号：36）、YVKQNTLK（配列番号：37）、VKQNTLKLA（配列番号：38）およびKQNTLKLAT（配列番号：39）について示す。Zスコアは、所与のHLA対立遺伝子に結合する9量体フレームの能力を示す。上位5%の中の全てのスコアは、「hits」と見なされるが、10%未満の非ヒット（*）は、簡素化のために図1では隠されている。

【0262】

（2）可溶性MHCに結合するレトロインベルソTレギトープを評価するための方法。

【0263】

レトロインベルソペプチドの合成。本開示のレトロインベルソTレギトープは、そのソースタンパク質の公知の変異体の間で高度に保存された（例えば、公知の変異体の10%超に存在する）Tレギトープに基づき設計されている。本開示のレトロインベルソTレギトープは、EpiMatrix（商標）分析により同定された少なくとも1つの推定T細胞エピトープに基づき設計されたレトロインベルソペプチドを有する。本発明のレトロインベルソTレギトープは、化学合成（直接および／または固相を含む）、組換え法、またはこの分野で公知の別の方法（例えば、J Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2^{ED}, 1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY (Publ) またはKrieger et al, 「Affinity purification of synthetic peptides」 PNAS 73:3160-3164 (1976)、この両方は、参照によりその全体として本明細書に組み込まれる）により製造することができる。全てのペプチドは、純度、質量、および正確な配列を決定するために、発表前に厳密な品質管理特性決定を受ける。ペプチドは、純度について逆相高圧液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）により評価した。ペプチドは、 $\geq 90\%$ の純度であり、各調製物は、アミノ酸分析を受けて、異なるロットのペプチド間での一貫性および再現性のためにアッセイにおいて等モル量を使用されていることを確認し、ペプチドの有効性の間の確実な比較研究も可能にする。ペプチドは、タンデム質量分析およびMS/MS分析を使用して質量および正確な配列も評価される。所定の態様では、レトロインベルソTレギトープは、N末端アセチル基および／またはC末端アミノ基でキャップされていることができる。選択されたTレギトープのHPLC、質量分析およびUVスキャン（それぞれ、純度、質量およびスペクトルを保証する）分析は、 $> 80\%$ の純度を示した。

【0264】

HLA結合アッセイ。結合活性は、EpiVax（Providence, Rhode Island）で分析する。使用した結合アッセイ（Steere AC et al., (2006), J Exp Med, 2003(4):961-71）は、ペプチド-MHC親和性の間接的な測定を与える。可溶性HLA分子は、標識されていない実験用レトロインベルソTレギトープおよび標識された対照ペプチドと一緒に96ウェルプレート上に負荷される。結合混合物が安定した平行に達すると（24時間）、HLA-レトロインベルソTレギトープ複合体は、抗ヒトDR抗体で被覆したELISAプレート上に捕捉され、標識用のユーロピウム連結プローブ（PerkinElmer, Waltham, MA）で検出する。結合した標識された対照ペプチドを測定する時間分解蛍光は、SpectraMax（登録商標）M5ユニット（Spectramax, Radnor, PA）により評価される。実験用レトロインベルソTレギトープの結合は、標識された対

照ペプチドの阻害率として表される（実験用蛍光／対照蛍光×100）。各実験用レトロインベルソトレギトープ（モル濃度の範囲にわたる）の阻害率の値は、標識された対照レトロインベルソトレギトープ特異的結合の50%を阻害する濃度、すなわちレトロインベルソトレギトープのIC₅₀を計算するために使用する。

【0265】

実験用レトロインベルソトレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加のアミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）は、DMSO中に溶解媒和される。希釈されたレトロインベルソトレギトープ（例えば、限定されるものではないが、配列番号：1、配列番号：16、配列番号：42、配列番号：56、配列番号：64、配列番号：72、配列番号：83、および配列番号：100、ここで、配列番号：1、16、42、56、64、72、83、または100のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）は、水性緩衝溶液中で結合試薬と混合し、100,000 nM～100 nMまでの最終濃度の範囲が得られる。レトロインベルソトレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチド（態様では、ポリペプチドは、単離され、合成され、または組み換えられてよい）のN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加のアミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）は、8つの一般的なクラスII HLA対立遺伝子：DRB1*0101、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0701、DRB1*0801、DRB1*1101、DRB1*1301、およびDRB1*1501のパネルに対してアッセイされる。各濃度での標識された対照ペプチドの阻害率から、線形回帰分析を用いて各レトロインベルソトレギトープ／対立遺伝子の組合せについてのIC₅₀値を導き出す。

【0266】

このアッセイでは、実験用レトロインベルソトレギトープは、100 nM以下の濃度で結合する対照ペプチドの50%を阻害する場合、極めて高い親和性で、100 nM～1,000 nMの濃度で結合する対照ペプチドの50%を阻害する場合、高い親和性で、1,000 nM～10,000 nMの濃度で結合する対照ペプチドの50%阻害する場合、中程度の親和性で結合すると見なされる。低い親和性のペプチドは、10,000 nM～100,000 nMの濃度で対照ペプチド結合の50%を阻害する。100,000 nM未満の任意の濃度で結合する対照ペプチドの少なくとも50%を阻害できずかつ用量反応を示さないペプチドは、非結合（NB）であると見なされる。

【0267】

例2．HLAクラスII分子との結合によるレトロインベルソトレギトープの特性決定

図3は、HLA結合アッセイにおいて、選択されたレトロインベルソトレギトープの、そのL型アミノ酸対応物と比較した例示的データを示す。配列番号：16および100のレトロインベルソトレギトープを、配列番号：114および115のトレギトープと並んでアッセイして、L型アミノ酸の従来のペプチド対応物をエミュレートする際のレトロインベルソトレギトープペプチドの能力を評価した。図3に示される数で解るように、レトロインベルソペプチドは、多様な対立遺伝子に対する結合にわたり同等にスコア付けされた。

【0268】

可溶性MHC結合アッセイを、本開示のさらに選択されたレトロインベルソトレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号

：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸（および態様では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）に関して先に記載された方法に対して実施する。IC₅₀値（nM）は、6点阻害曲線から導き出される。本開示のレトロインベルソトレギトープについてのHLA結合結果は、先に記載されたように、多様な試験された8つの慣用のクラスII HLA対立遺伝子についての極めて高い親和性、高い親和性、または中程度の親和性の結合を引き起こすことが予想される。

【0269】

（3）レトロインベルソトレギトープ—露出APCの表現型を評価する方法

プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）によるクラスII HLA（HLA-DR）およびCD86の表面発現は、APCがT細胞応答を調節する1つの方法である。クラスII HLA表面マーカーの発現は、トレギトープ、特にトレギトープ167（配列番号：31、PAVLQSSGLYSLSLSSSVTVTPSSSLGTQ 21st Century Biochemicals, Marlboro, MA）に対する応答においてダウンレギュレーションされることが以前から明らかにされている。さらに、表面マーカーCD86の低減された発現は、増強されたT_{Reg}機能と正の相関がある（Zheng Y et al., J Immunol, 2004, 172(5):2778-84）。このアッセイでは、候補レトロインベルソトレギトープ（例えば本明細書に開示された、配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々が、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を、プロフェッショナルAPC、特に樹状細胞の表面上でのクラスII HLAおよび同時刺激分子CD86の発現をダウンレギュレーションする能力について試験する。

【0270】

レトロインベルソトレギトープ（例えば、配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上、ここで、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を、EpiVax（EpiVax, Providence, Rhode Island）で以前に開発された独自のAPC表現型アッセイを使用する制限能力について個別に試験する。予め収穫され凍結されたPBMCを解凍し、従来の手段によりchRPMI中に懸濁させる。HLAタイピングを、Hartford Hospital（Hartford, Connecticut）により、EpiVaxにより提示された細胞材料の僅かな抽出されたサンプルに関して行う。アッセイ0日目に、 0.5×10^6 の細胞を抽出し、表面マーカーCD11c（樹状細胞に特異的なマーカー）の存在についてスクリーニングし、フローサイトメトリーにより表面マーカーHLA-DRおよびCD86の存在について分析する。残りの細胞を培養し（chRPMI+800ul培地中で 4.0×10^6 の細胞/mL）、緩衝液のみ（陰性対照）、トレギトープ167（陽性対照）（21st Century Biochemicals, Marlboro, MA）、Flu-HA306-318（陰性対照）（21st Century Biochemicals, Marlboro, MA）および／またはOva323-339（陰性対照）（21st Century Biochemicals, Marlboro, MA）を含む選択されたレトロインベルソペプチドの1つまたは陽性対照および陰性対照で刺激する（ $50 \mu\text{g/mL}$ ）。培養した細胞を、37℃で7日間インキュベートする。アッセイ7日目に、インキュベートされた細胞を、表面マーカーCD11cの存在についてフローサイトメトリーによりスクリーニングする。CD11c陽性細胞を、表面マーカーHLA-DRおよびCD86の存在について分析する。実験用ペプチドを、5人の異なるヒトドナーから採取したサンプル中で試験する。

【0271】

白血球除去フィルターは、健康なドナーから得られた全血から白血球を濾過するため口

ードアイランド血液センタ（Providence, RI）から入手される。全血をフィルターに通した後、フィルターを反対方向からフラッシュし、捕集された白血球をフィルターから押し出す。次いで、白血球を、従来のフィーコル分離勾配を使用して単離する。その後、捕集された白血球を、将来の使用に備えて凍結する。アッセイでの使用が必要である場合、凍結された白血球は、慣用の方法を用いて解凍される。以下に説明される G v H D 研究について、P B M C を得て（例えば、HemaCare, Van Nuys, CA から）、実験を実施する。

【0272】

樹状細胞の表現型に関するレトロインベルソ T レギトープへの暴露は、複数の方法により測定される。第 1 に、各実験条件について、C D 1 1 c および H L A - D R の表面発現を対比するドットプロットを作成する。全ての対照および実験用ペプチドに曝された細胞のドットプロットを、培地だけに曝された対照細胞から生成されたドットプロットに重ね合わせる。この重ね合わせは、レトロインベルソ T レギトープ刺激細胞と刺激されない C D 1 1 c - h i g h 細胞の間の H L A - D R 分布におけるシフトを視覚的に観察する効果的な方法を提供する（データは示されていない）。H L A - D R の分布における観察されたシフトを、定性的な尺度として報告する。次に、各ドットプロットの C D 1 1 c - h i g h セグメントについての H L A - D R 発現の強度における変化を計算する。H L A - D R 発現の強度における変化率は、ペプチドに暴露された細胞についての H L A - D R 発現の平均蛍光指数（M F I）から培地に暴露された細胞についての H L A - D R 発現の M F I を差し引き、培地に暴露された細胞についての H L A - D R 発現の M F I で割ったものに 1 0 0 を掛けた値に等しい（ $H L A - D R M F I \text{ ペプチド} - H L A - D R M F I \text{ 培地} / H L A - D R M F I \text{ 培地} \times 1 0 0$ ）。次に、C D 1 1 c - h i g h 集団内に存在する H L A - D R - l o w 細胞のパーセンテージにおける変化率を、培地対照に対する各ペプチドについて計算する。H L A - D R - l o w 細胞のパーセンテージにおける変化率を計算し、ペプチドに暴露された細胞についての H L A - D R - l o w のパーセントから培地に暴露された細胞についての H L A - D R - l o w のパーセントを差し引き、培地に暴露された細胞についての H L A - D R - l o w のパーセントで割ったものに 1 0 0 を掛けた値に等しい（ $H L A - D R - l o w \% \text{ ペプチド} - H L A - D R - l o w \% \text{ 培地} / H L A - D R - l o w \% \text{ 培地} \times 1 0 0$ ）。このアッセイでは、観察された H L A - D R M F I における負の変化および C D 1 1 c - h i g h 集団中に存在する H L A - D R - l o w 細胞のパーセンテージにおける正の変化は、低減された H L A の発現および制御性 A P C 表現型へのシフトを示す。

【0273】

同様のプロセスを、C D 8 6 の表面発現に関するレトロインベルソ T レギトープ暴露の影響を評価するために使用する；共刺激分子は、T 細胞活性化を促進することが知られている。第 1 に、各実験条件について、C D 1 1 c および C D 8 6 の表面発現を対比するドットプロットを作成する。全ての対照および実験用 T レギトープに曝された細胞のドットプロットを、培地だけに曝された対照細胞から生成されたドットプロットに重ね合わせる。この重ね合わせは、レトロインベルソ T レギトープ刺激細胞と刺激されない C D 1 1 c - h i g h 細胞の間の C D 8 6 分布におけるシフトを視覚的に観察する効果的な方法を提供する。（データは示されていない）。C D 8 6 の分布における観察されたシフトを、定性的な尺度として報告する。次に、各ドットプロットの C D 1 1 c - h i g h セグメントについての C D 8 6 - h i g h 発現の強度における変化を計算する。C D 8 6 - h i g h 発現の強度における変化率は、ペプチド（例えば、配列番号：1～29 の任意の 1 つ以上）に暴露された細胞についての C D 8 6 発現の平均蛍光指数（M F I）から培地に暴露された細胞についての C D 8 6 - h i g h 発現の M F I を差し引き、培地に暴露された細胞についての C D 8 6 発現の M F I で割ったものに 1 0 0 を掛けた値に等しい（ $C D 8 6 - h i g h M F I \text{ ペプチド} - C D 8 6 - h i g h M F I \text{ 培地} / C D 8 6 - h i g h M F I \text{ 培地} \times 1 0 0$ ）。次に、C D 1 1 c - h i g h 集団内に存在する C D 8 6 - l o w 細胞のパーセンテージにおける変化率を計算する。C D 8 6 - h i g h 細胞のパーセンテージにおける変

化率は、ペプチドに暴露された細胞についてのCD86-highのパーセントから培地に暴露された細胞についてのCD86-highのパーセントを差し引き、培地に暴露された細胞についてのCD86-highのパーセントで割ったものに100を掛けた値に等しい ($CD86-low\%I$ ペプチド - $CD86-low\%$ 培地 / $CD86-low\%$ 培地 $\times 100$)。このアッセイでは、観察されたCD86 MFIにおける負の変化およびCD11c-high集団中に存在するCD86-low細胞のパーセンテージにおける正の変化は、低減されたCD86の発現および制御性APC表現型へのシフトを示す。

【0274】

例3. レトロインベルソTレギトープに暴露されたAPCの特性決定

樹状細胞表現型アッセイを、選択されたレトロインベルソTレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107のアミノ酸（および態様では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）に関して先に記載された方法に従って実施する。

【0275】

多様なペプチド刺激物質の存在で5人のドナーにわたりアッセイ7日目に分析されたCD11対HLA-DRの表面発現を表すドットプロットを作成する。CD11c+ / HLA-DR+集団の下方移動は、後天的制御性表現型を示す培地対象と比較して、本開示のレトロインベルソTレギトープで処理したサンプルにおいて明らかであることが予想される。

【0276】

多様なペプチド刺激物質の存在で5人のドナーにわたりアッセイ7日目に分析されたCD11c対CD86の表面発現を表すドットプロット。本開示のレトロインベルソTレギトープで処理されたサンプル中に存在するCD86-low細胞における増大は、培地対照と比較して、後天的制御性表現型へのシフトを示すことが予想される。さらに、特許請求の範囲に記載されたレトロインベルソTレギトープへの暴露は、試験される全ての被験体においてHLA-DRの低減された発現を引き起こすことが予想される。

【0277】

(4) 制御性T細胞の増殖に関するペプチド効果を評価する方法

Epivax (Providence, RI) により実施された先の研究は、陽性対照のTレギトープ167（配列番号：31、PAVLQSSGLYSLSLSVTVPSSSLGTQ, 21st Century Biochemicals, Marlboro, MA）を含む公知のTレギトープへの暴露に引き続く制御性T細胞の増殖の増加が示された。このアッセイにおいて、本開示のTレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を含む候補のレトロインベルソTレギトープは、CD4+CD25+FoxP3+制御性T細胞の中で増殖を誘導する能力について試験する。プロセスの概要は、図4に示す。予め採取され凍結されたPBMCを解凍し、コンディショニングされたchRPMI (3.3×10^6 の細胞/mL) 中に従来の手段により懸濁させる。評価されたドナーは、HLA-DRB1スーパータイプの多様性を表す（表1および図5参照）。細胞をCFSE (Cat#: 65-0850-84, Affymetrix, Santa Clara, CA) で染色し、ウェル当たり300,000の細胞で培養する。プレートを、一晩中インキュベートする（5%CO₂中で37℃）。各ウェルは、200μLの培地を含む。アッセイ1日目に、本開示の1つ以上のレトロインベルソTレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／

またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および状態では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を、滅菌DMSO中で再構築し、10mg/mLの最終貯蔵濃度を得る。EpiVax（EpiVax, Providence, Rhode Island）で実施された先の滴定試験は、0.5μg/mLの破傷風トキソイド（TT）（Astarte Biologics, Bothell, WA）による刺激が、健康な対照ドナーから採取されたPBMC（Rhode Island Blood Center, Providence, RI）中の測定可能なCD4+エフェクターメモリーT細胞応答を導き出すことを確立した。破傷風トキソイドストック（100μg/mL）（Astarte Biologics, Bothell, WA）は、コンディショニングされたchRPMI中に希釈し、1μg/mL（2×濃度）の作業濃度を得る。培養された細胞（100μL培地中）を、100μLのコンディショニングされたchRPMI（陰性対照）、100μLの破傷風トキソイド溶液（2×溶液、陽性対照）（Astarte Biologics, Bothell, WA）、2991μLの破傷風トキソイド溶液+9μLの本開示の1つ以上のレトロインベルソトレギトープ溶液の100μLの希釈液、2997μLの破傷風トキソイド溶液+3μLの本開示の1つ以上のレトロインベルソトレギトープ溶液の100μLの希釈液、または6998.2μLの破傷風トキソイド溶液+1.8μLの本開示の1つ以上のレトロインベルソトレギトープ溶液の100μLの希釈液で刺激する。全てのプレートを、さらに6日間インキュベートする。アッセイ5日目に、100μLの上澄液を各ウェルから除去し、新たにコンディショニングされたchRPMI（TTなしの対照ウェルについて）に置き換えるか、または初めにTTだけでまたはTT+レトロインベルソトレギトープと共にインキュベーションしたウェルについては2×TT（1mg/mL）を有する100μLの培地に置き換える。追加のレトロインベルソトレギトープは添加されない。

10

20

【表1】

表1:HLAスーパータイプDRB1 8010、*0401、*0701、*0801、*1101、および*1501を含むドナーのパネル。

ドナー	年齢	性別	HLAハプロタイプ	
			1	2
ドナーA	43	F	DRB1*1104	DRB1*1301
ドナーB	57	M	DRB1*0801	DRB1*1102
ドナーC	18	M	DRB1*0101	DRB1*0701
ドナーD	40	F	DRB1*0401	DRB1*1503

30

【0278】

高度に活性化された制御性T細胞は、FoxP3、CD25、グランザイムBおよび増殖の上昇したレベルを示す。高度に活性化された制御性T細胞およびCD4+エフェクターT細胞についてのゲーティング戦略を、図2A～Cに示す（これは、代表的な結果を示す）。図2Aに示すように、細胞をゲーティングして、凝集物および死細胞を排除し、生細胞を、CD4+T細胞についてゲーティングし、引き続く全ての分析は、この集団について行う。CD4+T細胞を、上昇したCD25、FoxP3、およびlow CFSE（増殖）についてゲーティングする（図2B）。図2Bは、TTを添加しない代表的アッセイ（左側）、0.5μg/mLのTTを用いる代表的なアッセイ（右側）の結果を示す。図2Cは、このようなアッセイの代表的な結果を示し、増殖および活性化されたCD4+T細胞集団は、高度に相関していることを示す。

40

【0279】

50

例 4. レトロインベルソ T レギトープは、高度に増殖性の、活性化された制御性 T 細胞の集団を誘導する

制御性 T 細胞増殖アッセイを、本開示の 1 つ以上のレトロインベルソ T レギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29 および 42～107 の任意の 1 つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29 および 42～107（および態様では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である）に関して先に記載された方法に従って実施する。このようなデータは、本開示のレトロインベルソ T レギトープが、高度に増殖性の、活性化された制御性 T 細胞の集団を誘導することを説明することが予想される。

10

【0280】

(5) CD4 + エフェクター T 細胞の増殖に関するレトロインベルソ T レギトープ効果を評価する方法

PBMC 細胞集団中に含まれる CD4 + エフェクターメモリー T 細胞は、公知の T 細胞エピトープによる刺激に対する応答において増殖を誘導することができる。

【0281】

この実験の目的は、態様では、直接的 (T_{Reg} の係合および活性化) または間接的 (APC 表現型の調節) のいずれかの方法により抗原刺激された CD4 + エフェクターメモリー T 細胞を含む CD4 + T 細胞の増殖を抑制する、本開示の本開示のレトロインベルソ T レギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29 および 42～107 の任意の 1 つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29 および 42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である）の能力を確立することにある。

20

【0282】

EpiVax (Providence, RI) により実施された先の研究は、陽性対照の T レギトープ 167 (配列番号：31、21st Century Biochemicals, Marlboro, MA) を含む公知の T レギトープへの暴露に引き続く制御性 T 細胞の増殖の増加を示す。このアッセイにおいて、本開示のレトロインベルソ T レギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号 1～29 および 42～107 の任意の 1 つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29 および 42～107 のポリペプチドの N 末端および／または C 末端に任意の比率で分配された 1～12 の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29 および 42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である）を含む候補のレトロインベルソ T レギトープは、CD4 + CD3 + T 細胞ならびに活性化されたエフェクター CD4 + T 細胞 (CD4 + / CD25 - high / FoxP3 - intermediate) の中で増殖を誘導するその能力について試験する。予め採取され凍結された PBMC を解凍し、コンディショニングされた c h R P M I (3.3×10^6 の細胞 / mL) 中に従来の手段により懸濁させる。表 1 および図 5 は、評価されたドナーが、多様な HLA DRB1 スーパータイプを表すことを示す。細胞を CFSE (Cat#: 65-0850-84, Affymetrix, Santa Clara, CA) で染色し、ウェル当たり 300,000 の細胞で培養する。プレートを、一晩中インキュベートする (5% CO₂ 中で 37°C)。各ウェルは、200 μ L の培地を含む。アッセイ 1 日目に、候補レトロインベルソ T レギトープを、滅菌 DMSO 中で再構築し、10 mg / mL の最終貯蔵濃度を得る。EpiVax (EpiVax, Providence, Rhode Island) で実施された先の滴定試験は、0.5 μ g / mL の破傷風トキソイド (TT) (Astarte Biologics, Bothell, WA) による刺激が、健康な対照ドナーから採取された PBMC (Rhode Island Blood Center, Providence, RI) 中の測定可能な CD4 + エフェクターメモリー T 細胞応答を導き出すこ

30

40

50

とを確立した。しかしながら、ヤケヒョウヒダニ (*D. Pteronyssinus*) による刺激を含む他の手段による刺激を行うことができる。破傷風トキソイドストック ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Astarte Biologics, Bothell, WA) を、コンディショニングされた *chRPMI* 中に希釈し、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($2\times$ 濃度) の作業濃度を得る。培養された細胞 ($100 \mu\text{L}$ 培地中) を、 $100 \mu\text{L}$ のコンディショニングされた *chRPMI* (陰性対照)、 $100 \mu\text{L}$ の破傷風トキソイド溶液 ($2\times$ 溶液、陽性対照) (Astarte Biologics, Bothell, WA)、 $2991 \mu\text{L}$ の破傷風トキソイド溶液 + $9 \mu\text{L}$ の候補レトロインベルソトレギトープ溶液の $100 \mu\text{L}$ の希釈液、 $2997 \mu\text{L}$ の破傷風トキソイド溶液 + $3 \mu\text{L}$ の候補レトロインベルソトレギトープ溶液の $100 \mu\text{L}$ の希釈液、または $6998.2 \mu\text{L}$ の破傷風トキソイド溶液 + $1.8 \mu\text{L}$ の候補レトロインベルソトレギトープ溶液の $100 \mu\text{L}$ の希釈液で刺激する。全てのプレートを、さらに6日間インキュベートする。アッセイ5日目に、 $100 \mu\text{L}$ の上澄液を各ウェルから除去し、新たにコンディショニングされた *chRPMI* (TTなしの対照ウェルについて) に置き換えるか、または初めにTTだけまたはTT + レトロインベルソトレギトープと共にインキュベーションしたウェルについては $2\times$ TT ($1 \text{mg}/\text{mL}$) を有する $100 \mu\text{L}$ の培地に置き換える。追加のTレギトープは添加されない。

10

【0283】

アッセイ7日目に、細胞を、インキュベーションから取り出す。図2Aに示すように、細胞をゲーティングして、凝集物および死細胞を排除し、生細胞を、*CD4* + T細胞についてゲーティングし、引き続く全ての分析は、この集団について行う。幾つかの態様では、分析を *CD4* + *CD3* + T細胞に関して行う。別の態様では、*CD4* + T細胞を、上昇した *CD25*、*FoxP3*、および *low CFSE* (増殖) についてゲーティングする (図2B)。活性化されたTエフェクター集団は、*CD4* + / *CD25* - *high* / *FoxP3* - *intermediate* (*CD4* + / *CD25* ^{hi} / *FoxP3* ^{int}) として同定される (図2B)。 *CD4* + / *Foxp3* - *low* / *CD25* - *high* (*CD4* + / *Foxp3* ^{lo} / *CD25* ^{hi}) T細胞の増殖は、*CFSE* 染色 (Cat#: 65-0850-84, Affymetrix, Santa Clara, CA) の希釈から推定され、%増殖は、*CFSE* - *low* (*CFSE* ^{lo}) 集団により決定される (図2C)。

20

【0284】

例5. レトロインベルソトレギトープは、*CD4* + エフェクターT細胞の増殖および活性化を抑制する。

30

【0285】

図5は、4人のドナーのPBMCを2つのレトロインベルソトレギトープ (配列番号: 16および100) およびそのL型アミノ酸Tレギトープ対応物 (配列番号: 114および115) で試験し、同等の活性を評価した対立遺伝子データを示す (図3参照)。上述のように、細胞を培養し、TTで処理した。

【0286】

図2A~Cのように、細胞をゲーティングして、凝集物および死細胞を排除し、次いでゲーティングして、増殖を分析した。図6は、増大する用量でFV621Tレギトープを用いて得られた代表的データおよび細胞増殖に関するそれらの得られた効果を示す。

40

【0287】

図7A~7Bおよび図8A~8Bは、*CD4* + 増殖の阻害におけるレトロインベルソTレギトープ (配列番号: 16および100) の比較を示し、さらにL型アミノ酸対応物 (配列番号: 114および115) との並行比較を示す。両方のデータセットでは、レトロインベルソTレギトープが、*CD4* + 細胞増殖を低減する同等の能力を示した。

【0288】

更なるT細胞増殖アッセイを、先に記載した方法に従って、本開示の1つ以上のレトロインベルソTレギトープ (例えば、本明細書に開示された配列番号: 1~29および42~107の任意の1つ以上および/またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号: 1~29および42~107のポリペプチドのN末端および/ま

50

たはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を使用して、本開示の残りのレトロインベルソTレギトープについて実施する。このようなデータは、本開示のレトロインベルソTレギトープが、破傷風トキソイドに対して反応する（または他の刺激、例えばヤケヒョウヒダニ（*D. Pteronyssinus*）による刺激に対して反応する）CD4+CD3+T細胞、ならびに活性化されたエフェクターCD4+T細胞（CD4+／CD25-high／FoxP3-intermediate）の集団を、用量依存で強く抑制することを示すことを予測する。

【0289】

（6）CD8+エフェクターT細胞に関するレトロインベルソTレギトープ効果を評価する方法。

【0290】

先に、PBMC細胞集団中に含まれるCD8+エフェクターメモリーT細胞が、公知のクラスI T細胞エピトープによる刺激による応答において増殖を誘導することができることを示した。このアッセイの結果は、態様では、直接的（Tregの係合および活性化）または間接的（APC表現型の調節）のいずれかの方法により抗原刺激されたCD8+エフェクターメモリーT細胞を含むCD8+T細胞の増殖を抑制する、本開示のレトロインベルソTレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）の能力を確立することにある。

【0291】

T細胞増殖アッセイを、先に記載された方法に従って、本開示のレトロインベルソTレギトープに関して実施する。2人の健康なドナーからのPBMCを解凍し、コンディショニングされたchRPMI（ 3.3×10^6 の細胞/mL）中に従来の手段により懸濁させる。細胞をCFSE（Cat#: 65-0850-84, Affymetrix, Santa Clara, CA）で染色し、ウェル当たり300,000の細胞で培養する。プレートを、一晚中インキュベートする（5%CO₂中で37℃）。アッセイ1日目に、本開示のレトロインベルソTレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長物）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を、滅菌DMSO中で再構築し、20mg/mLの最終貯蔵濃度を得る。chRPMI中の最終濃度の2倍の本開示のレトロインベルソTレギトープの中間溶液を、前記のように調製する。本開示のレトロインベルソTレギトープの最終濃度を、2.5、5、10および20μg/mLから試験する。CD8+刺激抗原として、ヒトサイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルスおよびインフルエンザウイルス由来の23のMHCクラスI制限ウイルスエピトープからなるCEFペプチドプールを使用する（しかしながら、他の手段による刺激が使用できることは理解されるべきである）。CEFペプチドを、細胞および培地（対照）または本開示のレトロインベルソTレギトープと共に0、1、2または4μg/mLでウェル（データは2μg/mLについて示される）に添加する。全てのプレートを、さらに6日間インキュベートする。アッセイ5日目に、100μLの上澄液を、各ウェルから除去し、新たにコンディショニングしたchRPMIと交換する。

【0292】

生／死マーカー、細胞外マーカーCD4、CD8αおよびCD25、CD127、CD

10

20

30

40

50

45RAおよびCCR7、および細胞内マーカーFoxP3について細胞を染色するために慣用の方法を使用する。FACS分析の後に、細胞をゲーティングして、凝集体および死細胞を除外する。生細胞集団に関してCD8αおよびCD4細胞を別々にゲーティングし、各集団を、先に説明したように増殖（CFSE low集団）または活性化（CD25-high/FoxP3 low/intermediate, FoxP3int_lo CD25hiとして示す）について分析する。

【0293】

例6．本開示のレトロインベルソTレギトープは、CD8+エフェクターT細胞の増殖を抑制する。

【0294】

本開示のレトロインベルソTレギトープ（例えば、本明細書に記載された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）によるCD8+T細胞応答の潜在的阻害を、健康なドナーからのPBMCがCEFペプチド混合物により刺激される場合に試験する。本開示のレトロインベルソTレギトープは、CEFペプチドに対するCD8+T細胞増殖応答、ならびに活性化を、用量依存で強力に阻害することが予想される。

【0295】

（7）免疫応答（GvHD）に関するレトロインベルソTレギトープ効果を評価する方法

骨髄移植は、不健康な骨髄を、提供された健康な骨髄に置き換える手順である。骨髄移植は、白血病（Vincente D et al., (2007), Bone Marrow Transplant, 40(4):349-54）、再生不良性貧血のような骨髄機能不全を引き起こす疾病（Champlin RE et al., (2007), Blood, 109(10):4582-5）、および他の免疫系または遺伝的疾患（Chinen J and Buckley RH, (2010), J Allergy Clin Immunol, 125(2 Suppl 2):S324-35）のような生命を脅かす血液癌に患う患者を治療するために使用することができる。移植片対宿主病（GvHD）は、骨髄移植における主要な合併症として公知であり、発症後の直後の高い死亡率を特徴とする（Lee SJ et al., (2003), Biol Blood Marrow Transplant, 9(4):215-33）。GvHDでは、リンパ球が移植されたドナー組織からHLA不一致のレシピエント組織へ移動するためにドナーリンパ球により深刻な組織損傷が引き起こされる。症状は、レシピエント内への注入によって引き起こされる、皮膚、肺、肝臓および腸のような多様な臓器における深刻な損傷を含む（Goker H et al., (2001), Exp Hematol, 29(3):259-77）。

【0296】

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）（leukopak (Hemacare, Van Nuys, CA) から入手）の免疫不全マウス内への移植が、GvHD様症候群を引き起こし、20～50日後に死亡を引き起こすことがEpivax (Providence, RI) により以前に観察された。このモデルでは、移植されたPBMC内に含まれるT細胞が、宿主マウスの皮膚、肝臓、腸、肺および腎臓に浸潤して、深刻な損傷および最終的な死を引き起こす。免疫不全マウス系統のNOD-scid IL-2Rγ^{nu/nu} (NSG - Jax stock # 005557) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) マウスおよびヒトPBMCの移植片を、GvHDの進行に関して本開示のレトロインベルソTレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置で

10

20

30

40

50

ある)の影響を評価するために使用する。アッセイ1日目に、マウスは体重によりマッチする治療グループと対照グループとにグループ分けされ、X線照射源(Lifespan Hospital, Providence, RI)から100cGyで照射する。照射の6時間後、マウス被験体は、尾部静脈を介して1000万のhPBMC IVを受ける。幾つかのマウスは照射を受けるが、PBMCは受けない(表2のグループ8)。アッセイ0日目から開始して、アッセイ25日目まで続け、被験体マウスは、表2に概説されたスケジュールに従って投与される。

【0297】

体重減少、姿勢、活動、ならびに被毛および皮膚の概観を含む臨床観察は、毎週3回行われる。被験体マウスは、開始日から>20%の体重減少を示すかまたは次の臨床徴候:(i)開始日から10~20%の体重減少(ii)触ると冷たい(iii)猫背姿勢を伴う無気力およびみすばらしい被毛の組合せを示した場合に安楽死させる。

【表2】

表2:GVHD研究のための実験グループおよび投与スケジュール

グループ	マウス	PBMC	試験項目	投与量	投与頻度
1	3	+	PBS (疾患対照)	300 µl PBS	0, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 25 日
2	10	+	PBS + DMSO (輸送手段)	0.5% DMSO	0, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 25 日
6	10	+	本開示のレトロインベルソトレギトープ	20 µg	0, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 25 日
7	7	+	IVIG (陽性対照)	50 mg	0, 7, 14, 21, 28 日
8	3	-	なし (対照グループ)	NA	

【0298】

例7. 本開示のレトロインベルソトレギトープは、外因性GVHDモデルにおけるGVHDの発症を阻害する。

【0299】

ヒトリンパ球の免疫不全マウスへの移植および引き続く本開示のレトロインベルソトレギトープを用いる処置は、このインビボモデルにおける免疫機能に関する本開示のレトロインベルソトレギトープの評価を可能にする。本開示のレトロインベルソトレギトープ(例えば、本明細書に開示された配列番号:1~29および42~107の任意の1つ以上および/またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号:1~29および42~107のポリペプチドのN末端および/またはC末端に任意の比率で分配された1~12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号:1~29および42~107(および態様では、それらの場合による延長部)のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である)は、T細胞活性化を抑制し、よって、この疾患の進行を遅らせることが予想される。評価のために使用される主要な評価基準は、試験被験体の生存である。本開示のトレギトープで処置されたグループについてのGVHDの発症の遅延は、カプラン・マイヤー生存曲線により示唆されるように観察されることが予想される。本開示

のレトロインベルソTレギトープによる処置は、陰性対照および陽性対照 I V I G に対して延長された生存を引き起こすことが予想される。

【0300】

例8．F V I I I -レトロインベルソTレギトープ構築物

本開示のレトロインベルソTレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）の免疫原性タンパク質との融合は、免疫原性タンパク質の末梢寛容の誘導を引き起こすことができる。第V I I I 凝固因子は、重度の血友病Aを患う人において免疫原性である。表3および4は、本開示のレトロインベルソTレギトープを有するこのようなキメラまたは融合ポリペプチドの例示的な実施形態を示す。このようなキメラまたは融合ポリペプチドは、この分野で公知のように、リンカーを含むことができると理解されるべきである。表3および4は、配列番号：1（これは太字であり、配列番号：1のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）と融合した第V I I I 因子を示し、このような構築物が、その中に含まれる本開示の1つ以上のレトロインベルソTレギトープ（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を含むことができると理解されるべきである。

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表3: 第VIII因子ーレトロインベルソトレギトープ: 配列番号: 40 (レトロインベルソトレギトープ
は太字であり、太字のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である)

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFP
 PRVPKSFPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVY
 DTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPG
 GSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCRE
 GSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKM
 HTVNGTVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNH
 RQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLFCHISSHQHDGMEAYVKCDSCPE
 EPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFSIQIRSVAKKHPKT
 WVHYIAAEEEDWDYAPLVLPDDRYSYKSYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY
 TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLIIFKNQASRPYNIYPHGIT
 DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTR
 YYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDE
 NRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCL
 HEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMS
 MENPGLWLIGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLL
 SKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTMPMK
 IQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSL
 SEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSST
 SNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSSPLTE
 SGGPLSLSEENND SKLLESGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHGP
 ALLTKDNALFKVVISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQN
 ILES DTEFKKV TPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKK
 EGPIPPDAQNPDM SFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGSPKQLVS
 LGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNLDN
 LHENNTHNQEKKI QEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTFKNFMKNLFLLS
 TRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNR TKKHTAHFSKKGEEENLEGLG

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

NQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRI
 IVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSESIP
 QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSNLPAASYRKKDSGVQES
 SHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVENTVLP
 KPDLPKTSGKVVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEG
 AIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWK
 SQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGR
 TERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYD
 EDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVQFK
 KVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASR
 PYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNETKTYFWKVQHMAPTKDEFD
 CKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFT
 IFDETKSWYFTENMERNCRAPSNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLFG
 LVMAQDQQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPG
 VFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGH
 IRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMII
 HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVD
 SSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPHTHSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME
 SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQ
 VDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVK
 VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDL
YHKSPVTVVSSLSYLGSSQLVAK

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表4: 第VIII因子ーレトロインベルソレギトープ: 配列番号: 41 (レトロインベルソレギトープ
は、太字であり、太字のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である)

HKSPVTVVSSLSYLGSSQLVAKQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVEL
SWDYMQSDLGELPVDARFP
PRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVY
DTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPG
GSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCRE
GSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKM
HTVNGTVNRSPLGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNH
RQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKCDSCPE
EPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFIQIRSVAKKHPKT
WVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY
TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGIT
DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTR
YYSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQQRGNQIMSDKRNILFSVFDE
NRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCL
HEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMS
MENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLL
SKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTMPMK
IQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYETFSDDPSPGAIDSNNSL
SEMTHFRPQLHHSGDMVFTPEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSST
SNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD TTLFGKKSSPLTE
SGGPLSLSEENND SKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGP
ALLTKDNALFKVSI SLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQN
ILES DTEFKKV TPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSKNMEMVQKKK
EGPIPPDAQNPDM SFFKMLFLPESARW IQRTHGKNSLNSGQGSPKQLVS
LGPEKSVEGQNFLSEKNKV VVGKGEFTKD VGLKEMVFPSSRN LFLTNLDN
LHENNTHNQEKKI QEEIEKKETLIQENVVLPQIH T VTGTKNFMKNLFLLS

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

TRQNVESYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHFSKKGEEENLEGLG
 NQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRI
 IVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSESIP
 QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSNLPAASYRKKDSGVQES
 SHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVENTVLP
 KPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEG
 AIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWK
 SQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGR
 TERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYD
 EDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFK
 KVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASR
 PYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNETKTYFWKVQHMAPTKDEFD
 CKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFT
 IFDETKSWYFTENMERNCRAPSNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLFG
 LVMAQDQQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPG
 VFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGH
 IRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMII
 HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVD
 SSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME
 SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQ
 VDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVK
 VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDL
 Y

10

20

30

40

【0301】

(9) レトロインベルソトレグトープー血液成分抱合体の生成

レトロインベルソトレグトープの血液成分抱合体、例えばアルブミンとの融合は、レトロインベルソトレグトープペイロードのための担体タンパク質として有用であることができる。レトロインベルソトレグトープー血液成分抱合体は、インビボでレトロインベルソトレグトープの半減期を延長し、レトロインベルソトレグトープを急速なタンパク質分解性の分解から保護し、レトロインベルソトレグトープを循環からの急速なクリアランスおよび／または急速な腎臓排泄から保護し、被験体の体内全体にレトロインベルソトレグトープー血液成分抱合体を広く分配することを可能にし、レトロインベルソトレグトープを適切な免疫細胞（例えばマクロファージおよびAPC）へ輸送することを支援し、レトロ

50

インベルソTレギトープを所定の免疫細胞（例えばマクロファージおよびAPC）のエンドサイトーシス経路によりプロセッシングすることを可能にし、かつレトロインベルソTレギトープが前記免疫細胞により抗体として提示されることを支援することができる。

【0302】

レトロインベルソTレギトープー血液成分抱合体は、本開示のレトロインベルソTレギトープペプチド（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）を、レトロインベルソTレギトープペプチドに反応基を取り付けることにより修飾して、修飾されたレトロインベルソTレギトープペプチドを生成し、次いで、修飾されたレトロインベルソTレギトープペプチドの反応基と、血液成分上の反応性官能基との間の結合を形成させることにより、米国特許第6,849,714号明細書、米国特許第6,887,470号明細書、米国特許第7,256,253号明細書、および米国特許第7,307,148号明細書に開示されるように形成されてよい。アルブミンは、レトロインベルソTレギトープーアルブミン抱合体を、適切な細胞、例えばマクロファージおよびAPC内に運び込むFc新生児結合ドメインを含むため、好ましい血液成分である。さらに、アルブミンは、アミノ酸34でのシステイン（Cys³⁴）（ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列におけるアミノ酸の位置）を含み、約5のpKaを有する遊離チオールを含み、これが、アルブミンの好ましい反応性官能基として機能してよい。アルブミンのCys³⁴は、修飾されたレトロインベルソTレギトープペプチドの好ましい反応基であるマレイミドプロピオンアミド（MPA）と安定したチオエステル結合を形成することが可能である。アルブミンと、MPAで修飾されたレトロインベルソTレギトープペプチドとの間の安定したチオエステル結合は、生理学的条件下で切断することはできない。

【0303】

レトロインベルソTレギトープペプチドは、本明細書に開示されている通りであってよい（例えば、本明細書に開示された配列番号：1～29および42～107の任意の1つ以上および／またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号：1～29および42～107のポリペプチドのN末端および／またはC末端に任意の比率で分配された1～12の付加的アミノ酸、ここで、配列番号：1～29および42～107（および態様では、それらの場合による延長部）のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D型アミノ酸配置である）。1つ以上のリジンは、レトロインベルソTレギトープペプチドのN末端に存在してよく、例えば配列番号：1～6および9～54から選択されるペプチドのN末端に付加されていてよい。リンカー、例えばポリエチレングリコールリンカー（例えばPEG2またはPEG12）は、1つ以上のリシンと、レトロインベルソTレギトープ配列との間、またはレトロインベルソTレギトープ配列のN末端に存在する。態様では、場合により（N末端からC末端に向かって連続して）バリンおよびシトルリンからなるリソソーム切断部位、例えばカテプシンB部位は、PEG2基とレトロインベルソTレギトープ配列との間に存在する。マレイミドに基づく化学は、修飾されたレトロインベルソTレギトープペプチドを血液成分と、好ましくは血清アルブミンと、1：1のモル比で共有結合するために使用されてよい。修飾されたレトロインベルソTレギトープペプチドと血液成分との連結は、インビボまたはエクスピボで実施されてよい。

【0304】

カテプシンBは、リソソームシステインプロテアーゼのファミリーの最初に記載されたメンバーである。カテプシンBは、エンドペプチダーゼ活性とエキソペプチダーゼ活性の両方を有し、後者の場合、ペプチジルジペプチダーゼとして作用する。カテプシンBは、抗原提示細胞中のリソソーム区画内にある場合、アルブミンからのTレギトープの適切な切断を促進するために、レトロインベルソTレギトープペプチド設計内に含まれていた。

バリナーシトルリンは、先に好結果で使用されたカテプシン B 切断部位であり、抗体薬抱合体（例えば、ブレンツキシマブベドチン薬の形のモノメチルアウリスタチン E（MMAE）抱合体）の形で FDA 承認を受けていた。この部位を組み込むことへの関心は、ヒト血清アルブミンからのレトロインベルソ T レギトープの適切な切断を可能にし、これが APC 内にあると、効率的 MHC クラス II 提示を可能にする切断部位を提供することである。EpiVax は、カテプシン B 部位の組み込みが T レギトープ化合物または組成物の設計に必須であるかどうかを決定するために調査した。

【0305】

例 9．エクスピボ抱合によるレトロインベルソ T レギトープ-アルブミン抱合体の生成
標準 Fmoc（9-フルオレニルメトキシカルボニル）固相ペプチド合成化学を、ペプチド合成のために使用することができる。合成は、Intavis（商標）MultiPep（商標）自動ペプチド合成機で実施することができる。アミノ酸を、不溶性ポリスチレン樹脂支持体に取り付けながら、成長するペプチド鎖に段階的に（C 末端から N 末端へ；右から左へ）付加することができる。アミノ末端が Fmoc 基で保護されているアミノ酸構築ブロックは、カルボン酸末端の活性化後に、1 つ以上の縮合試薬（例えば、ヘキサフルオロホスファートアザベンゾトリアゾールテトラメチルウロニウム（HATU）、O-（1H-6-クロロベンゾトリアゾール-1-イル）-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート（HCTU））を介して生長する鎖に連結することができる。各付加時の反応副生成物は、溶媒洗浄（6X、ジメチルホルムアミド（DMF））により除去することができる。各連結ステップおよびキャッピングステップに引き続き、Fmoc は、ペプチド樹脂のピペリジン脱保護を介して除去することができ（2 回実施；Aps 脱水を抑制するために 0.1 M の HOBt を有する DMF 体積／体積中で 20 %）、樹脂を DMF で 6 回洗浄し、次のアミノ酸を添加する。カテプシン B 切断部位は、T レギトープ配列の N 末端に組み込むことができる。

【0306】

PEG2 構築物（「PEG2」または「P2」）について、所望のレトロインベルソ T レギトープペプチドが完成された後に、PEG2 基を N 末端に付加し、引き続き 4 つのリジンを N 末端に付加することができる。PEG2 およびリジンは、カテプシン B の潜在的ドッキング領域を提供するために組み込むことができる。さらに、PEG2 およびリジンは（リジン側鎖上の第一級アミンを介して）、最終構築物の溶解度を高める。PEG2 構築物の組成を、表 5（下記）に示す。

【表 5】

表5:PEG2構築組成物

HSA (Cys 34)-マレイミド連結-KKKK-Peg2-Val-Cit (CatB 切断部位)_レトロインベルソTレギトープ_Nle

【0307】

PEG12 構築物（「PEG12」または「P12」）について、PEG6 の 2 つの付加が、T レギトープペプチド合成の後に付加される。この場合、リジンは付加されない。PEG 長さが増すと、カテプシン B のためのドッキング領域も提供され、かつレトロインベルソ T レギトープの溶解度も向上する。PEG2 構築物の組成を、表 6（下記）に示す。

10

20

30

40

50

【表 6】

表6 PEG12構築組成物
HSA (Cys 34)-マレイミド連結- Peg12-Val-Cit (CatB 切断部位) _レトロインベルソトレギトープ_Nle

【0308】

引き続き、少量のペプチド構築物を、樹脂から除去し、ペプチドサンプルを、側鎖保護基を取り除くためにTIS（トリイソプロピルシラン、5%）および水（2.5%）の存在で、トリフルオロ酢酸（TFA 92.5% v/v）で処理することにより、切断および脱保護することができる。各粗製線状ペプチド（約3~5mg）を、20mm×50mmのYMC C18、5μm、Hydrosphereカラムを用いる分取逆相HPLC（Gilson）により精製することができる。ペプチドは、>90%の純度（分析HPLCを介して決定）まで精製することができ、質量は、カテプシンB評価の前に、ABI-SCIEX QSTAR XL Pro Qo-TOF質量分析計を用いて検証することができる。残りのペプチド（PEG2-レトロインベルソトレギトープおよびPEG12-レトロインベルソトレギトープ）は、後に、3-マレイミドプロピオン酸（MPA）の添加のために樹脂上に残することができる。

【0309】

組換えヒトカテプシンB（R&D Systems（商標）のカatalog 953-CY）は、レトロインベルソトレギトープペプチド内へ操作されたVal-Cit部位の切断を評価するために使用することができる。活性アッセイプロトコルは、0.01μgのrhカテプシンBおよび10μMのペプチド基質の最終アッセイ条件で、R&D Systems（商標）の推奨に従って使用することができる。カテプシンBを精製ペプチドと一緒にインキュベーションした後（RTで15分）。ペプチドは、Qstar XL Pro（商標）を用いて質量分析によって評価することができる。PEG2ペプチドは、好結果で切断されず、カテプシンBプロトコルの更なる変更が、好結果の切断を生じなかったことを決定することができる。PEG12生成物については、好結果の切断を立証することができる。

【0310】

カテプシンBによるVal-Cit部位の切断を評価した後に、3-マレイミドプロピオン酸（MPA）の反応基を、PEG2およびPEG12ペプチドのN末端に付加することができる。アミノ酸構築ブロックと同様に、MPAは、Fmoc基により保護され、カルボン酸末端の活性化の後に成長する鎖に連結される。最終的なMPA-レトロインベルソトレギトープ構築物を樹脂から除去し、ペプチドサンプルを、TIS（トリイソプロピルシラン、5%）および水（2.5%）の存在で、トリフルオロ酢酸（TFA、92.5% v/v）で処理することにより切断および脱保護することができる。各粗製線状ペプチド（約20mg）を、20mm×50mmのYMC C18、5μm、Hydrosphereカラムを用いる分取逆相HPLC（Gilson（商標））により精製することができる。MPA-ペプチドは、>90%の純度（分析HPLCを介して決定）まで精製することができる。MPA-P2およびMPA-P12レトロインベルソトレギトープの合計15mgを、最終的に予備形成されたHSA-レトロインベルソトレギトープ抱合体を構築するために、rHSA（Albucult-Novozyme（商標））との引き続き抱合において使用することができる。

【0311】

エルマン試薬（5,5'-ジチオビス-[2-ニトロ安息香酸]）を、スルフヒドリル含有化合物、例えばシステインの標準曲線と比較することにより、サンプル中のスルフヒドリル基を評価するために使用することができる。エルマン試験を、分析の精度を保証

するために、複数の濃度で r H S A (Sigma (商標)、Albucult (登録商標)) に関して実施することができる。エルマン試薬 (Sigma (商標))、Sigma (商標) ロット R F - 0 0 9 からの r H S A は、マレイミドとの抱合のために利用可能である遊離システインについて評価することができる。表 7 (下記) に示すように、r H S A の 7 8 % が、利用可能な遊離システインを有することが評価された。

【表 7】

表7 rHSAサンプル中の遊離システインの推定

グラム rHSA	モル huHSA	O.D. 412	濃度	モル	モル huHSA／モル 遊離システイン	% 遊離 システイン
0.001	1.50376E- 08	0.059	4.1696E-06	1.16749E- 08	1.29	77.64
0.002	3.00752E- 08	0.12	8.4806E-06	2.37456E- 08	1.27	78.95

10

【0312】

ペプチドを、d H 2 O 中で可溶化し、r H S A を添加し (1 5 m g / m l)、1 0 0 m M のリン酸緩衝液を添加して、最終 p H 8 にすることができる。ペプチドを、H S A に対して 1 0 倍のモル過剰で添加する。ペプチド／H S A を、室温で 2 時間インキュベーションし、引き続き 4 °C で、約 2 4 ～ 3 0 時間インキュベーションすることができる。

20

【0313】

抱合ステップ後に、次いで、H S A 抱合体を、P B S (p H 7 . 0) 内へ最初に室温で 2 時間透析し、引き続き 4 °C で 1 8 ～ 2 4 時間新たな P B S に 2 回交換することができる。このプロセスは、H S A および H S A - T レギトープ抱合体調製物から過剰のペプチドを除去する。

【0314】

エルマン試験は、r H S A 遊離システインを介してペプチドの抱合を明らかにしかつ反応における抱合の効率を決定するために、各抱合体に関して実施することができる。H S A - 抱合調製物は、既存の調製物中に内在する還元された H S A (メルカプトアルブミン) を除去しない (H A S 予備抱合の約 2 2 %)。残りの未反応の H S A は、H S A - M P A _ P 2 - T レギトープ構築物について 1 4 % に決定することができ、マレイミド T レギトープとの抱合後に、1 4 % の遊離システインが残ったことを意味する。よって、全 r H S A 調製物の約 6 4 % を、M P A _ P 2 - T レギトープペプチドと反応させることができる。

30

【0315】

(1 0) 免疫細胞に関するレトロインベルソ T レギトープー血液成分抱合体の効果を評価する方法

40

マレイミドベースの化学を、レトロインベルソ T レギトープ (例えば、本明細書に開示された配列番号: 1 ～ 2 9 および 4 2 ～ 1 0 7 の任意の 1 つ以上および / またはそれらの断片およびそれらの変異体、ならびに場合により、配列番号: 1 ～ 2 9 および 4 2 ～ 1 0 7 のポリペプチドの N 末端および / または C 末端に任意の比率で分配された 1 ～ 1 2 の付加のアミノ酸、ここで、配列番号: 1 ～ 2 9 および 4 2 ～ 1 0 7 (および態様では、それらの場合による延長部) のアミノ酸の各々は、グリシンを除き、D 型アミノ酸配置である) ペイロードを組換え H A S (r H S A) に 1 : 1 の化学量論で共有結合するために使用されてよい。マレイミド-プロピオンアミド (M P A) は、H S A 中の利用可能な遊離 C y s 3 4 と安定したチオールエステル抱合体を形成する。H S A は、新生児受容体 (F c R n) リサイクル経路をレバレッジし、任意の抱合されたペイロードの半減期を延長し、

50

繰り返し投与の必要性を潜在的に低減する。r H S Aは、抱合されたペイロードをリンパ節に輸送することも公知であり、樹状細胞およびF c R nを発現する他の抗原提示細胞によりエンドサイトーシスされる。

【0316】

E p i V a xは、レトロインベルソTレギトープの間に切断部位が含まれるようにr H S AーレトロインベルソTレギトープ抱合体を設計する。この切断部位は、レトロインベルソTレギトープをr H S A分子から遊離させ、細胞表面でのH M CクラスII提示の効率が向上することを可能にする初期エンドソームプロテアーゼに特異的である。このF D A承認r H S A抱合体化学アプローチの長くかつ実証された履歴、ならびにその好結果の製造の履歴は、T 1 Dペイロードの輸送のためのその選択を支持する。

10

【0317】

レトロインベルソTレギトープー血液成分抱合体が、本明細書に記載されるように形成されると、レトロインベルソTレギトープー血液成分抱合体は、エフェクターT細胞の阻害および制御性T細胞の活性化、およびそれらの増殖における有効性について、例えばレトロインベルソTレギトープペプチド単独と比較して評価されてよい。さらに、レトロインベルソTレギトープー血液成分抱合体は、所定の抗原に対する免疫寛容を誘導するその能力について評価されてよい。

【0318】

例10. レトロインベルソTレギトープーアルブミン輸送媒体の阻害効果の評価

レトロインベルソTレギトープ輸送媒体の阻害効果を決定するために、健康なドナーP B M Cを、破傷風トキソイドバイスタンダー抑制アッセイ(T T B S A)において使用し、C D 4 + T細胞増殖、T細胞活性化、T r e g / T e f fの比率を決定するためのTエフェクターおよびT制御性細胞の頻度に関して分析を行う。

20

【0319】

このように、臨床のための翻訳のためにレトロインベルソTレギトープの最良の組合せを最適化するために、インビボでのエフェクターT細胞応答を相乗的に抑制するその能力についてレトロインベルソTレギトープの組合せの効果を分析する。それらの比較を容易にするために、高スループットインビトロアッセイを、ヒトドナー末梢血単核細胞(P B M C)を使用して開発する。破傷風トキソイドバイスタンダー抑制アッセイと言われるこのアッセイは、破傷風トキソイド(T T)ワクチン接種の履歴のある個人において引き起こされる破傷風に特異的なTメモリー細胞を抑制するT r e gの能力を利用する。

30

【0320】

0日目に、P B M Cをインキュベートし、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(C F S E)染料で染色する。1日目に、細胞を、培地、破傷風トキソイド、および8、6、または24 μ g / m LのレトロインベルソTレギトープ；または10、40、または100 μ g / m LのレトロインベルソTレギトープーアルブミン抱合体のいずれかを添加することにより刺激する。破傷風トキソイドは、0.5 μ g / m Lの最終濃度で使用され、この濃度は、レトロインベルソTレギトープの阻害能力を測定するために念入りに滴定されかつ最適化される。培地だけを含む陰性対照が含まれる。7日目に、L / D細胞集団マーカー、細胞外染料、および細胞内染料を、細胞に添加する。8日目に、読み出しを行う。活性化マーカー(例えば、C F S E、C D 2 5)および細胞集団マーカー(例えば、L / D、C D 2 c、C D 4、およびF o x P 3)の分析のための細胞選別アッセイを実施する。

40

【0321】

ドナーP B M Cの、T Tと一緒にインキュベーションは、Tエフェクター細胞の増殖を刺激する。レトロインベルソTレギトープを、T Tと一緒にインビトロでP B M Cに添加し、T T特異的Tエフェクター細胞の増殖を抑制するC D 2 5^{hi} F o x P 3^{hi}制御性T細胞を活性化する。Tレギトープは、用量依存でC D 4 + Tエフェクター細胞の増殖(C F S E希釈により測定)および活性化(C D 2 5発現により測定)を有意に阻害し、T r e g / T e f f細胞の比率での増大により示唆されるT r e g (C D 2 5⁺ / F o x P

50

3⁺/CD127^{lo})を僅かに増殖させる。エフェクターT細胞増殖の低下は、T制御性細胞の活性化および／または例えばインビボでのTregの誘導によって支援されるようなTT特異的TエフェクターのTregへの変換の直接的な結果である。

【0322】

TTBSAを使用して、多数の利用可能なレトロインベルソTレギトープの各々は、個別にかつ対で組み合わせて、CD4⁺T細胞増殖を抑制するその能力について調査されてよい。先の研究は、TレギトープAが、他の単一のTレギトープと比較して、TTBSAにおける最も制御活性を有する単一のTレギトープであることを示す。TレギトープAとTレギトープCとの組合せで、TT特異的T細胞増殖の更なる大きな抑制効果が観察された。A+CのrHSAへの抱合は、インビトロでのその有効性を改善する。

10

【0323】

HSA-レトロインベルソTレギトープ抱合体は、CD4⁺T細胞の増殖および活性化を阻害し、Treg細胞対Teff細胞の比率を増大させることが予想される。

【0324】

例11. 予備形成された抱合体のHSA-レトロインベルソTレギトープ治療薬およびマレイミド-レトロインベルソTレギトープ治療薬の有効性の評価

予備形成された抱合体のHSA-レトロインベルソTレギトープ治療薬および遊離マレイミド-レトロインベルソTレギトープペプチドのOVA免疫に対する応答に関する効果を評価する。後者の遊離マレイミドペプチドは、注射後にインビボで、被験体の内因性HSAの遊離Cys34に対する反応性マレイミド基を介した抱合を形成する。5mgのMPA-P2およびMPA-P12を、遊離MPA-レトロインベルソレギトープとして使用し、サンプル中の抱合されていないHSAは、抱合されたHSA対抱合されていないHSAのモル比を計算することにより説明される。

20

【0325】

マウス(メスC57BL/6)に、0日目(CFA)および14日目(IFA)で50mgのオバルブミン(OVA)で皮下で免疫化する。予備形成されたHSA抱合体処置は、0日目にCFA中のOVAと一緒に投与する。試験グループは、OVA/HSA-P2-highおよびOCA/HSA-P2-lowを含む。注射当たりのOVAは、50μgであり、HSAは800μgであり、HSA-P2H(high)抱合は、825μg(約20μgのTレギトープ)である。HSA-P2L(low)抱合は、100μg(約3.7μgのレトロインベルソTレギトープ)である。4つの対照グループは、PBSだけ、PBS/OVA、HSA/OVA、およびレトロインベルソTレギトープ/OVAを含む。最後のアームは、遊離マレイミド-レトロインベルソTレギトープペプチドの有効性を評価するために含まれ、IVにより尾静脈内に投与する。グループ当たり5匹のマウスがいる。

30

【0326】

マウスを17日目に犠牲にする。犠牲にする際に、各動物について、心臓血および脾臓を採取する。IFNγ/IL2蛍光スポットアッセイ、IFNγ/IL17蛍光スポットアッセイ、CD4⁺T細胞増殖、およびT細胞特性決定を、OVAで刺激された脾細胞について実施する。PHAを、脾臓細胞アッセイについての陽性対照刺激として使用する。PHA刺激におけるウェルの全ては、融合性(confluent)である。刺激後のSFC(スポット形成細胞)は、陰性対照(培地ウェル)に対して50スポット/10⁶より大きくなければならない、また刺激指数は2より大きくなければならないという合格基準を使用する。IFNγ/IL2蛍光スポットアッセイとIFNγ/IL17蛍光スポットアッセイの両方によると、IFNγ産生は、治療により阻害され、HSAだけの対照グループは、治療グループと比較して僅かに阻害される。

40

【0327】

T細胞増殖および特性決定アッセイについて、脾臓細胞サンプルを、TCRTg細胞におけるFoxP3発現の誘導についてかつCFSE希釈によるOVA特異的T細胞増殖(インビトロでのOVAペプチドに対する応答において)の抑制について評価する。Fox

50

P3⁺Tregを検出するために、流入領域リンパ節の単細胞懸濁液は、FcRをブロックするために、2.4G2mAb（抗CD16/32、ATCC）と一緒に15分間インキュベートし、次いで、4℃で40分間、抗CD3、CD4、CD25および抗クロノタイプKJ1-26で染色する。KJ1-26は、DO11.10トランスジェニックマウスにより発現されるクロノタイプTCRに対して特異的である。次いで、細胞を、透過処理し、FoxP3核発現について染色し、FACS分析のために、Thermo Attune NxT Autosampler（商標）で獲得する。PBSまたはHSA単独と比較したOVA特異的T制御細胞の数および割合を決定するために、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺KJ1-26⁺生細胞ゲート集団を確立する。

【0328】

抗原特異的T細胞増殖は、CFSE希釈により評価される。流入領域リンパ節を採取し、細胞増殖染料CFSEで染色し、単細胞懸濁液を、 2×10^6 細胞/mLで調製する。細胞を、OVA323-339（New England Peptide, Gardner, MA, USA）の10 μg/mL濃度の存在で、96ウェルプレートに、ウェル当たり100 μLで添加する。細胞を、72時間刺激し、4℃で40分間、CD3α、CD4、CD8、CD54RA、CCR7、CD25、CD127、INFγHLA-II、CD69、CD154、IL-17、IL-21で染色するために採取する。細胞を固定し、透過処理し、FoxP3発現について染色し、フローサイトメトリーにより分析する。rHSAで処理されたマウスと比較して、遊離マレイミド-レトロインベルソトレギトープおよびHSA-レトロインベルソトレギトープ抱合体で処理されたマウス中のOVA特異的KJ1-26⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺適応性（変換された）T制御性細胞の増加が観察される。遊離マレイミド-レトロインベルソトレギトープおよびHSA-レトロインベルソトレギトープ抱合体は、rHSA単独と比較して、KJ1-26⁺CD4⁺Tエフェクター細胞のOVA特異的増殖をより効果的に低減する。

【0329】

17日目に採取された血液からの血清中の抗OVA抗体を、抗体濃度の決定のために、連続希釈プロットおよび標準ELISAを含むELISAにより血清中で評価する。HSA-レトロインベルソトレギトープ抱合体および遊離マレイミドで処置されたマウスは、異なる希釈度での吸光度、ならびに標準曲線上での吸光度の比較により示されるように、未処置のものと比較して低い血清抗体価を有することが予想されることが予想される。

【0330】

均等物

本開示は、その特別な実施形態と関連して説明されたが、更なる変更が可能であることが理解される。さらに、本出願は、本発明が属する分野における公知または慣用の実施の範囲内にある、ならびに添付の特許請求の範囲内にある本開示からの逸脱を含む本発明の任意の変更、使用または適応をカバーすることを意図している。

【図面】

【図1】

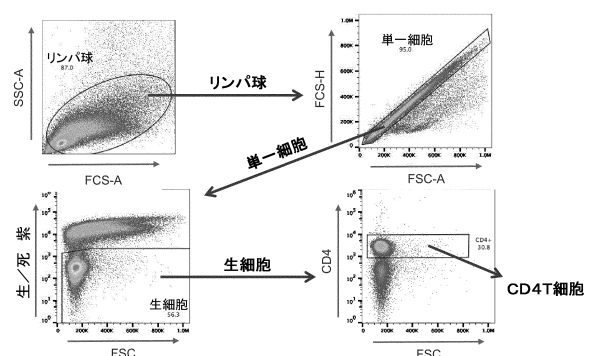
例示的EpiBar
目録：インフルエンザ配列：HA306-318

フレーム開始	AA配列	フレーム停止	DRB1*0101 Zスコア	DRB1*0301 Zスコア	DRB1*0401 Zスコア	DRB1*0701 Zスコア	DRB1*0901 Zスコア	DRB1*1101 Zスコア	DRB1*1301 Zスコア	DRB1*1501 Zスコア	HTS
306	EVVAVNTL	314	1.34	1.40		2.06				1.28	1
307	EVVAVNTL	315									
308	YVAVNTL	316	3.33	1.97	3.15	3.77	1.96	1.99	2.37	7.39	6
309	VAVNTLKA	317					1.59	1.67			1
310	EVNTLKLAT	318									

Zスコアは、所与のHLA対立遺伝子に結合する9量体フレームの能力を示す。スコアの強度は、以下に示すように黄色シェーディングにより示す：
 概略されたクラスター領域 上位1%のZスコア 上位5%のZスコア 上位10%のZスコア 隠された残りのスコア*

実施された評価: 40 予想から導出: 17. 62

【図2A】



10

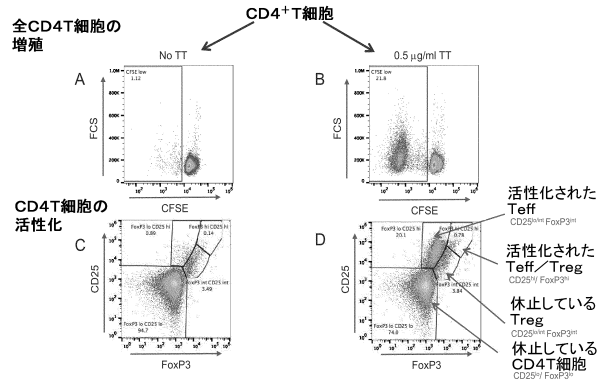
20

30

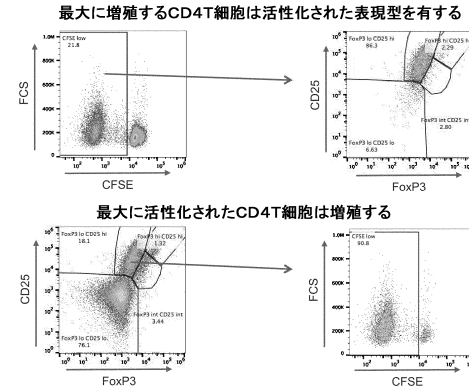
40

50

【図 2 B】



【図 2 C】

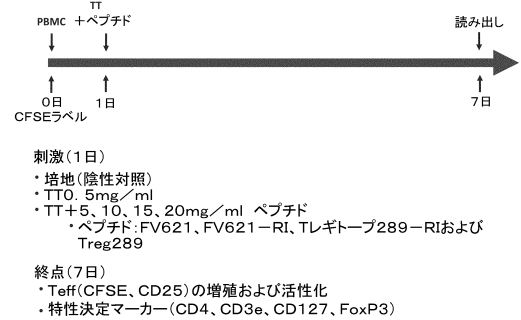


【図 3】

名称	配列	HLA DRB1 (IC50)							
		*0101	*0301	*0401	*0701	*1101	*1301	*1501	
配列番号:114	TLレギトープ289	55QYNSTRVVSVLTLRQD	19	1574	1208	115	84	1857	2111
配列番号:16	TLレギトープ289-RI	dqhlvtlvavvrytanyqee	190	496	4490	812	3425	3177	908
配列番号:115	FV621	tlsttwtgtsfvyok	235	341	500	153	1005	916	308
配列番号:100	FV621-RI	kayifshgtfhtlli	179	249	337	311	701	534	191
最も強い結合 (<100nMのIC50値)									
強い結合 (100~1000nMのIC50値)									
中程度の結合 (1,000~10,000nMのIC50値)									
弱い結合 (>100,000nMのIC50値)									
結合なし									

【図 4】

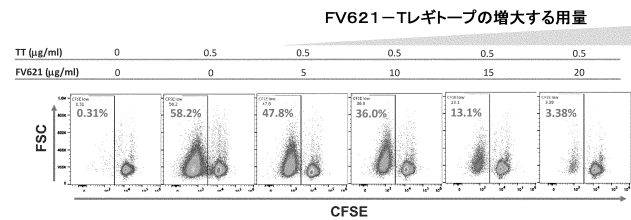
アッセイのアウトライン



【図 5】

ドナー ID	HLAハプロタイプ		性別	年齢
	対立遺伝子1	対立遺伝子2		
EV0145	DRB1*01:02	DRB1*04:02	M	58
EV0149	DRB1*01:01	DRB1*07:01	F	59
EV0158	DRB1*03:01	DRB1*13:03	M	72
EV0167	DRB1*03:01	DRB1*16:01	F	67

【図 6】



10

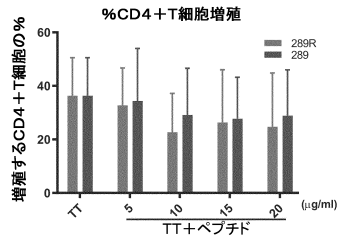
20

30

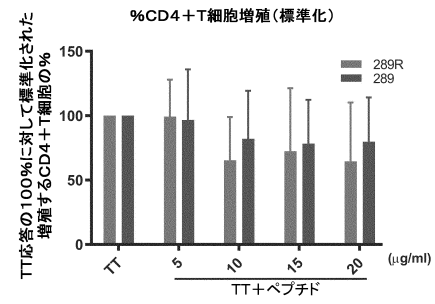
40

50

【図 7 A】

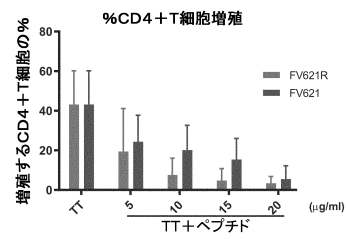


【図 7 B】

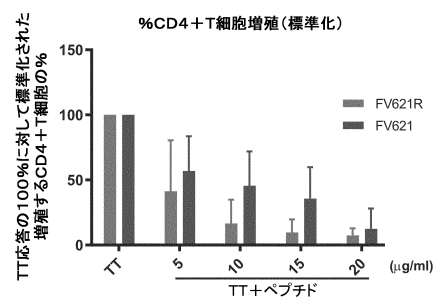


10

【図 8 A】



【図 8 B】



20

【配列表】

2023543801000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US21/52017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 38/17; C07K 14/705; A61P 37/06 (2021.01)

CPC - A61K 38/1774; A61K 38/177; C07K 14/70503; C07K 14/705; A61P 37/06; A61K 2035/122

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/071116 A1 (EPIVAX, INC.) 11 April 2019; page 4, second paragraph; page 5, second paragraph; page 6, second-third paragraphs; page 7, second paragraph page 10, first paragraph; page 31, second-third paragraphs; claims 9, 24	1-79
A	WO 2012/142022 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 18 October 2012; paragraphs [00060], [000168]; claim 3	1-79
A	GENPEPT, "hypothetical protein Pla110_08910 [Polystyrenella longa]". ACCESSION: QDU79186.1. Web. 31 July 2019; [retrieved 01 February 2022]. Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/QDU79186.1?report=genbank&log\$=prottop&blast_rank=2&RID=ZJTHKNBG01R >; pages 1-2	1-79

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 February 2022 (01.02.2022)

Date of mailing of the international search report

FEB 14 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/52017

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/US21/52017

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.:
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:
-***Please See Supplemental Page-***

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.:
Groups I+, Claims 1-79 and SEQ ID NO: 1 (amino acid sequence)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/52017

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-79 and SEQ ID NO: 1 (amino acid sequence) are directed towards polypeptides, nucleic acids, vectors, cells, methods, compositions, pharmaceutical compositions, and kits comprising, consisting of, or consisting essentially of retro-inverso T-cell epitopes.

The polypeptides, nucleic acids, vectors, cells, methods, compositions, pharmaceutical compositions, and kits of Claims 1-79 (each in-part) are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (first exemplary amino acid sequence).

Applicant is invited to elect additional amino acid sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional amino acid sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 2 (amino acid sequence).

No technical features are shared between the amino acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a polypeptide comprising an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a polypeptide consisting essentially of an amino acid sequence, and/or fragments and variants thereof, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a polypeptide consisting of an amino acid sequence, and/or fragments and variants thereof, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a nucleic acid encoding a polypeptide consisting essentially of an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a nucleic acid encoding a polypeptide consisting of an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a vector comprising the nucleic acid according; a call comprising the vector; a method for suppressing an immune response in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide comprising an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a composition comprising an effective amount of a polypeptide comprising an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration, and one or more immune stimulating T-cell epitope polypeptides wherein said composition suppresses the immune response activated by said immune stimulating T-cell epitope polypeptide; a pharmaceutical composition comprising a polypeptide comprising an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a method for stimulating regulatory T-cells in a subject in need thereof, suppressing an immune response in a subject in need thereof, and suppressing an antigen-specific immune response in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the composition; a method for suppressing an immune response in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition comprising a polypeptide comprising an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a kit for suppressing an immune response in a subject, wherein the kit comprises the composition; a method for expanding a population of regulatory T cells of a patient, comprising: a) providing a biological sample obtained from a subject; and b) isolating regulatory T-cells from the biological sample; and contacting the isolated regulatory T-cells with an effective amount of the composition under conditions wherein the T-regulatory cells increase in number to yield an expanded regulatory T-cell composition, thereby expanding the regulatory T-cells in the biological sample; and c) returning said increased number of regulatory T cells to said patient; a method for stimulating regulatory T cells in a biological sample, comprising: a) providing a biological sample obtained from a subject; b) isolating regulatory T-cells from the biological sample; and contacting the isolated regulatory T-cells with an effective amount of the composition under conditions wherein the T-regulatory cells are stimulated to alter one or more biological function, thereby stimulating the regulatory T-cells in the biological sample; a polypeptide composition comprising a retro-inverso T-cell epitope polypeptides linked to a heterologous polypeptide, wherein the retro-inverso T-cell epitope polypeptide consists of an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; a method of inducing regulatory T-cells to suppress immune response in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide composition, wherein the polypeptide composition comprises a retro-inverso T-cell epitope polypeptides linked to a heterologous polypeptide, wherein the retro-inverso T-cell epitope polypeptide consists of an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/52017

-***Continued from previous Supplemental Box-***

terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration; these shared technical features are previously disclosed by WO 2019/071116 A1 (EPIVAX, INC.) (hereinafter 'EpiVax').

EpiVax discloses a polypeptide comprising an amino acid sequence, and/or fragments and variants thereof (a polypeptide which is a Tregitope comprising an amino acid sequence; page 4, second paragraph), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph); a polypeptide consisting essentially of an amino acid sequence, and/or fragments and variants thereof (a polypeptide which is a Tregitope consisting essentially of an amino acid sequence; page 4, second paragraph), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph); a polypeptide consisting of an amino acid sequence, and/or fragments and variants thereof (a polypeptide which is a Tregitope consisting of an amino acid sequence; page 4, second paragraph), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph); a nucleic acid encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence, and/or fragments and variants thereof (a nucleic acid encoding a polypeptide which is a Tregitope comprising an amino acid sequence; page 6, second paragraph), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph); a nucleic acid encoding a polypeptide consisting essentially of an amino acid sequence, and/or fragments and variants thereof (a nucleic acid encoding a polypeptide which is a Tregitope consisting essentially of an amino acid sequence; page 6, second paragraph), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph); a vector comprising the nucleic acid (a vector comprising the nucleic acid; page 6, second paragraph); a cell comprising the vector (a cell comprising the vector; page 6, second paragraph); a method for suppressing an immune response in a subject in need thereof (a method for suppressing an immune response in a subject; page 10, first paragraph), the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide comprising an amino acid sequence (administering a therapeutically effective amount of Tregitope composition having an amino acid sequence; page 10, first paragraph), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph); a composition comprising an effective amount of a polypeptide comprising an amino acid sequence (a composition comprising an effective amount of a polypeptide comprising an amino acid sequence; claims 9, 24), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the isolated polypeptide is a Tregitope which are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, second-third paragraphs; claims 9, 24), and one or more immune stimulating T-cell epitope polypeptides (and one or more immune stimulating T-cell epitope polypeptides; claim 24) wherein said composition suppresses the immune response activated by said immune stimulating T-cell epitope polypeptide (wherein said composition suppresses the immune response activated by said immune stimulating T-cell epitope polypeptide; claim 24); a pharmaceutical composition comprising a polypeptide comprising an amino acid sequence (a pharmaceutical composition comprising a Tregitope comprising an amino acid sequence; page 6, third paragraph), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph); a method for stimulating regulatory T-cells in a subject in need thereof (a method for stimulating regulatory T-cells in a subject in need thereof; page 7, second paragraph), suppressing an immune response in a subject in need thereof (suppressing an immune response in a subject in need thereof; page 7, second paragraph), and suppressing an antigen-specific immune response in a subject in need thereof (and suppressing an antigen-specific immune response in a subject in need thereof; page 7, second paragraph; page 10, second paragraph), the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the composition (administering to the subject a therapeutically effective amount of the composition; page 7, second paragraph; page 10, second paragraph); a method for suppressing an immune response in a subject in need thereof (a method for suppressing an immune response in a subject in need thereof; page 7, second paragraph), the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a composition comprising a polypeptide (administering to the subject a therapeutically effective amount of the Tregitope composition; page 7, second paragraph) comprising an amino acid sequence, and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph); a kit for suppressing an immune response in a subject (a kit for suppressing an immune response in a subject; page 11, third paragraph), wherein the kit comprises the composition (the kit comprising the Tregitope composition; page 11, third paragraph); a method for expanding a population of regulatory T cells of a patient (a method for expanding a population of regulatory T cells of a subject; page 9, second paragraph), comprising: a) providing a biological sample obtained from a subject (providing a biological sample from a subject; page 9, second paragraph); and b) isolating regulatory T-cells from

-***Continued Within the Next Supplemental Box-***

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/52017

-***-Continued from previous Supplemental Box-***-

the biological sample (isolating regulatory T-cells from the biological sample; page 9, second paragraph); and contacting the isolated regulatory T-cells with an effective amount of the composition under conditions wherein the T-regulatory cells increase in number to yield an expanded regulatory T-cell composition (contacting the isolated regulatory T-cells with an effective amount of the Tregitope composition under conditions wherein the T-regulatory cells increase in number to yield an expanded regulatory T-cell composition; page 9, second paragraph), thereby expanding the regulatory T-cells in the biological sample (thereby expanding the regulatory T-cells in the biological sample; page 9, second paragraph); and c) returning said increased number of regulatory T cells to said patient (returning the sample comprising the increased regulatory T cells to the patient; page 9, second paragraph); a method for stimulating regulatory T cells in a biological sample (a method for stimulating regulatory T cells in a biological sample; page 9, third paragraph), comprising: a) providing a biological sample obtained from a subject (providing a biological sample obtained from a subject; page 9, third paragraph); b) isolating regulatory T-cells from the biological sample (isolating regulatory T-cells from the biological sample; page 9, third paragraph); and contacting the isolated regulatory T-cells with an effective amount of the composition under conditions wherein the T-regulatory cells are stimulated to alter one or more biological function (contacting the isolated regulatory T-cells with an effective amount of Tregitope composition under conditions wherein the T-regulatory cells are stimulated to alter one or more biological function; page 9, third paragraph), thereby stimulating the regulatory T-cells in the biological sample (thereby stimulating the regulatory T-cells in the biological sample; page 9, third paragraph); a polypeptide composition (a polypeptide composition; page 5, second paragraph) comprising a retro-inverso T-cell epitope polypeptides linked to a heterologous polypeptide (comprising a Tregitope linked to a heterologous polypeptide, where the Tregitope is a retro-inverso T-cell epitope polypeptide; page 5, second paragraph; page 31, third paragraph), wherein the retro-inverso T-cell epitope polypeptide consists of an amino acid sequence (the retro-inverso Tregitope consists of an amino acid sequence; page 5, second paragraph; page 31, third paragraph), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph); a method of inducing regulatory T-cells to suppress immune response in a subject (a method of inducing regulatory T-cells to suppress an immune response in a subject; page 7, second paragraph) comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide composition (administering to the subject a therapeutically effective amount of a Tregitope composition; page 7, second paragraph), wherein the polypeptide composition comprises a retro-inverso T-cell epitope polypeptides linked to a heterologous polypeptide (the Tregitope composition comprises a Tregitope linked to a heterologous polypeptide, where the Tregitope is a retro-inverso T-cell epitope polypeptide; page 5, second paragraph; page 7, second paragraph; page 31, third paragraph), wherein the retro-inverso T-cell epitope polypeptide consists of an amino acid sequence (the retro-inverso Tregitope consists of an amino acid sequence; page 5, second paragraph; page 31, third paragraph), and optionally 1 to 12 additional amino acids distributed in any ratio on the N terminus and/or C-terminus of the polypeptide, wherein each of the amino acids of the sequence, and optionally the extensions thereof, except for glycine are in the D-amino acid configuration (the Tregitopes are retro-inverso peptides (each of the amino acids of the sequence except for glycine are in the D-amino acid configuration); page 31, third paragraph).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the EpiVax reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 1 2 N	15/33	(2006.01)	C 1 2 N	15/33	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	5/0784	(2010.01)	C 1 2 N	5/0784	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 K	38/01	(2006.01)	A 6 1 K	38/01	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	35/15	(2015.01)	A 6 1 K	35/15	
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64	

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

弁理士 森田 拓

(74)代理人 100116403

弁理士 前川 純一

(74)代理人 100134315

弁理士 永島 秀郎

(74)代理人 100162880

弁理士 上島 類

(72)発明者 アン ディ グルース

アメリカ合衆国 0 2 9 0 9 ロードアイランド、プロビデンス、バレー ストリート 1 8 8、ス
ウィート 4 2 4 ケア・オブ エピボックス、インコーポレイテッド

(72)発明者 ウィリアム マーティン

アメリカ合衆国 0 2 9 0 9 ロードアイランド、プロビデンス、バレー ストリート 1 8 8、ス
ウィート 4 2 4 ケア・オブ エピボックス、インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA01Y AA57X AA72X AA87X AA90Y AA95Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA44

4C076 CC07 CC41 EE59

4C084 BA01 BA02 BA08 BA18 BA23 NA14 ZA531 ZA541 ZA811 ZB081
ZB131 ZB261 ZB331 ZB351 ZB371

4C085 AA02 BA01 EE03

4C087 AA01 AA02 BB64 DA32 NA14 ZB08

4H045 AA11 AA30 BA15 BA16 BA17 CA01 CA11 CA40 DA86 EA20
EA31 FA20 FA74