

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6885728号
(P6885728)

(45) 発行日 令和3年6月16日 (2021.6.16)

(24) 登録日 令和3年5月17日 (2021.5.17)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10

請求項の数 31 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-565137 (P2016-565137)	(73) 特許権者	513200313
(86) (22) 出願日	平成27年1月23日 (2015.1.23)		キングス・カレッジ・ロンドン
(65) 公表番号	特表2017-505634 (P2017-505634A)		イギリス国, ロンドン グレーター ロン
(43) 公表日	平成29年2月23日 (2017.2.23)		ドン ダブリューシー2アール 2エルエ
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/012752		ス, ストランド
(87) 国際公開番号	W02015/109340	(73) 特許権者	509239956
(87) 国際公開日	平成27年7月23日 (2015.7.23)		トラスティーズ・オブ・ダートマス・カレ
審査請求日	平成30年1月22日 (2018.1.22)		ッジ
審判番号	不服2020-2356 (P2020-2356/J1)		アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03
審判請求日	令和2年2月21日 (2020.2.21)		755, ハノーヴァー, ロープ・フェリー
(31) 優先権主張番号	14/534, 793		・ロード 11, オフィス・オブ・テクノ
(32) 優先日	平成26年11月6日 (2014.11.6)		ロジー・トランスファー
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V I S T Aアンタゴニスト及び使用の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1のアミノ酸配列 (S e r - S e r - A l a - C y s - A s p - T r p - I l e - L y s - A r g - S e r - C y s - H i s) に同一の アミノ酸配列 を含み、V I S T A に結合してV I S T A 活性に拮抗する ペプチド からなる、単離されたV I S T A アンタゴニスト。

【請求項2】

配列番号1のアミノ酸配列 (S e r - S e r - A l a - C y s - A s p - T r p - I l e - L y s - A r g - S e r - C y s - H i s) に同一のペプチドのマルチマー からなる、単離されたV I S T A アンタゴニスト。

【請求項3】

配列番号1のアミノ酸配列 (S e r - S e r - A l a - C y s - A s p - T r p - I l e - L y s - A r g - S e r - C y s - H i s) の ペプチド からなる、請求項1に記載の単離されたV I S T A アンタゴニスト。

【請求項4】

請求項1に記載のペプチドまたは請求項2に記載のペプチドのマルチマーに対して、インビボ半減期を改善するように修飾した修飾ペプチドであって、前記修飾が、P E G 化、アセチル化、X T E N 化、及び コンジュゲート 化 からなる群から選択される、単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項5】

10

20

コンジュゲート化がアルブミンへのコンジュゲート化である、請求項 4 に記載の単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 に記載のペプチドのマルチマーに対して、免疫グロブリンポリペプチドまたはその断片が直接または間接的に付加された、単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項 7】

前記免疫グロブリンポリペプチドが、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 若しくは I g G 4 の定常領域またはその断片を含む、請求項 6 に記載の単離されたアンタゴニスト。

【請求項 8】

前記免疫グロブリンポリペプチドが、ヒト I g G 1 定常領域またはその断片を含む、請求項 6 に記載の単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項 9】

ペプチドのマルチマーが 2、3、4、5、6、7 またはそれ以上のコピーのペプチドを含む、請求項 2 に記載の単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 に記載のペプチドのマルチマーに対して、標的部位へ標的化する別の部分が付加された、単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項 11】

前記標的化部分が、抗原へ結合する抗体若しくはリガンド、標的細胞によって発現される受容体、または感染性病原体から選択される、請求項 10 に記載の単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 に記載のペプチドのマルチマーに対して、リンカーを介して別の部分が付加された、単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項 13】

前記リンカーが、アンタゴニストが標的細胞の表面上で発現される V I S T A と相互作用することを可能にするペプチドである、請求項 12 に記載の単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項 14】

請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 に記載のペプチドのマルチマーに対して、検出可能標識または治療薬剤が直接または間接的に付加された、単離された V I S T A アンタゴニスト。

【請求項 15】

治療上、予防上または診断上有効量の請求項 1 または 2 に記載の単離された V I S T A アンタゴニストを含む、治療用、予防用、診断用の使用のために適切な組成物。

【請求項 16】

薬学的に許容される担体、希釈剤、溶解剤、防腐剤またはその混合物を更に含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

別の治療薬剤を更に含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記他の治療薬剤が、抗癌剤、抗ウイルス剤、サイトカインまたは免疫アゴニストである、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記他の治療薬剤が、C T L A - 4 - I g、抗 - P D - 1、P D - L 1 融合タンパク質または P D - L 2 融合タンパク質、及び E G F R アンタゴニストから選択される、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 20】

皮下投与または静脈内投与のために適切である、請求項 15 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 に記載のペプチドのマルチマーをコードする、単離された核酸。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の単離された核酸を含有する、ベクター。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 に記載の単離された核酸または該核酸を含有するベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 2 4】

哺乳類細胞、細菌細胞、真菌性細胞、酵母細胞、鳥類細胞または昆虫細胞である、請求項 2 3 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 2 5】

請求項 2 3 に記載の宿主細胞を、V I S T A アンタゴニストの発現を提供する条件下で、培養することを含む、V I S T A アンタゴニストを発現する方法。

【請求項 2 6】

V I S T A 媒介性 T 細胞抑制を遮断、阻害または中和するために、それを必要とする対象において使用される、治療的有効量の請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の V I S T A アンタゴニストを含む医薬組成物。

【請求項 2 7】

対象における免疫応答を刺激するために、それを必要とする対象において使用される、治療的有効量の請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の V I S T A アンタゴニストを含む医薬組成物。

20

【請求項 2 8】

癌に罹患している対象の治療に使用するための、請求項 2 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

抗癌免疫または抗腫瘍免疫を促進するために、それを必要とする対象において使用される、治療的有効量の請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の V I S T A アンタゴニストを含む医薬組成物。

【請求項 3 0】

癌を治療または防止する、腫瘍浸潤及び／または癌転移を阻害するために、それを必要とする対象において使用される、治療的有効量の請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の V I S T A アンタゴニストを含む医薬組成物。

30

【請求項 3 1】

感染を治療するために、それを必要とする対象において使用される、治療的有効量の請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の V I S T A アンタゴニストを含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

40

【0 0 0 1】 本出願は、2 0 1 3 年 6 月 2 4 日に提出された 1 3 / 9 2 5 , 0 9 4 の一部継続出願であり、それは、2 0 1 2 年 6 月 2 5 日に提出された米国仮出願番号 6 1 / 6 6 3 , 9 6 9 及び 2 0 1 2 年 6 月 2 2 日に提出された米国仮出願番号 6 1 / 6 6 3 , 4 3 1 の優先権を主張し、2 0 1 4 年 1 月 1 4 日に提出された米国仮出願番号 6 1 / 9 2 7 , 0 6 1 の優先権も主張し、各々のものの内容（配列リストが含まれる）はそれらの全体を参照することによって本明細書において援用される。

【0 0 0 2】

【0 0 0 2】 6 8 8 バイトのサイズを有し、2 0 1 4 年 1 1 月 6 日に生成された「4 3 2 6 0 0 1 0 0 3」と命名された配列表ファイルは、その全体を参照することによって本明細書に援用される。

50

【背景技術】

【0003】

【0003】 免疫系は、共刺激及び共阻害のリガンド及び受容体によって厳密に制御される。これらの分子は、T細胞活性化の第2のシグナルだけではなく、自己への免疫を限定しながら感染に対する免疫応答を最大化する正負のシグナルのバランスのとれたネットワークも提供する。

【0004】

【0004】 免疫応答の誘導は、T細胞の増殖、分化、収縮及びT細胞記憶の確立を必要とする。T細胞は抗原提示細胞（APC）に遭遇し、T細胞受容体（TCR）／主要組織適合複合体（MHC）の相互作用を介してAPC上で情報をやりとりする。一旦TCR／MHC相互作用が確立されたならば、T細胞とAPCとの間の受容体－リガンド接触の他のセット、すなわちCD154／CD40及びCD28／B7.1－B7.2経由の共刺激が必要とされる。これらの接触の間の相乗性は病原体及び腫瘍を消去することができる生産的な免疫応答をもたらす、自己免疫を誘導し得る。

【0005】

【0005】 別のレベルの制御、すなわち調節T細胞（T_{reg}）が同定されている。T細胞のこの特定のサブセットは胸腺中で生成され、周辺部の中へ送達され、T細胞応答の持続的及び誘導性の制御ができる。Sakaguchi（2000）Cell 101（5）：455－8；Shevach（2000）Annu. Rev. Immunol. 18：423－49；Bluestone and Abbas（2003）Nat. Rev. Immunol. 3（3）：253－7。T_{reg}はCD4＋CD25＋表現型によって表わされ、高レベルの細胞傷害性Tリンパ球関連抗原－4（CTLA－4）、OX－40、4－1BB及びグルコシルチコイド誘導性TNF受容体関連タンパク質（GITR）も発現する。McHugh, et al.（2002）Immunity 16（2）：311－23；Shimizu, et al.（2002）Nat. Immun. 3（2）：135－42。5日目の新生仔の胸腺摘出または抗CD25を使用する抗体枯渇によるT_{reg}細胞の排除は、自己免疫性病理、ならびに外来抗原及び自己抗原へのT細胞応答の増悪（抗腫瘍応答の増強が含まれる）の誘導をもたらす。Sakaguchi, et al.（1985）J. Exp. Med. 161（1）：72－87；Sakaguchi, et al.（1995）J. Immunol. 155（3）：1151－64；Jones, et al.（2002）Cancer Immun. 2：1。加えて、抗CD25モノクローナル抗体によるT_{reg}の枯渇が移植寛容の除去及び急性移植片拒絶をもたらすので、T_{reg}は移植寛容の誘導ならびに維持にも関与している。Jarvinen, et al.（2003）Transplantation 76：1375－9。アゴニスト性モノクローナル抗体とT_{reg}の表面上でのGITRのライゲーションがT_{reg}活性の迅速な終了をもたらす、自己免疫性病理及び移植寛容の除去をもたらすので、T_{reg}によって発現される受容体の中でも、GITRは重要な構成要素であるように思われる。

【0006】

【0006】 共刺激及び共阻害のリガンド及び受容体は、T細胞活性化の「第2のシグナル」だけではなく、自己への免疫を限定しながら感染に対する免疫応答を最大化する正負のシグナルのバランスのとれたネットワークも提供する。最もよく特徴が明らかにされている共刺激リガンドはB7.1及びB7.2であり、これらはプロフェッショナルAPCによって発現され、その受容体はCD28及びCTLA－4である。Greenwald, et al.（2005）Annu Rev Immunol 23, 515－548；Sharpe and Freeman（2002）Nat Rev Immunol 2, 116－126。CD28はナイーブT細胞及び活性化されたT細胞によって発現され、最適なT細胞活性化のために重要である。これとは対照的に、CTLA－4はT細胞活性化に際して誘導され、B7.1／B7.2へ結合することによ

10

20

30

40

50

ってT細胞活性化を阻害し、したがってCD28媒介性共刺激を損なう。CTLA-4は、その細胞質ITIMモチーフを介して負のシグナリングも伝達する。Tefft, et al. (2006). *Annu Rev Immunol* 24, 65-97。B7.1/B7.2のKOマウスは適応的免疫応答が異常である(Borriello, et al. (1997) *Immunity* 6, 303-313; Freeman, et al. (1993) *Science* 262, 907-909)が、CTLA-4のKOマウスは炎症を適切に制御することができず、全身性自己免疫疾患を発症する。Chambers, et al. (1997) *Immunity* 7, 885-895; Tivol, et al. (1995) *Immunity* 3, 541-547; Waterhouse, et al. (1995) *Science* 270, 985-988。B7ファミリーリガンドは拡大して、それらには、共刺激のB7-H2(ICOSリガンド)及びB7-H3に加えて、共阻害のB7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1またはB7x)及びB7-H6が含まれる。Brandt, et al. (2009) *J Exp Med* 206, 1495-1503; Greenwald, et al. (2005) *Annu Rev Immunol* 23: 515-548を参照されたい。

【0007】

【0007】 誘導性共刺激(ICOS)分子は活性化T細胞上で発現され、B7-H2へ結合する。Yoshinaga, et al. (1999) *Nature* 402, 827-832を参照されたい。ICOSはT細胞の活性化、分化及び機能のために重要であり、加えてTヘルパー細胞誘導性B細胞の活性化、Igクラススイッチング及び胚中心(GC)形成のために不可欠である。Dong, et al. (2001) *Nature* 409, 97-101; Tafuri, et al. (2001) *Nature* 409, 105-109; Yoshinaga, et al. (1999) *Nature* 402, 827-832。一方、プログラムド・デス1(PD-1)は、T細胞応答を負に調節する。PD-1のKOマウスは、狼瘡様自己免疫疾患または遺伝的背景に依存して自己免疫性拡張型心筋症を発症する。Nishimura, et al. (1999) *Immunity* 11, 141-151。Nishimura, et al. (2001) *Science* 291: 319-322。自己免疫は、リガンドPD-L1及びPD-L2の両方によるシグナリングの欠損から生じる可能性が最も高い。近年、CD80は、T細胞の中へ阻害シグナルを伝達するPD-L1についての第2の受容体として同定された。Butte, et al. (2007) *Immunity* 27: 111-122。B7-H3及びB7-H4についての受容体は、まだ未知のままである。

【0008】

【0008】 最もよく特徴が明らかにされている共刺激リガンドはB7.1及びB7.2であり、これらは、Igスーパーファミリーに属し、プロフェショナルAPC上で発現され、その受容体はCD28及びCTLA-4である(Greenwald, et al. (2005) *Annu. Rev. Immunol.* 23: 515-548)。CD28はナイーブT細胞及び活性化されたT細胞によって発現され、最適なT細胞活性化のために重要である。これとは対照的に、CTLA-4はT細胞活性化に際して誘導され、B7.1/B7.2へ結合することによってT細胞活性化を阻害し、CD28媒介性共刺激を損なう。B7.1及びB7.2のKOマウスは適応的免疫応答が異常である(Borriello, et al. (1997) *Immunity* 6: 303-313)が、CTLA-4のノックアウトマウスは炎症を適切に制御することができず、全身性自己免疫疾患を発症する(Tivol, et al. (1995) *Immunity* 3: 541-547; Waterhouse, et al. (1995) *Science* 270: 985-988; Chambers, et al. (1997) *Immunity* 7: 885-895)。

【0009】

【0009】 B7ファミリーリガンドは拡大して、それらには、共刺激のB7-H2（誘導性T細胞共刺激因子（ICOS）リガンド）及びB7-H3に加えて、共障害のB7-H1（PD-L1）、B7-DC（PD-L2）、B7-H4（B7S1またはB7x）及びB7-H6が含まれる（Greenwald, et al. (2005) 上記; Brandt, et al. (2009) J. Exp. Med. 206:1495-1503）。したがって、追加のCD28ファミリー受容体が同定されている。ICOSは活性化されたT細胞上で発現され、B7-H2へ結合する（Yoshinaga, et al. (1999) Nature 402:827-832）。ICOSは正の共調節因子であり、それはT細胞の活性化、分化及び機能のために重要である（Yoshinaga, et al. (1999) 上記; Dong, et al. (2001) Nature 409:97-101）。これとは対照的に、PD-1（プログラムド・デス1）はT細胞応答を負に調節する。PD-1のノックアウトマウスは、狼瘡様自己免疫疾患または自己免疫性拡張型心筋症を発症する（Nishimura, et al. (1999) Immunity 11:141-151; Nishimura, et al. (2001) Science 291:319-322）。この自己免疫は、リガンドPD-L1及びPD-L2の両方によるシグナリングの欠損から生じる可能性が最も高い。近年、CD80は、T細胞の中へ障害シグナルを伝達するPD-L1のための第2の受容体として同定されている（Butte, et al. (2007) Immunity 27:111-122）。

【0010】

【0010】 これらの2つの障害B7ファミリーリガンド（PD-L1及びPD-L2）は別個の発現パターンを有する。PD-L2は、DC及びマクロファージ上で誘導性に発現されるが、PD-L1は造血性細胞タイプ及び非造血性細胞タイプの両方上で広く発現される（Okazaki & Honjo (2006) Immunology 27:195-201; Keir, et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 26:677-704）。PD-1受容体の免疫抑制性の役割と一致して、PD-L1^{-/-}及びPD-L2^{-/-}マウスを使用する研究から、両方のリガンドはT細胞増殖及びサイトカイン産生の障害において重複する役割を有することが示されている（Keir, et al. (2006) J. Exp. Med. 203:883-895）。PD-L1欠損は、自己免疫性糖尿病の非肥満性糖尿病モデル及び多発性硬化症のマウスモデルの両方において疾患進行を促進する（実験的自己免疫性脳脊髄炎; Anasari, et al. (2003) J. Exp. Med. 198:63-69; Salama, et al. (2003) J. Exp. Med. 198:71-78; Latchman, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:10691-10696 (EAE)）。PD-L1^{-/-}T細胞は、両方の疾患モデルにおいて炎症誘発性サイトカインのレベルを上昇させる。加えて、骨髓キメラ実験から、PD-L1の組織発現（すなわち脾臓内の）は部位的に炎症を制御する能力に独自に寄与することが実証された（Keir, et al. (2006) 前出; Keir, et al. (2007) J. Immunol. 179:5064-5070; Grabié, et al. (2007) Circulation. 116:2062-2071）。PD-L1は胎盤合体栄養細胞層上でも高発現され、それは同種異系胎児への母親の免疫応答を決定的に制御する（Guleria, et al. (2005) J. Exp. Med. 202:231-237）。

【0011】

【0011】 免疫抑制性の役割と一致して、PD-L1は抗腫瘍性免疫応答を強力に抑制し、腫瘍が免疫監視を回避することを支援する。PD-L1は、浸潤する細胞傷害性CD8⁺T細胞（それは高レベルのPD-1を発現する）のアポトーシスを誘導することができる（Dong, et al. (2002) Nature 409:97-101; Dong & Chen (2003) J. Mol. Med. 81:2

10

20

30

40

50

81-287)。研究から、他の免疫療法と併用したPD-L1-PD-1シグナリング経路の遮断が、抗腫瘍性細胞傷害性Tリンパ球活性及びサイトカイン産生の促進により腫瘍進行を防止することが示されている(Iwai, et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:12293-12297; Blank, et al. (2004) Cancer Res. 64:1140-1145; Blank, et al. (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314; Geng, et al. (2006) Int. J. Cancer. 118:2657-2664)。加えて、樹状細胞上のPD-L1発現は適応性Foxp3⁺CD4⁺調節性T細胞(aTreg細胞)の誘導を促進し、PD-L1は腫瘍微小環境内のaTreg細胞の強力な誘導剤であることが示されている(Wang, et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105:9331-9336)。

【0012】

【0012】 T細胞活性化のVドメインIg抑制因子(VISTA)またはPD-L3と称される追加の免疫調節リガンドが、T細胞転写プロファイリングスクリーンにおいてアップレギュレートされる分子として近年同定されている(Wang, et al. (2011) J. Exp. Med. 208:577; WO 2011/120013)。VISTAの細胞外Igドメインは、B7ファミリーリガンドのPD-L1及びPD-L2とかなりの配列相同性を共有するが、それとB7ファミリーメンバーを区別するユニークな構造上の特色を備えることが示されている。

【0013】

【0013】 VISTAは、主として造血性細胞上で発現され、VISTA発現は骨髄性抗原提示細胞(APC)及びT細胞上で高度に調節される。抗原提示細胞(APC)上のVISTAの発現は、T細胞とAPCとの間の同族相互作用の時にT細胞上でそのカウンターレセプターと係合することによって、T細胞応答を抑制する。VISTA遮断は自己免疫疾患モデルにおいてT細胞媒介性免疫を促進し、他の阻害B7ファミリーリガンド(PD-L1及びPD-L2等)と比較した場合に自己免疫の制御におけるその固有で非冗長的な役割を示唆する。加えて、VISTA遮断は、前臨床マウス腫瘍モデルにおいて、抗腫瘍免疫及び腫瘍増殖抑制を促進する(WO 2011/120013)。この点に関して、VISTA阻害経路の治療法的介入は、疾患(ウイルス感染及び癌等)の治療のためのT細胞媒介性免疫を調節する新規のアプローチを表わす。

【発明の概要】

【0014】

【0014】 本発明は、配列番号1のアミノ酸配列に同一のペプチド(Ser-Ser-Ala-Cys-Asp-Trp-Ile-Lys-Arg-Ser-Cys-His)、またはそのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導體若しくは模倣物を含む、単離されたVISTAアンタゴニストを提供する。

【0015】

【0015】 一実施形態において、単離されたVISTAアンタゴニストは、配列番号1のアミノ酸配列に同一のペプチド(Ser-Ser-Ala-Cys-Asp-Trp-Ile-Lys-Arg-Ser-Cys-His)を含むか、または多くとも2つのアミノ酸残基で配列番号1と異なるアミノ酸配列を有するペプチド、またはそのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導體若しくは模倣物を含む。別の実施形態において、単離されたVISTAアンタゴニストは、多くとも1つのアミノ酸残基で配列番号1と異なるアミノ酸配列を有するペプチド、またはそのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導體若しくは模倣物を含む。さらに別の実施形態において、単離されたVISTAアンタゴニストは、配列番号1のアミノ酸配列に同一のペプチド(Ser-Ser-Ala-Cys-Asp-Trp-Ile-Lys-Arg-Ser-Cys-His)、またはそのマルチマー若しくはコンジュゲートを含む。特定の実施形態において、単離されたVISTAアンタゴニストは、配列番号1のアミノ酸配列(Ser-Ser-Ala-Cy

s - A s p - T r p - I l e - L y s - A r g - S e r - C y s - H i s) からなる。

【0016】

【0016】 一実施形態において、配列番号1 (S e r - S e r - A l a - C y s - A s p - T r p - I l e - L y s - A r g - S e r - C y s - H i s) の位置4及び11、または該ペプチドのバリエーション中のそれらの対応する位置でのシステイン残基は、ジスルフィド架橋を形成する。

【0017】

【0017】 別の実施形態において、単離されたV I S T Aアンタゴニストは、結合親和性及び／または安定性を改善するように修飾される。特定の実施形態において、単離されたV I S T Aアンタゴニストは、P E G、アセチル化、X T E N、アルブミン及び／またはマルチマー化によって修飾される。

10

【0018】

【0018】 別の実施形態において、単離されたV I S T Aアンタゴニストは、免疫グロブリンポリペプチドまたはその断片へ直接または間接的に付加される。免疫グロブリンポリペプチドは、ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3若しくはI g G 4定常領域またはその断片を含むことができる。好ましくは、免疫グロブリンポリペプチドはヒトI g G 1定常領域またはその断片を含む。

【0019】

【0019】 さらに別の実施形態において、単離されたV I S T Aアンタゴニストは、複数（すなわち2、3、4、5、6、7またはそれ以上）のコピーの該ペプチドを含む。

20

【0020】

【0020】 さらに別の実施形態において、単離されたV I S T Aアンタゴニストは、該ペプチドを標的部位へ標的化する別の部分を含む。標的化部分は、抗原へ結合する抗体若しくはリガンド、標的細胞によって発現される受容体、または感染性病原体から選択され得る。

【0021】

【0021】 なおさらなる実施形態において、単離されたV I S T Aアンタゴニストはリンカーを介して別の部分または該アンタゴニストの別のコピーへ付加される。リンカーは、アンタゴニストが標的細胞の表面上で発現されるV I S T Aと相互作用することを可能にするペプチドであり得る。

30

【0022】

【0022】 さらに別の実施形態において、単離されたV I S T Aアンタゴニストは、検出可能標識または治療薬剤へ直接または間接的に付加される。

【0023】 実施形態のうちのいくつかにおいて、単離されたV I S T Aアンタゴニストは、V I S T Aの細胞外ドメインへ結合し、V I S T A受容体との相互作用を攪乱し、及び／またはV I S T A媒介性T細胞抑制を低減若しくは阻害する。

【0023】

【0024】 一実施形態において、単離されたV I S T Aアンタゴニストは抗腫瘍活性及び／または抗ウイルス活性を誘発する。

40

【0025】 加えて、本発明は、治療法上、予防上または診断上有効量の単離されたV I S T Aアンタゴニストを含む、治療法用、予防用または診断用の使用のために適切な組成物を企図する。

【0024】

【0026】 一実施形態において、組成物は、更に薬学的に許容される担体、希釈剤、溶解剤、防腐剤またはその混合物を含む。

【0027】 別の実施形態において、組成物は、他の治療薬剤（例えば抗癌剤、抗ウイルス剤、サイトカインまたは免疫アゴニスト）を更に含む。特定の実施形態において、他の治療薬剤は、C T L A - 4 - I g、抗P D - 1、P D - L 1融合タンパク質またはP D - L 2融合タンパク質、及びE G F Rアンタゴニストから選択される。

50

【0025】

【0028】 一実施形態において、組成物は皮下投与または静脈内投与のために適切である。

【0029】 さらに、本発明は、本明細書において開示されるVISTAアンタゴニストペプチド、その類似体、誘導体または模倣物をコードする単離された核酸配列、その単離された核酸配列を含有するベクター、及びその単離された核酸配列またはベクターを含む宿主細胞を、更に企図する。

【0026】

【0030】 一実施形態において、宿主細胞は、哺乳類細胞、細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、鳥類細胞または昆虫細胞である。

【0031】 本発明は、VISTAアンタゴニストペプチド、その類似体、誘導体または模倣物の発現を提供する条件下で宿主細胞を培養することを含む、該ペプチド、その類似体、誘導体または模倣物を発現する方法を、更に企図する。

【0027】

【0032】 更に、本発明は、単離されたVISTAアンタゴニストの様々な使用を企図する。

【0033】 一実施形態において、本発明は、有効量の本明細書において開示される単離されたVISTAアンタゴニストまたは該単離されたVISTAアンタゴニストを含む組成物を、必要とする対象へ投与することを含む、VISTA媒介性T細胞抑制を遮断、阻害または中和する方法を提供する。

【0028】

【0034】 別の実施形態において、本発明は、有効量の本明細書において開示される単離されたVISTAアンタゴニストまたは該単離されたVISTAアンタゴニストを含む組成物を、必要とする対象へ投与することを含む、対象において免疫応答を刺激する方法を提供する。かかる方法は対象における癌の治療のために使用することができる。

【0029】

【0035】 対象は、癌ならびに／または細菌感染、ウイルス感染、寄生生物感染及び真菌感染からなる群から選択される感染を有し得る。

【0036】 細菌感染は、Bordetella、Borrelia、Brucella、Burkholderia、Campylobacter、Chlamydia、Clostridium、Corynebacterium、Enterobacter、Enterococcus、Erwinia、Escherichia、Francisella、Haemophilus、Helicobacter、Legionella、Leptospira、Listeria、Mycobacterium、Mycoplasma、Neisseria、Pasteurella、Pelobacter、Pseudomonas、Rickettsia、Salmonella、Serratia、Shigella、Staphylococcus、Streptococcus、Treponema、Vibrio、Yersinia及びXanthomonasからなる群から選択される少なくとも1つの細菌によって引き起こされ得る。

【0030】

【0037】 ウイルス感染は、Adenoviridae、Papillomaviridae、Polyomaviridae、Herpesviridae、Poxviridae、Hepadnaviridae、Parvoviridae、Astroviridae、Caliciviridae、Picornaviridae、Coronaviridae、Flaviviridae、Retroviridae、Togaviridae、Arenaviridae、Bunyaviridae、Filoviridae、Orthomyxoviridae、Paramyxoviridae、Rhabdoviridae及びReoviridaeからなる群から選択される少なくとも1つのウイルスによって引き起こされ得る。より具体的には、ウイルスは、アデノウイルス、単純ヘルペスタイプI、単純ヘルペスタイプ2、水痘帯状疱疹ウイルス、エプスタ

インーバーウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルスタイプ8、パピローマウイルス、BKウイルス、JCウイルス、天然痘、B型肝炎、ポカウイルス、パルボウイルスB19、アストロウイルス、ノーウォークウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎、ポリオウイルス、ライノウイルス、重症急性呼吸器症候群ウイルス、C型肝炎、黄熱病、デング熱ウイルス、西ナイルウイルス、風疹、E型肝炎、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、インフルエンザ、グアナリトウイルス、フニンウイルス、ラッサ熱ウイルス、マクポウイルス、サビアウイルス、クリミアーコンゴ出血熱ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、はしかウイルス、おたふくかぜウイルス、パラインフルエンザ、呼吸器合胞体ウイルス、ヒトメタ肺炎ウイルス、ヘンドラウイルス、ニパウイルス、狂犬病、D型肝炎、ロタウイルス、オルビウイルス、コルティウイルスまたはバンナウイルスであり得る。

10

【0031】

【0038】 真菌感染は、鵝口瘡、カンジダ症、クリプトコッカス症、ヒストプラズマ症、分芽菌症、アスペルギルス症、コクシジオイデス症、パラコクシジオイデス症、スポロトリウム症、接合菌症、黒色分芽菌症、ロボ真菌症、菌腫、爪真菌症、砂毛症、癬風、白癬性毛瘡、頭部白癬、体部白癬、頑癬、黄癬、黒色癬、足白癬、耳真菌症、フェオフィホ真菌症またはリノスポリジウム症からなる群から選択され得る。

【0032】

【0039】 寄生生物感染は、*Entamoeba histolytica*、*Giardia lamblia*、*Cryptosporidium muris*、*Trypanosomatida gambiense*、*Trypanosomatida rhodesiense*、*Trypanosomatida cruzi*、*Leishmania mexicana*、*Leishmania braziliensis*、*Leishmania tropica*、*Leishmania donovani*、*Toxoplasma gondii*、*Plasmodium vivax*、*Plasmodium ovale*、*Plasmodium malariae*、*Plasmodium falciparum*、*Trichomonas vaginalis*、*Histomonas meleagridis*、*Secementea*、*Trichuris trichiura*、*Ascaris lumbricoides*、*Enterobius vermicularis*、*Ancylostoma duodenale*、*Necator americanus*、*Strongyloides stercoralis*、*Wuchereria bancrofti*、*Dracunculus medinensis*；住血吸虫、肝吸虫、腸内吸虫、肺吸虫；*Schistosoma mansoni*、*Schistosoma haematobium*、*Schistosoma japonicum*、*Fasciola hepatica*、*Fasciola gigantica*、*Heterophyes heterophyes*及び*Paragonimus westermani*からなる群から選択される少なくとも1つの寄生生物によって引き起こされ得る。

20

30

【0033】

【0040】 別の実施形態において、本発明は、有効量の本明細書において開示される単離されたVISTAアンタゴニストまたは該単離されたVISTAアンタゴニストを含む組成物を、必要とする対象へ投与することを含む、抗癌免疫または抗腫瘍免疫を促進する方法を提供する。

40

【0034】

【0041】 別の実施形態において、本発明は、有効量の本明細書において開示される単離されたVISTAアンタゴニストまたは該単離されたVISTAアンタゴニストを含む組成物を、必要とする対象へ投与することを含む、腫瘍浸潤及び／または癌転移を阻害する、癌の治療または防止方法を提供する。

【0035】

【0042】 癌は、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、リンパ性悪性疾患、

50

黒色腫、扁平上皮癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及び肺扁平上皮癌が含まれる）、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌（gastric cancer）または胃癌（stomach cancer）（消化管癌が含まれる）、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（kidney cancer）または腎臓癌（renal cancer）、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、頭頸部癌、B細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンストレームマクログロブリン血症が含まれる）；慢性リンパ球性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；毛様細胞性白血病；慢性骨髄芽球性白血病；移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、母斑症に伴う異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍に伴うもの等）、及びメーグス症候群からなる群から選択され得る。

10

【0036】

【0043】 さらに別の実施形態において、本発明は、有効量の本明細書において開示される単離されたVISTAアンタゴニストまたは該単離されたVISTAアンタゴニストを含む組成物を、必要とする対象へ投与することを含む、ウイルス感染を治療または防止する方法を提供する。

【0037】

20

【0044】 これらの方法は、別の治療薬剤の投与を更に含むことができ、前記ペプチド及び治療法は、同時または異なる時間で分離してまたは併用して投与することができる。

【0038】

【0045】 一実施形態において、他の治療薬剤は、抗癌剤、抗ウイルス剤若しくは他の抗感染剤、サイトカインまたは免疫アゴニストである。好ましくは、他の治療薬剤は、CTLA-4-Ig、抗PD-1、PD-L1融合タンパク質またはPD-L2融合タンパク質、及びEGFRアンタゴニストから選択される。

【0039】

【0046】 最後に、本発明は、VISTAの活性部位をマッピングする方法であって、（a）単離されたVISTA融合タンパク質を、配列番号1のアミノ酸配列に同一のペプチド（Ser-Ser-Ala-Cys-Asp-Trp-Ile-Lys-Arg-Ser-Cys-His）を含むか、または多くとも2つのアミノ酸残基で配列番号1と異なるアミノ酸配列を有するペプチドまたはそのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体若しくは模倣物を含む、単離されたVISTAアンタゴニストと、インキュベーションすることと；（b）単離されたVISTAアンタゴニストの結合部位を決定することを含む、該方法も企図する。

30

【0040】

【0047】 一実施形態において、VISTAの活性部位はVISTA受容体へ結合し、免疫抑制を媒介する。別の実施形態において、ステップ（b）は、ドメイン欠失、ドメインスワッピング、アミノ酸変異誘発、フットプリンティング、NMR、X線結晶学、またはホモロジーモデリングを含む。

40

【図面の簡単な説明】**【0041】**

【図1】 【0048】 抗VISTAの抗体（aVISTA）及び抗PD-L1抗体（aPDL1）と比較して、VISTAアンタゴニストペプチド（配列番号1）はT細胞の増殖を有意に促進することを示す。骨髄性CD11B+ APCを、OT2 CD4+T細胞、抗原、及びモノクローナル抗体（aVISTAまたはaPDL1）またはAP1049と共にインキュベーションした。T細胞の増殖を72時間でのトリチウム取り込みによって測定した。

50

【図2】[0049] VISTAアンタゴニストペプチド（配列番号1）は抗腫瘍免疫を有意に促進することを示す。MB49腫瘍を接種したメスマウスを、PBS（対照）またはAP1049のいずれかにより処置した。腫瘍サイズを2～3日ごとにキャリパーによって測定した。

【発明を実施するための形態】

【0042】

[0050] 本明細書において記載される本発明が完全に理解され得るために、以下の詳細な説明が記載される。本発明の様々な実施形態が詳細に記載され、提供される実施例によって更に例証され得る。

【0043】

[0051] 特別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本発明または本発明の試験において、本明細書において記載されるものに類似または同等の方法及び材料を使用することができるが、適切な方法及び材料が本明細書において記載される。それらの材料、方法、及び例は単に例示説明的なものであり、限定を意図したものではない。

【0044】

定義

[0052] 本明細書における説明中で使用される時、及び後続する請求項を通して、「a」、「an」及び「the」の意味には、文脈が明確に指示しない限り複数の参照が含まれる。

【0045】

[0053] 「アンタゴニスト」は、本明細書において使用される時、別の化合物の生理的作用に対抗する化合物（好ましくはペプチド）を指す。例えば、受容体レベルで、アンタゴニストは、受容体へ結合し、受容体の生物学的活性を活性化する他の薬剤によって通常は誘導される受容体関連応答に対抗する化合物である。同様に、リガンドレベルで、アンタゴニストは、リガンドがその標的受容体及び／またはアクセサリー因子へ結合する場合に通常は誘導されるリガンド関連応答に対抗する化合物である。具体的な実施形態において、VISTAアンタゴニストは、VISTAへ結合し、その生物学的活性（例えば、VISTA媒介性T細胞抑制及び／またはVISTA媒介性抗腫瘍免疫抑制）のうちの1つまたは複数に対抗し、それによってT細胞媒介性免疫及び／または抗腫瘍免疫を促進する化合物（例えばペプチドまたはその類似体、誘導体若しくは模倣物）である。

【0046】

[0054] 「類似体」は、本明細書において使用される時、その構造が所与の化合物（好ましくはペプチド）のものに関連しているが、化学的特性及び生物学的特性が異なる化合物（好ましくはペプチド）を指す。

【0047】

[0055] 「抗原提示細胞」は、本明細書において使用される時、プロフェッショナル抗原提示細胞（例えばBリンパ球、単球、樹状細胞及びランゲルハンス細胞）に加えて、他の抗原提示細胞（例えば角化細胞、内皮細胞、星状細胞、線維芽細胞及びオリゴデンドロサイト）を広く指す。

【0048】

[0056] 「アミノ酸」は、本明細書において使用される時、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸に加えて、天然に存在するアミノ酸に類似する様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物を広く指す。天然に存在するアミノ酸は遺伝コードによってコードされたものに加えて、後に修飾されるそれらのアミノ酸（例えばヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸及びO-フォスホセリン）である。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造（すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基へ結合した炭素）及びR基（例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）を有する化合物を指す。類似体は、修飾された

10

20

30

40

50

R基（例えばノルロイシン）または修飾されたペプチド主鎖を有し得るが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般的化学構造とは異なるが、天然に存在するアミノ酸に類似する様式で機能する構造を有する化学化合物を指す。

【0049】

【0057】 「アレルギー性疾患」は、本明細書において使用される時、アレルギー反応が関与する疾患を広く指す。より具体的には、「アレルギー性疾患」は、アレルゲンが同定され、そのアレルゲンへの曝露と病理学的変化の開始との間で強い相関性があり、その病理学的変化が免疫的機序を有することが証明されている疾患と定義される。本明細書において、免疫的機序は、白血球がアレルゲン刺激への免疫応答を示すことを意味する。

10

【0050】

【0058】 「自己免疫疾患」は、本明細書において使用される時、個体自身の組織若しくは共分離物から生じ、それらに対して向けられる疾患若しくは障害、またはその所見若しくはそれからもたらされる病態を広く指す。

【0051】

【0059】 「癌」は、本明細書において使用される時、悪性増殖または腫瘍を引き起こす異常で制御されない細胞分裂(例えば調節されない細胞増殖)によって特徴づけられる任意の腫瘍性疾患(浸潤性か転移性に関わらず)を広く指す。

【0052】

20

【0060】 「保存的に修飾されたバリエーション」は、本明細書において使用される時、アミノ酸及び核酸配列の両方へ適用され、特定の核酸配列に関して、同一若しくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードするそれらの核酸を指すか、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一の配列を指す、保存的に修飾されたバリエーションを広く指す。遺伝コードの縮重があるので、多数の機能的に同一の核酸が任意の与えられたタンパク質をコードする。「サイレントバリエーション」は保存的に修飾された核酸変異形態の1種である。本明細書においてポリペプチドをコードするすべての核酸配列は、それぞれ核酸のすべてのサイレントバリエーションも記載する。当業者は、核酸中の各々のコドン（通常メチオニンについてのただ一つのコドンであるAUG及び通常トリプトファンについてのただ一つのコドンであるTGG以外）が、機能的に同一の分子をもたらすように修飾され得ることを認識するだろう。

30

【0053】

【0061】 「共刺激受容体」は、本明細書において使用される時、免疫細胞への共刺激シグナル（例えばCD28、ICOS）を伝える受容体を広く指す。

【0062】 「細胞質ドメイン」は、本明細書において使用される時、細胞の細胞質の中へ延長するタンパク質の部分を広く指す。

【0054】

【0063】 「誘導体」または「ペプチド誘導体」は、本明細書において使用される時、1つまたは複数のアミノ酸残基若しくはリンカー基または他の共有結合で連結された基の修飾を含有する。誘導体の非限定的な例には、アミノ末端または別の遊離アミノ基のN-アシル誘導体、カルボキシル末端または別の遊離カルボキシル基若しくはヒドロキシル基のエステル、アンモニアまたは適切なアミンとの反応によって産生されるカルボキシル末端または別の遊離カルボキシル基のアミド、糖鎖付加された誘導体、ヒドロキシル化された誘導体、ヌクレオチジル化された誘導体、ADPリボシル化された誘導体、PEG化された誘導体、リン酸化された誘導体、親油性部分へコンジュゲートされた誘導体、及び抗体または他の生物学的リガンドへコンジュゲートされた誘導体が含まれる。例えば-C₂H₅-NH-への還元または-CO-N（アルキル）-へのアルキル化によるペプチド結合-CO-NH-の修飾によって得られたものも、化学的誘導体の中に含まれる。好ましい誘導体化には、C末端アミド化及びN末端アセチル化（それぞれ、C末端の負電荷を除去するかまたはN末端の正電荷を除去する）が含まれるが、これらに限定されない。C末

40

50

端またはN末端のブロッキング（C末端アミド化またはN末端アセチル化によって等）は、エキソタンパク分解への感受性の低減に起因してタンパク質分解への安定性を改善することができる。C末端アミドを有するペプチド誘導体は、C末端での「NH₂」により表わされる。

【0055】

〔0064〕 「診断」は、本明細書において使用される時、病理学的状態の存在または本質を同定することを広く指す。診断方法はそれらの感受性及び特異性で異なる。診断アッセイの「感受性」は、検査で陽性とする疾患個体のパーセンテージ（「真陽性」のパーセント）である。アッセイによって検出されない疾患個体は「偽陰性」である。疾患がなく、アッセイにおいて検査で陰性とする対象は「真の陰性」と称される。診断アッセイの「特異度」は1－偽陽性率であり、「偽陽性」率は疾患がなく検査で陽性とするものの割合として定義される。特定の診断方法は病態の確定診断を提供しないかもしれないが、この方法が診断を支援する陽性の指標を提供するならば、それは十分である。

10

【0056】

〔0065〕 「診断」は、本明細書において使用される時、疾患若しくは症状の分類、疾患の重症度の決定、疾患進行のモニタリング、疾患の転帰の予測及び／または回復の予想を広く指す。「検出」という用語は、随意に前述の任意のものも包含することができる。本発明に記載の疾患の診断は、いくつかの実施形態において、対象から得られる生物試料中の本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルを決定することによって影響を受け得、決定されたレベルは、疾患への素因または疾患の存在若しくは非存在と相関し得る。「対象から得られる生物試料」は、対象から物理的に取り出されていない試料も随意に含み得ることが指摘されるべきである。

20

【0057】

〔0066〕 「有効量」は、本明細書において使用される時、疾患の治療のために患者へ投与された場合に、疾患についてのかかる治療を達成するのに十分な量の化合物、抗体、抗原または細胞を広く指す。有効量は予防のために有効量及び／または防止のために有効量であり得る。有効量は、徴候／症状の出現の低減、防止に有効な量、徴候／症状の出現の重症度の低減、徴候／症状の出現の消失、徴候／症状の出現の発達の減速、徴候／症状の出現の発達の防止、及び／または徴候／症状の出現の予防の達成に有効な量であり得る。「有効量」は、疾患及びその重症度、ならびに治療される患者の年齢、体重、病歴、感受性及び既往病態に依存して変動し得る。「有効量」という用語は、本発明の目的のための「治療有効量」と同義である。

30

【0058】

〔0067〕 「細胞外ドメイン」は、本明細書において使用される時、細胞の表面から延長するタンパク質の部分を広く指す。

〔0068〕 「発現ベクター」は、本明細書において使用される時、任意の細胞（原核生物細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞または哺乳類細胞が含まれる）中で、本発明の核酸配列を、インビトロまたはインビボで、構成的または誘導性に発現する目的のための任意の組換え発現系を広く指す。この用語には直線状または環状の発現系が含まれる。この用語には、エピソームのままであるか、または宿主細胞ゲノムの中へ組み込まれる発現系が含まれる。発現系は、自己複製する能力を有することができるか、または有しておらず、すなわち細胞中で一時的な発現のみを駆動することができる。この用語には、組換え核酸の転写のために必要とされる最小要素のみを含有する組換え発現カセットが含まれる。

40

【0059】

〔0069〕 「相同性」は、本明細書において使用される時、核酸配列と参照核酸配列との間またはポリペプチド配列と参照ポリペプチド配列との間の類似性の程度を広く指す。相同性は部分的または完全なものであり得る。完全な相同性は、核酸配列またはアミノ酸配列が同一であることを示す。部分的に相同な核酸またはアミノ酸配列は、参照の核酸またはアミノ酸配列に同一でないものである。相同性の程度は配列比較によって決定す

50

ることができる。「配列同一性」という用語を「相同性」と互換的に使用することができる。

【0060】

〔0070〕 「宿主細胞」は、本明細書において使用される時、本発明の核酸分子（本発明の組換え発現ベクター等）が導入されている細胞を参照するように広く指す。宿主細胞は、原核生物細胞（例えば大腸菌）、または真核生物細胞（酵母細胞、昆虫細胞（例えばSF9）、両生類細胞または哺乳類細胞（CHO、HeLa、HEK-293等）、例えば培養細胞、外植片及びインビボの細胞等）であり得る。「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書において互換的に使用される。かかる用語が特定の対象細胞だけでなくかかる細胞の子孫または可能性のある子孫も指すことを理解すべきである。ある特定の修飾が、突然変異または環境の影響のいずれかに起因して次世代において起こり得るので、子孫は実際は親細胞に同一ではないが、本明細書において使用される時、それでもこの用語の範囲内に含まれる。

10

【0061】

〔0071〕 「免疫応答」は、本明細書において使用される時、T細胞共刺激の修飾によって影響を受けるT細胞媒介性及び／またはB細胞媒介性の免疫応答を広く指す。例示的な免疫応答には、B細胞応答（例えば抗体産生）、T細胞応答（例えばサイトカイン産生及び細胞性細胞傷害）、及びサイトカイン応答性細胞（例えばマクロファージ）の活性化が含まれる。本明細書において使用される時、免疫応答に関して「ダウンモジュレーション」という用語には任意の1つまたは複数の免疫応答における減少が含まれ、一方で、免疫応答に関して「アップモジュレーション」という用語には任意の1つまたは複数の免疫応答における増加が含まれる。1つのタイプの免疫応答のアップモジュレーションが、別のタイプの免疫応答において対応するダウンモジュレーションをもたらし得ることが理解されるだろう。例えば、特定のサイトカイン（例えばIL-10）の産生のアップモジュレーションは、細胞性免疫応答のダウンモジュレーションをもたらし得る。

20

【0062】

〔0072〕 「炎症性疾患」は本明細書において使用される時、慢性または急性の炎症性疾患を広く指す。

〔0073〕 「検出可能な標識」は、本明細書において使用される時、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、化学的手段、または他の物理的手段によって検出可能な組成物を広く指す。

30

【0063】

〔0074〕 「模倣物」または「ペプチド模倣物」は、本明細書において使用される時、所与のペプチドの活性を有する、完全または部分的に合成のペプチドを指す。かかる模倣物またはペプチド模倣物は、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的模倣物である1つまたは複数のアミノ酸残基、天然に存在するアミノ酸ポリマー、及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーを含む。

【0064】

〔0075〕 本明細書において記載されるVISTA及びVISTAコンジュゲートポリペプチドの修飾には、N末端修飾、C末端修飾、ペプチド結合修飾（例えば $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S=O}$ 、 O=C-NH 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 S=C-NH 、 CH=CH または CF=CH ）、主鎖修飾、及び例えば糖タンパク質を形成する炭水化物残基の付加、化学残基（PEG及び／またはXTEN等）の付加などによる残基修飾が含まれるが、これらに限定されない。ペプチド模倣化合物を調製する方法は当技術分野において周知である。Martin, (2010)。

40

【0065】

〔0076〕 「核酸」または「核酸配列」は、本明細書において使用される時、一本鎖形状または二本鎖形状のいずれかのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを広く指す。この用語は、天然のヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸（すなわちオリゴヌクレオチド）を包含する。この用語は合成主鎖を備えた核

50

酸様構造も包含する。特別の指示のない限り、特定の核酸配列は、明瞭に示された配列に加えて、保存的に修飾されたそのバリエーション（例えば縮重コドン置換）及び相補的配列も暗に包含する。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドと互換的に使用される。

【0066】

【0077】 「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを広く指す。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーに加えて、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の類似体または模倣物であるアミノ酸ポリマーへ適用される。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーに加えて、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的模倣物であるアミノ酸ポリマーへ適用される。ポリペプチドは、例えば炭水化物残基の付加によって修飾されて糖タンパク質を形成することができる。「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、非糖タンパク質に加えて糖タンパク質を含む。

10

【0067】

【0078】 「予防的有効量」は、本明細書において使用される時、疾患の予防または疾患の再発の防止のために患者へ投与された時に、疾患または再発についてかかる予防を達成するのに十分な化合物の量を広く指す。予防的有効量は徴候及び／または症状の出現を防止するのに有効な量であり得る。「予防的有効量」は、疾患及びその重症度、ならびに治療される患者の年齢、体重、病歴、病態に対する素因、既往病態に依存して変動し得る。

20

【0068】

【0079】 「予防」は、本明細書において使用される時、徴候及び／若しくは症状が患者において存在しないか、寛解状態であるか、または以前に患者において存在した場合の療法の経過を広く指す。予防には、患者における疾患の治療の後に続いて起こる疾患を防止することが含まれる。更に、防止には、疾患を発症し得る可能性のある患者、特に疾患へ感受性のある患者（例えば患者集団のメンバー、リスクファクターがあるかまたは疾患の発症のリスクがあるもの）を処置することが含まれる。

【0069】

【0080】 「組換え」は、本明細書において使用される時、産物（例えば細胞、または核酸、タンパク質若しくはベクター）に関して、細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種の核酸若しくはタンパク質の導入または生来の核酸若しくはタンパク質の変更によって修飾されたこと、または細胞がそのように修飾された細胞に由来することを示すことを広く指す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の生来（非組換え）の形状内で見出されない遺伝子を発現するか、またはそうでなければ、生来の遺伝子を異常発現するか、低発現するか、若しくは全く発現しない。

30

【0070】

【0081】 「配列同一性」は、本明細書において使用される時、核酸配列と参照核酸配列との間またはポリペプチド配列と参照ポリペプチド配列との間の類似性の程度を広く指す。配列同一性（「相同性」とも同義）は部分的または完全なものであり得る。完全な配列同一性は、核酸配列またはアミノ酸配列が同一であること（すなわち100%の配列同一性）を示す。部分的に相同な核酸またはアミノ酸配列は、参照の核酸またはアミノ酸配列に同一でないものである。相同性の程度は配列比較によって決定することができ、例えば60%同一性、70%同一性、80%同一性、90%同一性、95%同一性、97%同一性、98%同一性または99%同一性である。

40

【0071】

【0082】 疾患の「徴候」は、本明細書において使用される時、患者の検査に際して認められる、疾患が示す任意の異常を広く指し；症状（疾患の主観的な指標である）とは対照的に、疾患の客観的な指標である。

【0072】

50

【0083】 「対象」は、本明細書において使用される時、疾患状態を緩和するかまたは疾患状態の発生若しくは再発を防止するかのいずれかの治療を必要とする任意の動物を広く指す。また、「対象」は、本明細書において使用される時、リスクファクター、疾患歴、感受性、症状及び徴候を有するか、以前に疾患と診断されたか、疾患のリスクがあるか、または疾患の患者集団のメンバーである任意の動物を広く指す。対象は、臨床的な患者（ヒト等）または獣医学的患者（ペット用動物、飼育動物、家畜動物、外来動物または動物園の動物等）であり得る。「対象」という用語は、「患者」という用語と互換的に使用することができる。

【0073】

【0084】 疾患の「症状」は、本明細書において使用される時、任意の病的現象、または患者によって経験され、疾患を示す、構造、機能若しくは感覚における通常のものからの逸脱を広く指す。

【0074】

【0085】 「T細胞」は、本明細書において使用される時、CD4+T細胞及びCD8+T細胞を広く指す。T細胞という用語には、Tヘルパー1タイプのT細胞およびTヘルパー2タイプのT細胞の両方とも含まれる。

【0075】

【0086】 「療法」、「治療法」、「治療すること」または「治療」は、本明細書において使用される時、疾患を処置、停止すること、または疾患もしくはその臨床症状の発症を低減すること、および／または疾患もしくはその臨床症状の退行を引き起こす疾患を軽減することを広く指す。療法は、疾患、疾患の徴候及び／または症状の予防、治療、矯正、低減、緩和、及び／または軽減の提供を包含する。療法は、進行中の疾患の徴候及び／または症状（例えば炎症、疼痛）をともなう患者における徴候及び／または症状の緩和を包含する。療法は「予防」も包含する。療法の目的のための「低減された」という用語は、徴候及び／または症状における臨床的な有意の低減を広く指す。療法には、ぶり返または再発性の徴候及び／または症状（例えば炎症、疼痛）を治療することが含まれる。療法は、徴候及び／または症状が現われることをいつでも排除することに加えて、既存の徴候及び／または症状を低減することならびに既存の徴候及び／または症状を消失させることを包含するが、これらに限定されない。療法には、慢性疾患（「維持」）及び急性疾患を治療することが含まれる。例えば、治療には、徴候及び／または症状（例えば炎症、疼痛）のぶり返または再発を治療または防止することが含まれる。

【0076】

【0087】 「膜貫通ドメイン」は、本明細書において使用される時、原形質膜にわたる長さ約15アミノ酸残基のアミノ酸配列を広く指す。より好ましくは、膜貫通ドメインは、少なくとも約20、25、30、35、40または45アミノ酸残基を含み、原形質膜にわたる。膜貫通ドメインは疎水性残基に富み、典型的には α ヘリックス構造を有する。一実施形態において、膜貫通ドメインのアミノ酸のうちの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上は、疎水性である（例えばロイシン、イソロイシン、チロシンまたはトリプトファン）。膜貫通ドメインは、例えばZagotta, et al. (1996) Annu. Rev. Neurosci. 19:235-263に記載される。

【0077】

【0088】 「腫瘍」は本明細書において使用される時、組織新生物の形状、特に内因性の組織の自発的、自律的及び不可逆的な過剰な、多かれ少なかれ阻害されない増殖の形状（その増殖は通常特異的な細胞及び組織の機能の多かれ少なかれ顕著な欠損を伴う）の少なくとも1つの細胞または細胞塊を広く指す。この細胞または細胞塊は、その増殖に関して、それ自体または宿主生物体の調節機構によって効果的に阻害されない（例えば黒色腫または癌腫）。腫瘍抗原には、悪性細胞自体の中またはそれらの上に存在する抗原が含まれるだけでなく、内皮細胞及び他の血管構成要素が含まれる腫瘍の間質性支持組織上に存在する抗原も含まれる。

【0078】

【0089】 「ベクター」は、本明細書において使用される時、それが連結される別の核酸分子を輸送することができる核酸分子を広く指す。1つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、それは追加のDNAセグメントがライゲーションされ得る環状二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントがウイルスゲノムの中へライゲーションされ得る。ある特定のベクターはそれらが導入される宿主細胞中で自律的複製が可能である（例えば細菌性複製起点を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば非エピソード哺乳類ベクター）は、宿主細胞の中への導入に際して宿主細胞のゲノムの中へ組み込まれ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある特定のベクターは、それらが操作可能に連結される遺伝子の発現を指令することができる。ベクターは、「組換え発現ベクター」または単純に「発現ベクター」と本明細書において称される。一般に、組み換えDNA技法において有用な発現ベクターは、多くの場合プラスミドの形状である。本明細書中で、プラスミドがベクターの最も一般に使用される形状であるので、「プラスミド」及び「ベクター」は互換的に使用することができる。しかしながら、本発明は、ウイルスベクター等の同等な機能を供する他の形状の発現ベクター（例えば複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）が含まれることを意図する。その技法及び手順は、当技術分野において周知の従来の方

10

20

【0079】

【0090】 本明細書において記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医用化学及び医薬品化学に関連する利用した命名法、ならびにそれらの実験手順及び技法は、周知であり当技術分野において一般に使用されるものである。標準的な技法を、化学合成、化学分析、医薬品調製、製剤及び送達、ならびに患者の治療のために使用することができる。

30

【0080】

VISTA及びVISTAアンタゴニスト

【0091】 本出願は、VISTAを認識し、その阻害活性を抑制することができるペプチドアンタゴニストに関する。このペプチド（AP1049と本明細書において表記される）はファージディスプレイを介して見出され、抗VISTAのモノクローナル抗体に比較した場合に優れた生物活性を表わすことが示された。その中和活性を考慮すると、AP1049を使用して、例えば癌及び／または病原性（すなわち、細菌性、真菌性、寄生生物性またはウイルス性）感染を治療すること、ならびに抗腫瘍免疫応答を促進すること、ならびに腫瘍増殖を抑制することができる。

40

【0081】

【0092】 したがって、本発明は、VISTAアンタゴニスト性ペプチドに加えて、そのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体及び模倣物であり、ならびにこのペプチドを使用してVISTAの活性を阻害または抑制する方法である。本明細書において使用される時、「ペプチド」という用語は、アミド結合により共有結合で連結された少なくとも2つのアミノ酸から構成されるアミノ酸ポリマーを表わす。本発明のペプチドは、望ましくは10～20残基の長さ、またはより望ましくは12～15残基の長さである。ある特定の実施形態において、VISTAアンタゴニスト性ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を含有する12～20残基ペプチドである。本発明の他の実施形態において、

50

単離されたVISTAアンタゴニストは、配列番号1のアミノ酸配列に同一のペプチド（Ser-Ser-Ala-Cys-Asp-Trp-Ile-Lys-Arg-Ser-Cys-His）を含むか、または多くとも1つのアミノ酸残基若しくは多くとも2つのアミノ酸残基で配列番号1と異なるアミノ酸配列を有するペプチド、またはそのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体若しくは模倣物を含む。本発明のさらに他の実施形態において、単離されたVISTAアンタゴニストは、配列番号1のアミノ酸配列（Ser-Ser-Ala-Cys-Asp-Trp-Ile-Lys-Arg-Ser-Cys-His）からなる。

【0082】

【0093】 本発明のある特定の実施形態において、VISTAアンタゴニスト性ペプチドの位置4及び11（またはVISTAアンタゴニストのバリエーション中のそれらの対応する位置）でのシステイン残基は、ジスルフィド架橋を形成する。

10

【0083】

【0094】 本発明に従って、本発明のペプチドのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体及び模倣物も提供される。

【0095】 類似体は、親化合物と化学構造で異なる分子であり、例えば、ホモログ（1アミノ酸残基の差等の化学構造中の増分で異なる）、1つ若しくは複数の官能基で異なる構造、またはイオン化の変化である。構造的類似体は、Remington (The Science and Practice of Pharmacology、第19版（1995）、28章）中で開示されるもの等の技法により、定量的構造活性相関（QSAR）を使用して、多くの場合見出される。

20

【0084】

【0096】 類似体は配列番号1のアミノ酸配列の修飾によって調製することができる。最も単純な修飾は、類似の生理化学的特性及び／または構造的な特性を有するアミノ酸についての1つまたは複数のアミノ酸の置換を含む。これらのいわゆる保存的置換は、もたらされたペプチドの活性及び／または構造に最小の影響を有する可能性が高い。保存的置換の例には、スレオニンによるセリンの置換、セリン若しくはバリンによるアラニンの置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸の置換、チロシンによるトリプトファンの置換、ロイシン若しくはバリンによるイソロイシンの置換、リジンによるアルギニンの置換、及び／またはアルギニン若しくはリジンによるヒスチジンの置換が含まれる。保存的置換は、一般的には、（a）置換の領域中のペプチド主鎖の構造（例えば螺旋状の立体配座として）、（b）標的部位での分子の荷電若しくは疎水性、または（c）側鎖のかさ、を維持する。

30

【0085】

【0097】 アミノ酸置換は、典型的にはそれらの側鎖に従って、1つまたは複数のカテゴリー（極性、疎水性、酸性、塩基性、及び芳香族が含まれる）で分類される。極性アミノ酸の例には、側鎖官能基（ヒドロキシル、スルフヒドリル及びアミド等）を有するものに加えて、酸性アミノ酸及び塩基性アミノ酸が含まれる。極性アミノ酸には、アスパラギン、システイン、グルタミン、ヒスチジン、セレノシステイン、セリン、スレオニン、トリプトファン及びチロシンが限定されずに含まれる。疎水性アミノ酸または非極性アミノ酸の例には、非極性脂肪族側鎖を有する残基のもの、例えば、限定されずに、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、プロリン、メチオニン及びフェニルアラニンが、含まれる。塩基性アミノ酸残基の例には、塩基性側鎖（アミノ基またはグアニジノ基等）を有するものが含まれる。塩基性アミノ酸残基には、アルギニン、ホモリジン及びリジンが限定されずに含まれる。酸性アミノ酸残基の例には、酸性側鎖官能基（カルボキシ基等）を有するものが含まれる。酸性アミノ酸残基には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が限定されずに含まれる。芳香族アミノ酸には、芳香族側鎖基を有するものが含まれる。芳香族アミノ酸の例には、ビフェニルアラニン、ヒスチジン、2-ナフチルアラニン、ペンタフルオロフェニルアラニン、フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンが、限定されずに含まれる。いくつかのアミノ酸が2つ以上の群に分類されることが指

40

50

摘され、例えば、ヒスチジン、トリプトファン及びチロシンは極性アミノ酸及び芳香族アミノ酸の両方として分類される。上述の群の各々に分類される追加のアミノ酸は、当技術分野において当業者に公知である。

【0086】

【0098】 本明細書において使用される時、ペプチド誘導体はペプチドの一次アミノ酸を保持する分子であるが、N末端、C末端、及び／またはその中のアミノ酸の側鎖のうちの1つまたは複数は、化学的に改変または誘導体化されている。かかる誘導体化されたペプチドには、例えば天然に存在するアミノ酸誘導体（例えばプロリンについての4-ヒドロキシプロリン、リジンについての5-ヒドロキシリジン、セリンについてのホモセリン、リジンについてのオルニチン、及び同種のもの）が含まれる。他の誘導体または修飾には、例えば標識（フルオレセインまたはテトラメチルローダミン等）；または1つまたは複数の翻訳後修飾（アセチル化、アミド化、ホルミル化、ヒドロキシル化、メチル化、リン酸化、硫酸化、糖鎖付加または脂質付加等）が含まれる。実際、ある特定の化学修飾（特にN末端糖鎖付加）はヒト血清中のペプチドの安定性を増加させることが示された（Powell et al. (1993) *Pharma. Res.* 10:1268-1273）。ペプチド誘導体には、N-ミリスチル化によって得られる増加した膜透過性を備えたものも含まれる（Brand, et al. (1996) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 270:C1362-C1369）。

10

【0087】

【0099】 加えて、本発明のペプチド誘導体は、細胞の中へのペプチドの膜貫通性輸送または細胞内送達を、容易にするか、促進するか、または増加させる、細胞透過配列を含むことができる。例えば、多様なタンパク質（HIV-1 Tat転写因子、ショウジョウバエアンテナペディアル転写因子に加えて、単純ヘルペスウイルスVP22タンパク質が含まれる）は、細胞の中へのタンパク質の輸送を容易にすることが示されている（Wadia and Dowdy (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:52-56）。更に、アルギニンリッチペプチド（Futaki (2002) *Int. J. Pharm.* 245:1-7）、ポリリジンペプチド含有Tat PTD（Hashida, et al. (2004) *Br. J. Cancer* 90 (6):1252-8）、Pep-1（Deshayes, et al. (2004) *Biochemistry* 43 (6):1449-57）またはHSP70タンパク質若しくはその断片（WO00/31113）は、本発明のペプチドまたは模倣物の細胞の中への細胞内送達の促進のために適切である。

20

30

【0088】

【00100】 上で示された修飾のうちの1つによって本発明のペプチドを誘導体化することができるが、本発明のペプチドは同じペプチド内で上述の修飾のうちの2つ以上を含有してもよいことが理解される。

【0089】

【00101】 模倣物またはペプチド模倣物は、本発明のペプチドに実質的に同じ構造的特徴及び／または機能的特徴を有する合成化学化合物を指す。模倣物は、完全合成の非天然アミノ酸類似体から構成することができるか、または1つ若しくは複数の天然ペプチドアミノ酸及び1つ若しくは複数の非天然アミノ酸類似体を含むキメラ分子であり得る。模倣物は、任意の数の天然のアミノ酸の保存的置換も、かかる置換が模倣物の活性を破壊しない限り取り込むことができる。ルーチンの試験を使用して、模倣物が例えばVISTAの活性を阻害できる必須の活性を有するかどうかを決定することができる。

40

【0090】

【00102】 模倣物またはペプチド模倣物に関して使用される時に、「実質的に同じ」という表現は、模倣物またはペプチド模倣物が、参照された分子の1つまたは複数の活性または機能（例えばT細胞増殖を促進する能力）を有することを意味する。

【0091】

50

【00103】 所与のペプチドの模倣物の使用については明らかな利点がある。例えば、ペプチドでは非経口投与であることと比較して、ペプチド模倣物は経口的に投与することができるので、ペプチド模倣物に伴うかなりの費用節約及び患者コンプライアンス改善がある。更に、ペプチド模倣物の産生はペプチドよりもはるかに安価である。

【0092】

【00104】 したがって、本発明のペプチドは、類似の生物学的活性及びしたがって類似の治療法的有用性を備えたかかる小さな化学化合物の開発において有用性を有する。ペプチド模倣物を開発する技法は従来のものである。例えば、ペプチド結合は、ペプチド模倣物が類似の構造、したがって生物学的活性をもとのペプチドへ取り入れることを可能にする非ペプチド結合または非天然のアミノ酸によって置き換えることができる。更なる修飾もアミノ酸の化学基を他の類似構造の化学基による置き換えによって行うことができる。ペプチド模倣物の開発は、NMR分光法、結晶学及び／またはコンピューター支援分子モデリングによってもとのペプチドの三次構造を決定することによって支援することができる。これらの技法は、もとのペプチドよりもより高い有効性及び／またはより高い生物学的利用能及び／またはより高い安定性の新規の組成物の開発を支援する (Dean (1994) BioEssays 16:683-687; Cohen & Shatzmiller (1993) J. Mol. Graph. 11:166-173; Wiley & Rich (1993) Med. Res. Rev. 13:327-384; Moore (1994) Trends Pharmacol. Sci. 15:124-129; Hruby (1993) Biopolymers 33:1073-1082; Bugg, et al. (1993) Sci. Am. 269:92-98)。一旦可能性のあるペプチド模倣化合物が同定されれば、それは合成され、VISTA活性のモニタリングのために本明細書において記載されるアッセイまたは他の適切なアッセイを使用してアッセイすることができる。

【0093】

【00105】 ペプチド模倣組成物は、非天然の構造成分の任意の組み合わせを含有することができ、それは典型的には3つの構造グループ、すなわち天然のアミド結合(「ペプチド結合」)連結以外の残基連結基；天然に存在するアミノ酸残基の代わりに非天然残基；二次構造的な模倣を誘導、すなわち二次構造(例えばβターン、γターン、βシート、αヘリックスの立体配座、及び同種のもの)を誘導または安定化する残基からであるか；またはタンパク質分解への耐性を付与する他の変化である。例えば、残基のうちの1つまたは複数がアミド結合以外の化学的手段によって繋がれる場合、ペプチドは模倣物として特徴づけることができる。個別のペプチド模倣残基は、アミド結合、非天然の非アミド化学結合、他の化学結合またはカップリング手段(例えば、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、二官能性マレイミド、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)またはN, N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)が含まれる)によって繋ぐことができる。アミド結合に対する連結基の代替には、例えばケトメチレン(例えば-C(=O)-NH-の代わりに-C(=O)-CH₂-)、アミノメチレン(CH₂-NH)、エチレン、オレフィン(CH=CH)、エーテル(CH₂-O)、チオエーテル(CH₂-S)、テトラゾール(CN₄-)、チアゾール、レトロアミド、チオアミドまたはエステルが含まれる(例えばChemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins、7:267-357、「Peptide and Backbone Modifications」、Marcel Dekker、NY中のSpatola(1983)を参照)。

【0094】

【00106】 論じられたように、ペプチドは、天然に存在するアミノ酸残基の代わりに1つまたは複数の非天然残基を含有することによって、模倣物として特徴づけることができる。非天然残基は当技術分野において公知である。天然のアミノ酸残基の模倣物として有用な非天然残基の特定の非限定的な例は、芳香族アミノ酸の模倣物であり、それら

には例えば、D-ナフィラルアニン (naphylalalanine) またはL-ナフィラルアニン; D-フェニルグリシンまたはL-フェニルグリシン; D-2チエネイルアニン (thieneylalanine) またはL-2チエネイルアニン; D-1-ピレネイルアニン (pyreneylalanine)、D-2-ピレネイルアニン、D-3-ピレネイルアニン、D-4-ピレネイルアニン、L-1-ピレネイルアニン、L-2-ピレネイルアニン、L-3-ピレネイルアニン、またはL-4-ピレネイルアニン; D-3チエネイルアニンまたはL-3チエネイルアニン; D-(2-ピリジニル)-アラニンまたはL-(2-ピリジニル)-アラニン; D-(3-ピリジニル)-アラニンまたはL-(3-ピリジニル)-アラニン; D-(2-ピラジニル)-アラニンまたはL-(2-ピラジニル)-アラニン; D-(4-イソプロピル)-フェニルグリシンまたはL-(4-イソプロピル)-フェニルグリシン; D-(トリフルオロメチル)-フェニルグリシン; D-(トリフルオロメチル)-フェニルアラニン; D-p-フルオロ-フェニルアラニン; D-p-ビフェニルフェニルアラニンまたはL-p-ビフェニルフェニルアラニン; D-p-メトキシ-ビフェニル-フェニルアラニンまたはL-p-メトキシ-ビフェニル-フェニルアラニン; 及びD-2-インドール(アルキル)アラニンまたはL-2-インドール(アルキル)アラニン(式中、アルキルは、置換または非置換のメチル、エチル、プロピル、ヘキシル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、イソブチルまたはsec-イソチル(isotyl)、イソペンチルまたは非酸性アミノ酸であり得る)が含まれる。天然の芳香環の代わりに使用することができる非天然アミノ酸の芳香環には、例えば、チアゾリル、チオフェニル、ピラゾリル、ベンズイミダゾリル、ナフチル、フラニル、ピロリル及びピリジル芳香環が含まれる。

10

20

【0095】

[00107] 酸性アミノ酸の模倣物は、負の電荷を維持しながら非カルボン酸塩のアミノ酸; (ホスホノ)アラニン; 及び硫酸化スレオニンによる置換によって生成することができる。カルボキシル側基(例えばアスパルチルまたはグルタミル)も、カルボジイミド($R'-N-C-N-R'$)(例えば、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4, 4-ジメチルペンチル(dimetholpentyl))カルボジイミドが含まれる)との反応によって選択的に修飾され得る。アスパルチル基またはグルタミル基はアンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル基及びグルタミニル基にも転換することができる。

30

【0096】

[00108] リジン模倣物は、コハク酸無水物または他のカルボン酸無水物とリジニル(lysiny)を反応させることによって生成することができる(及びアミノ末端残基を改変することができる)。リジン及び他の α アミノ含有残基の模倣物は、イミドエステル(ピコリンイミド酸メチル、ピリドキサルリン酸、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソ尿素、2, 4, ペンタンジオン等)との反応、及びグリオキシラートとのトランスアミダーゼ触媒反応によっても生成することができる。

【0097】

[00109] 1つまたは複数の残基は、逆のキラリティーのアミノ酸(またはペプチド模倣残基)によって置き換えることもできる。したがって、L-立体配置での天然に存在する任意のアミノ酸(それは化学物質の構造に依存して、RまたはSとも称することができる)は、同じアミノ酸または模倣物であるが逆のキラリティーのもの(D-アミノ酸と称されるがそれは追加でR体またはS体と称することができる)により置き換えることができる。

40

【0098】

[00110] 当業者によって認識されるように、本発明のペプチド模倣物は、誘導体化されたペプチドについて本明細書において記載される修飾のうちの1つ若しくは複数、例えば検出可能な標識(エフェクター標識または放射性核種等)、治療薬剤(化学療法剤等)、1つ若しくは複数の翻訳後修飾、または細胞透過配列も含むことができる。

50

【0099】

〔00111〕 例えば、本明細書において記載されるVISTAアンタゴニストを翻訳後に修飾して、エフェクター標識（化学的リンカー等）、検出可能な標識（例えば蛍光色素、酵素、基質、生物発光材料、放射性物質及び化学発光標識等）、または機能性標識（例えばストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、細胞毒素、細胞毒性剤及び放射性物質等）を付加することができる。更なる例示的な酵素には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ及びルシフェラーゼが含まれるが、これらに限定されない。更なる例示的な蛍光体には、ローダミン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ウンベリフェロン、ジクロロトリアジニルアミン、フィコエリトリン及び塩化ダンシルが含まれるが、これらに限定されない。更なる例示的な化学発光標識には、ルミノールが含まれるが、これらに限定されない。更なる例示的な生物発光材料には、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びイクオリンが含まれるが、これらに限定されない。更なる例示的な放射性物質には、ビスマス213 (^{213}Bi)、炭素14 (^{14}C)、炭素11 (^{11}C)、塩素18 (^{18}Cl)、クロミウム51 (^{51}Cr)、コバルト57 (^{57}Co)、コバルト60 (^{60}Co)、銅64 (^{64}Cu)、銅67 (^{67}Cu)、ジスプロシウム165 (^{165}Dy)、エルビウム169 (^{169}Er)、フッ素18 (^{18}F)、ガリウム67 (^{67}Ga)、ガリウム68 (^{68}Ga)、ゲルマニウム68 (^{68}Ge)、ホルミウム166 (^{166}Ho)、インジウム111 (^{111}In)、ヨウ素125 (^{125}I)、ヨウ素123 (^{123}I)、ヨウ素124 (^{124}I)、ヨウ素131 (^{131}I)、イリジウム192 (^{192}Ir)、鉄59 (^{59}Fe)、クリプトン81 (^{81}Kr)、鉛212 (^{212}Pb)、ルテチウム177 (^{177}Lu)、モリブデン99 (^{99}Mo)、窒素13 (^{13}N)、酸素15 (^{15}O)、パラジウム103 (^{103}Pd)、リン32 (^{32}P)、カリウム42 (^{42}K)、レニウム186 (^{186}Re)、レニウム188 (^{188}Re)、ルビジウム81 (^{81}Rb)、ルビジウム82 (^{82}Rb)、サマリウム153 (^{153}Sm)、セレン75 (^{75}Se)、ナトリウム24 (^{24}Na)、ストロンチウム82 (^{82}Sr)、ストロンチウム89 (^{89}Sr)、硫黄35 (^{35}S)、テクネチウム99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、タリウム201 (^{201}Tl)、トリチウム (^3H)、キセノン133 (^{133}Xe)、イッテルビウム169 (^{169}Yb)、イッテルビウム177 (^{177}Yb) 及びイットリウム90 (^{90}Y) が含まれるが、これらに限定されない

〔00112〕 加えて、本明細書において提供されるVISTAアンタゴニストは、化学療法剤（カルボプラチン、シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、カリケアマイシン、ドキシソルピシン、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、シクロフォスファミド、ビンクリスチン、ブレオマイシン、VEGFアンタゴニスト、EGFRアンタゴニスト、プラチン、タキソール、イリノテカン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン (gemcytabine)、ロイコボリン (leucovorine)、ステロイド、シクロフォスファミド、メルファラン、ビンカアルカロイド（例えばビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン及びビノレルビン）、ムスチン、チロシンキナーゼ阻害剤、放射線療法、性ホルモンアンタゴニスト、選択的アンドロゲン受容体修飾物質、選択的エストロゲン受容体修飾物質、PDGFアンタゴニスト、TNFアンタゴニスト、IL-1アンタゴニスト、インターロイキン（例えばIL-12またはIL-2）、IL-12Rアンタゴニスト、毒素コンジュゲートモノクローナル抗体、腫瘍抗原特異的モノクローナル抗体、Erbibitux（登録商標）、Avastin（登録商標）、パーツズマブ、抗CD20抗体、Rituxan（登録商標）、オクレリズマブ、オフアツムマブ、DXL625、Herceptin（登録商標）、またはその任意の組み合わせ等）が含まれるが、これらに限定されない治療薬剤を付加するように修飾することができる。植物及び細菌からの毒性酵素（リシン、ジフテリア毒素及びPseudomonas毒素等）をVISTAアンタゴニストへコンジュゲートして、細胞タイプ特異的に殺傷する試薬を生成することができる。Youle, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77 5483; Gillila

10

20

30

40

50

nd, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77 4539; Krollick, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77 5419.

【0100】

[00113] 更に、本明細書において記載されるVISTAアンタゴニストは、アルファ粒子またはベータ粒子を放射する放射性核種へコンジュゲートされ得る（例えば放射性免疫コンジュゲート）。かかる放射性同位体には、ベータ放射体（リン32 (^{32}P)、スカンジウム47 (^{47}Sc)、銅67 (^{67}Cu)、ガリウム67 (^{67}Ga)、イットリウム88 (^{88}Y)、イットリウム90 (^{90}Y)、ヨウ素125 (^{125}I)、ヨウ素131 (^{131}I)、サマリウム153 (^{153}Sm)、ルテチウム177 (^{177}Lu)、レニウム186 (^{186}Re)、レニウム188 (^{188}Re) 等)、及びアルファ放出体（アスタチン211 (^{211}At)、鉛212 (^{212}Pb)、ビスマス212 (^{212}Bi)、ビスマス213 (^{213}Bi) またはアクチニウム225 (^{225}Ac) 等)が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0101】

[00114] 方法は、本明細書において記載されるVISTAアンタゴニストの標識へのコンジュゲートについては当技術分野において公知であり、Hunter, et al. (1962) Nature 144: 945; David, et al. (1974) Biochemistry 13: 1014; Pain, et al. (1981) J. Immunol. Meth. 40: 219; and Nygren (1982) Histochem and Cytochem, 30: 407によって記載されるこれらの方法等である。

20

【0102】

[00115] 加えて、本明細書において記載されるVISTAアンタゴニストは、アンタゴニストペプチドを標的部位（癌細胞、腫瘍、ウイルス感染した細胞など等）へ標的化する別の部分（すなわち、「標的化部分」）を含むことができる。標的化部分は、抗原へ結合する抗体若しくはリガンド、標的細胞によって発現される受容体、または感染性病原体から選択され得る。

【0103】

[00116] VISTAアンタゴニスト（そのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体及び模倣物に加えて）は、免疫グロブリンポリペプチドまたはその断片（例えば抗体定常領域）へも直接または間接的に付加され得る。

30

【0104】

[00117] 「コンジュゲート」は、本明細書において使用される時、リンカーの使用ありまたはなしでポリペプチドレベルにより繋がれる、少なくとも1つの単離されたVISTAアンタゴニストペプチド及び1つの免疫グロブリンポリペプチドまたはその断片（例えば抗体定常領域）を有する化合物を指す。コンジュゲートは、ペプチドリinkerについてのコード配列ありまたはなしで、少なくとも1つのナトリウム利尿ペプチド及び1つの抗体定常領域をコードする遺伝子を核酸レベルで繋ぐ結果として産生される融合物ポリペプチドであり得る。

40

【0105】

[00118] かかるVISTAアンタゴニストペプチド抗体コンジュゲートは、より高い血清安定性（例えば少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、50%、80%、100%、200%以上）を有し、同じ条件下の抗体定常領域なしのアンタゴニストペプチドと比較した場合に血清半減期が増加し得る。ヒト抗体（例えばIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4等のヒトIgG）は、本発明のナトリウム利尿ペプチドコンジュゲートの作製の目的のための定常領域またはその断片の由来として頻繁に使用される。

【0106】

[00119] 本明細書において使用される時、「抗体（または免疫グロブリン）定

50

常領域」は、抗体の重鎖または軽鎖の定常領域の少なくとも一部に対応するポリペプチドを指し、かかる一部には少なくとも1つの定常ドメイン（例えばC_Lの定常ドメインまたはC_Hの定常ドメインのうちの1つ）が含まれる。例えば、本発明のコンジュゲートの作製のために使用される「抗体定常領域」は、抗体重鎖に由来することができ、それらには、3つのうちの2つ（I g A、I g D及びI g GについてはC_H 2及びC_H 3）または4つのうちの3つ（I g E及びI g MについてはC_H 2、C_H 3及びC_H 4）の定常ドメインが含まれ；第1の定常ドメイン（C_H 1）はいくつかの事例において存在し得るが、他において除外され得る。かかる抗体定常領域は、例えば組換え法または合成方法によって、またはインタクトな抗体または抗体の重鎖若しくは軽鎖の酵素による消化（例えばペプシン消化またはパパイン消化に続く精製等の多様な手段によって、得ることができる。

10

【0107】

〔00120〕 本出願において使用される時、この用語によって更に包含されるものは、抗体の重鎖もしくは軽鎖の定常領域またはその一部（それは抗体鎖のC末端に最も近い少なくとも1つの定常ドメインを含有する）の対応するアミノ酸配列に実質的な配列同一性（例えば少なくとも80%、85%、90%、95%またはそれ以上）を、V I S T Aアンタゴニストペプチド-抗体定常領域コンジュゲート中のかかる「抗体定常領域」の存在がコンジュゲートへより高い血清安定性を与える限り、有するポリペプチドである。

【0108】

〔00121〕 加えて、ペプチド、マルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体または模倣物を修飾して、ある特定の特性（例えば生物学的半減期）を増加させることができる。N末端の修飾/コンジュゲーション（例えば脂質付加またはアセチル化）、C末端の修飾/コンジュゲーション（例えば脂質付加またはアセチル化）、アミノ酸置換（すなわち天然に存在しないアミノ酸（D-立体配座、N-メチル化、テトラ置換、β-アミノ酸など等）による天然のアミノ酸の置換）、ペプチド主鎖修飾（例えばペプチド結合の化学修飾（エステル及びスルフィド及びアルキルによるカルボニルまたはアミドの基の単純な還元または置き換え等））、側鎖修飾及び/または環化（例えばジスルフィド結合形成）が含まれるが、これらに限定されない様々なアプローチが可能である。

20

【0109】

〔00122〕 一実施形態において、ペプチドは、抗体の生物学的（例えば血清）半減期を増加させるように、例えばP E G化され得る。ペプチドをP E G化するために、典型的には、1つ若しくは複数のP E G基がペプチドへ付加されるようになる条件下でポリエチレングリコール（P E G）（反応性のP E Gのエステル誘導体またはアルデヒド誘導体等）とそれを反応させる。好ましくは、P E G化は、反応性のP E G分子（または類似した反応性の水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。

30

【0110】

〔00123〕 同様に、別の実施形態において、ペプチド、マルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体または模倣物をポリシアル酸（P S A）のコンジュゲーションによって修飾して、半減期を増加させることができる。

【0111】

40

〔00124〕 加えて、ペプチド、マルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体または模倣物を、修飾して（例えば遺伝的に融合または化学的にコンジュゲートして）、X T E N化と呼ばれるプロセスを介して延長された組換えポリペプチド（X T E N）を含めて、その半減期を改善することができる。X T E Nは、864アミノ酸の長い親水性の非構造化タンパク質ベースのポリマーである。例えばW O 2013/130683（その全体は参照することにより本明細書に明示的に援用される）を参照されたい。対象となる分子へ付加された時に、分子の有効サイズが大幅に増加し、P E Gのものに類似した様式で腎臓クリアランスを減速することによって、その結果として血清中での存在を延長する。腎臓クリアランスの減速に加えて、X T E Nへの付加は、リガンドのその受容体への親和性の低減によって受容体媒介性クリアランスも阻害することができる。X T E Nカップ

50

リング化学には、チオール-X T E N；マレイミド-X T E N；アルキン-X T E N；及びヨードアセチル-X T E Nが含まれるが、これらに限定されない。

【0112】

〔00125〕 さらに、ペプチド、マルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体または模倣物を、組換えアルブミン（例えばNovozymes Recombumín（登録商標））により修飾して、半減期を改善することができる。ペプチドは標準的なプロトコルを使用して、組換えアルブミンへ遺伝子的に融合されるか、または化学的にコンジュゲートされ得る。

【0113】

〔00126〕 更に、ペプチド、マルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体または模倣物は、ペプチドへの特異的なアミノ酸の付加及び／またはペプチドからの特異的なアミノ酸の除去によって修飾することができる。例えば、いくつかの特異的なアミノ酸をペプチドへ付加し、それによって分子構造を強化または引き締めて生物学的分解を受けにくくし、したがって例えばZealandのStructure Induced Probe（SIP（登録商標））テイル技術を使用して、血液中のより長い寿命を提供することができる。

10

【0114】

〔00127〕 ペプチド、類似体、誘導体または模倣物の安定性及び治療法上の可能性を改善するさらに別の例示的な方法は、マルチマー化である。例えば、マルチマーは、単離されたVISTAアンタゴニストまたはそのバリエーションの2つ以上のコピー（例えば2、3、4、5、6、7またはそれ以上）を含むことができる。マルチマーには、ホモマルチマー及びヘテロマルチマーの両方が含まれる。マルチマー化は、ペプチド安定性の増加、より高い結合の強度（分子中の複数原子価に起因する）、及び／または薬物動態特性の改善をもたらすことができる。

20

【0115】

〔00128〕 本明細書において開示されるVISTAアンタゴニストペプチド、マルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体または模倣物の安定性及びしたがって治療法上の可能性を改善するための別の例示的なアプローチは、ペプチドのN末端及び／またはC末端へのアセチル基の付加である。アセチル化はエキソペプチダーゼからペプチドを保護し、それによってペプチドの半減期を延長することができる。

30

【0116】

VISTAアンタゴニストの産生

〔00129〕 ペプチドマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体または模倣物は、当技術分野において公知の任意の方法を使用して、産生及び単離することができる。ペプチドは、当技術分野において公知の化学的方法を使用して全体でまたは部分的に合成することができる（例えばCaruthers（1980）Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223；Horn（1980）Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232；and Banga（1995）Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa.を参照）。ペプチド合成は様々な固相法を使用して遂行することができ（例えばRoberge（1995）Science 269:202；Merrifield（1997）Methods Enzymol. 289:3-13を参照）、自動合成は例えば製造者の説明書に従ってABI 431Aペプチド合成機（Perkin Elmer）を使用して達成することができる。

40

【0117】

〔00130〕 個別の合成残基及び模倣物を取り込んだペプチドは当技術分野において公知の多様な手順及び手法を使用して合成することができる（例えばOrganic Syntheses Collective Volumes、Gilman, et

50

al. (編) John Wiley & Sons, Inc.、NYを参照)。ペプチド及びペプチド模倣物はコンビナトリアル手法を用いて合成することもできる。ペプチド及びペプチド模倣物のライブラリーの生成のための技法は周知であり、それらには例えばマルチピン技法、ティーバッグ技法及びスプリットーカップルーミックス技法が含まれる(例えば、al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9: 205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 114-119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3: 17-27; and Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267: 220-234を参照)。修飾ペプチドは化学修飾方法によって更に産生することができる(例えば、Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19: 373-380; and Blommers (1994) Biochemistry 33: 7886-7896を参照)。

【0118】

【00131】あるいは、本発明のペプチドはペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を使用して、組換えタンパク質系において調製することができる。例証として、本発明のペプチドをコードする核酸分子は、ペプチドの発現のために適切な条件下で宿主細胞(細菌、酵母または哺乳類細胞等)の中へ導入され、ペプチドは当技術分野において公知の方法を使用して精製または単離される。例えばDeutscher et al. (1990) Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology Vol. 182, Academic Pressを参照されたい。特定の実施形態において、ペプチドまたはその類似体、誘導体若しくは模倣物は、均一(例えば90%を超える純度)に単離及び/または精製される。

【0119】

【00132】本明細書において開示されるペプチドは、改善された有効性、クリアランス、半減期及び同種のことを備えた化合物の設計及び合成のためにリード化合物として使用できることが企図される。

【0120】

【00133】1つのアプローチは、ペプチドとVISTAとの間の特異的な結合相互作用を決定する構造-活性関係性(SAR)分析(例えばNMR分析)を含んでおり、より有効な薬剤の開発を容易にする。次いで、かかるSAR分析においてまたは薬剤ライブラリーから同定された薬剤は、例えばVISTAの活性を減少させる及び/またはT細胞増殖を促進する能力について検査することができる。

【0121】

医薬組成物

【00134】本明細書において記載されるVISTAアンタゴニストペプチド、そのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体及び模倣物は、医薬組成物において提供することができる。

【0122】

【00135】「医薬組成物」は哺乳類への投与のために適切な化学的組成物または生物学的組成物を指す。かかる組成物は、いくつかの経路(頬腔、皮膚上、硬膜外、吸入、動脈内、心臓内、大脳室内、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、脊髄内、髄腔内、静脈内、経口、非経口、皮下、浣腸または坐薬を介して経直腸、皮下、皮膚下、舌下、経皮、及び経粘膜が含まれるがこれらに限定されない)のうちの1つまたは複数を介する投与のために具体的には製剤化することができる。加えて、投与は、注射、粉末、液体、ゲル、ドロップ、または投与の他の手段を用いて行われ得る。

【0123】

【00136】「医薬品賦形剤」または「薬学的に許容される賦形剤」は、活性のある治療薬剤が製剤化される担体(通常は液体)である。本発明の一実施形態において、活

性のある治療薬剤は、本明細書において述されるヒト化抗体または1つ若しくは複数のその断片である。賦形剤は、一般的には製剤への薬理学的活性及び／または生物学的な安定性を提供しないが、化学的および放出特性を提供し得る。例示的な製剤は、例えばGrennaro (2005) [編] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [第21版] 中に見出すことができる。

【0124】

【00137】 医薬組成物は典型的には滅菌され、製造及び保管の条件下で安定してなくてはならない。本発明は、医薬組成物が凍結乾燥された形状においてあることを企図する。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に適切な他の秩序のある構造として製剤化することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール）、及び適切なその混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。本発明は医薬組成物中での安定剤の包含を更に企図する。

10

【0125】

【00138】 本明細書において記載されるVISTAアンタゴニストペプチド、そのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体及び模倣物は、様々な投薬量形状の医薬組成物へと製剤化することができる。本発明の医薬組成物を調製するために、活性成分として少なくとも1つのVISTAアンタゴニストが、医薬品製剤の当業者に周知の技法に従って、適切な担体及び添加剤と密に混合され得る。Grennaro (2005) [編] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [第21版]を参照されたい。例えば、本明細書において記載されるアンタゴニストはリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2)中で製剤化され、5.0mg/mLの透明無色の液体溶液として供給することができる。

20

【0126】

【00139】 同様に、液体調製のための組成物には、適切な担体及び添加剤（水、アルコール、油、グリコール、防腐剤、風味剤、着色剤及び懸濁化剤が含まれるがこれらに限定されない）を有する、溶液、エマルジョン、分散、懸濁、シロップ及びエリキシルが含まれる。非経口投与の典型的な調製は、担体（滅菌水または非経口的に許容される油（ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、レシチン、落花生油または胡麻油が含まれるがこれらに限定されない）等）と共に活性成分を含み、可溶性または貯蔵の支援のための他の添加剤も含むことができる。溶液の場合、粉末へ凍結乾燥され、次いで使用の直前に再構成することができる。分散物及び懸濁物のために、適切な担体及び添加剤には、水性ゴム、セルロース、シリケートまたは油が含まれる。

30

【0127】

【00140】 列举された実施形態の各々について、VISTAアンタゴニストペプチド、そのマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体及び模倣物は、多様な投薬形状によって投与することができる。当業者に公知の任意の生物学的に許容される投薬形状及びその組み合わせが企図される。かかる投薬形状の例には、再構成可能粉末、エリキシル、液体、溶液、懸濁物、エマルジョン、粉末、顆粒、粒子、マイクロ粒子、分散可能顆粒、カシェー、吸入剤、エアロゾル吸入剤、パッチ、粒子吸入剤、インプラント、デポインプラント、注射可能物（皮下、筋肉内、静脈内及び皮内が含まれる）、点滴、及びその組み合わせが、限定されずに含まれる。

40

【0128】

【00141】 多くの場合、組成物中に等張剤（例えば糖、多価アルコール（マンニトール、ソルビトール等）、または塩化ナトリウム）を含むことは好ましいだろう。注射可能組成物の吸収の延長は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤（例えばモノステアリン酸塩及びゼラチン）を含めることによってもたらされ得る。さらに、本明細書において記載される化合物は、徐放性製剤において（例えば緩慢放出ポリマーを含む組成物において）製剤化することができる。VISTA及びVISTAコンジュゲートは、迅速放出に対し

50

て化合物を保護する担体（制御放出製剤等、インプラント及びマイクロカプセル化された送達系が含まれる）により調製され得る。生物分解性生体適合性ポリマーを使用することができ、それらは、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、ポリ乳酸及びポリ乳、ポリグリコールコポリマー（PLG）等である。かかる製剤の調製については多くの方法が当業者に公知である。

【0129】

〔00142〕 当技術分野において当業者は、例えば本明細書における開示によって導かれる日常の実験、及び Goodman, et al. (2011) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [第12版] ; Howland, et al. (2005) Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology [第2版] ; and Golan, (2008) Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy [第2版] 中の教示を介して、投与の効果的な投薬量及び頻度を決定することができるだろう。Grennar (2005) [編] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [第21版] も参照されたい。

10

【0130】

〔00143〕 本明細書において記載される組成物は以下の経路、すなわち頬腔、皮膚上、硬膜外、点滴、吸入、動脈内、心臓内、大脳室内、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、脊髄内、髄腔内、静脈内、経口、非経口、肺、皮下、浣腸または坐薬を介して経直腸、皮膚下、舌下、経皮、及び経粘膜のうちの任意のものにおいて投与することができる。好ましい投与経路は静脈注射または点滴である。投与は、局所的（組成物は、疾患（例えば腫瘍）の部位へ直接、そこに近接して、その地点中に、その付近に、そこで、そのまわりで、またはその近辺に投与される）、または全身的（組成物は患者へ与えられ、体を介して広く通過し、それによって疾患の部位に到達する）であり得る。局所的投与（例えば注射）は、細胞、組織、器官、及び／または器官系（それは、疾患を包含する及び／若しくは疾患に罹患し、ならびに／または疾患徴候及び／または症状が活発であるか若しくは起こるであろう場所（例えば腫瘍部位）である）への投与によって行うことができる。投与は局所効果を備えた局所用のものであり得、その作用が所望される場所に（例えば腫瘍部位）組成物は直接適用される。

20

30

【0131】

〔00144〕 列挙された実施形態の各々について、当技術分野において公知であるように化合物は多様な投薬形状によって投与することができる。当業者に公知の任意の生物学的に許容される投薬形状及びその組み合わせが企図される。かかる投薬形状の例には、チュアブル錠、迅速溶解性錠、発泡錠、再構成可能粉末、エリキシル、液体、溶液、懸濁物、エマルジョン、錠、多層錠、二層錠、カプセル、ソフトゼラチンカプセル、ハードゼラチンカプセル、カプレット、ロゼンジ、チュアブルロゼンジ、ビーズ、粉末、ゴム、顆粒、粒子、マイクロ粒子、分散可能顆粒、カシェー、圧注、坐薬、クリーム、局所用剤、吸入剤、エアロゾル吸入剤、パッチ、粒子吸入剤、インプラント、デポーインプラント、摂取可能物、注射可能物（皮下、筋肉内、静脈内及び皮内が含まれる）、点滴、及びその組み合わせが限定されずに含まれる。

40

【0132】

〔00145〕 混和物によって含まれ得る他の化合物は、例えば医学的不活性成分（例えば固体希釈剤及び液体希釈剤）（錠またはカプセルについてはラクトース、デキストロース、サッカロース、セルロース、デンプンまたはリン酸カルシウム、ソフトカプセルについてはオリーブ油またはオレイン酸エチル、及び懸濁物またはエマルジョンについては水または植物油等）；滑沢剤（シリカ、タルク、ステアリン酸、マグネシウム若しくはステアリン酸カルシウム及び／またはポリエチレングリコール等）；ゲル化剤（コロイド粘土等）；増粘剤（トラガカントゴムまたはアルギン酸ナトリウム等）、結合剤（デンプ

50

ン、アラビアゴム、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはポリビニルピロリドン等)；崩壊剤(デンプン、アルギン酸、アルギン酸塩またはデンプングリコール酸ナトリウム等)；沸騰剤；染料；甘味料；湿潤剤(レシチン、ポリソルベートまたはラウリル硫酸等)；及びかかる製剤について公知の添加剤である他の治療法的に許容される副成分(湿潤剤、防腐剤、バッファー及び抗酸化剤等)である。

【0133】

〔00146〕 経口投与のための液体分散物はシロップ、エマルジョン、溶液または懸濁物であり得る。シロップは、例えばサッカロース、またはグリセロール及び／若しくはマンニトール及び／若しくはルビトールと共にサッカロースを担体として含有することができる。懸濁物及びエマルジョンは、担体(例えば天然ゴム、寒天、アルギン酸ナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール)を含有することができる。

10

【0134】

〔00147〕 さらに実施形態において、本発明は、本発明の1つまたは複数のVISTAアンタゴニストの有効量を含む医薬品投薬単位を含む1つまたは複数の容器を含むキットを提供する。キットは、説明書、指示、ラベル、マーケティング情報、警告または情報パンフレットを含み得る。

【0135】

〔00148〕 本発明の任意の実施形態に記載の治療法用の組成物中のVISTAアンタゴニストの量は、疾患状態、年齢、性別、重量、患者歴、リスクファクター、疾患への素因、投与経路、既存の治療レジーム(例えば他の医薬品との相互作用の可能性)、及び個体の重量等の要因に従って変動し得る。投薬レジメンは至適の治療法への応答を提供するように調整され得る。例えば、単一のボラスを投与することができるか、数分割された用量を経時的に投与することができるか、または用量は治療法状況の事態に応じて比例して低減若しくは増加させることができる。

20

【0136】

〔00149〕 投与の容易性及び投薬量の均一性のために、非経口組成物を投薬単位形状で製剤化することは特に有利である。投薬単位形状は、本明細書において使用される時、治療される哺乳類対象のための一体型投薬量として適合させた物理的に分離した単位を指し；各々の単位は、要求される医薬品担体と共同して所望される治療法上の効果を産生することが意図される既定の量の抗体及びその断片を含有する。本発明の投薬量単位形状のための規格は、抗体及びその断片の固有の特性、ならびに達成される特定の治療法上の効果、ならびに個体における感受性の治療のためのかかる抗体およびその断片を調合する当該技術分野に本来存在する限定によって決定され、それらに直接依存する。本発明の抗体およびその断片またはその適切な医薬組成物が有効である哺乳類(例えばヒト)における病態の治療のための治療法用の使用において、本発明の抗体及びその断片は有効量で投与することができる。本発明のために適切な投薬は、組成物、医薬組成物または本明細書において記載される任意の他の組成物であり得る。

30

【0137】

〔00150〕 投薬は、単一用量、2倍用量、3倍用量、4倍用量及び／または5倍用量として投与することができる。投薬は、単独で、同時に、及び連続して投与することができる。

40

【0138】

〔00151〕 投薬形状は、当業者に公知の任意の放出の形状であり得る。本発明の組成物は、活性成分の即時放出または活性成分の持続放出若しくは制御放出性を提供するように製剤化され得る。持続放出または制御放出の調製物において、活性成分の放出は、延長された期間(例えば4～24時間)にわたり、血中レベルが治療域内だが毒性レベルより下で維持されるような率で起こり得る。好ましい投薬量形状には、即時放出、延長放出、パルス放出、可変放出、制御放出、徐放出、持続放出、遅延放出、長時間作用型、及びその組み合わせ、ならびに当技術分野において公知のものが含まれる。

50

【0139】

【00152】 本明細書において定義されるように、VISTAアンタゴニストペプチド、その類似体、誘導体または模倣物の治療法上有効量（すなわち効果的な投薬量）は、約0.001～30mg/kg体重、好ましくは約0.01～25mg/kg体重、より好ましくは約0.1～20mg/kg体重、及びさらにより好ましくは約1～10mg/kg、2～9mg/kg、3～8mg/kg、4～7mg/kg、または5～6mg/kg体重の範囲である。

【0140】

【00153】 当業者は、疾患または障害の重度、従来の治療、対象の全体的な健康及び／または年齢、ならびに存在する他の疾患が含まれるがこれらに限定されない、ある特定の要因が、対象の効果的な治療に要求される投薬量に影響を及ぼし得ることを認識するだろう。さらに、治療法上有効量のペプチドによる対象の治療には、単一の治療が含まれ得るか、または好ましくは一連の治療が含まれ得る。

10

【0141】

【00154】 好ましい例において、対象は、約1～10週間の間で、好ましくは2～8週間の間で、より好ましくは約3～7週間の間で、ならびにさらにより好ましくは約4、5または6週間で、1週間あたり1回、約0.1～20mg/kgの体重の間の範囲において、ペプチド、その類似体、誘導体または模倣物により治療される。治療のために使用される抗体、タンパク質またはポリペプチドの効果的な投薬量が特定の治療の経過にわたって増加または減少され得ることも認識されるだろう。本明細書において記載されるような診断アッセイの結果から、投薬量の変化が生じ、明らかになり得る。

20

【0142】

【00155】 組成物の薬理学的活性が当技術分野において公知の標準的な薬理学モデルを使用してモニターされ得ることが認識されるだろう。更に、VISTAアンタゴニストを含む組成物は、部位特異的送達のために適切なポリマーマトリクス若しくは膜中に取り込まれるかまたはカプセル化され得るか、または部位特異的送達を達成できる特異的な標的薬剤により官能化され得ることが認識されるだろう。これらの技法ならびに他の薬物送達技法は当技術分野において周知である。特定の状況についての至適の投薬量の決定は当業者の能力内である。Grennaro (2005) [編] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [第21版]を参照されたい。

30

【0143】

【00156】 本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物は、1つまたは複数の追加の治療薬剤（例えば抗癌剤、抗ウイルス剤、サイトカイン及び／または免疫アゴニスト）と共製剤化及び／または同時投与することができる。かかる組み合わせ療法は、より少ない投薬量のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物及び／または同時投与される薬剤を要求し、したがって様々な単独療法に伴う可能性のある毒性または合併症を避けることができる。本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物と有利に組み合わせることができるいくつかの薬剤があり、かかる薬剤の選択は治療を意図する疾患または病態に依存するだろう。例えば、本発明には、癌性または前癌性病態に対する応答を誘導または促進することができる、本発明のペプチドまたはマルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体若しくは模倣物及び少なくとも1つの抗癌剤からなる組み合わせ療法が含まれる。したがって、特定の実施形態において、本ペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物は、癌の治療におけるアジュバント療法として使用される。別の例として、本発明は、ウイルス感染に対する治療法への応答を誘導または促進することができる、本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物及び少なくとも1つの抗ウイルス剤を含む組み合わせ療法を包含する。VISTAアンタゴニストペプチド、マルチマー、コンジュゲート、類似体、誘導体または模倣物を含む組成物中に含有され得る例示的な治療薬剤には、例えばCTLA-4-Ig、抗PD-1、PD-L1融合タンパク質またはPD-L2融合タンパク質、及びEGFRアンタゴニストが含まれる。

40

50

【0144】

【00157】 抗癌剤には、細胞毒性剤（ビンカルカロイド、タキサン及びトポイソメラーゼ阻害剤等）；アンチセンス核酸（オーグメロセン／G3139、LY900003（ISIS 3521）、ISIS 2503、OGX-011（ISIS 112989）、LE-AON／Ler af-AON（リポソームカプセル化c-r afアンチセンスオリゴヌクレオチド／ISIS-5132）、MG98、及びPKC α 、クラステリン、IGFBP、タンパク質キナーゼA、サイクリンD1またはBcl-2を標的とする他のアンチセンス核酸等）；抗癌ヌクレオザイム（アンジオザイム（Ribozyme Pharmaceuticals）等）；腫瘍抑制因子をコードする核酸（p53、BRCA1、RB1、BRCA2、DPC4（Smad4）、MSH2、MLH1及びDCC等）；癌溶解ウイルス（癌溶解アデノウイルス及びヘルペスウイルス等）；抗癌免疫原（癌抗原／腫瘍関連抗原、例えば、上皮細胞接着分子（E p-CAM／TACSTD1）、ムチン1（MUC1）、癌胎児性抗原（CEA）、腫瘍関連糖タンパク質72（TAG-72）、gp100、Melan-A、MART-1、KDR、RCAS1、MDA7、癌関連ウイルスワクチン、腫瘍誘導性熱ショックタンパク質、及び同種のもの等）；抗癌サイトカイン、抗癌ケモカイン若しくはその組み合わせ；血管新生、新血管新生、及び／若しくは他の血管侵入の阻害剤；ならびに／または任意の他の従来の抗癌剤（フルオロピリミジナー（fluoropyrimidiner）カルバメート、非ポリグルタメート化可能な（polyglutamatable）チミジル酸生成酵素阻害剤、ヌクレオシド類似体、抗葉酸剤、トポイソメラーゼ阻害剤、ポリアミン類似体、mTOR阻害剤、アルキル化剤、レクチン阻害剤、ビタミンD類似体、炭水化物プロセッシング阻害剤、抗代謝葉酸アンタゴニスト、スミジレート（thumidy late）シンターゼ阻害剤、抗代謝剤、リボヌクレアーゼ還元酵素阻害剤、ジオキソレート（dioxolate）ヌクレオシド類似体、及び化学的に修飾したテトラサイクリンが含まれる）が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0145】

【00158】 本発明において使用される抗ウイルス剤には、HIV治療の状況におけるプロテアーゼ阻害因子（例えばアシクロビル）または抗ウイルス抗体（例えばHIV治療の状況における抗gp41抗体；CMVの治療の状況における抗CD4抗体など）が含まれるが、これらに限定されない。多数の他のタイプの抗ウイルス剤が当技術分野において公知である。

30

【0146】

【00159】 ペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物の毒性及び治療法効果性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投薬量の範囲の処方において使用することができる。かかる薬剤の投薬量は、好ましくはほとんどまたはまったく毒性を持たずにED₅₀が含まれる血中循環濃度の範囲内にある。投薬量は、用いられる投薬形状及び利用される投与経路に応じてこの範囲内で変動し得る。本発明の方法において使用される任意の薬剤について、治療法上効果的な用量は細胞培養アッセイから最初に推定することができる。用量を動物モデルにおいて処方して、細胞培養において決定されるようなIC₅₀（すなわち症状の最大障害の半量を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成することができる。かかる情報を使用してヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

40

【0147】

VISTAアンタゴニスト及びそれを含む組成物の使用

【00160】

本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物は、VISTA（すなわちPD-L3）の活性の障害、それによる免疫応答のアップレギュレーションにおける使用が見出される。免疫応答のアップレギュレーションは、既存の免疫応答の促進または初回免疫応

50

答の誘発の形状であり得る。例えば、V I S T A 活性の阻害を介して免疫応答を促進することは、微生物（例えば細菌、ウイルス、または寄生生物）による感染の防止及び／若しくは治療において、または免疫抑制及び癌の事例において有用である。

【0148】

〔00161〕したがって、本発明には、癌及び感染性疾患の防止及び治療のための予防的及び治療的な方法が含まれる。本明細書において、「治療する」、「治療すること」及び「治療」等の用語は、既に発症したかかる症状または疾患状態を、軽減、寛解、または根絶（治癒）する目的による、有効量の本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物の送達を指す。「防止する」、「防止すること」及び、「防止」という用語は、発症する予定の任意の症状または疾患の状態を防止する目的による、有効量の本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物の送達を指す。したがって、これらの用語には予防的治療が含まれることが意図される。

10

【0149】

〔00162〕一実施形態によれば、本発明は、有効量の本明細書において開示される単離されたV I S T A アンタゴニストまたは該単離されたV I S T A アンタゴニストを含む組成物を、必要とする対象（哺乳類対象等、好ましくはヒト対象）へ投与することによって、腫瘍浸潤及び／または癌転移を阻害する癌を治療または防止する方法を提供する。随意に、対象は、1つ若しくは複数の前癌性病巣を有するか、または例えば遺伝的変異、家族歴若しくは発癌物質への曝露の結果として癌への素因がある。別の実施形態において、本発明は、対象（哺乳類対象、好ましくはヒト対象等（検出可能なレベルの癌細胞を随意に有するヒト対象等））中の癌を治療する方法を提供する。これらの実施形態に従って、対象は、本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物を、対象における癌の発症または進行を検出可能に低減するのに十分な量で投与される。

20

【0150】

〔00163〕癌は、一般的には宿主における部分的に独立した増殖（例えば良性腫瘍）または宿主における完全に独立した増殖（悪性癌）が可能である細胞の単一クローンまたは数クローンから構成される。癌細胞は、制御されない増殖で異常に分裂および複製する細胞である。

【0151】

〔00164〕癌細胞は悪性形質転換（すなわち発癌）を介して宿主細胞から生じる。本明細書において、「前新生物性」、「前悪性」及び「前癌性」等の細胞及び／または組織の記述に関する用語は、癌になる有意な能力を示す遺伝学的及び／または表現型のプロファイルを有する細胞または組織を指す。通常かかる細胞は、癌進行の開始または癌進行の始まりについての有意なリスクをシグナリングする、それらの最も近い対応物との1つまたは複数の差によって特徴づけることができる。かかる前癌性変化は、検出可能なならば、通常優れた結果で治療することができる。

30

【0152】

〔00165〕一般に、前癌状態は新生物（複数可）または前新生物性病巣（複数可）の出現を伴うであろう。公知であり可能性が高い前新生物性組織の例には、乳癌における非浸潤性乳管癌（D C I S）増殖、子宮頸癌における子宮頸部上皮内新生物（C I N）、結腸直腸癌における結腸の腺腫性ポリープ、肺癌における非定型腺腫様過形成、及び皮膚癌における光線性角化症（A K）が含まれる。様々な癌についての前新生物性表現型及び遺伝子型ならびに細胞における前新生物性状態の存在を査定する方法は特徴づけられている。例えばMedina（2000）J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 5（4）：393-407；Krishnamurthy, et al.（2002）Adv. Anat. Pathol. 9（3）：185-97；Ponten（2001）Eur. J. Cancer Suppl 8：S97-113；Niklinski, et al.（2001）Eur. J. Cancer Prev. 10（3）：213-26；Walch, et al. Pathobiology（2000）68（1）：9-1

40

50

7; Busch (1998) Cancer Surv. 32:149-79を参照されたい。

【0153】

〔00166〕 遺伝子発現プロファイルは、正常細胞と前癌性細胞と癌細胞を区別するためにますます使用することができる。例えば、家族性腺腫様ポリプ遺伝子は結腸癌についてのサーベイランスで密接して促され；変異したp53腫瘍抑制遺伝子は侵襲性癌へと発達する細胞にフラグを立て；オステオポンチン発現レベルは前悪性細胞において上昇し、テロメラゼ活性の増加も前癌症状の（例えば膀胱癌及び肺癌における）マーカーであり得る。一態様において、本発明は前癌性細胞の治療に関する。別の態様において、本発明は前癌性細胞の治療のための医薬品の調製に関する。

10

【0154】

〔00167〕 一般に、本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物を使用して、任意のステージの癌を患う対象を治療する（及び癌の低減、遅延または他の治療のための医薬品を調製する）ことができる。癌の効果的な治療（したがってその低減）は、任意の多様な適切な方法によって検出することができる。癌の検出及び効果的な癌治療のための方法には、臨床検査（症状には膨潤、触診可能なしこり、リンパ節腫大、出血、目視可能な皮膚病巣及び体重損失が含まれ得る）；イメージング（X線技法、マンモグラフィ、結腸内視鏡術、コンピューター断層撮影法（CT及び／またはCAT）走査、磁気共鳴イメージングなど（MRI））；免疫診断的アッセイ（例えばCEA、AFP、CA125などの検出）；抗体媒介性の放射性イメージング；及び細胞／組織免疫組織化学分析が含まれる。癌性状態の査定及び効果的な癌治療のために適切な技法の他の例には、PCR及びRT-PCR（例えば癌細胞関連遺伝子または「マーカー」の）、生検、電子顕微鏡法、陽電子放射断層撮影法（PET）、コンピューター断層撮影法、磁気共鳴イメージング（MRI）、核型分析及び他の染色体分析、免疫アッセイ／免疫細胞化学的検出技法（例えば差別的抗体認識）、組織学的及び／または組織病理学的なアッセイ（例えば細胞膜変化の）、細胞動態研究及び細胞周期分析、超音波または他の超音波検査検出技法、放射線検出技法、フローサイトメトリー、内視鏡検査法可視化技法、ならびに身体検査技法が含まれる。

20

【0155】

〔00168〕 一般に、対象への本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物の送達（直接投与または核酸からの発現のいずれかによって）を使用して、対象における癌の任意の形態を低減、治療、防止、またはそうでなければ寛解することができる。この点において、癌の治療には、例えば、新生物性細胞（またはその任意の態様）へ形質転換する正常細胞の率、前新生物性細胞若しくは新生物性細胞の増殖の率、前新生物性表現型及び／若しくは悪性表現型を示す細胞の数、前新生物性細胞及び／若しくは新生物性細胞を含有する細胞媒質（例えば細胞培養、組織または器官）の物理的な領域、正常細胞及び／または前新生物性細胞が新生物性細胞へ形質転換する確率、癌細胞が癌進行の次の形態へ進む確率（例えば転移能力の低減）、またはその任意の組み合わせにおける任意の検出可能な減少が含まれ得る。かかる変化は、上述の技法または当技術分野において公知の適切なその対応法のうちの任意のもの（それはその有効性を査定するように治療法のレジメンの投与の前の適切な時間に典型的には適用される）を使用して検出することができる。癌の低減が起こったかどうかに関わらず、アッセイのための時間及び条件は、複数の要因（癌のタイプ、宿主へ送達されているペプチド、関連組成物、または組み合わせ組成物のタイプ及び量が含まれる）に依存するだろう。

30

40

【0156】

〔00169〕 本発明の方法を使用して多様な癌を治療することができる。本発明のペプチドまたは類似体、誘導体若しくは模倣物の送達または投与及びそれを含有する組み合わせ療法によって治療され得る癌の形態には、扁平上皮癌、白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、有毛細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、急性または慢性骨髄性白血

50

病、前骨髄性白血病、線維肉腫、横紋筋肉腫、黒色腫、精上皮腫、奇形腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、星細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、神経鞘腫；線維肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、黒色腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、濾胞性甲状腺癌及び奇形腫が含まれる。本発明の組成物は、膀胱、乳房、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、前立腺、膵臓、胃、子宮頸部、甲状腺または皮膚の他の癌腫の治療においても有用であり得る。本発明の組成物は、リンパ性系譜の他の造血器腫瘍、骨髄性系譜の他の造血器腫瘍、間充織起源の他の腫瘍、中枢神経系若しくは末梢神経系の他の腫瘍、及び／または間充織起源の他の腫瘍の治療においても有用であり得る。有利には、本発明の方法は、前立腺癌細胞、黒色腫細胞（例えば皮膚黒色腫細胞、眼黒色腫細胞、及び／またはリンパ節関連黒色腫細胞）、乳癌細胞、結腸癌細胞及び肺癌細胞における癌進行の低減においても有用であり得る。本発明の方法は、腫瘍形成性癌及び非腫瘍形成性癌（例えば非腫瘍形成性造血器癌）の治療に使用することができる。本発明の方法は、上皮癌（例えば癌腫）及び／または結腸直腸癌、乳癌、肺癌、膣癌、子宮頸癌、及び／または扁平上皮細胞癌腫（例えば頭頸部の）の治療において特に有用である。追加の可能性のある標的には肉腫及びリンパ腫が含まれる。追加の有利な標的には、固形腫瘍及び／または播種性腫瘍（例えば骨髄性腫瘍及びリンパ性腫瘍、それは急性または慢性であり得る）が含まれる。

10

【0157】

〔00170〕 本発明は、有効量の単離されたVISTAアンタゴニストまたは該単離されたVISTAアンタゴニストを含む組成物を、必要とする対象へ投与することを含む、抗癌免疫または抗腫瘍免疫を促進する方法も提供する。

20

【0158】

〔00171〕 癌治療に加えて、本発明は、対象または宿主において、病原体感染（すなわち細菌感染、ウイルス感染、寄生生物感染または真菌感染）を治療する方法も特色とする。この方法は、かかる感染の重症度、伝播、症状または継続期間を低減させるように、有効量の本発明のペプチドまたは類似体、誘導體若しくは模倣物を投与またはそうでなければ送達することを含む。かかる病原体感染には、細菌、原生動物、真菌、寄生生物またはウイルスによって引き起こされる疾患が含まれるが、これらに限定されない。

【0159】

〔00172〕 特定の実施形態において、ウイルス感染が治療される。エフェクターリンパ細胞の活性と通常関連する任意のウイルスを、この方法によって治療することができる。例えば、かかる方法を使用して、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、水痘ウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスタイプ1（HSV-1）ウイルス、単純ヘルペスタイプ2（HSV-2）ウイルス、牛痘ウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パピローマウイルス、パピローマウイルス、サイトメガロウイルス（CMV、例えばHCMV）、エキノウイルス（echinovirus）、アルボウイルス、ハンタウイルス（hantavirus）、コクサッキーウイルス、おたふくかぜウイルス、はしかウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、及び／またはヒト免疫不全ウイルスタイプ1若しくはタイプ2（HIV-1、HIV-2）から選択される1つまたは複数のウイルスによる感染を治療することができる。かかる方法の実践は、ウイルスの力価（ウイルス負荷）の低減、ウイルス感染した細胞の数の低減などをもたらし得る。

30

40

【0160】

〔00173〕 病原体感染に加えて、本発明のペプチドまたは類似体、誘導體若しくは模倣物は、免疫増殖性疾患、免疫不全症、自己免疫疾患、炎症反応、及び／またはアレルギー反応の治療と共同して対象へ投与またはそうでなければ送達され得る。さらに、本発明は、有効量の単離されたVISTAアンタゴニストまたは該単離されたVISTAアンタゴニストを含む組成物を、必要とする対象へ投与することを含む、対象においてVISTA媒介性T細胞抑制を遮断、阻害若しくは中和する、及び／または免疫応答を刺激する方法も提供する。かかる方法は、細菌感染、ウイルス感染、寄生生物感染及び真菌感染ならびに／または癌のうちの1つまたは複数の罹患した対象を治療するために有用であり

50

得る。

【実施例】

【0161】

〔00174〕 ここで本発明が一般的に記載されたが、以下の実施例を参照することによってより容易に理解されるだろう。それらの実施例は、単に本発明のある特定の態様及び実施形態の例証の目的のために含まれ、本発明を限定することは意図されない。

【0162】

実施例1：材料及び方法

〔00175〕 ペプチド合成。AP1049 (SSACDWIKRSCH-アミド、式中、Cys4-Cys11はジスルフィド架橋を形成する；配列番号1 (Ser-Ser-Ala-Cys-Asp-Trp-Ile-Lys-Arg-Ser-Cys-His)) 及びスクランブルされた陰性対照配列 (SSACKSWRDICH-アミド、式中、Cys4-Cys11はジスルフィド架橋を形成する；配列番号2) を、標準的なFmocベースの固相ペプチド合成 (SPPS) を使用して調製した。ペプチドを、HPLCを介して精製し、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 及びマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) を使用する質量分光学によって分析した。

【0163】

〔00176〕 ファージディスプレイを使用するペプチド探索。M13ファージペプチドライブラリーがBrian Kay博士 (U. Illinois-Chicago) によって提供された。ファージディスプレイバイオパニング実験及び確認のELISA結合実験の両方のために要求されるVISTAタンパク質は、従来の組換えタンパク質技法によって調製した。

【0164】

〔00177〕 T細胞増殖分析。VISTA-Ig融合タンパク質または対照Ig融合タンパク質を、ポリクローナルT細胞受容体 (TCR) 刺激 (すなわち抗CD3の抗体) と一緒に細胞培養プレートへ共吸収させた。VISTA特異的ペプチドの活性を評価するために、ペプチド (VISTA特異的及びスクランブルされた対照) を0日目に培養へ可溶性試薬として添加し、T細胞増殖及びサイトカイン産生を3～4日後に分析した。

【0165】

〔00178〕 T細胞プライミングアッセイ。VISTAは抗原提示細胞 (APC) 上で発現された時にT細胞プライミングを抑制することが公知である。VISTA発現骨髓性APC (Cd11b^{hi} MHCII⁺ 骨髓細胞) をマウス脾臓から精製し、FACSによりソートし、照射した (2500 rad)。VISTA特異的ペプチドの活性を試験するために、遺伝子導入T細胞 (OT-II等) を、VISTA発現APC及び同族抗原のトリオポアルブミン (15 ng/mL) によりエクスピボで刺激した。VISTA特異的ペプチドまたは対照スクランブルペプチドを細胞培養へ添加した。T細胞増殖及びサイトカイン産生を培養3～5日後に評価した。追加の特異性対照として、VISTA陰性の親細胞系統A20またはVISTAノックアウトマウスから精製したAPCを使用した。

【0166】

〔00179〕 Foxp3+CD4+調節性T細胞 (Treg) 抑制アッセイ。VISTA遮断モノクローナル抗体がインビトロTreg抑制アッセイにおけるTreg抑制活性を部分的に回復させるので、VISTAは、Foxp3+CD4+調節性T細胞 (Treg) の抑制機能において役割を果たす。このアッセイは抗原提示細胞、精製されたFoxp3+CD4+Treg、及びFoxp3-CD4+ナイーブT細胞を含み、それらはポリクローナルTCR刺激によって刺激される。VISTA特異的ペプチドの活性を検査するために、ペプチド (VISTA特異的及びスクランブルした対照) を0日目にTreg抑制アッセイへ添加した。T細胞増殖及びサイトカイン産生を+3日目に測定した。

【0167】

〔00180〕 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) のモデル (ヒト多発性硬化症に

10

20

30

40

50

ついでマウス自己免疫性炎症性疾患モデル)。VISTA遮断モノクローナル抗体は、受動伝達EAEモデルにおいて、発病開始を有意に加速することに加えて、疾患の重症度を悪化させることが示されている。このモデルにおいて、MOG特異的脳炎誘発性CD4⁺T細胞を、MOGペプチドによる免疫付与に際してドナーマウスにおいて最初にプライミングし、次いで精製し、MOGペプチド及びサイトカイン(IL23、TGFβ、IL6及びIL1b)の存在下においてエキスポで増幅させる。増幅させた脳炎誘発性CD4⁺T細胞をナイーブプレシピエントの中へ移入して、疾患を誘導する。VISTA特異的ペプチドの活性を評価するために、ペプチド(VISTA特異的及びスクランブルした対照)を、予防的に(2日目から開始して)または治療的に(発病開始の間に+7日目から開始して)のいずれかで、及び2日ごとに連続的に実験の全体の継続期間に腹腔内投与を介してマウスへ投与する。疾患の重症度を確立されたプロトコルに従って評価する。

10

【0168】

[00181] マウス腫瘍モデル。VISTAが腫瘍特異的T細胞応答を抑制することが実証されている。VISTA特異的モノクローナル抗体経路のVISTA遮断は有意に抗腫瘍の免疫応答を促進し、マウス腫瘍モデル(B16黒色腫瘍モデル等)において腫瘍進行を阻害する。VISTA特異的ペプチドの活性は、この腫瘍モデルを使用してインビボで評価することができる。0日目にB16腫瘍細胞(15,000細胞)をマウスの脇腹上に接種する。ペプチド(VISTA特異的及びスクランブルした対照)を、予防的に(2日目から開始して)または治療的に(すなわち腫瘍が触診可能な場合)のいずれかで、及び2日ごとに連続的に実験の全体の継続期間に腹腔内投与を介してマウスへ投与する。腫瘍増殖を2~3日ごとにキャリパーにより測定する。

20

【0169】

実施例2：T細胞増殖の促進

[00182] VISTA⁺CD11b⁺単球を、CD11b磁性ビーズ(Milteny)を使用してナイーブ脾細胞から濃縮した。VISTA⁺CD11b^{hi}MHCII⁺骨髄性APCをFACSによりソートし、照射し(2500rad)、OVAペプチドの存在下においてOT-I I遺伝子導入CD4⁺T細胞を刺激するために抗原提示細胞として使用した。対照Ig、VISTA及びPD-L1について特異的なモノクローナル抗体(30μg/mL)、またはVISTA特異的ペプチド(100μg/mL)を、示されるように添加した。72時間のアッセイのうちの最後の8時間の間のトリチウム取り込みによって、細胞増殖を測定した。この分析から、T細胞増殖がVISTA若しくはPD-L1の中和モノクローナル抗体またはAP1049ペプチドの存在下において増強されたことが示された(図1)。実際、AP1049ペプチドはモノクローナル抗体のいずれよりもはるかに良好に細胞増殖を刺激し、このペプチドがVISTAに対する強いアンタゴニスト活性を保持することを指摘する。

30

【0170】

実施例3：抗腫瘍免疫の促進

[00183] 免疫原性膀胱癌腫瘍(MB49)をメスマウスに接種した。AP1049の腫瘍増殖を減速する及び/または腫瘍退行を容易にする能力について試験した。このアッセイの測定値は腫瘍増殖であった。

40

【0171】

[00184] MB49腫瘍を、皮内(i.d.)接種(それは腫瘍サイズの測定を容易にする)を介してメスマウス(300k)中に接種した。+1日目に始め、2週間継続する、腫瘍塊の周囲への毎日の注射を介して、PBS(対照)またはVISTAアンタゴニストペプチド(AP1049)のいずれかにより、マウスを処置した。腫瘍サイズを2~3日ごとにキャリパーによって測定した。

【0172】

[00185] これらの方法を使用して、対照により処理されたマウスと比較して、AP1049により処理されたマウスにおいて腫瘍増殖の遅延及び/または腫瘍退行が得

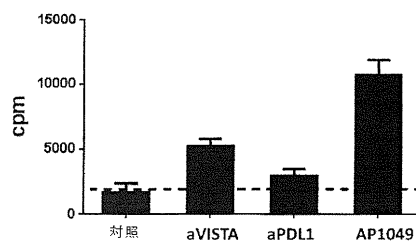
50

られた。

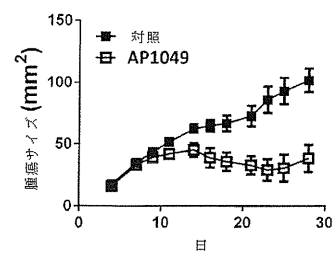
【0173】

〔00186〕 図2中で示されるように、AP1049処置はMB49腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖を低減し、ペプチドがVISTAの重要な部位／活性のある部位へ結合し、VISTAの免疫抑制性の機能を遮断し得ることが指摘された。

【図1】



【図2】



【配列表】

0006885728000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/00	(2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
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	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	(2006.01)	G 0 1 N 33/566	

(73)特許権者 516212692

マーク・スパラー

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03756, レバノン, ルビン 652 7936, ダートマス・ヒッチコック・メディカル・センター

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100120112

弁理士 中西 基晴

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 マーク・スパラー

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03756, レバノン, ルビン 652 7936, ダートマス・ヒッチコック・メディカル・センター

(72)発明者 ノエル, ランドルフ・ジェイ

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03781, プレインフィールド, フリーマン・ロード 301

(72)発明者 セーラズ, サブリナ

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03766, レバノン, ウルフ・ロード 42 424

(72)発明者 ルメルシェ, イザベル

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03748, エンフィールド, ユーエス・ルート・4 251, ピー・オー・ボックス 905

(72)発明者 ノワク, エリザベス

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03784, ウェスト・レバノン, メドーズブルック・ビレッジ 3, アpartment 14

(72)発明者 ラインズ, ジャネット・ルイーザ

イギリス国ロンドン エスイー1・4ジェイズィー, トリニティ・ストリート 52, ポートランド・コート, フラット 12

(72)発明者 ワン, リー

アメリカ合衆国バーモント州05055, ノーウィッチ, ニュー・ボストン・ロード 948

合議体

審判長 田村 聖子

審判官 中島 庸子

審判官 大久保 智之

- (56)参考文献 国際公開第2013/192504号
国際公開第2014/039983号
特表2013-527144号公報

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)