

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7663237号
(P7663237)

(45)発行日 令和7年4月16日(2025.4.16)

(24)登録日 令和7年4月8日(2025.4.8)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	38/10 (2006.01)	A 6 1 K	38/10 Z N A
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00 H
A 6 1 K	31/4745(2006.01)	A 6 1 K	31/4745
請求項の数 22 (全49頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-540174(P2021-540174)	(73)特許権者	305023366
(86)(22)出願日	令和2年1月13日(2020.1.13)		リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
(65)公表番号	特表2022-517226(P2022-517226 A)		オブ ミネソタ
(43)公表日	令和4年3月7日(2022.3.7)		アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 4 5 5 ,
(86)国際出願番号	PCT/US2020/013349		ミネアポリス, オーク ストリート エス
(87)国際公開番号	WO2020/150149		イー 2 0 0 , マクナマラ アラムナイ
(87)国際公開日	令和2年7月23日(2020.7.23)	(74)代理人	センター 6 0 0
審査請求日	令和4年12月22日(2022.12.22)		100078282
(31)優先権主張番号	62/792,311	(74)代理人	弁理士 山本 秀策
(32)優先日	平成31年1月14日(2019.1.14)		100113413
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	弁理士 森下 夏樹
			オーリン, マイケル
			アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 4 5 5 -
			2 0 2 0 , ミネアポリス, オーク ス
			トリート エスイー 2 0 0 , マクナマラ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がん免疫療法のためのCD200ARリガンド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

がんの治療における使用のための薬学的組成物であって、(i)薬学的に許容される担体または希釈剤と(ii)ペプチドとを含み、前記ペプチドは、P1A8(配列番号6)、P2A5(配列番号8)、P3A12(配列番号9)、またはP4A10(配列番号10)である、薬学的組成物。

【請求項2】

前記がんが、膠芽腫である、請求項1に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項3】

前記ペプチドが、P1A8(配列番号6)である、請求項1または2に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項4】

前記ペプチドが、P2A5(配列番号8)である、請求項1または2に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項5】

前記ペプチドが、P3A12(配列番号9)である、請求項1または2に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項6】

前記ペプチドが、P4A10(配列番号10)である、請求項1または2に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項 7】

哺乳動物において腫瘍溶解物ワクチンの有効性を高めることにおける使用のための組成物であって、前記組成物がペプチドを含み、前記ペプチドは、P 1 A 8（配列番号 6）、P 2 A 5（配列番号 8）、P 3 A 1 2（配列番号 9）、または P 4 A 1 0（配列番号 10）であり、前記組成物は、前記腫瘍溶解物ワクチンより前に前記哺乳動物に投与するためのものである、組成物。

【請求項 8】

前記ペプチドが、P 1 A 8（配列番号 6）である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記ペプチドが、P 2 A 5（配列番号 8）である、請求項 7 に記載の組成物。

10

【請求項 10】

前記ペプチドが、P 3 A 1 2（配列番号 9）である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記ペプチドが、P 4 A 1 0（配列番号 10）である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記組成物が、局所注射によって投与される、請求項 7～11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記腫瘍溶解物ワクチンが、皮下投与される、請求項 7～12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 14】

前記腫瘍溶解物ワクチンが、自家腫瘍溶解物ワクチンである、請求項 7～13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記組成物が、前記哺乳動物における腫瘍の外科的除去の 5～14 日経過後に投与するためのものである、請求項 7～14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記組成物が、前記哺乳動物における腫瘍の外科的除去の約 10 日経過後に投与するためのものである、請求項 7～14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 17】

イミキモドが皮膚に局所的に適用される 24 時間前に、前記組成物が、前記腫瘍溶解物ワクチンと混合されて皮内注射されるものであり、

前記腫瘍溶解物ワクチンが自家腫瘍溶解物ワクチンであり、イミキモドが 10～15 分間吸収させられる、請求項 7～13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 18】

前記組成物が、約 5 μg / kg のペプチドの投薬量で皮内注射するためのものである、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記イミキモドが、5 % (w/w) クリーム / 12.5 g の投薬量で前記皮膚に局所的に適用するためのものである、請求項 17 または 18 に記載の組成物。

40

【請求項 20】

前記自家腫瘍溶解物ワクチンが、約 500 μg のタンパク質を含む、請求項 17～19 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 21】

皮内注射及び局所適用が、3 週間にわたって毎週行われる、請求項 17～20 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 22】

皮内注射及び局所適用が、3 週間にわたって毎週、次いで 3 ヶ月間にわたって 4 週間毎に 1 回、次いで、6～8 週間毎に行われる、請求項 21 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年1月14日に出願された米国仮特許出願第62／792，311号に対する優先権を主張する。上で参照される出願の全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

がん研究の進歩にもかかわらず、多くのがんに対する十分な治療法はまだ存在しない。例えば、悪性神経膠腫は、米国で年間1万4,000人を超える患者に生じる、深刻な疾患である。神経膠腫細胞がバルク腫瘍の空洞から数センチメートル離れて移動する能力があるため、現在の標準的な治療は、わずかな改善しかもたらさず、5年生存率は30%未満である。膠芽腫患者は、獲得免疫応答不全を引き起こす全身性免疫抑制を示す。これらの不全は、T細胞増殖及び細胞障害性機能を抑制する、腫瘍によって分泌される免疫抑制因子の濃縮に起因する。免疫抑制は、膠芽腫患者における腫瘍進行に重要な役割を果たす。免疫抑制を逆転させ、効果的な免疫標的化を可能にすることができる場合、神経膠腫患者は、腫瘍進行がほとんど起こらなくなり、転帰が改善する。

10

【0003】

したがって、がんを治療するための新しい組成物及び方法が必要である。特に、腫瘍によって引き起こされる免疫学的に抑制された微小環境を逆転させる新しい組成物が必要である。

20

【発明の概要】

【0004】

本発明は、特定の実施形態において、細胞にCD200活性化受容体リガンド（CD200AR-L）を投与することによる、細胞においてPD-1を阻害する方法を提供する。特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチド模倣薬である。特定の実施形態において、ペプチド模倣薬は、1つ以上のD-異性体アミノ酸を含む。特定の実施形態において、ペプチド模倣薬は、1つ以上の非天然アミノ酸を含む。

【0005】

本発明は、特定の実施形態において、哺乳動物において腫瘍溶解物ワクチンの有効性を高める方法であって、腫瘍溶解物ワクチンの投与前に哺乳動物にCD200活性化受容体リガンド（CD200AR-L）を投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態において、腫瘍溶解物は、CD200を実質的に含まない。本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」とは、物質（例えば、腫瘍溶解物）が、未処理物質よりも少ないレベルのCD200、例えば、1～100%少ないCD200を有することを意味する。特定の実施形態において、CD200は、標準的な方法を使用した吸収によって除去される。

30

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1A】実験モデル。CD200及びPD-Lは、腫瘍細胞から分泌され、抗原提示細胞上のCD200阻害性受容体（CD200R1）またはPD-1受容体に結合し、免疫系を停止させる。CD200R1及びPD-1は両方とも、SHIPシグナル伝達分子を介して互いにクロストークし、活性化受容体シグナル伝達経路と相互作用する（図1a）。阻害性受容体に加えて、CD200チェックポイントは、刺激を受けたときにアジュバント様の特性を有する活性化受容体を有し、阻害性シグナルに打ち勝ち、免疫細胞を活性化する。

40

【図1B】実験モデル。CD200及びPD-Lは、腫瘍細胞から分泌され、抗原提示細胞上のCD200阻害性受容体（CD200R1）またはPD-1受容体に結合し、免疫系を停止させる。CD200阻害性ペプチドリガンド（CD200AR-L）を用いてCD200活性化を標的とすることで、免疫細胞上でCD200AR及びPD-1を下方制

50

御することによってCD200R1経路及びPD-L経路を征服する(図1b)。阻害性受容体に加えて、CD200チェックポイントは、刺激を受けたときにアジュバント様の特性を有する活性化受容体を有し、阻害性シグナルに打ち勝ち、免疫細胞を活性化する。

【図2A】CD200活性化受容体を標的化することによって、抗原提示細胞を刺激する。(図2A)異なるCD200ペプチドの相同性を示す、イヌCD200(アミノ酸60~178)(配列番号11)、ヒトCD200(アミノ酸33~152)(配列番号12)、及びマウスCD200(アミノ酸33~152)(配列番号13)配列。イヌP4は、配列番号11の配列147~161である。ヒトP1は、配列番号12の配列61~75であり、ヒトP2は、配列番号12の配列110~124であり、ヒトP3は、配列番号12の配列76~90であり、ヒトP4は、配列番号12の配列121~135である。マウスP1は、配列番号13の配列62~75である。

10

【図2B】健康なドナー由来のCD14⁺細胞を、ヒトペプチドP1(IVTWQKKK AVSPENM)(配列番号1)、P2(NITLED EG CYMCLFN)(配列番号2)、P3(VTFSENHG VV IQPAY)(配列番号3)またはP4(CLFNT FGFGKISGTA)(配列番号4)でパルスし、48時間インキュベートした。パルスされなかった(NP)細胞を対照として使用した。上清を採取し、IL1 β (図2B)について分析した。

【図2C】健康なドナー由来のCD14⁺細胞を、ヒトペプチドP1(IVTWQKKK AVSPENM)(配列番号1)、P2(NITLED EG CYMCLFN)(配列番号2)、P3(VTFSENHG VV IQPAY)(配列番号3)またはP4(CLFNT FGFGKISGTA)(配列番号4)でパルスし、48時間インキュベートした。パルスされなかった(NP)細胞を対照として使用した。上清を採取し、TNF α (図2C)について分析した。

20

【図2D】未成熟樹状細胞を、CMV抗原pp65 $\pm$ P1-P4でパルスした。細胞を洗浄し、CMV陽性及びCMV陰性の健康なドナー由来の自家T細胞を添加して戻し、さらに48時間インキュベートした。上清を採取し、IFN α 産生について分析した。エラーバーは、標準偏差を表す(n=3/群、t検定によると、*P<0.05、**P<0.005、***P<0.0005、二元配置ANOVAによると、*P<0.05)。データは、各群における3個体の別々の健康なドナーを表す。

【図3A】アラニン置換は、抗原提示細胞刺激を高める。(図3A)CD14⁺細胞を等モル比のペプチドでパルスし、48時間インキュベートした。上清を採取し、IFN-1 β 、IL-12p70、MIG、及びTNF α 含有量について分析した。(図3B)別々の実験において、細胞を1時間インキュベートした。RNAを採取し、免疫に関連する転写変化についてNanoSightによって分析した。パルスされた細胞を、パルスされていない(NP)対照に対して正規化し、ヒートマップを導出し、ヒートマップは、nSolver内のJava Treeviewを使用することによって生成された。調べた35個の遺伝子のクラスター解析は、NP対照と比較した場合、治療された試料の1つ以上において有意なP1A8(IVTWQKKK AVSPENM)(配列番号6)、P2A0(NITLED EG CYMCLFN)(配列番号7)、P2A5(NITLADEGC YMCLFN)(配列番号8)、P3A12(VTFSENHG VV IAPAY)(配列番号9)、及びP4A10(CLFNT FGFGAISGTA)(配列番号10)発現変化を示した。D1-P3A12は外れ値であり、解析から除外した。エラーバーは、標準偏差を表す(n=3/群、t検定によると、*P<0.05、**P<0.005、***P<0.0005、二元配置ANOVAによると、*P<0.05)。

30

40

【図3B】アラニン置換は、抗原提示細胞刺激を高める。(図3A)CD14⁺細胞を等モル比のペプチドでパルスし、48時間インキュベートした。上清を採取し、IFN-1 β 、IL-12p70、MIG、及びTNF α 含有量について分析した。(図3B)別々の実験において、細胞を1時間インキュベートした。RNAを採取し、免疫に関連する転写変化についてNanoSightによって分析した。パルスされた細胞を、パルスされていない(NP)対照に対して正規化し、ヒートマップを導出し、ヒートマップは、nS

50

olver内のJava Treeviewを使用することによって生成された。調べた35個の遺伝子のクラスター解析は、NP対照と比較した場合、治療された試料の1つ以上において有意なP1A8 (IVTWQKKAAVSPENM) (配列番号6)、P2A0 (NITLEDEGCYMCLFN) (配列番号7)、P2A5 (NITLADEGCYMCLFN) (配列番号8)、P3A12 (VTFSENHGVVIAPAY) (配列番号9)、及びP4A10 (CLFNTFGFGAISGTA) (配列番号10) 発現変化を示した。D1-P3A12は外れ値であり、解析から除外した。エラーバーは、標準偏差を表す (n=3/群、t検定によると、*P<0.05、**P<0.005、***P<0.0005、二元配置ANOVAによると、*P<0.05)。

【図4A】CD200活性化受容体を標的化することによって、樹状細胞成熟を向上させる。CD14精製細胞を、GM-CSF+IL4、または等モル比のペプチドP1A8、P2A0、もしくはP4A10でパルスし、48時間インキュベートした。細胞を採取し、CD80、CD86、及びHLA-DRについて表現型を決定した。

10

【図4B】CD200活性化受容体を標的化することによって、樹状細胞成熟を向上させる。CD14精製細胞を、GM-CSF+IL4、さらに等モル比のペプチドP1A8、P2A0、またはP4A10でパルスし、48時間インキュベートした。細胞を採取し、CD80、CD86、及びHLA-DRについて表現型を決定した。

【図4C】CMVを加えて、または加えずに、ドナー由来の未成熟樹状細胞を、ペプチドP1A8、P2A0、またはP4A10のCMV抗原pp65+/-の等モル比でパルスした。細胞を洗浄し、自家T細胞を添加して戻し、さらに48時間インキュベートした。上清をIFN γ 産生について分析した。

20

【図4D】未成熟樹状細胞を、CMV抗原pp65+/-P4A10でパルスした。細胞を洗浄した後、自家T細胞を添加して戻し、さらに48時間インキュベートした。上清をIFN γ 、IL-6、TNF α 及びRANTES含有量について分析した。エラーバーは、標準偏差を表す (n=3の健康なドナー/群、t検定によると、*P<0.05、**P<0.005、***P<0.0005)。データは、3個体の別々の健康なドナーを表す。黒色の棒グラフは、CMV陰性ドナーを表す。

【図5A】CD200阻害剤による治療は、イヌにおいて腫瘍退縮を誘発する。(図5A) 腫瘍を切除し、イヌに自家腫瘍溶解物及びイヌ特異的CD200AR-Lをワクチン接種し、無増悪生存期間 (最上部の黒色の線) 及び全生存期間 (矢印の付いた中央の線) について追跡した。比較のために、腫瘍溶解物のみで治療された過去のコホートを示す (左側の急勾配の線)。黒色矢印は、現在治験中のイヌを表す。

30

【図5B】(図5B、5C) 切除後に、(図5B) 残存する腫瘍の範囲が存在し、(図5C) 術後4ヶ月の退縮を示す。

【図5C】(図5B、5C) 切除後に、(図5B) 残存する腫瘍の範囲が存在し、(図5C) 術後4ヶ月の退縮を示す。

【図5D】(図5D、5E) 脳室周囲白質のトラクトのT2高信号域及び心室拡張を特徴とする中心性白質脳症を発症した5匹のイヌのうちの1匹からの画像 (図5D)、コルチコステロイド治療後に消失した (図5E)。

【図5E】(図5D、5E) 脳室周囲白質のトラクトのT2高信号域及び心室拡張を特徴とする中心性白質脳症を発症した5匹のイヌのうちの1匹からの画像 (図5D)、コルチコステロイド治療後に消失した (図5E)。

40

【図5F】(図5F~5I) しかしながら、このイヌは、コルチコステロイド治療の2ヶ月後に行われたMRIで見ることができる腫瘍再発を有していた。

【図5G】(図5F~5I) しかしながら、このイヌは、コルチコステロイド治療の2ヶ月後に行われたMRIで見ることができる腫瘍再発を有していた。

【図5H】(図5F~5I) しかしながら、このイヌは、コルチコステロイド治療の2ヶ月後に行われたMRIで見ることができる腫瘍再発を有していた。

【図5I】(図5F~5I) しかしながら、このイヌは、コルチコステロイド治療の2ヶ月後に行われたMRIで見ることができる腫瘍再発を有していた。

50

【図5 J】（図5 J～5 M）CD200AR-Lによるワクチン接種は、回復後にこのイヌで再開され、2回のワクチン投与から2ヶ月後に腫瘍退縮の証拠があった。

【図5 K】（図5 J～5 M）CD200AR-Lによるワクチン接種は、回復後にこのイヌで再開され、2回のワクチン投与から2ヶ月後に腫瘍退縮の証拠があった。

【図5 L】（図5 J～5 M）CD200AR-Lによるワクチン接種は、回復後にこのイヌで再開され、2回のワクチン投与から2ヶ月後に腫瘍退縮の証拠があった。

【図5 M】（図5 J～5 M）CD200AR-Lによるワクチン接種は、回復後にこのイヌで再開され、2回のワクチン投与から2ヶ月後に腫瘍退縮の証拠があった。

【図5 N】血清CD200（sCD200）レベルは、全生存期間と有意に関連していた（* $p=0.005$ ）。生存群を、傾向についてのログランク検定であるMantel-Cox、及びGehan-Breslow-Wilcoxonを使用して解析した。

10

【図6 A】CD200R1関連遺伝子は、ヒトにおけるさらに短い全生存期間と関連している。（図6 A）全生存期間に関連する遺伝子のクラスターを、The Cancer Genome Atlasデータベースで利用可能な患者の腫瘍試料において分析した。Gene Cluster Expression Summary Scoresを使用して、図中の特定されたクラスターを数字によって特定した。Kaplan-Meier分析において有意なものは、記号付きで示され、それらに関連するp値が示される。

【図6 B】CD200を含有する高レベルの遺伝子クラスターを発現した患者（破線）が、低レベルを発現した患者（実線）よりも短い全生存期間を示したことを示すKaplan-Meier（KM）プロット。比較は、3つの最下位四分位数（Q234）に対する上位四分位数（Q1）で行われる。

20

【図6 C】CD200を含有する高レベルの遺伝子クラスターを発現した患者（破線）が、低レベルを発現した患者（実線）よりも短い全生存期間を示したことを示すKaplan-Meier（KM）プロット。比較は、2つの最下位四分位数（Q34）に対する2つの上位四分位数（Q12）で行われる。

【図6 D】CD200を含有する高レベルの遺伝子クラスターを発現した患者（破線）が、低レベルを発現した患者（実線）よりも短い全生存期間を示したことを示すKaplan-Meier（KM）プロット。比較は、最下位四分位数（Q4）に対する3つの上位四分位数（Q123）で行われる。

【図6 E】CD200関連遺伝子が生存率に関連しているかどうかを示す表を提供し、GCESSを使用して、TCGAデータセット内の患者腫瘍試料の遺伝子発現プロファイルを分析した。これにより、データセット全体にわたって一貫して発現され、偏りのない統計分析において全生存期間に関連する遺伝子クラスターを特定することができた。CD200R1発現は、免疫関連転写物を高度に濃縮した遺伝子の大きなクラスター内で見出された。このクラスター内の遺伝子の転写レベルの増加は、生存率の減少と有意に関連していた。高レベルのCD200R1含有クラスターを発現した患者（クラスター14）は、低レベルのクラスターを発現した患者よりも短い全生存時間を示した。これらの結果は、免疫抑制性腫瘍微小環境の媒介におけるCD200/CD200R1相互作用の決定的な重要性を示唆する。

30

【図7 A】CD200AR-Lパルスは、阻害性CD200R1を下方制御する。マウスCD11b細胞をmCD200AR-Lでパルスし、RNAを抽出し、CD200R1またはPD-1発現について分析した（図7 A及びB）。図7の実験は、CD200R1とPD-1のクロストーク、ならびに阻害性CD200R1及びPD-1経路が、CD200AR4と相互接続することを確認する、マウス及びヒト抗原提示細胞の両方においてCD200ARが阻害剤CD200R1及びPD-1を下方制御することを標的とすることを実証した。エラーバーは、標準偏差を表す（ $n=3$ /群、t検定によると、* $P<0.05$ 、** $P<0.005$ 、*** $P<0.0005$ 、**** $P<0.00005$ ）。

40

【図7 B】CD200AR-Lパルスは、阻害性CD200R1を下方制御する。マウスCD11b細胞をmCD200AR-Lでパルスし、RNAを抽出し、CD200R1またはPD-1発現について分析した（図7 A及びB）。図7の実験は、CD200R1と

50

PD-1のクロストーク、ならびに阻害性CD200R1及びPD-1経路が、CD200AR4と相互接続することを検証する、マウス及びヒト抗原提示細胞の両方においてCD200ARが阻害剤CD200R1及びPD-1を下方制御することを標的とすることを実証した。エラーバーは、標準偏差を表す（ $n=3$ ／群、 t 検定によると、 $*P<0.05$ 、 $**P<0.005$ 、 $***P<0.0005$ 、 $****P<0.00005$ ）。

【図7C】これらの研究をさらに進めるために、CD11b細胞をOVA+／-CD200AR-Lで刺激し、細胞を洗浄し、精製されたT細胞を添加した。24時間インキュベートした後、T細胞を単離し、CD200R1またはPD-1発現について分析した（図7C及びD）。図7の実験は、CD200R1とPD-1のクロストーク、ならびに阻害性CD200R1及びPD-1経路が、CD200AR4と相互接続することを検証する、マウス及びヒト抗原提示細胞の両方においてCD200ARが阻害剤CD200R1及びPD-1を下方制御することを標的とすることを実証した。エラーバーは、標準偏差を表す（ $n=3$ ／群、 t 検定によると、 $*P<0.05$ 、 $**P<0.005$ 、 $***P<0.0005$ 、 $****P<0.00005$ ）。

10

【図7D】これらの研究をさらに進めるために、CD11b細胞をOVA+／-CD200AR-Lで刺激し、細胞を洗浄し、精製されたT細胞を添加した。24時間インキュベートした後、T細胞を単離し、CD200R1またはPD-1発現について分析した（図7C及びD）。図7の実験は、CD200R1とPD-1のクロストーク、ならびに阻害性CD200R1及びPD-1経路が、CD200AR4と相互接続することを検証する、マウス及びヒト抗原提示細胞の両方においてCD200ARが阻害剤CD200R1及びPD-1を下方制御することを標的とすることを実証した。エラーバーは、標準偏差を表す（ $n=3$ ／群、 t 検定によると、 $*P<0.05$ 、 $**P<0.005$ 、 $***P<0.0005$ 、 $****P<0.00005$ ）。

20

【図7E】これらの実験をヒトに転換したかどうかを確認するために、CD14細胞を本願発明者らのヒトCD200AR-Lでパルスした。24時間インキュベートした後、細胞を抗CD200R1で染色し、フローサイトメトリーによって分析した（図7E）。図7の実験は、CD200R1とPD-1のクロストーク、ならびに阻害性CD200R1及びPD-1経路が、CD200AR4と相互接続することを検証する、マウス及びヒト抗原提示細胞の両方においてCD200ARが阻害剤CD200R1及びPD-1を下方制御することを標的とすることを実証した。エラーバーは、標準偏差を表す（ $n=3$ ／群、 t 検定によると、 $*P<0.05$ 、 $**P<0.005$ 、 $***P<0.0005$ 、 $****P<0.00005$ ）。

30

【図7F】平均蛍光強度をCD200R1発現について分析した。図7の実験は、CD200R1とPD-1のクロストーク、ならびに阻害性CD200R1及びPD-1経路が、CD200AR4と相互接続することを検証する、マウス及びヒト抗原提示細胞の両方においてCD200ARが阻害剤CD200R1及びPD-1を下方制御することを標的とすることを実証した。エラーバーは、標準偏差を表す（ $n=3$ ／群、 t 検定によると、 $*P<0.05$ 、 $**P<0.005$ 、 $***P<0.0005$ 、 $****P<0.00005$ ）。

【図7G】平均蛍光強度をPD-1発現について分析した。図7の実験は、CD200R1とPD-1のクロストーク、ならびに阻害性CD200R1及びPD-1経路が、CD200AR4と相互接続することを検証する、マウス及びヒト抗原提示細胞の両方においてCD200ARが阻害剤CD200R1及びPD-1を下方制御することを標的とすることを実証した。エラーバーは、標準偏差を表す（ $n=3$ ／群、 t 検定によると、 $*P<0.05$ 、 $**P<0.005$ 、 $***P<0.0005$ 、 $****P<0.00005$ ）。

40

【図8】CD200AR-Lパルスは、抑制性PD-L1を征服する。マウスCD11b細胞をPMAで活性化し、PD-L1またはPD-L1+マウスCD200AR-Lで治療した。48時間後、上清を採取し、TNF α （図8A）、IL4（図8B）、またはIL5（図8C）について分析した。これらの実験は、CD200AR-Lで細胞をパルス

50

することが、PD-L1の抑制特性を征服することを示した。

【図9】ワクチンスケジュール。0日目に外科的デバルキング及び術後MRIを実施した。CD200阻害剤の皮内(ID)注射、次いで、6～24時間後にイミキモド適用、及び腫瘍溶解物ワクチン+CD200阻害剤の混合物のID注射(下向きの実線矢印)を10日目に開始し、3週間にわたって毎週、次いで3ヶ月間にわたって4週間毎に1回、次いで、1年間、または腫瘍再発または死亡まで、8週間毎に繰り返した。術後直ちに脳のMRI(上向きの破線矢印)を行い、その後4ヶ月毎に行った。

【図10】実験モデル。

【図11A】CD200活性化受容体を標的化することは、抑制性PD-L1の効果を阻害する。マウス脾細胞をPMA、+/-PD-L1またはPD-L1+mCD200AR-Lで活性化した。48時間インキュベートした後、上清をTNF α について分析した。エラーバーは、n=3の代表であり、*P<0.005。

10

【図11B】CD200活性化受容体を標的化することは、抑制性PD-L1の効果を阻害する。マウス脾細胞をPMA、+/-PD-L1またはPD-L1+mCD200AR-Lで活性化した。48時間インキュベートした後、上清をIL-4について分析した。エラーバーは、n=3の代表であり、*P<0.005。

【図11C】CD200活性化受容体を標的化することは、抑制性PD-L1の効果を阻害する。マウス脾細胞をPMA、+/-PD-L1またはPD-L1+mCD200AR-Lで活性化した。48時間インキュベートした後、上清をIL-5について分析した。エラーバーは、n=3の代表であり、*P<0.005。

20

【図12A】PD-L1の効果は、CD200R1をノックアウトすることによって阻害される。野生型またはCD200R1KOマクロファージをPD-L1でパルスし、pSHPについて分析した。

【図12B】PD-L1の効果は、CD200R1をノックアウトすることによって阻害される。CD200R1KO細胞の野生型をLPS +/- PD-L1でパルスした。エラーバーは、n=3の代表であり、t検定によると、**P<0.001。

【図13A】CD200活性化受容体を標的とすることで、CD200R1及びPD-1の発現を下方制御する。マウスCD11b細胞をCD200AR-Lでパルスし、CD200R1の転写レベルについて分析した。エラーバーは、n=3の代表であり、*P<0.005、**P<0.0001、及び***P<0.00001。

30

【図13B】CD200活性化受容体を標的とすることで、CD200R1及びPD-1の発現を下方制御する。マウスCD11b細胞をCD200AR-Lでパルスし、PD-1の転写レベルについて分析した。エラーバーは、n=3の代表であり、*P<0.005、**P<0.0001、及び***P<0.00001。

【図13C】ヒトCD14細胞をヒトCD200AR-Lでパルスし、48時間のインキュベート後、CD200R1の発現についてフローサイトメトリーによって細胞を分析した。エラーバーは、n=3の代表であり、*P<0.005、**P<0.0001、及び***P<0.00001。

【図13D】ヒトCD14細胞をヒトCD200AR-Lでパルスし、48時間のインキュベート後、PD-1の発現についてフローサイトメトリーによって細胞を分析した。エラーバーは、n=3の代表であり、*P<0.005、**P<0.0001、及び***P<0.00001。

40

【図13E】野生型マウス由来のマウスCD11b細胞をOVA +/- CD200AR-Lでパルスした。細胞を洗浄し、精製されたCD3細胞をCD11b細胞に24時間かけて添加した。CD3細胞を精製し、CD200R1の転写レベルについて分析した。エラーバーは、n=3の代表であり、*P<0.005、**P<0.0001、及び***P<0.00001。

【図13F】野生型マウス由来のマウスCD11b細胞をOVA +/- CD200AR-Lでパルスした。細胞を洗浄し、精製されたCD3細胞をCD11b細胞に24時間かけて添加した。CD3細胞を精製し、PD-1の転写レベルについて分析した。エラーバー

50

は、 $n = 3$ の代表であり、 $*P < 0.005$ 、 $**P < 0.0001$ 、及び $***P < 0.00001$ 。

【図14A】CD200AR-Lは、CTLA4及びPD-L1の発現を征服する。CD200、PD-L1+/-mCD200AR-Lで脾細胞をパルス化した。細胞を、CD4⁺CTLA4⁺集団についてフローサイトメトリーによって分析した。エラーバーは、 $n = 2$ の代表であり、 $*P < 0.005$ 、 $**P < 0.0001$ 。

【図14B】CD200AR-Lは、CTLA4及びPD-L1の発現を征服する。CD200、PD-L1+/-mCD200AR-Lで脾細胞をパルス化した。細胞を、CD8⁺CTLA4⁺集団についてフローサイトメトリーによって分析した。エラーバーは、 $n = 2$ の代表であり、 $*P < 0.005$ 、 $**P < 0.0001$ 。

【図14C】CD200AR-Lは、CTLA4及びPD-L1の発現を征服する。CD200、PD-L1+/-mCD200AR-Lで脾細胞をパルス化した。細胞を、CD11b⁺PD-L1⁺集団についてフローサイトメトリーによって分析した。エラーバーは、 $n = 2$ の代表であり、 $*P < 0.005$ 、 $**P < 0.0001$ 。

【発明を実施するための形態】

【0007】

過去10年間にわたるがん免疫療法の前例のない成功は、免疫監視の概念の直接的な結果であり、以前は予後が悪かった悪性腫瘍の臨床管理に革命をもたらした。免疫療法開発の最前線にあるのは、免疫チェックポイント阻害剤であり、多くの組織学的腫瘍型にわたるそれらの広範な生物活性、それらの応答の耐久性、及び転移性疾患及び化学耐性疾患でさえ観察された治癒の結果として、がん療法において膨大で他に類を見ない成功がみられた。

【0008】

免疫チェックポイント遮断戦略の中で、（これまでの臨床的成功の点で）最も顕著な2つは、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）を標的とすること、ならびにプログラム細胞死1（PD-1）とプログラム細胞死リガンド1（PD-L1）との間の相互作用である。しかしながら、腫瘍が免疫応答を阻害するために利用する複数の機構に起因して、単剤療法の使用は妨げられている。このことは、変異負荷が低く、及び／または免疫原性が低い腫瘍が、この形態の療法に本質的に耐性であり得るため、神経膠腫などの高悪性度（HGG）及び低悪性度（LGG）の両方の悪性脳腫瘍に特に当てはまる。好ましい腫瘍型であっても、腫瘍の多様性が免疫療法を妨げる。これは、免疫チェックポイント阻害剤によって標的化される一連の活性化分子及び阻害分子における冗長性に関連し得る。したがって、生存率を著しく向上させる複数の阻害剤が用いられてきた。残念ながら、これらの療法は、しばしば死亡を含む重大な免疫関連有害事象を引き起こす。したがって、複数のチェックポイントを標的とする代替的アプローチは、必須である。

【0009】

現在、研究は、PD-1、PD-L1及びCTLA4に対する単一阻害剤に焦点を当てたものである。本願発明者らは、CD200チェックポイントを標的とすることで、CD200、PD-1及びCTLA4チェックポイントの抑制特性を征服することを発見した。CD200阻害剤は、固形腫瘍に対する免疫療法のための有効かつ安全なチェックポイント阻害剤である。

【0010】

本発明は、特定の実施形態において、細胞にCD200活性化受容体リガンド（CD200AR-L）を投与することによる、細胞においてPD-1を阻害する方法を提供する。特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチド模倣薬である。特定の実施形態において、ペプチド模倣薬は、1つ以上のD-異性体アミノ酸を含む。特定の実施形態において、ペプチド模倣薬は、1つ以上の非天然アミノ酸を含む。

【0011】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、イヌ特異的ペプチド（cCD200AR-L）である。

10

20

30

40

50

【0012】

特定の実施形態において、細胞は、がん細胞である。

【0013】

特定の実施形態において、がん細胞は、膠芽腫細胞である。

【0014】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチドP1A8、P2A0、P2A5、P3A12、またはP4A10である。

【0015】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチドヒトP1A8である。

【0016】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチドヒトP2A0である。

【0017】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチドヒトP4A10である。

【0018】

特定の実施形態において、細胞は、がん細胞である。

【0019】

特定の実施形態において、がん細胞は、膠芽腫細胞である。

【0020】

本発明は、特定の実施形態において、哺乳動物において腫瘍溶解物ワクチンの有効性を高める方法であって、腫瘍溶解物ワクチンの投与前に哺乳動物にCD200活性化受容体リガンド（CD200AR-L）を投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態において、腫瘍溶解物は、CD200を実質的に含まない。本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」とは、物質（例えば、腫瘍溶解物）が、未処理物質よりも少ないレベルのCD200、例えば、1～100%少ないCD200を有することを意味する。特定の実施形態において、CD200は、標準的な方法を使用した吸収によって除去される。

【0021】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ヒト特異的ペプチド（hCD200AR-L）である。

【0022】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、イヌ特異的ペプチド（cCD200AR-L）である。

【0023】

特定の実施形態において、細胞は、がん細胞である。

【0024】

特定の実施形態において、がん細胞は、膠芽腫細胞である。

【0025】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチドP1A8、P2A0、P2A5、P3A12、またはP4A10である。

【0026】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチドヒトP1A8である。

【0027】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチドヒトP2A0である。

【0028】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチドヒトP4A10である。

【0029】

特定の実施形態において、細胞は、がん細胞である。

【0030】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、局所注射によって投与される。

【0031】

10

20

30

40

50

特定の実施形態において、腫瘍溶解物ワクチンは、皮下投与される。

【0032】

特定の実施形態において、腫瘍溶解物ワクチンは、自家腫瘍溶解物ワクチンである。

【0033】

特定の実施形態において、哺乳動物は、腫瘍を外科的に除去してから5～14日後にCD200AR-Lを投与される。

【0034】

特定の実施形態において、哺乳動物は、腫瘍を外科的に除去してから約10日後にCD200AR-Lを投与される。

【0035】

特定の実施形態において、(a)種特異的CD200AR-Lペプチドを皮内(ID)注射し、(b)24時間後、イミキモドを皮膚に局所的に適用し、10～15分間吸収させ、(c)CD200AR-Lと混合した自家腫瘍溶解物を皮内注射する。

【0036】

特定の実施形態において、種特異的CD200AR-Lペプチドは、約5 μ g/kgの投薬量で皮内(ID)注射される。

【0037】

特定の実施形態において、イミキモド(1パッケージ)は、5%クリーム/12.5gの投薬量で皮膚に局所的に適用される。

【0038】

特定の実施形態において、自家腫瘍溶解物の約500 μ gのタンパク質を、約5 μ g/kgのCD200AR-Lと混合し、皮内注射する。

【0039】

特定の実施形態において、治療レジメンは、3週間にわたって毎週繰り返される。

【0040】

特定の実施形態において、治療レジメンは、3週間にわたって毎週、次いで3ヶ月間にわたって4週間毎に1回、次いで、必要に応じて6～8週間毎に繰り返される。

【0041】

「哺乳動物」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト、高等非ヒト霊長類、げっ歯類、家畜、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、イヌ及びネコを指す。一実施形態において、対象は、ヒトである。一実施形態において、対象は、イヌである。

【0042】

本発明は、特定の実施形態において、薬学的に許容される担体または希釈剤と、活性成分としてCD200AR-Lと、任意選択で、異常な細胞成長、機能または挙動から生じる疾患または障害を治療するための医薬の使用またはその製造のために上で定義されるがんワクチン(例えば、腫瘍溶解物)と、を含む、薬学的組成物の使用を提供する。特定の実施形態において、疾患または障害は、がんである。特定の実施形態において、がんは、結腸、乳房、脳、肝臓、卵巣、胃、肺、及び頭頸部の固形腫瘍から選択される。特定の実施形態において、がんは、膠芽腫、黒色腫、前立腺癌、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、頭頸部癌、肝細胞癌、及び甲状腺癌から選択される。特定の実施形態において、がんは、乳房、卵巣、子宮頸部、前立腺、精巣、生殖泌尿器、食道、喉頭、膠芽腫、神経芽腫、胃、皮膚、ケラトアkantoma、肺、類表皮癌、大細胞癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞癌、肺腺癌、骨、結腸、腺腫、脾臓、腺癌、甲状腺、濾胞癌、未分化癌、乳頭癌、精巣腫、黒色腫、肉腫、膀胱癌、肝臓癌及び胆道、腎臓癌、骨髄障害、リンパ系障害、有毛細胞、口腔及び咽頭(口腔)、唇、舌、口、咽頭、小腸、結腸直腸、大腸、直腸、脳及び中枢神経系、ホジキンリンパ腫及び白血病から選択される。

【0043】

本発明は、特定の実施形態において、異常な細胞成長、機能または挙動から生じる疾患または障害を治療する方法であって、この方法が、それを必要とする患者に、順次投与されるCD200AR-Lとがんワクチン(例えば、腫瘍溶解物)とを含む治療レジメンを

10

20

30

40

50

投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態において、治療レジメンは、少なくとも2回投与される。特定の実施形態において、投与は、少なくとも3回用量の治療レジメンを投与することを含む。特定の実施形態において、投与は、少なくとも5回用量の治療レジメンを投与することを含む。特定の実施形態において、投与は、少なくとも10回用量の治療レジメンを投与することを含む。特定の実施形態において、少なくとも2回の連続した投与量の投与は、約1週間または約1ヶ月の間隔によって間がけられる。特定の実施形態において、方法は、治療レジメンの投与の前、同時に、または後に、アジュバントを投与することをさらに含む。

【0044】

特定の実施形態において、本発明は、異常な細胞成長、機能または挙動から生じる疾患または障害を有する患者において免疫抑制を逆転または調節する方法であって、この方法が、それを必要とする患者に、上述の組成物または治療レジメンを投与することを含む、方法を含む。

【0045】

特定の実施形態において、本発明は、異常な細胞成長、機能または挙動から生じる疾患または障害を有する患者において腫瘍微小環境またはセンチネルリンパ節における免疫抑制を逆転または調節する方法であって、この方法が、それを必要とする患者に、上述の組成物または治療レジメンを投与することを含む、方法を含む。特定の実施形態において、疾患または障害は、がんである。特定の実施形態において、がんは、膠芽腫、黒色腫、前立腺癌、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、頭頸部癌、肝細胞癌、及び甲状腺癌から選択される。

【0046】

特定の実施形態において、がんは、乳房、卵巣、子宮頸部、前立腺、精巣、生殖泌尿器、食道、喉頭、膠芽腫、神経芽腫、胃、皮膚、ケラトアkantoma、肺、類表皮癌、大細胞癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞癌、肺腺癌、骨、結腸、腺腫、脾臓、腺癌、甲状腺、濾胞癌、未分化癌、乳頭癌、精巣腫、黒色腫、肉腫、膀胱癌、肝臓癌及び胆道、腎臓癌、骨髄障害、リンパ系障害、有毛細胞、口腔及び咽頭（口腔）、唇、舌、口、咽頭、小腸、結腸直腸、大腸、直腸、脳及び中枢神経系、ホジキンリンパ腫及び白血病から選択される。

【0047】

特定の実施形態において、本発明は、送達することが、組成物を動物に静脈内投与することを含む、方法を提供する。

【0048】

特定の実施形態において、本発明は、組成物が全身ポンプを使用して動物に投与される、方法を提供する。

【0049】

「治療有効量」という用語は、病状／状態を治療することに関して、単回用量として、または複数回用量で投与される場合に、病状／状態の任意の症状、態様、または特徴に対して任意の検出可能な正の効果を有することができる治療薬剤の量を指す。そのような効果は、絶対的に有益である必要はない。

【0050】

「治療する」及び「治療」という用語は、治療的処置及び防止的もしくは予防的な措置の両方を指し、その目的は、望ましくない生理学的変化または障害を防止または低減することである。本発明の目的のために、有益または望ましい臨床結果としては、限定されないが、検出可能であるか検出不可能であるかにかかわらず、症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の安定化した（すなわち、悪化しない）状態、疾患進行を遅らせるか、または遅くすること、病状の改善または緩和（部分的または全体的）が挙げられる。「治療」は、治療を受けていない場合の予想生存期間と比較して、生存期間の延長も意味し得る。治療を必要としているものとしては、既に状態もしくは障害を患っているもの、状態もしくは障害を患いやすいもの、または状態もしくは障害が予防されるべきものが挙げられる。

【0051】

がんワクチン

本明細書に記載される場合、がんワクチンは、腫瘍抗原ワクチンであり得る。腫瘍抗原ワクチンは、がん細胞（例えば、腫瘍溶解物）、がん細胞の一部、または純粋な腫瘍抗原（腫瘍細胞から単離された物質）から作製されるワクチンである。腫瘍抗原ワクチンは、身体の免疫系を刺激して、がん細胞を発見し、死滅させることができる。例えば、がんワクチンは、神経膠腫瘍細胞、乳癌細胞、または他の固形腫瘍癌細胞、またはこれらの細胞の一部もしくはこれらの細胞に由来する抗原を含み得る。特定の実施形態において、がんワクチンは、ワクチン抗原を含み、ここで、培養した腫瘍細胞由来溶解物は、抗原の供給源である。

10

【0052】

ペプチド及びペプチド模倣薬

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、12～15アミノ酸長を有するペプチドである。例えば、特定の実施形態において、ペプチドは、12、13、14、または15アミノ酸長である。

【0053】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ヒトCD200AR-Lである。

P1: I V T W Q K K K A V S P E N M (配列番号1)

P2: N I T L E D E G C Y M C L F N (配列番号2)

P3: V T F S E N H G V V I Q P A Y (配列番号3)

P4: C L F N T F G F G K I S G T A (配列番号4)

20

【0054】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、イヌCD200AR-Lである。

P4: C L F N T F G S G K I S G T A (配列番号5)

【0055】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、マウスCD200AR-Lである。

P1: V T W Q K K K A V S P E N M (配列番号17)

【0056】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、天然の産物ではない、天然に存在しないペプチドである。特定の実施形態において、本明細書に記載のCD200AR-Lは、CD200のドメインに対応する天然に存在するペプチドと比較して、著しく異なる特徴（例えば、構造、機能、及び／または他の特性）を含む。ペプチドの純度は、95%を超えており、各ペプチドは、その安定性を向上させるために、N末端アセチル化及びC末端アミド化によって修飾される。

30

【0057】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチドP1A8、P2A0、P2A5、P3A12、またはP4A10。P1A8 (I V T W Q K K A A V S P E N M) (配列番号6)、P2A0 (N I T L E D E G C Y M C L F N) (配列番号7)、P2A5 (N I T L A D E G C Y M C L F N) (配列番号8)、P3A12 (V T F S E N H G V V I A P A Y) (配列番号9)、またはP4A10 (C L F N T F G F G A I S G T A) (配列番号10)である。

40

【0058】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、ペプチド模倣薬である。本明細書で使用される場合、「ペプチド模倣薬」は、ペプチドを模倣するように化学的に設計された小さなタンパク質様鎖である。特定の実施形態において、ペプチド模倣薬は、非修飾ペプチドと比較して、安定性（例えば、インビボ半減期）または生物学的活性の向上など、特定の調節された分子特性を有するように設計される。例えば、ペプチド模倣薬は、本明細書に記載のペプチドを化学修飾することによって生成され得る。化学修飾としては、限定されないが、D-異性体アミノ酸、β3アザアミノ酸、変化した骨格を含むこと、及び／または非天然アミノ酸の組み込みが挙げられる。例えば、これらの戦略は、天然（L-

50

）アミノ酸を非天然（D－）アミノ酸またはβ 3アザアミノ酸に置き換えることに基づいている。他の戦略としては、アミド結合（－CONH－）をチオアミドまたはN－メチル化アミドで置き換えることが挙げられる。他の方法は、N末端及びC末端アミノ酸をアミド、エステル、またはD－アミノ酸に変化させることを伴う。

【0059】

したがって、特定の実施形態において、CD200AR-Lは、1つ以上のD－異性体アミノ酸を含むように操作される。特定の実施形態において、CD200AR-Lは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個以上のD－異性体アミノ酸を含む。特定の実施形態において、アミノ酸の約10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%は、D－異性体アミノ酸である。

10

【0060】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、1つ以上の非天然アミノ酸（例えば、デヒドロアラニン、ホモセリン、ホスホセリン、ホスホトレオニン、ホスホチロシン、ヒドロキシプロリン、ガンマカルボキシグルタメート、馬尿酸、オクタヒドロインドール2－カルボン酸、スタチン、1，2，3，4，テトラヒドロイソキノリン－3 カルボン酸、ペニシラミン、オルニチン、シトルリン、αメチルアラニン、パラベンゾイルフェニルアラニン、フェニルグリシン、プロパルギルグリシン、サルコシン、及びtertブチルグリシン）を含むように操作される。特定の実施形態において、CD200ペプチド阻害剤は、12、13、14、または15個の非天然アミノ酸を含む。特定の実施形態において、アミノ酸の約10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%は、非天然アミノ酸である。

20

【0061】

CD200AR-Lの使用

本明細書に記載される場合、CD200AR-LまたはCD200AR-Lを含む本明細書に記載の組成物は、免疫抑制を逆転させるか、または調節するために使用され得る。CD200は、CD200Rを有する免疫細胞を負に制御する（例えば、抗原特異的CD8＋T細胞応答を抑制する）免疫抑制タンパク質である。本明細書に記載される場合、「免疫抑制を逆転または調節すること」は、CD200タンパク質及び／または腫瘍の免疫抑制特性を変化させ、妨害し、減少させることを指す。特定の実施形態において、CD200タンパク質活性は、哺乳動物において、CD200タンパク質が存在しない状態での腫瘍に対する活性と比較して、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%減少する。例えば、骨髓由来抑制細胞及び制御性T細胞などの免疫抑制細胞は、増加した活性を示し、一方で、樹状細胞（DC）は、がん患者の腫瘍及びセンチネルリンパ節において障害されているようである。したがって、特定の実施形態において、CD200AR-LまたはCD200AR-Lを含む本明細書に記載の組成物の投与により、骨髓由来抑制細胞及び制御性T細胞などの免疫抑制細胞の活性を低下させることができ、及び／または腫瘍微小環境及び／またはセンチネルリンパ節においてDCの活性を増加させることができる。特定の実施形態において、逆転または調節は、本明細書に記載のサイトカインプロファイルを評価することによって確認することができる。（例えば、サイトカインプロファイルは、CD200AR-Lの投与の前及び後に決定し、比較することができる。実施例も参照されたい。）

30

40

【0062】

本明細書で言及される場合、「腫瘍微小環境」は、腫瘍細胞を取り囲み、供給する正常な細胞、分子及び血管である。腫瘍は、その微小環境を変えることができ、微小環境は、腫瘍の成長及び拡散に影響を及ぼす可能性がある。

【0063】

本明細書に記載される場合、CD200AR-Lは、（例えば、同時に、または順次投与される場合に）がんワクチンの有効性を高め得る。例えば、特定の実施形態において、CD200AR-L及びがんワクチンは、複合製剤（すなわち、本明細書に記載の組成物）であってもよく、または順次投与または同時投与のための別々の製剤であってもよい。

50

【0064】

本明細書に記載される場合、「有効性を高める」は、がんワクチンだけを投与することによって生成される有益な免疫応答よりも大きい、CD200AR-L及びがんワクチンを投与することによって生成される有益な免疫応答を意味する。特定の実施形態において、CD200AR-L及びがんワクチン（例えば、本明細書に記載の組成物）の投与によって、哺乳動物において、腫瘍のサイズ（体積）が1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%減少し、この減少は、がんワクチン単独の投与からの減少よりも大きい。特定の実施形態において、CD200AR-L及びがんワクチンの投与（例えば、同時投与または逐次投与）によって、相乗効果をもたらす。

10

【0065】

薬学的組成物

本発明はまた、特定の実施形態において、薬学的に許容される担体または希釈剤と、活性成分として、本明細書に記載の組成物と、を含む、薬学的組成物を提供する。特定の実施形態において、組成物は、経口投与または注射のために製剤化される。

【0066】

本発明はまた、特定の実施形態において、治療によるヒトまたは動物の身体の治療方法で使用するための本明細書に記載の組成物も提供する。

【0067】

本発明はまた、特定の実施形態において、医薬療法で使用するための本明細書に記載の組成物も提供する。

20

【0068】

本発明はまた、特定の実施形態において、異常な細胞成長、機能または挙動から生じる疾患または障害の治療において使用するための本明細書に記載の組成物を提供する。

【0069】

本発明はまた、特定の実施形態において、異常な細胞成長、機能または挙動から生じる疾患または障害を治療するための医薬の製造における本明細書に記載の組成物の使用を提供する。特定の実施形態において、疾患または障害は、がんである。特定の実施形態において、がんは、結腸、乳房、脳、肝臓、卵巣、胃、肺、及び頭頸部の固形腫瘍から選択される。特定の実施形態において、がんは、膠芽腫、黒色腫、前立腺癌、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、頭頸部癌、肝細胞癌、及び甲状腺癌から選択される。特定の実施形態において、がんは、乳房、卵巣、子宮頸部、前立腺、精巣、生殖泌尿器、食道、喉頭、膠芽腫、神経芽腫、胃、皮膚、ケラトアkantoma、肺、類表皮癌、大細胞癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞癌、肺腺癌、骨、結腸、腺腫、膵臓、腺癌、甲状腺、濾胞癌、未分化癌、乳頭癌、精巣腫、黒色腫、肉腫、膀胱癌、肝臓癌及び胆道、腎臓癌、骨髄障害、リンパ系障害、有毛細胞、口腔及び咽頭（口腔）、唇、舌、口、咽頭、小腸、結腸直腸、大腸、直腸、脳及び中枢神経系、ホジキンリンパ腫及び白血病から選択される。

30

【0070】

本発明はまた、特定の実施形態において、異常な細胞成長、機能または挙動から生じる疾患または障害を治療する方法であって、この方法が、それを必要とする患者に、本明細書に記載の組成物を投与することを含む、方法も提供する。特定の実施形態において、疾患または障害は、がんである。特定の実施形態において、がんは、膠芽腫、黒色腫、前立腺癌、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、頭頸部癌、肝細胞癌、及び甲状腺癌から選択される。特定の実施形態において、がんは、乳房、卵巣、子宮頸部、前立腺、精巣、生殖泌尿器、食道、喉頭、膠芽腫、神経芽腫、胃、皮膚、ケラトアkantoma、肺、類表皮癌、大細胞癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞癌、肺腺癌、骨、結腸、腺腫、膵臓、腺癌、甲状腺、濾胞癌、未分化癌、乳頭癌、精巣腫、黒色腫、肉腫、膀胱癌、肝臓癌及び胆道、腎臓癌、骨髄障害、リンパ系障害、有毛細胞、口腔及び咽頭（口腔）、唇、舌、口、咽頭、小腸、結腸直腸、大腸、直腸、脳及び中枢神経系、ホジキンリンパ腫及び白血病から選択される。

40

50

【0071】

本発明はまた、特定の実施形態において、本明細書に記載の組成物と薬学的に許容される担体とを組み合わせることを含む、薬学的組成物を製造するためのプロセスも提供する。

【0072】

本発明はまた、特定の実施形態において、がんを治療するためのキットであって、(a) 本明細書に記載の組成物を含む第1の薬学的組成物と、(b) 使用説明書とを含む、キットも提供する。

【0073】

本発明は、上述のCD200AR-Lペプチドをコードする核酸配列をさらに提供する。CD200AR-Lペプチドをコードする核酸は、当該技術分野において周知の方法を使用して製造することができる(例えば、Sambrook and Russell, 2001を参照されたい)。

【0074】

対象に免疫を付与するために、組成物は、通常、適切なビヒクル中の筋肉内注射または皮下注射によって、経口投与される。しかしながら、経口、鼻腔内、または皮内送達などの他の投与様式も許容される。

【0075】

ワクチン製剤は、有効量の活性成分をビヒクル中に含有し、有効量は、当業者によって容易に決定される。活性成分は、典型的には、組成物の約1%~約95%(w/w)、または適切な場合、さらに高いまたは低い範囲であり得る。投与される量は、ワクチン接種を検討される動物またはヒト対象の年齢、体重及び健康状態などの要因に依存する。この量はまた、動物の免疫系が抗体を合成する能力、及び所望な保護の程度に依存する。有効投薬量は、用量応答曲線を確立する日常的な試験を介して、当業者によって容易に確立され得る。対象は、バイオフィルムペプチドまたはその断片を1つ以上の用量で投与することによって免疫化される。目的の細菌に対する免疫状態を維持するために必要に応じて、複数の用量を投与することができる。

【0076】

鼻腔内製剤としては、鼻粘膜に刺激を引き起こさず、線毛機能を著しく障害しないビヒクルが含まれ得る。水、生理食塩水、または他の既知の物質などの希釈剤は、本発明とともに用いられ得る。経鼻製剤はまた、保存剤(限定されないが、クロロブタノール及び塩化ベンザルコニウムなど)を含有してもよい。界面活性剤は、鼻粘膜による対象タンパク質の吸収を高めるために存在し得る。経口液体調製物は、例えば、水性もしくは油性懸濁液、溶液、乳剤、シロップ剤もしくはエリキシル剤の形態であってもよく、または使用前に水もしくは他の適切なビヒクルで再構成するための錠剤の形態もしくは製品で乾燥状態で提示されてもよい。そのような液体調製物は、懸濁化剤、乳化剤、非水性ビヒクル(食用油を含み得る)、または保存剤などの従来の添加剤を含み得る。

【0077】

ワクチンを調製するために、精製された組成物を単離し、凍結乾燥し、安定化することができる。次いで、組成物を適切な濃度に調整し、任意選択で、適切なワクチンアジュバントと組み合わせ、使用のために包装してもよい。

【0078】

アジュバント

「アジュバント」は、体液及び／または細胞の免疫応答を非特異的に刺激する任意の分子または化合物である。これらは、抗原の存在下でのみ免疫応答を産生するため、非特異的であると考えられる。アジュバントは、かなり少ない用量の抗原を使用することを可能にし、可溶性抗原に対する強力な抗体応答を誘導するために不可欠である。例えば、治療薬剤がアジュバントと併せて投与される場合、治療薬剤は、アジュバントの前、後、及び／または同時に投与され得る。アジュバントは、当該技術分野において知られており、限定されないが、CpGオリゴヌクレオチド、ポリ：I:C:L:C、及びイミキモドが挙げられ得る。

【0079】

腫瘍溶解物を作製するための方法

腫瘍溶解物は、治療される腫瘍の試料を対象から抽出することによって作製される。次いで、腫瘍細胞を溶解させる。有効な腫瘍溶解物を作製する方法としては、限定されないが、凍結解凍法、超音波処理、マイクロ波、沸騰、高熱、洗剤または化学系細胞溶解、電気または電流に基づく溶解、ならびに極限力などの他の物理的方法が挙げられる。

【0080】

特定の実施形態において、例えば、神経膠腫が治療される場合、神経膠腫特異的受容体（またはこれらのタンパク質をコードする発現ベクター）であるEGF受容体VIEIバリアント及びIL-13受容体 α -2を、腫瘍溶解物に添加してもよい。

10

【0081】

製剤及び投与方法

本発明のワクチン及び組成物は、薬学的組成物として製剤化され、選択された投与経路、すなわち、経口、鼻腔内、皮内、または非経口、静脈内、筋肉内、局所、または皮下経路によって適合される様々な形態で、ヒト患者などの哺乳動物宿主に投与され得る。

【0082】

したがって、本発明の化合物は、例えば、不活性希釈剤または同化可能な食用担体などの薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせて、全身（例えば、経口）投与され得る。それらは、硬質または軟質のシェルゼラチンカプセルに封入され得るか、錠剤に圧縮され得るか、または患者の食事の食物に直接組み込まれ得る。治療的経口投与のために、活性化化合物は、1つ以上の賦形剤と組み合わせられ、摂取可能な錠剤、口腔錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ剤、ウエハなどの形態で使用され得る。かかる組成物及び調製物は、少なくとも0.1%の活性化化合物を含有しなければならない。組成物及び調製物の割合は、もちろん変化してもよく、簡便には、所与の単位剤形の重量の約2〜約60%であってもよい。そのような治療上有用な組成物中の活性化化合物の量は、有効な投与量レベルが得られるような量である。

20

【0083】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセルなどはまた、以下のものを含有してもよい。結合剤、例えば、トラガカントガム、アカシア、トウモロコシデンプン、もしくはゼラチン、賦形剤、例えば、リン酸二カルシウム、崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸など、滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、及び甘味剤、例えば、スクロース、フルクトース、ラクトース、もしくはアスパルテーム、または香味剤、例えば、ペパーミント、ウィンターグリーン油、もしくはチェリー香味料を添加してもよい。単位剤形がカプセルである場合、上記の種類の材料に加えて、植物油またはポリエチレングリコールなどの液体担体を含み得る。コーティングとして、または固体単位剤形の物理的形態を変更するために、様々な他の材料が存在し得る。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセルは、ゼラチン、ワックス、シェラック、または糖などでコーティングされ得る。シロップまたはエリキシル剤は、活性化化合物、甘味剤としてのスクロースまたはフルクトース、保存剤としてのメチル及びプロピルパラベン、色素、ならびにチェリーまたはオレンジ風味などの香味剤を含有し得る。もちろん、任意の単位剤形の調製に使用される任意の材料は、薬学的に許容され、使用される量では実質的に非毒性であるべきである。加えて、活性化化合物は、徐放性調製物及びデバイスに組み込まれ得る。

30

【0084】

活性化化合物はまた、注入または注射によって静脈内投与または腹腔内投与され得る。活性化化合物またはその塩の溶液は、任意選択で非毒性の界面活性剤と混合された水中で調製されてもよい。分散剤が、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、及びそれらの混合物の中で、また、油の中で調製される場合もある。通常の保管及び使用条件下で、これらの調製物は、微生物の成長を阻止するための保存剤を含有する。

40

【0085】

注射または注入に適した薬学的剤形は、滅菌水溶液または分散液、または任意選択でリ

50

ポソームに封入された、滅菌注射液もしくは注入液もしくは分散液の即時調製に適した活性成分を含む滅菌粉末を含み得る。全ての場合において、最終的な剤形は、製造及び保存条件下で滅菌され、流体であり、かつ安定でなければならない。液体担体またはビヒクルは、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、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステル、及びそれらの好適な混合物を含む溶媒または液体分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、リポソームの形成によって、分散液の場合は必要な粒径を維持することによって、または界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物の作用の予防は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどの種々の抗菌剤及び抗真菌剤によってもたらすことができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、緩衝液、または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中で使用することによってもたらされ得る。

【0086】

滅菌の注射可能な溶液は、必要に応じて、上に列挙される種々の他の成分とともに、適切な溶媒に、必要とされる量の活性化化合物を組み込み、その後で濾過滅菌することによって調製される。滅菌の注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥及び凍結乾燥技術であり、予め滅菌濾過した溶液中に存在する活性成分及び任意の追加の所望の成分の粉末を得る。局所投与のために、本発明の化合物は、純粋な形態で適用され得る（すなわち、それらが液体である場合に）。しかしながら、それらを組成物または製剤として、固体または液体であり得る皮膚科的に許容される担体と組み合わせて皮膚に投与することが一般的に望ましい。

【0087】

有用な固体担体としては、タルク、粘土、微結晶セルロース、シリカ、アルミナなどの細かく分割された固体が挙げられる。有用な液体担体としては、水、アルコールもしくはグリコール、または水-アルコール／グリコールブレンドが挙げられ、ここで、本発明の化合物は、任意選択で非毒性界面活性剤で補助することにより、有効なレベルで溶解または分散することができる。香料または抗菌剤などの追加の成分を添加して、所与の使用のための特性を最適化することができる。得られる液体組成物は、吸収性パッドから塗布することができ、包帯及び他の創傷被覆材を含浸させるために使用することができ、またはポンプ式またはエア路ゾルスプレーを使用して患部にスプレーすることができる。

【0088】

合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩及びエステル、脂肪族アルコール、修飾セルロース、または修飾鉱物材料などの増粘剤も、液体担体とともに用いて、使用者の皮膚に直接適用するための、拡散可能なペースト、ゲル、軟膏、石鹸などを形成することができる。

【0089】

本発明の化合物を皮膚に送達するために使用することができる有用な皮膚学的組成物の例は、当技術分野に既知であり、例えば、J a c q u e t e t a l .（米国特許第4,608,392号）、G e r i a（米国特許第4,992,478号）、S m i t h e t a l .（米国特許第4,559,157号）及びW o r t z m a n（米国特許第4,820,508号）を参照されたい。

【0090】

本発明の化合物の有用な投薬量は、動物モデルにおけるそれらのインビトロ活性及びインビボ活性を比較することによって決定することができる。マウス及び他の動物における有効投薬量のヒトへの外挿方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、米国特許第4,938,949号を参照されたい。

【0091】

一般に、ローションなどの液体組成物中の本発明の化合物（複数可）の濃度は、約0.1～25重量%、好ましくは約0.5～10重量%である。ゲルまたは粉末などの半固体または固体の組成物中の濃度は、約0.1～5重量%、好ましくは約0.5～2.5重量

10

20

30

40

50

%である。

【0092】

治療における使用に必要な化合物、またはその活性塩もしくは誘導体の量は、選択される特定の塩だけでなく、投与経路、治療される状態の性質、ならびに患者の年齢及び状態によっても変化し、最終的には、担当医師または臨床医の裁量である。

【0093】

しかしながら、一般に、好適な用量は、1日当たり約0.5～約100mg/kgの範囲内、例えば、1日当たり約10～約75mg/kg、例えば、1日当たりレシピエントの体重1kg当たり3～約50mg、好ましくは6～90mg/kg/日の範囲内、最も好ましくは15～60mg/kg/日の範囲内にある。

【0094】

化合物は、簡便には単位剤形で投与され、例えば、単位剤形当たり5～1000mg、簡便には10～750mg、最も簡便には50～500mgの活性成分を含有する。

【0095】

理想的には、活性成分は、約0.5～約75μM、好ましくは約1～50μM、最も好ましくは約2～約30μMの活性化合物のピーク血漿濃度を達成するように投与されるべきである。これは、例えば、0.05～5%の活性成分の溶液（任意選択で生理食塩水の溶液）を静脈内注射するか、または約1～100mgの活性成分を含有するボラスとして経口投与することによって達成され得る。望ましい血中レベルは、約0.01～5.0mg/kg/時間を提供するような連続注入によって、または約0.4～15mg/kgの活性成分（複数可）を含有する断続的な注入によって維持され得る。

【0096】

所望の用量は、簡便には、単回用量で、または適切な間隔、例えば、1日当たり2回、3回、4回、またはそれ以上の用量未満の用量として投与される分割用量として提示され得る。用量未満の用量自体を、例えば、複数の個別の緩い間隔の投与、例えば、吸入器からの複数回の吸入、または複数の液滴を眼に塗布することによって、さらに分割してもよい。

【0097】

特定の実施形態において、本発明のワクチンは、対象における腫瘍のサイズを少なくとも約10%～100%（腫瘍の体積）減少させる。

【0098】

定義

「結合した」とは、例えば、化学的に結合することによって共有結合性であり得るか、または非共有結合性（例えば、イオン性相互作用、疎水性相互作用、水素結合）であり得る結合または接続を指す。共有結合は、例えば、エステル、エーテル、ホスホエステル、アミド、ペプチド、イミド、炭素-硫黄結合、炭素-リン結合などであり得る。「結合した」という用語は、「共役した」、「カップリングした」、「融合した」及び「接続した」などの用語よりも広く、これらを含む。

【0099】

本発明は、単離されたか、または実質的に精製されたタンパク質（またはペプチド）組成物を包含する。本発明の文脈において、「単離された」か、または「精製された」ポリペプチドは、その天然環境とは別に存在し、したがって、天然の産物ではないポリペプチドである。ポリペプチドは、精製された形態で存在していてもよく、または例えば、トランスジェニック宿主細胞などの非天然環境に存在していてもよい。例えば、「単離された」もしくは「精製された」タンパク質、またはその生物学的に活性な部分は、組換え技法によって産生される場合、他の細胞物質もしくは培養培地を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。細胞物質を実質的に含まないタンパク質としては、汚染タンパク質を約30%、20%、10%、5%（乾燥重量で）未満含むタンパク質またはポリペプチドの調製物が挙げられる。本発明のタンパク質、またはその生物学的に活性な部分が、組換えによって産生される場合

10

20

30

40

50

、好ましくは、培養培地は、目的の化学物質の化学前駆体または非タンパク質の約30%、20%、10%、5%（乾燥重量で）未満を表す。開示されるタンパク質またはそれによってコードされる部分長タンパク質の断片及びバリエーションもまた、本発明によって包含される。「断片」または「部分」とは、ポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列の全長または全長未満を意味する。

【0100】

「天然に存在する」とは、自然界に見出すことができる物体を、人為的に生じるものとは異なるものとして説明するために用いられる。例えば、天然の供給源から単離することができ、実験室で人間によって意図的に改変されていない、生物体（ウイルスを含む）内に存在するタンパク質またはヌクレオチド配列は、天然に存在する。

10

【0101】

ペプチドの文脈における「実質的同一性」という用語は、ペプチドが、特定の比較ウィンドウにわたって、参照配列に対して少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、または79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または89%、少なくとも90%、91%、92%、93%、または94%、または95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する配列を含むことを示す。最適アラインメントは、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズムを使用して実施される。2つのペプチド配列が実質的に同一であることの指標は、1つのペプチドが、第2のペプチドに対して産生された抗体と免疫学的に反応性であることである。したがって、ペプチドは、例えば、2つのペプチドが保存的置換のみによって異なる場合、第2のペプチドと実質的に同一である。

20

【0102】

配列比較のために、典型的には、1つの配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて、配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づき、参照配列に対する試験配列（複数可）のパーセント配列同一性を計算する。

【0103】

「アミノ酸」という用語には、D形態またはL形態の天然アミノ酸（例えば、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Hyl、Hyp、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、及びVal）の残基、ならびに非天然アミノ酸（例えば、デヒドロアラニン、ホモセリン、ホスホセリン、ホスホトレオニン、ホスホチロシン、ヒドロキシプロリン、γカルボキシグルタメート、馬尿酸、オクタヒドロインドール 2-カルボン酸、スタチン、1, 2, 3, 4 テトラヒドロイソキノリン-3 カルボン酸、ペニシラミン、オルニチン、シトルリン、αメチルアラニン、パラベンゾイルフェニルアラニン、フェニルグリシン、プロパルギルグリシン、サルコシン、及びtertブチルグリシン）が含まれる。この用語はまた、従来のアミノ酸保護基（例えば、アセチルまたはベンジルオキシカルボニル）を有する天然及び非天然アミノ酸、ならびにカルボキシ末端で保護される天然及び非天然アミノ酸（例えば、(C1-C6)アルキル、フェニルまたはベンジルエステルまたはアミドとして、またはα-メチルベンジルアミドとして）を含む。他の好適なアミノ保護基及びカルボキシ保護基は、当業者に既知である（例えば、T. W. Greene, Protecting Groups In Organic Synthesis, Wiley: New York, 1981、及びその中で引用される参考文献を参照されたい）。この用語はまた、シクロプロピル側鎖またはエチル側鎖を有する天然及び非天然のアミノ酸を含む。

30

40

【0104】

本発明は、単離されたか、または実質的に精製されたタンパク質組成物を包含する。本発明の文脈において、「単離された」か、または「精製された」ポリペプチドは、その天

50

然環境とは別に存在するポリペプチドである。「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に使用される。単離されたタンパク質分子は、精製された形態で存在していてもよく、または例えば、トランスジェニック宿主細胞またはバクテリオファージなどの非天然環境に存在していてもよい。例えば、「単離された」もしくは「精製された」タンパク質、またはその生物学的に活性な部分は、組換え技法によって産生される場合、他の細胞物質もしくは培養培地を実質的に含まない場合があり、または化学的に合成される場合、化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない場合がある。細胞物質を実質的に含まないタンパク質としては、汚染タンパク質を約30%、20%、10%、5%（乾燥重量で）未満含むタンパク質またはポリペプチドの調製物が挙げられる。特定の実施形態において、「単離された」か、または「精製された」タンパク質は、細胞溶解物を含み得る。本発明のタンパク質、またはその生物学的に活性な部分が、組換えによって産生される場合、好ましくは、培養培地は、目的の化学物質の化学前駆体または非タンパク質の約30%、20%、10%、または5%（乾燥重量で）未満を表す。開示されるタンパク質またはそれによってコードされる部分長タンパク質の断片及びバリエーションもまた、本発明によって包含される。「断片」または「部分」とは、タンパク質のアミノ酸配列の全長または全長未満を意味する。

【0105】

「バリエーション」ポリペプチドは、天然タンパク質のN末端及び／またはC末端への1つ以上のアミノ酸の欠失（いわゆるトランケーション）または付加、天然タンパク質中の1つ以上の部位における1つ以上のアミノ酸の欠失または付加、あるいは天然タンパク質中の1つ以上の部位における1つ以上のアミノ酸の置換による、天然タンパク質に由来するポリペプチドを意図する。かかるバリエーションは、例えば、遺伝子多型を形成し得るか、または人間による操作から生じ得る。かかる操作のための方法は、一般に、当該技術分野において知られている。

【0106】

したがって、本発明のポリペプチドは、アミノ酸の置換、欠失、トランケーション、及び挿入を含む様々な様式で変化し得る。かかる操作のための方法は、一般に、当該技術分野において知られている。例えば、ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションは、DNAにおける変異によって調製され得る。変異誘発及びヌクレオチド配列改変のための方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1985)、Kunkel et al., Meth. Enzymol., 154:367 (1987)、米国特許第4,873,192号、Walker and Gaastra, Techniques in Mol. Biol. (MacMillan Publishing Co. (1983)、及びその中で引用される参考文献を参照されたい。目的となるタンパク質の生物学的活性に影響を及ぼさない適切なアミノ酸置換に対する助言は、Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found. 1978)のモデルにおいて見出され得る。あるアミノ酸を、類似の特性を有する別のアミノ酸と交換するなどの保存的置換は、生物学的活性の変化がほとんどないか、または変化がないことが望ましい場合に好ましい。

【0107】

したがって、本発明のポリペプチドは、天然に存在するタンパク質、ならびにその変形及び修飾形態を包含する。かかるバリエーションは、所望の活性を依然として保持するであろう。本明細書に包含されるポリペプチド配列の欠失、挿入、及び置換は、ポリペプチドの特徴において根本的な変化をもたらすことは予想されない。しかし、そうする前に、置換、欠失、または挿入の正確な効果を予測することが困難な場合、当業者は、その効果が日常的なスクリーニングアッセイによって評価されることを理解するであろう。

【0108】

コード配列中の単一アミノ酸または少ない割合のアミノ酸（典型的には5%未満、より典型的には1%未満）を改変、付加または欠失させる個々の置換欠失または付加は、「保

存的に改変された変異」であり、改変によって、アミノ酸を化学的に類似したアミノ酸で置換する。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当該技術分野で周知である。以下の5つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する。脂肪族：グリシン（G）、アラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、芳香族：フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）、硫黄含有：メチオニン（M）、システイン（C）、塩基性：アルギニン（R）、リジン（K）、ヒスチジン（H）、酸性：アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）。これに加えて、コード配列中の単一アミノ酸または少ない割合のアミノ酸を変化させ、付加し、または欠失する個々の置換、欠失または付加もまた、「保存的に改変された変異」である。

10

【0109】

「作動可能に連結された」とは、一方の機能が他方の機能の影響を受けるような分子の会合を指す。

【0110】

本明細書で使用される場合、「治療薬剤」または「治療複合体」という用語は、哺乳動物レシピエントに対して有益な効果を有する任意の薬剤または材料を指す。したがって、「治療薬剤」は、核酸またはタンパク質成分を有する治療分子及び予防分子の両方を包含する。

【0111】

「治療すること」は、本明細書で使用される場合、所与の疾患または状態の少なくとも1つの症状を改善し、治癒し、及び／またはその発症を予防することを指す。

20

【0112】

「免疫応答」は、Bリンパ球及び／またはTリンパ球及び／または抗原提示細胞の活性化または増殖をもたらす体液性免疫応答及び／または細胞性免疫応答を指す。しかし、いくつかの場合において、免疫応答は、低強度であってもよく、本発明による少なくとも1つの物質を使用する場合にのみ、検出可能になる。「免疫原性」は、免疫系の1つ以上の機能が增加し、免疫原性薬剤に向けられるように、生体の免疫系を刺激するために使用される薬剤を指す。「免疫原性ポリペプチド」は、細胞及び／または体液性免疫応答を単独または担体に連結して誘発するポリペプチドである。好ましくは、抗原提示細胞を活性化してもよい。

30

【0113】

免疫応答を「高める」物質とは、その物質を添加せずに測定した同一の免疫応答と比較した場合、その物質の添加に伴って何らかの方法で増加するか、または強化されるか、または逸脱する免疫応答が観察される物質を指す。例えば、細胞傷害性T細胞の溶解活性は、例えば、 $51Cr$ 放出アッセイを使用して、免疫化中の物質の使用の有無にかかわらず、得られた試料中で測定することができる。CTL溶解活性が、物質を含まないCTL溶解活性と比較して高められる物質の量は、抗原に対する動物の免疫応答を高めるのに十分な量であると言われている。特定の実施形態において、免疫応答は、少なくとも約2倍、例えば約3倍以上高められる。分泌されるサイトカインの量または種類も変化し得る。あるいは、誘導される抗体またはそのサブクラスの量が、変化し得る。

40

【0114】

用語「免疫化する」または「免疫化」または関連用語は、標的抗原またはエピトープに対して実質的な免疫応答（抗体及び／またはエフェクターCTLなどの細胞免疫を含む）をマウントする能力を付与することを指す。これらの用語は、完全な免疫を作製することを必要とせず、むしろベースラインよりも実質的に大きい免疫応答を生成することを必要とする。例えば、標的抗原に対する細胞及び／または体液性免疫応答が本発明の方法の適用後に生じる場合、哺乳動物は標的抗原に対して免疫化されるとみなされ得る。

【0115】

「免疫療法薬」という用語は、疾患、障害、または状態を治療するための組成物を指す。より具体的には、この用語は、有益な免疫応答が、ワクチン接種によって、または免疫

50

分子の移入によって生成される治療方法を指すように使用される。「免疫学的に有効な量」は、個体に導入されたときに、その個体において免疫応答を誘導するのに十分な組成物の量を指す。能動免疫化の文脈において、この用語は、「免疫原的に有効な量」と同義である。免疫学的に有効であるために必要な組成物の量は、その組成、組成物中の他の成分の存在、抗原、免疫化の経路、個体、以前の免疫状態または生理学的状態などを含む多くの要因に応じて変化する。

【0116】

ここで、本発明を、以下の非限定的な実施例によって説明する。

【実施例】

【0117】

実施例1

膠芽腫免疫療法のための自家腫瘍ワクチン接種と組み合わせた、CD200免疫チェックポイントの逆転。

免疫療法の最近の進歩は、腫瘍微小環境における免疫チェックポイントタンパク質の阻害と、腫瘍溶解物に基づくワクチン接種戦略を含んでいる。ここでは、本願発明者らは、膠芽腫モデルにおいて、これらのアプローチを組み合わせた。免疫チェックポイントタンパク質CD200を標的とする合成ペプチドの投与は、T細胞媒介性抗膠芽腫効果を誘導するための抗原提示細胞の能力を向上させた。本願発明者らは、イヌ自然発生神経膠腫において、自家腫瘍溶解物ワクチンの皮下送達前にイヌ特異的CD200指向性ペプチドを局所注射すると、自家腫瘍溶解物単独で治療された過去の対照と比較して、生存期間が延びることを見出した（生存期間中央値は、それぞれ12.7ヶ月及び6.36ヶ月）。このペプチドでプライミングされた抗原提示細胞及びTリンパ球は、阻害性CD200受容体のそれらの発現を抑制し、それにより、免疫抑制性CD200タンパク質が豊富な膠芽腫微小環境において、それらが免疫反応を開始させる能力を高めた。これらの結果は、新規の膠芽腫免疫療法剤としてのCD200リガンドの使用を裏付ける。

【0118】

免疫療法は、がん治療の歴史において3番目に重要な進歩である。モノクローナル抗体による免疫チェックポイント遮断の臨床的成功により、推定3000回の免疫腫瘍学的治療が行われている。対照的に、腫瘍ワクチンに基づく治療戦略に対する免疫チェックポイントの適切さは、あまり注目されていない。原則として、腫瘍ワクチン中に免疫チェックポイント分子が存在すると、局所抗原提示細胞（APC）が腫瘍抗原に対する獲得免疫応答を活性化する能力が損なわれ、それによって、治療の有効性が損なわれるであろう。

【0119】

獲得免疫応答の間、選択された細胞表面タンパク質の発現は、免疫活性化を下方制御または終結させる。免疫チェックポイント分子として知られるこれらのタンパク質が固形腫瘍で発現するという観察結果は、免疫腫瘍学における影響の大きな発見であった。これらの分子は、Tリンパ球上の同種の受容体と相互作用して、抗原提示時にT細胞活性化に必要なシグナル伝達を抑制し、それによって腫瘍がその後の免疫応答を回避することを可能にする。これらの所見は、腫瘍微小環境における免疫抑制を逆転させるための免疫チェックポイント阻害剤を開発するための努力の根底にある。

【0120】

ここでは、CD200（OX2）免疫チェックポイントの阻害剤が、膠芽腫に対する自家腫瘍溶解物ワクチンの有効性を増強するかどうかを検討する。膠芽腫は、原発性成人脳癌の最も一般的な形態である。膠芽腫に罹患した患者の予後は依然として悪く、侵襲的な外科的切除、化学療法、及び放射線療法の後の生存期間中央値は、14.6ヶ月である。中枢神経系（CNS）は、以前は免疫特権を有する部位であると考えられていたが、その後の研究により、先天性免疫応答及び獲得免疫応答が、膠芽腫発病に対する宿主応答において重要な役割を果たすことが明らかになった。この知見は、膠芽腫の治療モダリティとしての腫瘍ワクチンの研究につながった。このアプローチでは、切除された腫瘍由来の抗原を注射して、任意の残存腫瘍細胞に対する免疫応答を誘発する。しかしながら、膠芽腫

10

20

30

40

50

は、腫瘍に対する宿主免疫反応を中和する細胞表面及び可溶性タンパク質の両方の形態で、いくつかの免疫抑制チェックポイント分子を発現する。膠芽腫の腫瘍微小環境における免疫抑制に加えて、これらのチェックポイント分子は、腫瘍溶解物に基づくワクチン接種戦略にとって非常に大きな課題を提示する。溶解物中の1つのそのようなチェックポイント分子であるCD200（OX2としても知られる）の存在は、局所APCが腫瘍抗原に対する獲得免疫応答を開始する能力を損なわせる。

【0121】

CD200は、T細胞シグナル伝達に必要な共刺激受容体のB7ファミリーに関連する免疫チェックポイントタンパク質である。CD200欠損マウスは、自己免疫表現型を示し、このことは、免疫チェックポイントタンパク質としてのCD200の役割をさらに実証する。重要なことに、CD200は、慢性リンパ球性白血病（CLL）、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、黒色腫、卵巣腫瘍、転移性小細胞癌、及び膠芽腫を含む広範囲のがんで発現される。CD200は、腫瘍細胞表面で発現するが、ADAM28（A Disintegrin And Metalloprotease enzyme 28）などの金属プロテアーゼによって切断される。特に、血漿中の可溶性CD200のレベルは、CLL患者における腫瘍負荷及び生存率と相関する。がんによって放出されるCD200とAPC上のその阻害性受容体（CD200R1）との間の物理的相互作用（図1A及び1B）は、インターロイキン2（IL2）及びインターフェロンγ（IFNγ）を含む炎症促進性サイトカインの分泌を抑制し、骨髄由来抑制細胞（MDSC）及び制御性T細胞（Treg）の産生を増加させ、抗腫瘍免疫応答が損なわれる。

【0122】

本願発明者らは、以前に、CD200-CD200R1相互作用が、膠芽腫の免疫抑制性微小環境を維持するための中心であることを実証し、これらの相互作用を標的とするペプチドを開発した。その後の研究により、これらのペプチドは、阻害性CD200R1を介するのではなく、別個のCD200活性化受容体（CD200AR）を介して、それらの効果を媒介することが明らかになった（図1A及び1B）。これらの所見は、CD200を模倣するペプチドがCD200ARを調節することを示唆する。さらに、本願発明者らの以前のマウス実験は、CD200ARを標的とするリガンド（CD200AR-L）としてCD200を模倣するペプチドを投与することによって、免疫刺激を達成することができることを示唆している。本願発明者らは、注目せずにはいられないCD200模倣ペプチドの治療効果を見出し、これらの所見を臨床現場に転換することを望んだ。ヒトCD200AR-L受容体とマウスCD200AR-L受容体との間の配列ダイバージェンスのため、マウスペプチドは、ヒトCD200ARを標的とするのに最適なものではなかった。ここでは、ヒト特異的CD200AR-L及びイヌ特異的CD200AR-Lの開発を記載する。これらのペプチドが、ヒトAPCが抗腫瘍応答を開始する能力を高めることを示す。重要なことに、皮下自家腫瘍溶解物ワクチンの投与前のイヌCD200AR-Lの局所注射は、イヌ自然発生膠芽腫モデルにおいてインビボでこのワクチンの有効性を有意に高めた。

【0123】

方法

ペプチド合成。ペプチドを、1）CD200ARと相互作用することが以前に示されたCD200タンパク質の領域と、2）マウス、イヌ、及びヒトCD200の間の相同性を示す配列とに基づいて設計した。3つの15アミノ酸ペプチド（P1、P3、及びP4）及び1つの14アミノ酸ペプチド（P2）を合成した（Thermo Fisher Scientific、ロックフォード、IL）。

P1：IVTWQKKKAVSPENM（配列番号1）

P2：NITLEDEEGCYMCLFN（配列番号2）

P3：VTFSENHGVV IQPAY（配列番号3）

P4：CLFNNTFGFGKISGTA（配列番号4）

【0124】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、イヌCD200AR-Lである。

P4:CLFNTFGSGKISGTA (配列番号5)

【0125】

特定の実施形態において、CD200AR-Lは、マウスCD200AR-Lである。

P1:VTWQKKKAVSPENM (配列番号17)

【0126】

ペプチドの純度は、95%を超えており、各ペプチドは、その安定性を向上させるために、N末端アセチル化及びC末端アミド化によって修飾される。

【0127】

TCGA分析。Cancer Genome Atlas (TCGA) データポータル (tcga-data.nci.nih.gov/tcga) を使用して、膠芽腫患者についての生存時間、死亡事象、及びRNAseqデータをダウンロードした。Cluster 3.0 (C Clustering Library 1.52) を使用して、遺伝子発現データをlog₂変換し、平均中心を計算し、次いで、標準偏差>1.0を有する全ての遺伝子に対してPearson類似性基準を使用した階層的平均連結クラスタリングを行った。デンドログラムノード相関>0.20であり、少なくとも50個の個々の遺伝子を有する遺伝子クラスターを同定し、転帰との関連性が生成された。CD200R1含有クラスターのGene Cluster Expression Summary Scores (GCESS) と転帰との間の関連性は、GCESS値の四分位数を使用して生成された群のKaplan-Meier分析に基づいて報告される。クラスター14に共局在化した遺伝子のリストは、CD200R1_cluster_gene_list.xlsとして含まれる。

【0128】

サイトカイン測定。抗CD14ビーズ (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用して、ヒトCD14⁺細胞 (5×10⁵個) を末梢血単核細胞 (PBMC) から単離し、典型的には、70%以上の回収率及び90%以上の純度を得た。細胞を2μMのCD200AR-Lペプチドでパルスし、48時間インキュベートし、その後、上清をサイトカイン産生のためのビーズアレイ (BD Biosciences, San Jose, CA) によって分析した。

【0129】

樹状細胞分化。サイトメガロウイルス (CMV) 陽性HLA-A2⁺リンパ球パックを米国赤十字 (American Red Cross) から入手し、CD14⁺細胞を精製した。約1×10⁸個のCD14⁺細胞を、5%CO₂中、37℃のポリスチレン組織培養フラスコ中で培養した。GM-CSF (25ng/mL) 及びIL-4 (40ng/mL) の両方を3日目及び5日目に添加して、未成熟樹状細胞 (iDC) を誘導した。

【0130】

CMVアッセイ。iDC (5×10⁵個) を10μgのCMV抗原ペプチドpp65495-503 (NLVPMVATV) でパルスし、上述のように培養した。次いで、iDCを3回洗浄し、CMV陽性ドナー由来の5×10⁵個のCD8⁺T細胞を、パルスされたiDCとともにインキュベートした。CMV陰性PBMCを陰性対照として使用した。48時間のインキュベートの後に上清を収集し、サイトメトリービーズアレイ (BD Biosciences) によってIFNγ産生について分析した。

【0131】

ナノストリング遺伝子発現分析: CD14⁺細胞由来の全RNAを、New Zealand Genomics Limited (Dunedin, New Zealand) に送り、炎症の間に差次的に発現される遺伝子の発現を測定した (nCounter GX, NanoString Technologies, Seattle, WA, USA)。簡単に述べると、全RNAを、組織に適合させたプロトコル (KingFisher Duo機、Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) を使用して、CD14⁺細胞 (MagJET RNA

10

20

30

40

50

キット、Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) から抽出した。次いで、RNA試料を定量化し (Qubit (登録商標) 2.0 蛍光計、Thermo Fisher Scientific)、RNA 完全性分析 (2100 Bioanalyzer、Agilent Technologies、サンタクララ、CA) を行った。CD44 (NM_001001392.1)、NANOG (NM_024865.2)、OCT4 (NM_002701.4)、STAT3 (NM_139276.2)、及びハウスキーピング遺伝子グルクロニダーゼベータ (NM_000181.1)、クラスリン重鎖 (NM_4859.2)、及びヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1 (NM_000194.1) をコードする遺伝子のためのプローブは、NanoString Technologies によって設計され、製造された。

10

【0132】

NanoString GX を用いて得られた発現データを、デフォルト設定を有する nSolver Analysis Software 3.0 (nanosttring.com/products/nSolver) を使用して分析し、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。nSolver を使用してクラスター解析を行い、Java Treeview Version 1.1.6r4 を使用することによってヒートマップを生成した。経路解析を、PathCards Pathway Unification Database (pathcards.genecards.org) を使用して行った。スチューデントの t 検定を使用して、有意差を決定した ($p < 0.05$)。

20

【0133】

イヌの研究。核磁気共鳴画像法 (MRI) によって発見された孤発性軸内塊を有するペットのイヌを、パイロット研究に採用し、イヌ特異的ペプチドの効果を評価した。MRI を実施して、全身発作活性または挙動変化の原因を見出し、発作を制御し、脳浮腫を最小限に抑えるために、それぞれ、抗てんかん薬療法及びコルチコステロイドを処方した。追加の組み入れ基準は、1) 外科的切除に適した腫瘍、2) イヌの飼い主から提供されたインフォームドコンセント、3) 手術時の正常な精神状態、及び 4) 神経膠腫の疑いに対する以前の原因療法がないこと、であった。

【0134】

全てのイヌは、最大限の腫瘍デバルキングのための軸内塊の外科的切除を受けた。取り出した腫瘍を直ちに処理し、自家腫瘍溶解物を生成した。細かく切り刻んだ新鮮な腫瘍試料からの単一細胞懸濁液を、5% O_2 中、37°C で培養することによって、溶解物を調製した。培養した腫瘍細胞を、複数回の凍結融解サイクルによって溶解し、20 Gy を照射した。術後直ちに MRI を行って、切除の程度を評価し、残存腫瘍体積を定量化した。腫瘍体積は、各 MR スライス上の腫瘍周辺の輪郭を描く平面測定法を使用して測定した。Ossirix ソフトウェアを使用して面積を計算し、次いで、面積を合計し、スライス厚さ + ギャップ幅を掛け算した。麻酔から回復した後、全てのイヌを集中治療室で少なくとも 24 時間監視した。抗てんかん薬 (フェノバルビタール、レベチラセタム、及びゾニサミド、単独または併用) は術後継続したが、コルチコステロイド投与は、徐々に量を減らし、10~14 日以内に中止した。

30

40

【0135】

最初のワクチン接種は、手術から 10 日後に投与され、3 週間にわたって毎週、次いで 3 ヶ月間にわたって 4 週間毎に 1 回、次いで、腫瘍の進行または死亡まで 6~8 週間毎に繰り返された (図 9)。ワクチンプロトコルは以下の通りであった。イヌ特異的 CD200AR-L ペプチド (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を皮内注射した (ID)。24 時間後、イミキモド (1 パッケージ 5% クリーム / 12.5 g) を皮膚に局所的に適用し、10~15 分間吸収させた後に、CD200AR-L (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と混合した自家腫瘍溶解物 (約 500 μg のタンパク質) を皮内注射した。術後 4 ヶ月、8 ヶ月、12 ヶ月の MRI 及び身体検査により疾患状況を監視し、その後、腫瘍再発が疑われる場合は必要に応じて監視した。

【0136】

50

外科的切除は、ガドリニウム増強病変に対する残存コントラスト増強がない場合、または非増強病変についてT2荷重FLAIR（流体減衰反転回復）の高強度がない場合、全切除であると定義され、元の腫瘍体積の10%未満が残存する場合は、ほぼ全切除であると定義され、または10%を超える残存腫瘍体積がある場合は、部分切除であると定義された。フォローアップMRIに対する臨床応答は、腫瘍の証拠がない場合、完全奏効（CR）とみなされ、腫瘍体積が65%以上減少している場合、部分奏効（PR）とみなされ、腫瘍体積が40%を超えて増加している場合、進行（PD）とみなされ、応答が上に定義するCR、PR、またはPDに該当しない場合、安定とみなされた。イヌが予定されたMRIの前に再発性または悪化する神経学的徴候を呈した場合、MRIが実施された。

【0137】

結果

CD200AR-Lに対する阻害性ペプチドの設計及び同定。CD200AR-Lと相互作用するCD200の領域の以前の分析により、ヒト、イヌ、及びマウスの間で有意な相同性を共有する4つの領域を明らかにした（図2a）。ヒトCD200中のこれらの4つの領域に対応する、P1~4と呼ばれる4つのCD200AR-Lペプチドを生成した。これらのペプチドがAPCを活性化するかどうかを判定するために、マウスCD200模倣ペプチドについて以前に観察されたように、精製されたヒトCD14⁺細胞を、4つの異なるCD200AR-Lペプチドでパルスし、上清を免疫刺激性サイトカインについて分析した（図2b、c）。パルスされていない対照と比較して、それぞれ、P1、P2、P3、及びP4でパルスされたCD14⁺細胞において、IL-1 β （ $p=0.0126$ 、 $p=0.364$ 、 $p=0.0022$ 、 $p=0.0008$ ）及びTNF α （ $p=0.0146$ 、 $p=0.0007$ 、 $p=0.0022$ 、及び $p=0.0082$ ）の統計的に有意な増加が観察された。これらのペプチドが抗原特異的応答を生成するかどうかを判定するために、CMV陽性ドナー由来のT細胞がCMV抗原pp65でプライミングされたCMVモデルを使用した。未成熟樹状細胞をCMV抗原pp65+CD200AR-Lペプチドでパルスすると、pp65単独と比較して、有意な抗原特異的応答、すなわち、IFN γ の産生を誘発した（P1： $p=0.034$ 、P2： $p=0.033$ 、P3： $p=0.0042$ 、及びP4： $p=0.0202$ 、図2d）。

【0138】

APCを最大限に刺激するペプチドを作製するために、4つのペプチドの各アミノ酸をアラニンで置換し、61個のアラニン置換ペプチドを得た。精製されたCD14⁺細胞をこれらのペプチドでパルスし、応答をサイトカイン放出として測定した。CD14⁺細胞からの炎症性サイトカインの分泌を最大限に刺激する5つのペプチドを選択した。P1A8（P1A8=8番目のアミノ酸で置換されたアラニンを有するP1ペプチド）、P2A0（P1A0=アラニン置換を有しないP2ペプチド）、P2A5、P3A12、及びP4A10。

【0139】

次に、これらのペプチドがCD14⁺細胞をパルスするために使用された後の、より広範なセットの免疫刺激性サイトカイン（IL-12p70、MIG、及びTNFを含む）に対するこれらのペプチドの効果を分析した（図3a）。5つのペプチドの各々での治療後に、有意なサイトカイン誘導が観察された。CD14⁺細胞に対するこれらのペプチドの効果を特性決定するために、RNAseqを行った。P1A8、P2A0、またはP4A10による治療は、TNFシグナル伝達に応答して放出されるサイトカインのmRNA発現の顕著な増加を誘導し（表1、図3a）、これは、CD200の暴露がAPCにおけるTNFシグナル伝達を抑制し、CD200模倣薬がこの効果Rを逆転させるという本願発明者らの以前の結果と一致する。これらの結果を、TNF制御サイトカインのmRNA発現を検出するように設計されたNanoStringプラットフォームを使用して反復発生させた（図3b）。最も強力かつ一貫してTNF制御サイトカインのmRNA発現を誘導した3つのペプチド（P1A8、P2A0、及びP4A10）を、その後の分析のために選択した。

【表 1 - 1】

表 1

経路	遺伝子上方制御
アテローム形成における LDL 酸化	CCL 2、CCL 3、ICAM1、IL 1B、TNF
免疫応答、MIF 媒介性グルコシルチコイド制御	ICAM1、IL 8、NFKBIA、PTGS 2、TNF
EBV LMP 1 シグナル伝達	CCL 20、IL 8、NFKBIA、TNF
II 型インターフェロンシグナル伝達 (IFN γ)	CXCL 10、GBP 1、ICAM1、IL 1B、SOCS 3
サイトカイン及び炎症応答	CXCL 2、IL 1A、IL 1B、TNF
カノニカル NF- κ B 経路	NFKBIA、TNF、TNFAIP 3
IL-10 経路	IL 1A、IL 1B、SOCS 3、TNF
異なる免疫細胞型における IL-15 シグナル伝達経路及びそ	CCL 3、CCL 4、TNF

10

【表 1 - 2】

経路	遺伝子上方制御
これらの主要な生物学的効果	
ケモカインスーパーファミリー経路：ヒト/マウスリガンド-受容体相互作用	CCL 2、CCL 20、CCL 3、CCL 4、CXCL 10、CXCL 2、IL 8
ケモカインスーパーファミリー経路：ヒト/マウスリガンド-受容体相互作用	CCL 2、ICAM1、IL 1B、IL 8、TNF
TNF シグナル伝達経路	CCL 2、CCL 20、CXCL 10、CXCL 2、ICAM1、IL 1B、NFKBIA、PTGS 2、SOCS 3、TNF、TNFAIP 3

20

30

【0140】

CD 200 活性化受容体を標的化することによって、樹状細胞成熟を向上させる。TNF 制御サイトカイン（表 1）は、樹状細胞成熟に参与している。したがって、RNAseq 結果（図 3b）は、P1A8、P2A0、及び P4A10 が、樹状細胞成熟に寄与することを示唆する。これを立証するために、健康なヒトドナーから CD 14⁺細胞を単離し、GM-CSF+IL 4、P1A8、P2A0、または P4A10 でパルスした。P1A8、P2A0、及び P4A10 でパルスされた細胞は、GM-CSF+IL 4 で治療された細胞よりも高いレベルの共刺激分子 CD 80、CD 86、及び HLA-DR を発現した（ $p < 0.0001$ 、図 4a）。さらに、CD 14⁺細胞を GM-CSF+IL 4 及び各ペプチドとともにインキュベートした場合の、CD 80/86 及び HLA-DR の相乗的上方制御を観察した（ $p < 0.0001$ ）（図 4b）。これらの結果は、P1A8、P2A0、及び P4A10 が、CD 14⁺単球の iDC への分化を向上させたことを示唆する。

40

【0141】

抗原特異的応答に対する P1A8、P2A0、及び P4A10 の効果を評価するために、以下のアッセイで IFN γ 放出を測定した。iDC を、等モル量の P1A8、P2A0、または P4A10 を加えるか、または加えずに、CMV 抗原 pp 65 でパルスした。次

50

いで、自家T細胞を添加し、iDCとともに48時間インキュベートし、その後、上清中でIFN γ 産生を測定した。pp65への曝露は、T細胞IFN γ 産生を約4倍増加させた(図4c)。pp65及びP1A8、P2A0、またはP4A10を用いたiDCの同時治療は、pp65単独よりもさらに2~3倍、IFN γ 放出を増加させた。これらのデータは、P1A8、P2A0、またはP4A10が、ヒトT細胞から抗原特異的応答を誘導する樹状細胞の能力を高めたことを示す。3つのペプチドのうち最も強力なP4A10によるiDCの治療は、IFN γ 、IL6、TNF α 、及びRANTESのT細胞分泌をそれぞれ5.4倍、5.6倍、16.6倍、及び16.3倍高めた。スクランブルしたペプチド対照は、pp65応答を高めることができなかった(図4d)。これらの結果は、P4A10が、T細胞媒介性免疫応答を誘導するAPCの能力を高めることを示唆する。

【0142】

CD200AR-Lペプチドは、自然発生イヌ神経膠腫モデルにおける腫瘍溶解物ワクチン接種の有効性を増強する。本願発明者らの研究所は、膠芽腫を治療するための戦略としての自家腫瘍溶解物ワクチン接種の開発に長年の関心を寄せている。本願発明者らは、このような溶解物中の免疫チェックポイントタンパク質の存在は、この療法の有効性を損なう可能性があるかと仮定する。ヒトP4A10ペプチドは、イヌペプチドと高い相同性を有するため(図2a)、自家腫瘍溶解物の導入前にイヌCD200AR-Lを皮下注射すると、自然発生する膠芽腫のイヌモデルにおいてワクチンの有効性が高まるという仮説を立てた。この仮説を試験するために、自然発生する膠芽腫を有する21匹のイヌを、腫瘍切除と、イヌCD200AR-L+自家腫瘍溶解物からなるワクチン接種で治療した(図9)。腫瘍進行及び全生存期間を、腫瘍切除後に自家腫瘍溶解物単独で治療されたイヌの以前の cohorts からの過去のデータと比較した。これらの2つのcohortsについての切除の程度は、同等であった。イヌCD200AR-Lを投与されたイヌにおいて、25ヶ月間の無増悪生存率67%を観察した(図5a)。死亡は、イヌの33%(7/21)が腫瘍再発に起因し、イヌの33%(7/21)が腫瘍進行以外の原因で死亡したか、または安楽死させられた。死後の検査を行わない2匹のイヌは、腫瘍の進行により死亡したと推定された。対照的に、腫瘍進行は、腫瘍溶解物のみで治療された群のイヌの100%(15/150)における死因であった。自家腫瘍溶解物接種前のイヌCD200AR-L投与により治療されたイヌの生存期間中央値は、12.7ヶ月であった。この生存期間は、腫瘍溶解物ワクチン接種のみで治療されたイヌの6.36ヶ月の生存期間と比較して良好であった(図5a)。術後18ヶ月(548日)に腫瘍再発を有する1匹のイヌを、第2の手術、続いてイヌCD200AR-Lと同時に投与された自家腫瘍溶解物ワクチンで治療し、合計28ヶ月の間、さらに9.93ヶ月生存した。このイヌは、図5aに含まれなかった。

【0143】

興味深いことに、6匹のイヌは、術後最大50%の残存腫瘍を有していたが、CD200AR-Lと腫瘍溶解物ワクチンの同時投与から4ヶ月後に得られたMRIで腫瘍の退縮が見られた(図5b、c)。5匹のイヌは、脳室周囲白質のトラクトのT2高信号域及び心室拡張を特徴とする大脳白質脳症を発症した。しかしながら、これらの徴候は、コルチコステロイド治療後に消失した(図5d及びe)。重篤な臨床症状を有する1匹のイヌにおいて、ワクチン療法も中止され、T2高信号域は消失したが、2ヶ月後に実施されたMRIで腫瘍再発が認められた(図5f~5i)。イヌが回復したときにワクチン及びペプチド療法を再開し、2ヶ月時点で再び腫瘍退縮がみられた(図5j~5m)。

【0144】

血清CD200レベルは、上衣腫患者における腫瘍負荷及び全生存期間と関連することが以前に示されていたため、本願発明者らは、21匹のイヌ対象から血清を収集し、分析した。前回の研究と一致して、本願発明者らは、血清CD200レベルと全生存期間との間に有意な関連性を見出した(図5n)。全血球数及び血清化学プロファイルは、治療に関連する有害作用の明らかな証拠を明らかにしなかった。これらのデータは、P4A10に基づく治療戦略のためのコンパニオンバイオマーカーとしての血清CD200の潜在的

な有用性を示唆する。

【0145】

P4A10でプライミングされたTリンパ球は、CD200R1の発現を下方制御する。CD200関連遺伝子が生存期間に関連しているかどうかを調べるために、GCESS24を使用して、TCGAデータセット内の患者腫瘍試料の遺伝子発現プロファイルを分析した。これにより、データセット全体にわたって一貫して発現され、偏りのない統計分析において全生存期間に関連する遺伝子クラスターを特定することができた。CD200R1発現は、免疫関連転写物を高度に濃縮した遺伝子の大きなクラスター内で見出された。このクラスター内の遺伝子の転写レベルの増加は、生存率の減少と有意に関連していた（図6a、6e）。高レベルのCD200R1含有クラスターを発現した患者（クラスター14）は、低レベルのクラスターを発現した患者よりも短い全生存時間を示した（図6b～d）。これらの結果は、免疫抑制性膠芽腫微小環境の媒介におけるCD200／CD200R1相互作用の決定的な重要性を示唆する。

10

【0146】

この文脈におけるP4A10＋自家腫瘍溶解物戦略の有効性は、興味深い解決困難な問題を生じさせる。刺激後にAPC提示に応答するT細胞は、阻害性CD200R129を発現する。したがって、これらのプライミングされたT細胞の免疫刺激効果は、可溶性であり腫瘍によって発現されるCD200が豊富な膠芽腫微小環境に入ると鈍化すると予想される。しかしながら、本願発明者らは、T細胞に対する抗原提示前のCD200AR-Lプライミングが、本願発明者らのマウスモデルにおけるAPC（ $p=0.0001$ ）及びT細胞（ $p=0.009$ ）の両方における阻害性CD200R1の発現を抑制し（図7a、b）、それによって、膠芽腫腫瘍微小環境におけるCD200の効果に対するこれらの細胞の耐性を生じさせることを見出した。この仮説を裏付けるように、抗原提示前のP4A10プライミングがCD200R1発現を抑制することを見出した（図7d）。このような抑制は、モック治療細胞において観察されなかった。同様のPD-1の下方制御がAPCで観察された（ $p=0.005$ 、図7c）。これらの結果は、CNSにおける免疫抑制を、CNS外で生じる免疫調節を通じて克服することができることを示す。

20

【0147】

さらに、ヒトCD14細胞をヒトCD200AR-L（P1A8）でパルスし、パルスされていない細胞を対照として使用して実験を行った。細胞を単離し、PD-1のレベルについてフローサイトメトリー（図7e）によって分析した。平均蛍光強度をCD200R1（図7f）及びPD-1発現（図7g）について分析した。これらの実験により、CD200AR-Lが、抑制性PD-1受容体を下方制御することが示された（図7g）。

30

【0148】

考察

ほとんどの免疫チェックポイント阻害剤は、腫瘍微小環境における免疫抑制を逆転させることを目的として開発される。ここで、本願発明者らは、自家腫瘍ワクチン接種の部位における免疫チェックポイント逆転の有効性を探る代替のパラダイムを探索した。本願発明者らの以前の研究は、腫瘍溶解物中のCD200免疫チェックポイントタンパク質の存在が、局所APCが動員されたT細胞を活性化し、効果的な抗腫瘍免疫応答を引き起こす能力を抑制するという、注目せずにはいられないデータを提供した。この観察に基づいて、CD200媒介性免疫抑制を標的とするペプチドであるP4A10が、CD200の免疫抑制効果を逆転させることができるかどうかを調べた。本願発明者らの結果は、P4A10が、ヒトT細胞から抗原特異的応答を誘導するAPCの能力を高めることを示した。注目すべきことに、T細胞に対する抗原提示前のCD200AR-Lプライミングが、阻害性CD200R1の発現を抑制し、それによって、膠芽腫腫瘍微小環境におけるCD200の効果に対するこれらの細胞の耐性を生じさせる。これらの免疫刺激分子の皮内注射は、免疫調節因子の全身投与に関連する全身毒性の可能性を最小限にする。

40

【0149】

マウス脳腫瘍モデルは、膠芽腫の病因に関する貴重な洞察をもたらしたが、これらのモ

50

デルにおいて非常に有望であることを示した療法は、臨床転換においてしばしば失敗している。最適な治療モデルに対するコンセンサスなしに、これらの失敗に対処するために米国国立衛生研究所（United States National Institutes of Health）によって複数の専門家パネルが招集されている。そのようなコンセンサスがない場合、マウス以外の動物における治療試験は、臨床試験を設計する前に考慮する必要がある。本願発明者らのイヌ研究は、この文脈で特に関連がある。膠芽腫は、ボクサー、フレンチブルドッグ、及びイングリッシュブルドッグを含む特定の種のイヌで頻繁に自然発生する。この自然発生イヌ「モデル」は、CD200の免疫学的効果を特性決定するための魅力的なプラットフォームである。1) 腫瘍が、ヒト膠芽腫で観察されるものと非常に類似した組織学的特徴を示し、2) 腫瘍が、実験的操作を行わずに免疫微小環境で生じ、成長し、3) ヒト及びイヌ膠芽腫の組織病理学的試料において、免疫細胞集団に関してかなりの類似性があり、4) ヒトの膠芽腫と同様に、イヌにおける膠芽腫は、典型的には、腫瘍負荷が神経学的欠損を引き起こす後期に検出され、5) ヒトCD200とイヌCD200との間に有意な相同性が存在するからである。この文脈で理解すると、イヌモデルにおけるイヌCD200AR-Lの有効性は、将来のヒト臨床試験のための強力な裏付けを提供する。

【0150】

現在の臨床診療において、治療応答の評価は、主にMRI上の膠芽腫の外観の評価に基づいている。MRIはコストが高く、MR画像の解像度が細胞レベルでの腫瘍成長を検出するには不十分であるため、この診療は問題がある。したがって、膠芽腫の成長を評価するための最低限の侵襲性のバイオマーカーが決定的に必要である。多くの態様において、CD200の生物学的特性は、CD200を腫瘍負荷のバイオマーカーとして十分に好適なものにする。CD200は、細胞表面糖タンパク質であるが、膠芽腫で発現するCD200のほとんどは、可溶性因子10として放出される。この原稿に示されるデータを含む、独立した群は、がん患者の血清中の可溶性CD200のレベルが、腫瘍負荷と相関することを決定し、このことは、この原稿に示されるデータによって裏付けられた（図5n）。概して、これらの結果は、膠芽腫監視のための潜在的な「液体生検」プラットフォームとしての血清CD200を裏付ける。

【0151】

要約すると、本願発明者らの研究は、膠芽腫に対する新規療法として、腫瘍ワクチン投与前のCD200免疫チェックポイントの生物学的機能を妨げることを指向する免疫刺激ペプチドの皮下投与の治療有効性を裏付けるデータを提供する。

【0152】

実施例2

CD200AR-Lは、PD-L1阻害性シグナルを征服する。

これらの実験において、マウスCD11b細胞をPMAで刺激し、マウスCD200AR-Lを加えるか、または加えずに、PD-L1でパルスした。これらの実験は、PD-L1がCD11b細胞の活性化を抑制するが、CD200AR-LがPD-L1の阻害効果を征服することを示した（図8A～8C）。

【0153】

実施例3

T細胞阻害に対する抑制分子（CD200及びPD-L1）の効果

本願発明者らは、可溶性CD200及びPD-L1が、複数のチェックポイントを介したT細胞活性化を阻害することを提案する（図10）。したがって、複数の抑制分子（CD200及びPD-L1）がT細胞阻害に及ぼす効果を調査した。これを達成するために、全脾細胞をCD200またはPD-L1でパルスし、CD200治療後のCD4細胞上のCTLA4の上方制御を明らかにした。加えて、PD-L1治療後、CD11b上のPD-L1の上方制御及びT細胞上のCTLA4の上方制御が観察された。CTLA4及びPD-L1は別個の阻害性シグナルを伝播するため、PD-L1は、1) T細胞上の直接的なCD200及びPD-L1、ならびに2) CTLA4を上方制御するサイトカインを

産生する直接的なPD-L1 (APC上) / PD-I (APC上) を介して、T細胞活性化を阻害し、 α -PD-1 及び α -CTLA4 治療の組み合わせでみられる高められた応答を説明するという仮説を立てた。しかし、いずれもT細胞に対するCD200効果を阻害するものではない。

【0154】

CD200及びPD-1経路はクロストークし、CD200AR-Lが抑制性PD-L1に優先することを可能にする。本願発明者らは、マウスP1A12 (VTWQKKKA VSPANM、配列番号15) 及びイヌP4A10 CD200AR-L (CLFNTF GSGAISGTA、配列番号16) で動物を治療することで、マウス及びイヌの神経腫モデルの両方において有意な生存利益をもたらすことを確立した。これらの結果は、CD200及びPD-1が共通のシグナル伝達経路を共有する可能性があるという仮説を導いた。PD-1 / PD-L1に対するCD200AR-Lの効果を評価するために、脾細胞をPMA+ / -PD-L1またはPD-L1+CD200AR-Lで活性化し、上清をTNF α 、IL-4、及びIL-5産生について分析した (図11A~11C)。CD200タンパク質で観察されるように (図11B)、PD-L1は、サイトカイン産生によって測定されるような免疫抑制環境を誘導したが、PD-L1は、PMAによって誘導されるTNF α 、IL-4、及びIL-5の産生を減少させ、CD200AR-Lの添加によって回復した。これらの実験は、CD200経路とPD-1経路が接続されているという仮説を導いた。

【0155】

CD200AR-Lは、CD200R1及びPD-1の発現を下方制御する。CD200AR-LがPD-L1阻害を防止する機構をさらに調べるために、CD11b細胞をCD200AR-Lでパルスし、CD200R1及びPD-1の転写レベルを分析した (図12A~12B)。両方の阻害性受容体が、CD200AR-Lによって下方制御された。加えて、ヒトCD14細胞をヒトCD200AR-Lでパルスすると、同じ阻害が生じた (図12C~12D)。野生型マウス由来のCD11b細胞を、十分に特性決定されたタンパク質SIIINF EKL (配列番号14) を含有する卵白アルブミン (OVA) でパルスして、抗原特異的応答を解明した。OVA+ / -CD200AR-Lを洗浄し、CD3細胞をCD11b細胞に添加した。これらの実験は、CD200AR-Lが抗原提示細胞 (CD11b及びヒトCD14) 及びT細胞上でのCD200R1及びPD-1の発現を制御することが可能であることを示し、異なるチェックポイントが相互接続されていることを示した。

【0156】

CD200AR-Lは、CD200R1及びPD-1の発現を下方制御する。CD200AR-LがPD-L1阻害を防止する機構をさらに調べるために、CD11b細胞をCD200AR-Lでパルスし、CD200R1及びPD-1の転写レベルを分析した (図13A~13B)。両方の阻害性受容体が、CD200AR-Lによって下方制御された。加えて、ヒトCD14細胞をヒトCD200AR-Lでパルスすると、同じ阻害が生じた (図13C~13D)。野生型マウス由来のCD11b細胞を、十分に特性決定されたタンパク質SIIINF EKL (配列番号14) を含有する卵白アルブミン (OVA) でパルスして、抗原特異的応答を解明した。OVA+ / -CD200AR-Lを洗浄し、CD3細胞をCD11b細胞に添加した。これらの実験は、CD200AR-Lが抗原提示細胞 (CD11b及びヒトCD14) 及びT細胞上でのCD200R1及びPD-1の発現を制御することが可能であることを示し、異なるチェックポイントが相互接続されていることを示した。

【0157】

CD200AR-Lは、CTLA-4上方制御を阻害する。次に、T細胞阻害に対するCD200AR-Lの効果を調べた。これらの実験において、脾細胞をCD200またはPD-L1でパルスし、CD8細胞上ではなく、CD4細胞上のCTLA4の上方制御を明らかにした (図14A)。CD200とは対照的に、PD-L1は、CD4及びCD8

10

20

30

40

50

T細胞の両方でCTLA4を上方制御した(図14A)。さらに、CD200ではなくPD-L1は、CD11b細胞上でのPD-L1の発現を上方制御し(図14C)、これは可溶性PD-L1/PD-1(CD11b上での)相互作用を介する可能性がある。CTLA4及びPD-L1は、別個の阻害性シグナルを伝播するため、PD-L1が、1)直接的なPD-L1(APC上)/PD-1(T細胞上)相互作用による、また、CD11b細胞上のPD-1にPD-L1が結合した後のサイトカイン産生による、2つの別個の機構によって、T細胞活性化を阻害するという仮説が成り立ち、α-PD-1及びα-CTLA4治療の組み合わせでみられる応答の向上を説明するだろう。

【0158】

上述の明細書及び実施例は、本発明を完全に開示し、可能にするが、それらは、本明細書に添付される特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0159】

全ての刊行物、特許及び特許出願は、参照により本明細書に組み込まれる。前述の明細書において、本発明を、その特定の実施形態に関して説明しており、多くの詳細を例示の目的で記載しているが、本発明が追加の実施形態に影響を受けやすく、本明細書に記載される特定の詳細が、本発明の基本原則から逸脱することなく大幅に変更され得ることは、当業者には明らかであろう。

【0160】

本発明を説明する文脈において、用語「a」及び「an」ならびに「the」及び同様の指示対象の使用は、本明細書で別段の指示がなされるか、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方を網羅するように解釈されるべきである。「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」、及び「含有する(containing)」という用語は、別段の記載がない限り、オープンエンド用語(すなわち、「含むがこれらに限定されない」を意味する)として解釈されるべきである。本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書に別段の指示がない限り、単に、その範囲内に含まれる各個別の値を個別に参照する簡略法として機能することのみを意図しており、各個別の値は、本明細書に個別に列挙されるかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に別段の指示がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実行され得る。本明細書に提供される任意の及び全ての実施例、または例示的な言語(例えば、「例えば」)の使用は、単に本発明をより良く明らかにすることを意図しており、特に別段の請求がない限り、本発明の範囲を限定するものではない。本明細書におけるいかなる言語も、任意の請求されていない要素を本発明の実施に不可欠であると示すものとして解釈されるべきではない。

【0161】

本発明を実施するための発明者に知られている最良の形態を含む、本発明の実施形態を本明細書で説明する。これらの実施形態の変形は、前述の説明を読めば当業者に明らかになり得る。本願発明者らは、当業者がかかる変形を適切に用いることを期待し、本願発明者らは、本発明が、本明細書に具体的に記載される以外の方法で実施されることを意図する。したがって、本発明は、適用される法律によって許可されるように、本明細書に添付される特許請求の範囲に列挙された主題の全ての修正及び等価物を含む。さらに、本明細書に別段に示さない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、それらの全ての可能な変形における上述の要素の任意の組み合わせは、本発明によって包含される。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

細胞においてPD-1を阻害する方法であって、前記細胞にCD200活性化受容体リガンド(CD200AR-L)を投与することを含むか、またはそれからなる、前記方法。

(項目2)

前記CD200AR-Lが、ヒト特異的ペプチド(hCD200AR-L)である、項

10

20

30

40

50

目 1 に記載の方法。(項目 3)

前記 CD 200 AR-L が、イヌ特異的ペプチド (c CD 200 AR-L) である、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

前記細胞が、がん細胞である、項目 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5)

前記がん細胞が、膠芽腫細胞である、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記 CD 200 AR-L が、ペプチド P 1 A 8、P 2 A 0、P 2 A 5、P 3 A 1 2、または P 4 A 1 0 である、項目 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

(項目 7)

前記 CD 200 AR-L が、ペプチドヒト P 1 A 8 である、項目 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8)

前記 CD 200 AR-L が、ペプチドヒト P 2 A 0 である、項目 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9)

前記 CD 200 AR-L が、ペプチドヒト P 4 A 1 0 である、項目 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

(項目 10)

前記細胞が、がん細胞である、項目 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 11)

前記がん細胞が、膠芽腫細胞である、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

哺乳動物において腫瘍溶解物ワクチンの有効性を高める方法であって、前記腫瘍溶解物ワクチンの投与前に前記哺乳動物に CD 200 活性化受容体リガンド (CD 200 AR-L) を投与することを含むか、またはそれからなる、前記方法。

(項目 13)

前記 CD 200 AR-L が、ヒト特異的ペプチド (h CD 200 AR-L) である、項目 12 に記載の方法。

30

(項目 14)

前記 CD 200 AR-L が、イヌ特異的ペプチド (c CD 200 AR-L) である、項目 12 に記載の方法。

(項目 15)

前記細胞が、がん細胞である、項目 12～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 16)

前記がん細胞が、膠芽腫細胞である、項目 5 に記載の方法。

(項目 17)

前記 CD 200 AR-L が、ペプチド P 1 A 8、P 2 A 0、P 2 A 5、P 3 A 1 2、または P 4 A 1 0 である、項目 12～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(項目 18)

前記 CD 200 AR-L が、ペプチドヒト P 1 A 8 である、項目 12～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 19)

前記 CD 200 AR-L が、ペプチドヒト P 2 A 0 である、項目 12～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 20)

前記 CD 200 AR-L が、ペプチドヒト P 4 A 1 0 である、項目 12～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

(項目 2 1)

前記細胞が、がん細胞である、項目 1 2 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記 C D 2 0 0 A R - L が、局所注射によって投与される、項目 1 2 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記腫瘍溶解物ワクチンが、皮下投与される、項目 1 2 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 4)

前記腫瘍溶解物ワクチンが、自家腫瘍溶解物ワクチンである、項目 1 2 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記哺乳動物が、腫瘍を外科的に除去してから 5 ～ 1 4 日後に前記 C D 2 0 0 A R - L を投与される、項目 1 2 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 6)

前記哺乳動物が、腫瘍を外科的に除去してから約 1 0 日後に前記 C D 2 0 0 A R - L を投与される、項目 1 2 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 7)

(a) 種特異的 C D 2 0 0 A R - L ペプチドを皮内 (I D) 注射し、(b) 2 4 時間後、イミキモドを皮膚に局所的に適用し、1 0 ～ 1 5 分間吸収させ、(c) C D 2 0 0 A R - L と混合した自家腫瘍溶解物を皮内注射する、項目 1 2 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 8)

前記種特異的 C D 2 0 0 A R - L ペプチドが、約 5 μ g / k g の投薬量で皮内 (I D) 注射される、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記イミキモド (1 パッケージ) が、5 % クリーム / 1 2 . 5 g の投薬量で前記皮膚に局所的に適用される、項目 2 7 または 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

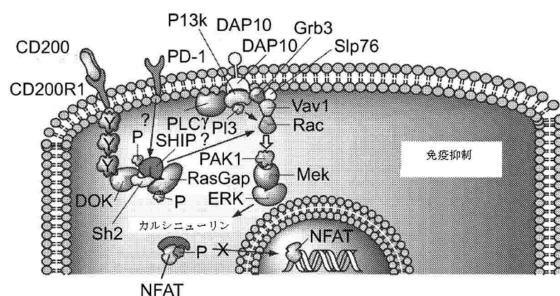
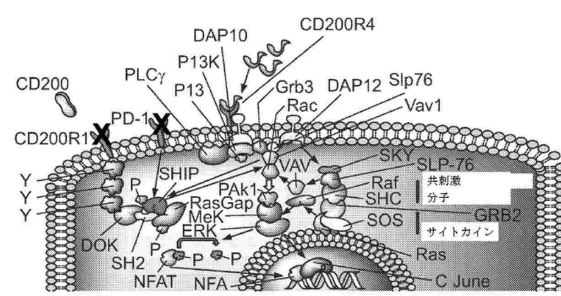
前記自家腫瘍溶解物の約 5 0 0 μ g のタンパク質を、約 5 μ g / k g の C D 2 0 0 A R - L と混合し、皮内注射する、項目 2 7 ～ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 1)

治療レジメンが、3 週間にわたって毎週繰り返される、項目 2 7 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記治療レジメンが、3 週間にわたって毎週、次いで 3 ヶ月間にわたって 4 週間毎に 1 回、次いで、必要に応じて 6 ～ 8 週間毎に繰り返される、項目 3 1 に記載の方法。

【図面】**【図 1 A】****【図 1 B】**

10

20

30

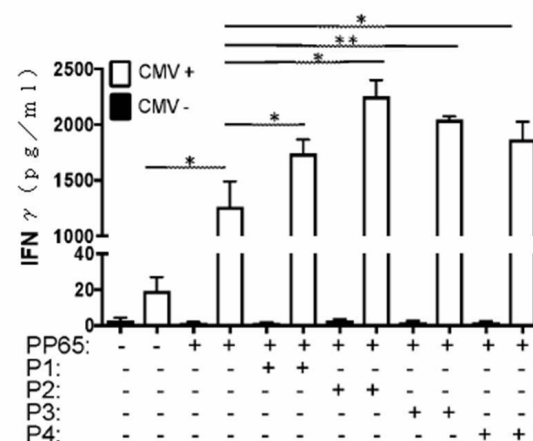
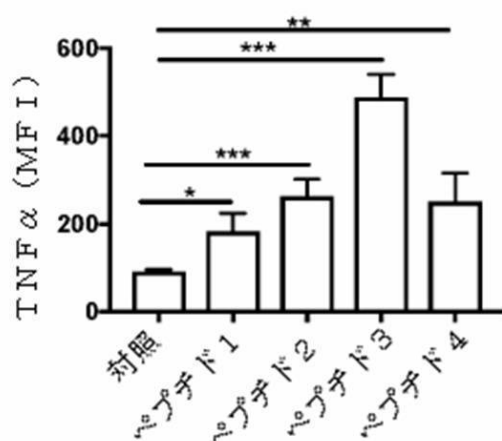
40

50

【図 2 B】

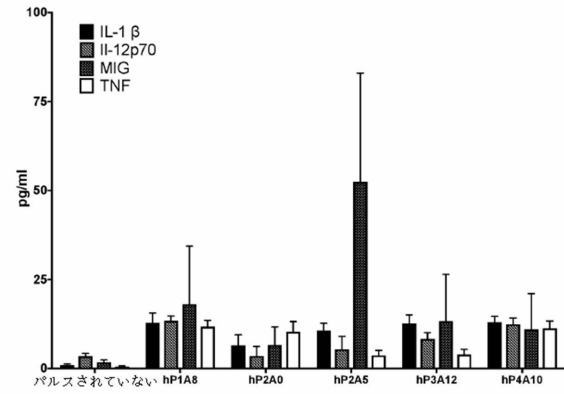
Group	IL1β (MFI)
対照 (Control)	~100
100 μg	~2000
200 μg	~3700
300 μg	~1900
400 μg	~2400

【図 2 D】

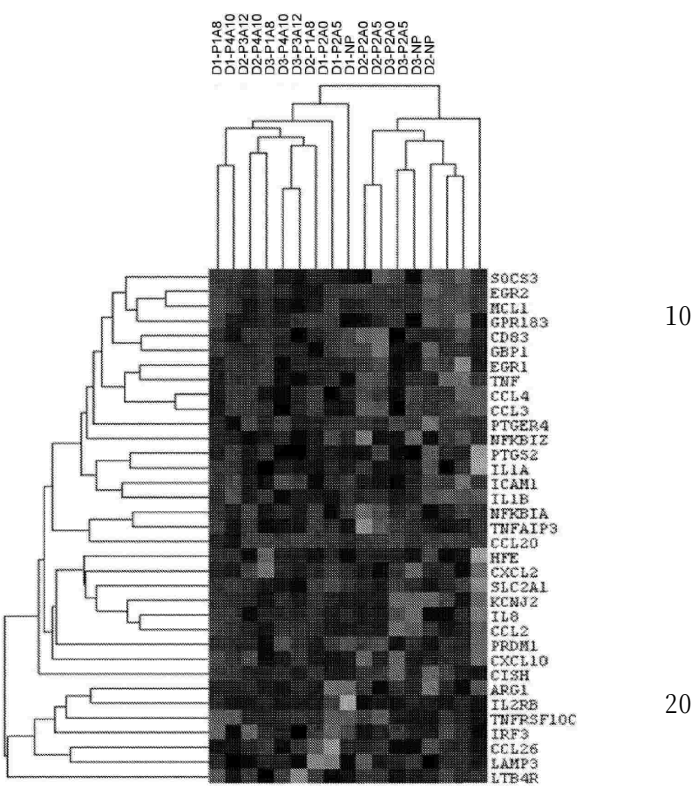


50

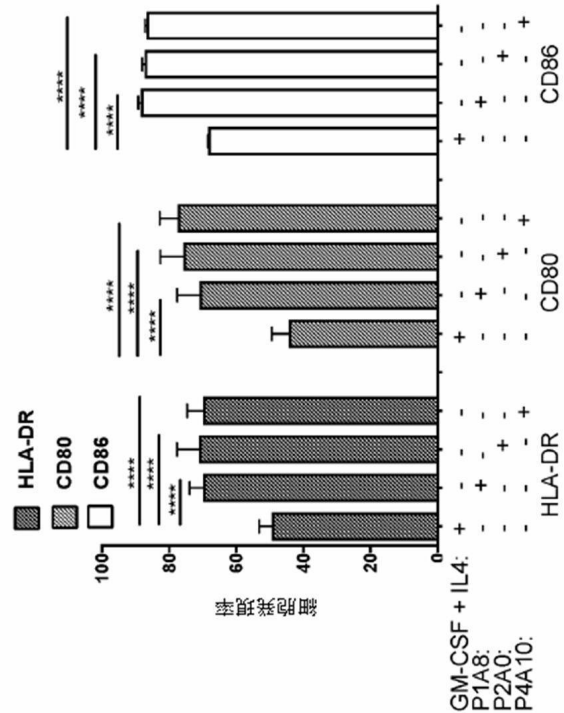
【図 3 A】



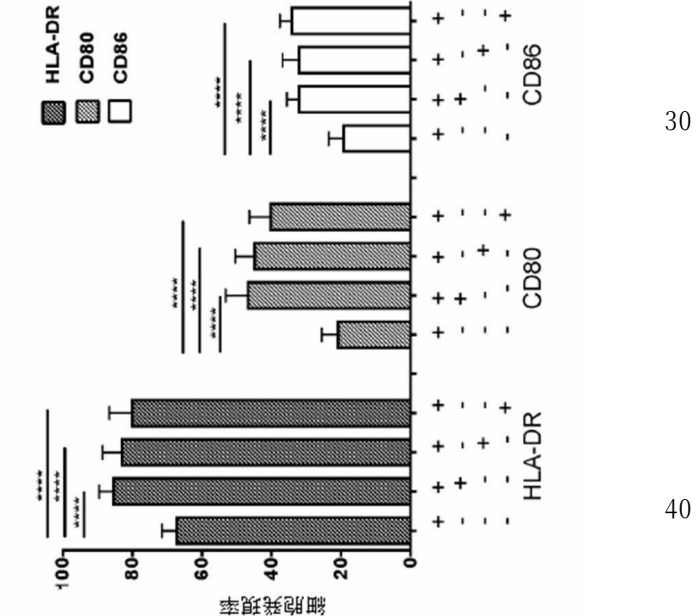
【図 3 B】



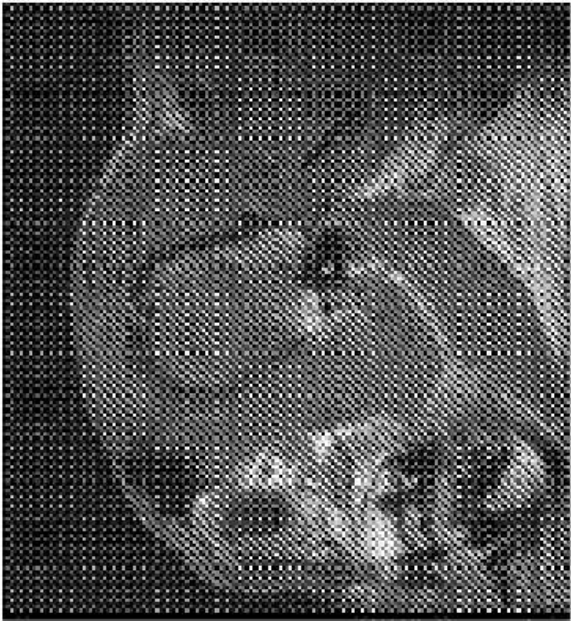
【図 4 A】



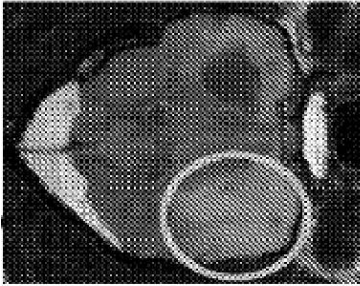
【図 4 B】



【図 5 C】



【図 5 D】

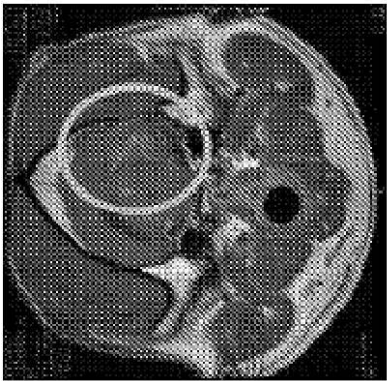


10

【図 5 E】



【図 5 F】



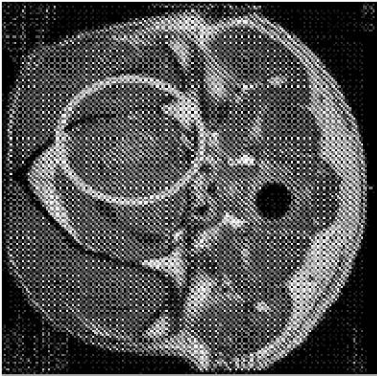
20

30

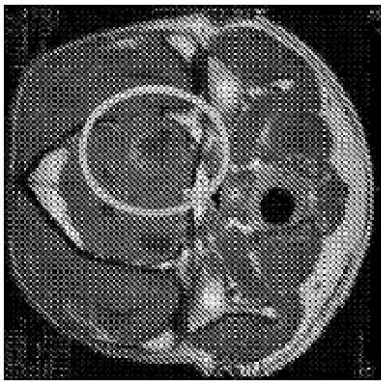
40

50

【図 5 G】

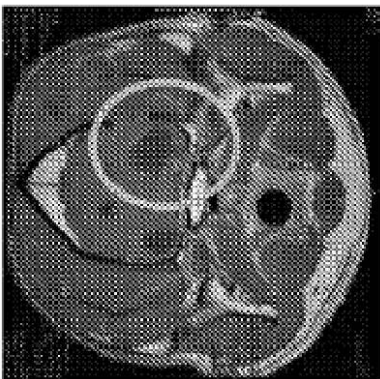


【図 5 H】

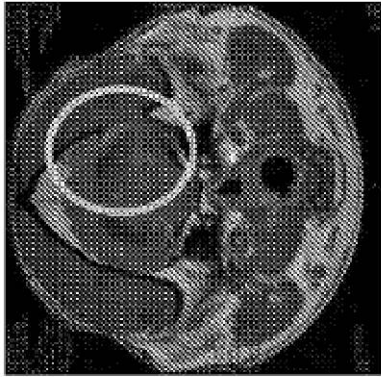


10

【図 5 I】

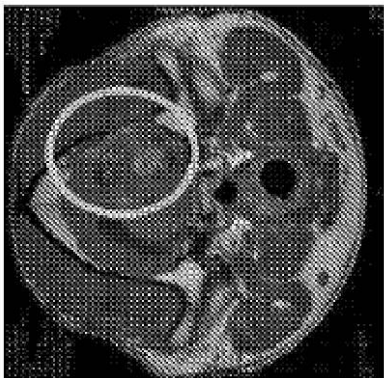


【図 5 J】

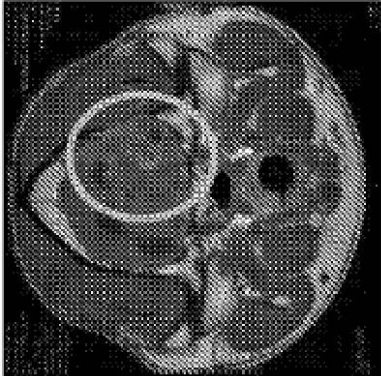


20

【図 5 K】



【図 5 L】

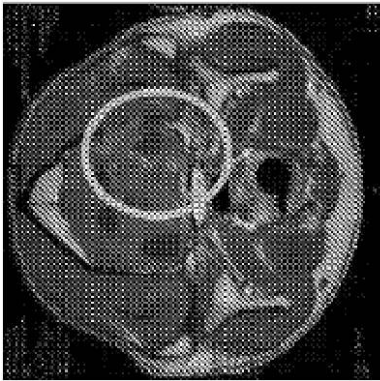


30

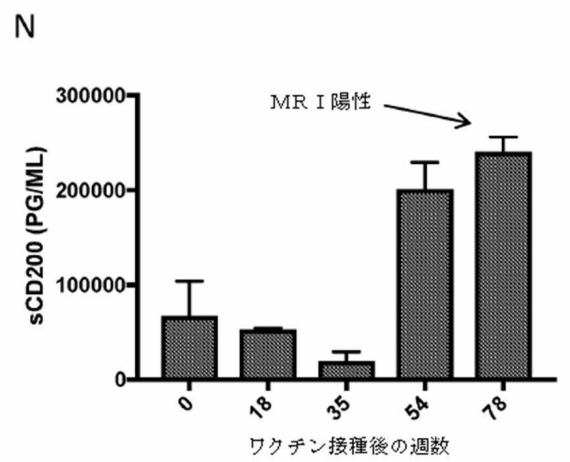
40

50

【図 5 M】

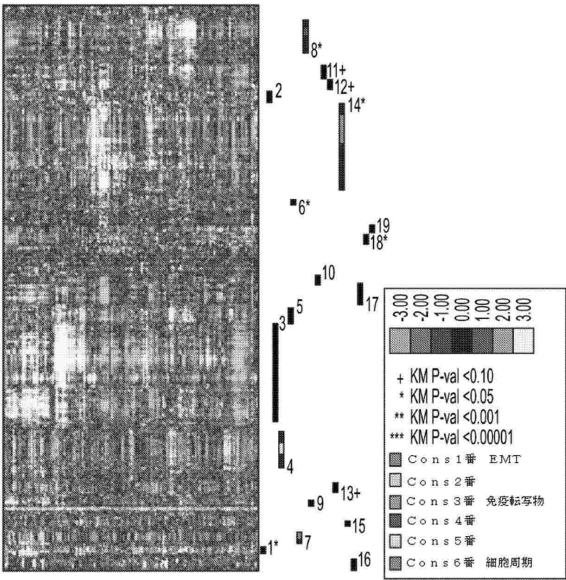


【図 5 N】

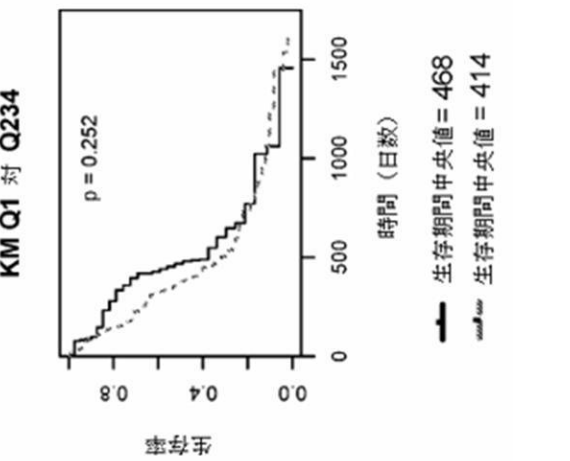


10

【図 6 A】



【図 6 B】



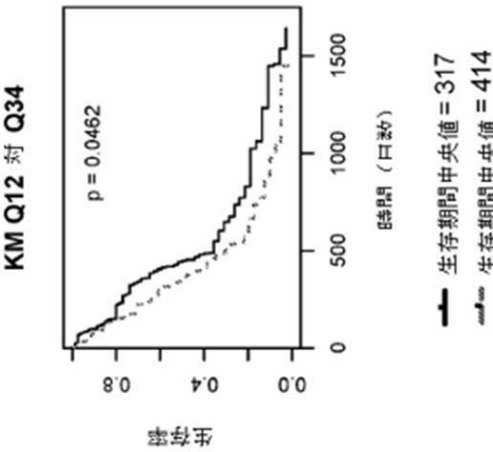
20

30

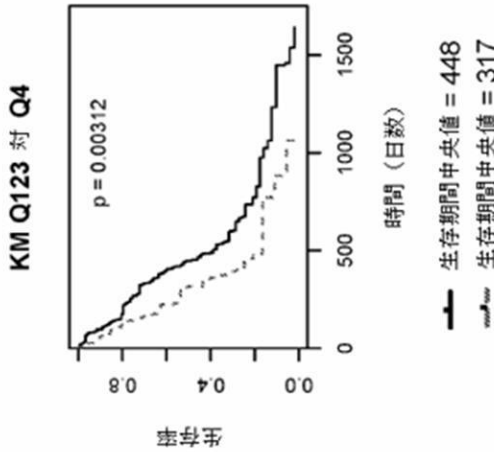
40

50

【図 6 C】



【図 6 D】

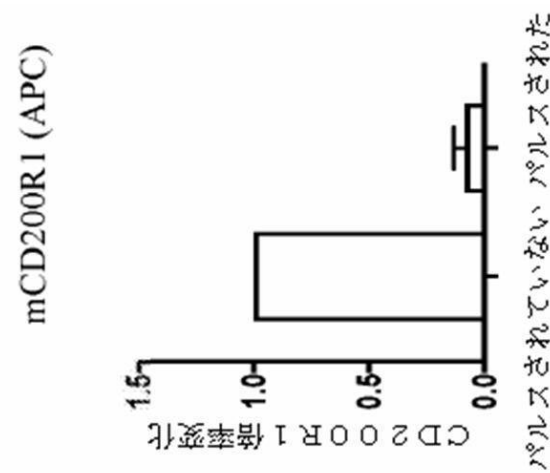


10

【図 6 E】

インデックス 名称	P 値	調整された p 値	Z スコア	組み合わせたスコア
1 免疫系__ホモサピエンス_R-HSA-168256	1.116e-49	8.886e-47	-2.23	251.61
2 リンパ球と非リンパ球細胞との間の免疫調節相互作用__ホモサピエンス_R-HSA-198933	4.226e-37	1.682e-34	-2.00	167.65
3 細胞外マトリックス組織化__ホモサピエンス_R-HSA-1474244	1.460e-29	3.875e-27	-2.10	139.12
4 獲得免疫系__ホモサピエンス_R-HSA-1280218	2.066e-21	3.290e-19	-2.25	107.12
5 クラス A/1 (ロドプシン様受容体)__ホモサピエンス_R-HSA-373076	9.042e-21	1.200e-18	-2.10	96.97
6 ケモカイン受容体はケモカインに結合する__ホモサピエンス_R-HSA-380108	2.178e-22	4.334e-20	-1.93	96.39
7 免疫系におけるサイトカインシグナル伝達__ホモサピエンス_R-HSA-1280215	5.330e-17	6.061e-15	-2.35	88.11
8 GPCR リガンド結合__ホモサピエンス_R-HSA-500792	1.172e-15	1.166e-13	-2.20	75.57
9 先天性免疫系__ホモサピエンス_R-HSA-168249	1.917e-13	1.272e-11	-2.33	68.28
10 ペプチドリガンド結合受容体__ホモサピエンス_R-HSA-375276	1.771e-15	1.566e-13	-1.91	64.80

【図 7 A】



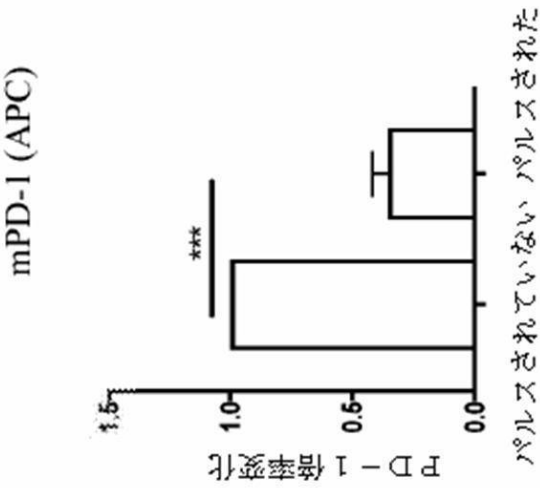
20

30

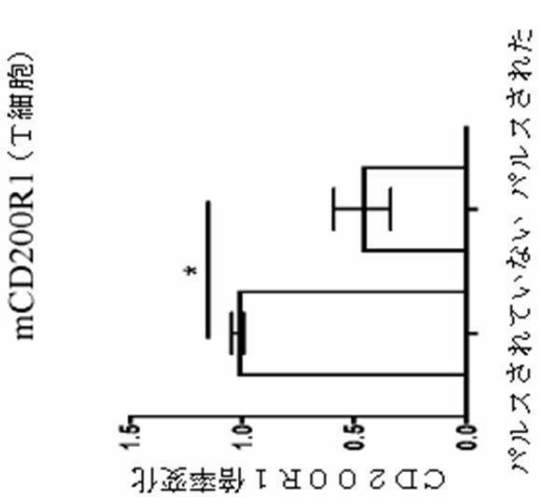
40

50

【図 7 B】

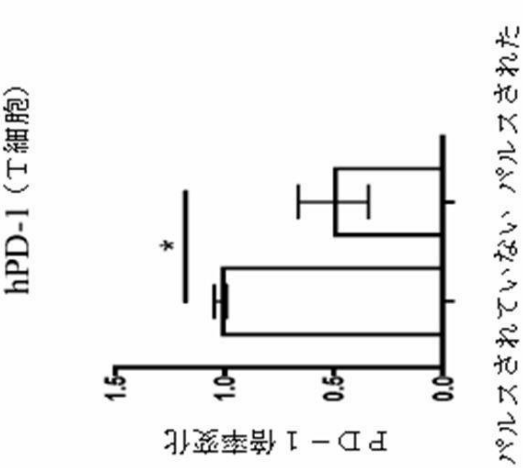


【図 7 C】

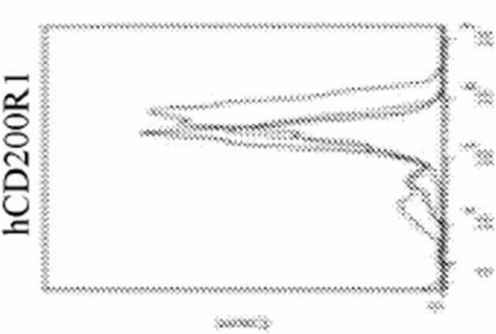


10

【図 7 D】



【図 7 E】



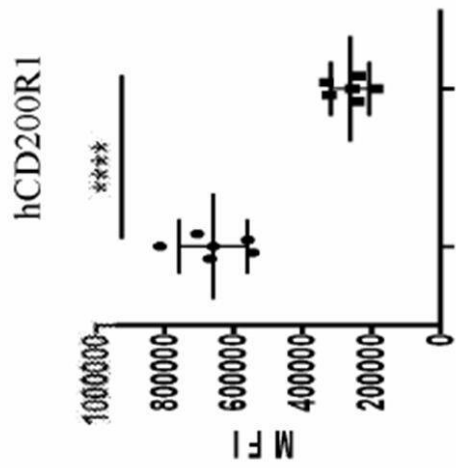
20

30

40

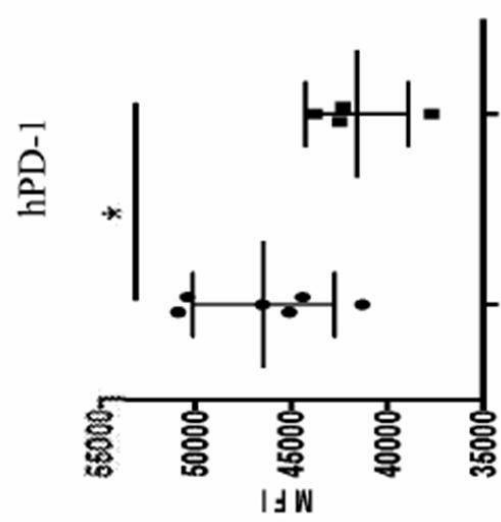
50

【図 7 F】



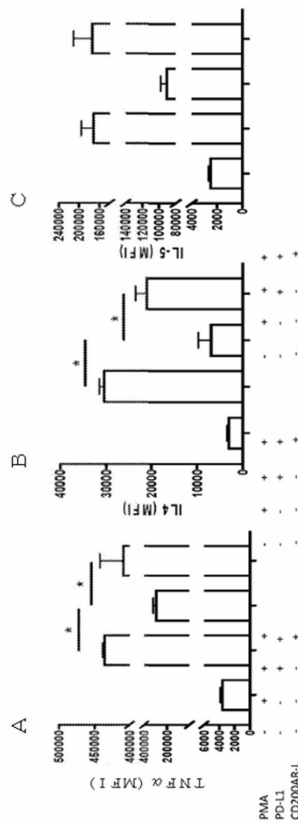
パルスされていない パルスされた

【図 7 G】



パルスされていない、パルスされた

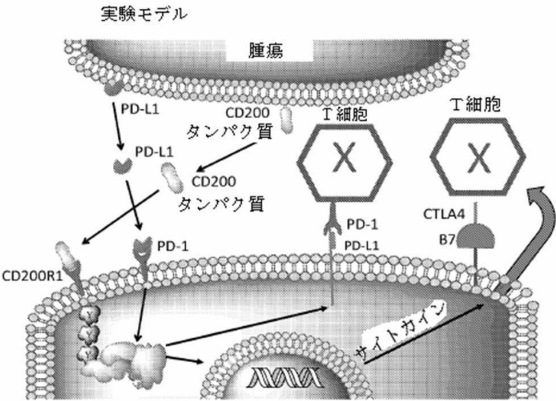
【図 8】



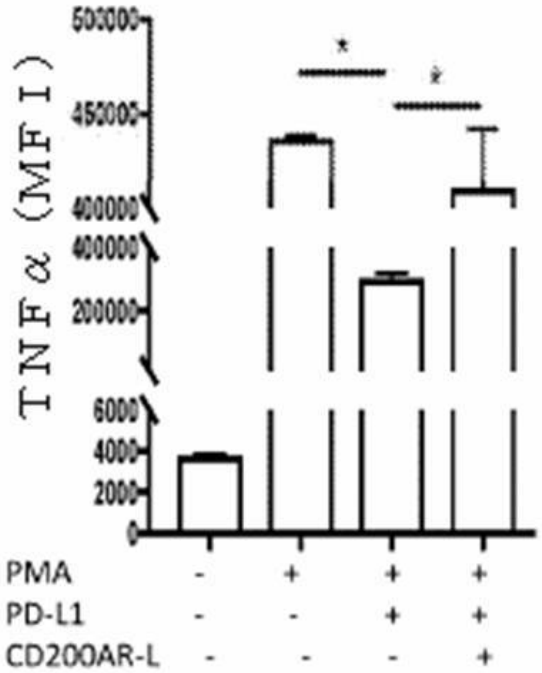
【図 9】



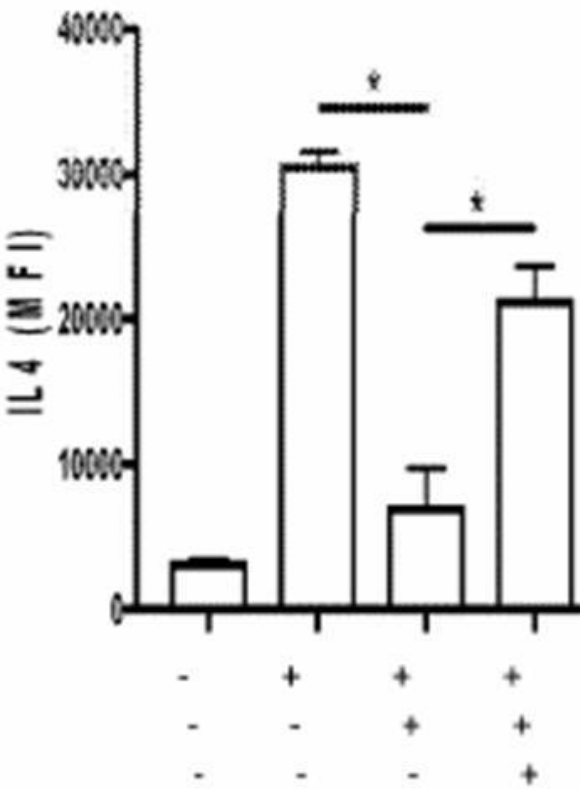
【図 1 0】



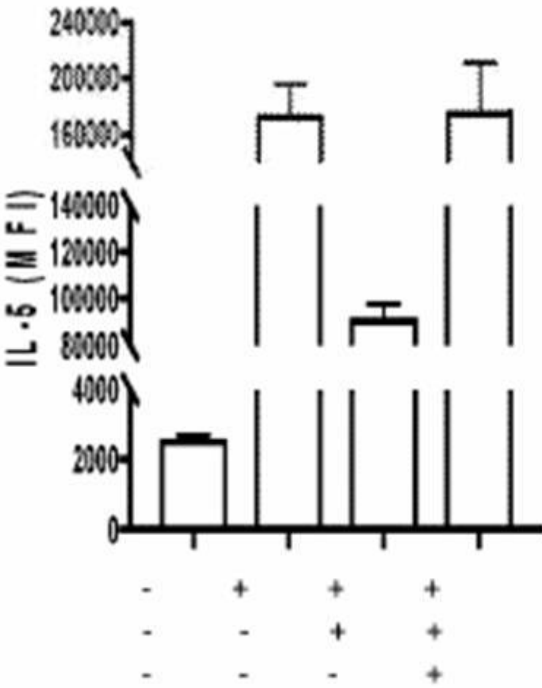
【図 1 1 A】



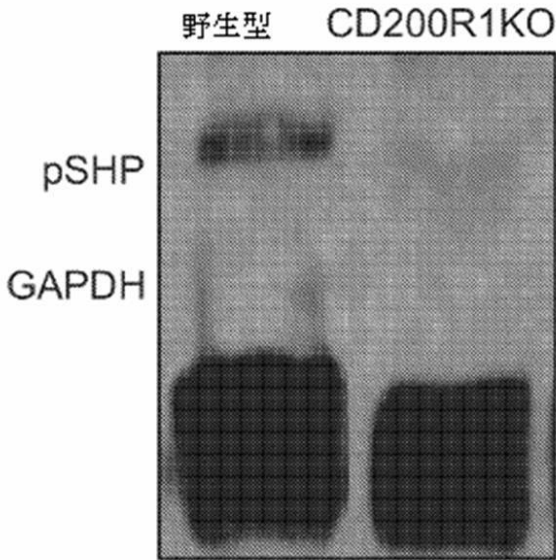
【図 1 1 B】



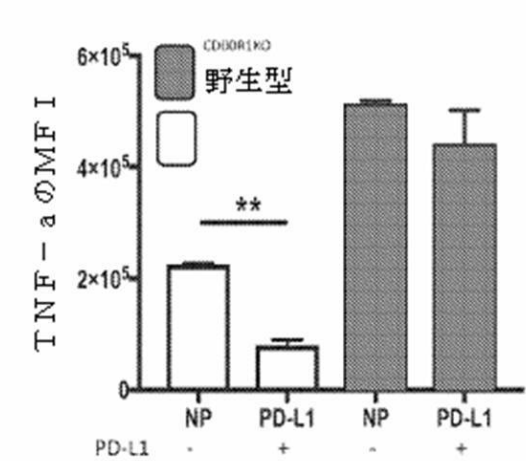
【図 1 1 C】



【図 1 2 A】

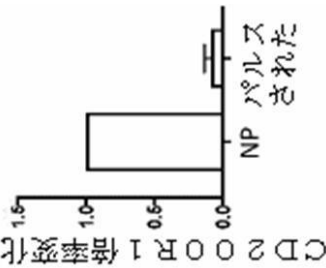


【図 1 2 B】

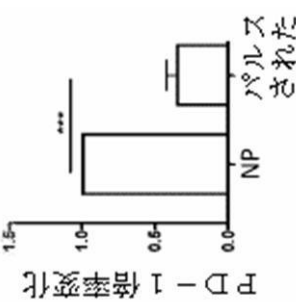


10

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



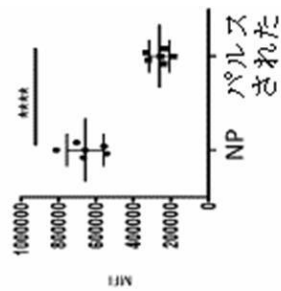
20

30

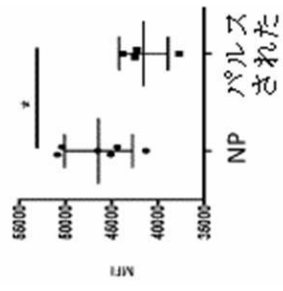
40

50

【図 1 3 C】

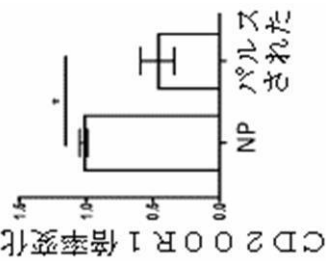


【図 1 3 D】

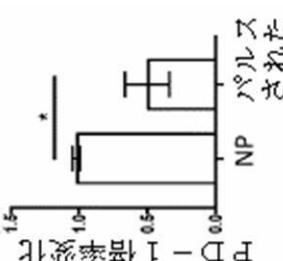


10

【図 1 3 E】

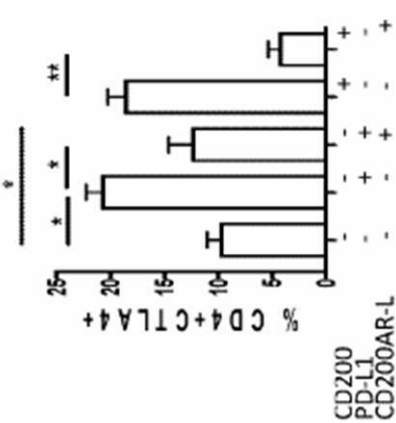


【図 1 3 F】

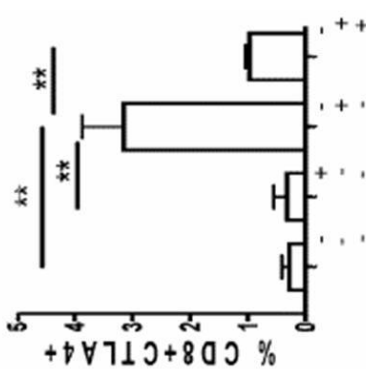


20

【図 1 4 A】



【図 1 4 B】

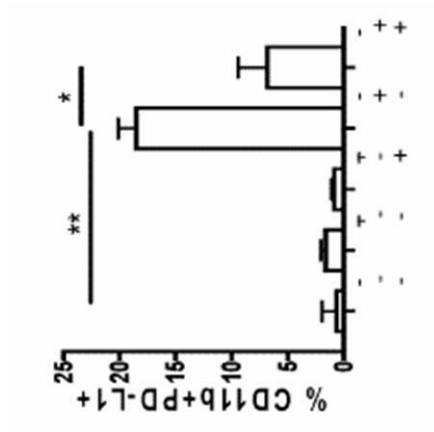


30

40

50

【図 1 4 C】



10

【配列表】

0007663237000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 7/08 (2006.01)

F I

C 0 7 K 7/08

アラムナイ センター 6 0 0

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 3 2 6 0 2 8 (U S , A 1)

Leukemia, 2015年, Vol.29, pp.1952-1954, doi:10.1038/leu.2015.62

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

C 0 7 K 7 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)