

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6285923号
(P6285923)

(45) 発行日 平成30年2月28日(2018.2.28)

(24) 登録日 平成30年2月9日(2018.2.9)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C O 7 K 14/47 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C O 7 K 14/47
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10

請求項の数 11 (全 219 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-518603 (P2015-518603)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月21日(2013.6.21)
 (65) 公表番号 特表2015-526064 (P2015-526064A)
 (43) 公表日 平成27年9月10日(2015.9.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/047009
 (87) 国際公開番号 W02013/192504
 (87) 国際公開日 平成25年12月27日(2013.12.27)
 審査請求日 平成28年6月21日(2016.6.21)
 (31) 優先権主張番号 61/776,234
 (32) 優先日 平成25年3月11日(2013.3.11)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/807,135
 (32) 優先日 平成25年4月1日(2013.4.1)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 509239956
 トラスティーズ・オブ・ダートマス・カレッジ
 アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03755, ハノーヴァー, ローブ・フェリー・ロード 11, オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー
 (73) 特許権者 513200313
 キングス・カレッジ・ロンドン
 イギリス国ロンドン ダブリューシー2アール・2エルエス, ザ・ストランド
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規V I S T A - I g コンストラクト及び自己免疫、アレルギー性及び炎症性障害の処置のためのV I S T A - I g の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下から選択される単離又は組換えV I S T A - I g 融合タンパク質又は細胞：

(1) (i) 配列番号2、4、5、16から25、36、37、68、69、72又は73又は75におけるV I S T A ポリペプチド配列の細胞外ドメインに対して少なくとも90%の配列同一性がある少なくとも1つの免疫抑制ポリペプチド、又は該細胞外ドメインの免疫抑制断片であって少なくとも50アミノ酸を具備する該断片と、

(i i) 少なくとも18アミノ酸残基を具備するリンカーであって、その少なくとも8個はグリシン残基である少なくとも1つのリンカーと、

(i i i) 少なくとも1つのI g F c タンパク質又はその断片と、を具備し、

前記リンカーが(i)の免疫抑制ポリペプチド又は断片及び(i i i)のI g F c タンパク質又は断片に介入し、得られるV I S T A - I g 融合タンパク質が、インビボで前記リンカーを欠く同一融合タンパク質よりも強力な免疫抑制活性を引き出す、単離又は組換えV I S T A 融合タンパク質；

(2) 前記ポリペプチド(i)が、ヒト又はマウスV I S T A の細胞外ドメイン又は細胞外領域の少なくとも50、100、150、200、250、300、又は少なくとも310又は311アミノ酸であるその断片に対して少なくとも95%の配列同一性を有する少なくとも1つのポリペプチドを具備する、(1)のV I S T A - I g 融合タンパク質；

(3) 融合タンパク質が、ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3又はI g G 4 F c 領域

10

20

又はその断片もしくは変異体を具備する、(1)のVISTA-Ig融合タンパク質；

(4) 融合タンパク質が、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4Fc領域又はその断片もしくは変異体を具備する；補体結合及び／又はFcR結合を調整する（増加又は減少させる）又はFcR結合を減少させるか又は排除する1以上の修飾、又はFcR結合を増加させる1以上の修飾を具備する少なくとも1つのFc領域を含有する；又はグリコシル化もしくはエフェクター機能を調整する（増加、減少又は変化させる）か又はFcR結合を減少させるかもしくは排除する1以上の修飾を具備する少なくとも1つのFc領域を含有する、(1)のVISTA-Ig融合タンパク質；

(5) 少なくとも9個、10個、11個、12個、13個、14個又は15個のグリシン残基を具備する少なくとも1つのリンカーを含有する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

10

(6) 少なくとも19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45又は50アミノ酸残基を具備する少なくとも1つのリンカーを含有する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

(7) 配列番号2、4、5、16から25、36もしくは37のポリペプチド配列の細胞外ドメイン又は少なくとも50、100、150、200、250もしくは300アミノ酸を具備するその断片に対してそれぞれが少なくとも約90%、95%又はそれ以上の配列同一性を保持する少なくとも2、3又は4個のポリペプチドを具備する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

(8) 配列番号2、4、5、16から25、36又は37のポリペプチド配列の細胞外ドメイン又は少なくとも100アミノ酸を具備するその断片に対してそれぞれが少なくとも約90%の配列同一性を保持する少なくとも2、3又は4個のポリペプチドを具備する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

20

(9) リンカーの残基の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%がグリシン及び／又はセリン残基から構成される少なくとも1つのリンカーを具備する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

(10) T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、前記少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%高い、又は少なくとも1から1.5倍、1.0から2.0倍、2.0から3.0倍、3.0から4.0倍、4.0から5.0倍、5.0から6.0倍、6.0から7.0倍、7.0から8.0倍、8.0から9.0倍、9.0から10.0倍高い免疫抑制活性を示す、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

30

(11) 配列番号2、4、5、16から25、36もしくは37のポリペプチド配列又は少なくとも50、75、100、125、150、175、200、225、250、275もしくは300アミノ酸を具備するその断片に対する少なくとも約90から95%の配列同一性を有する少なくとも1つのVISTAポリペプチドを具備する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

(12) 少なくとも1つのIgG、IgG1、IgG2、IgG2a、IgM、IgE又はIgA又はヒトIgG1の定常及びヒンジ領域を具備する少なくとも1つのIgタンパク質を具備する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

40

(13) アミノ酸残基32から190を具備する少なくとも1つのVISTAの細胞外ドメイン又はアミノ酸16から194を具備するVISTAの細胞外IgVドメインを具備する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

(14) 少なくとも2、3、4、5、6、7、8コピー又はそれ以上のコピーのVISTAタンパク質又は少なくとも50、75、100、125、150、175、200、225、250、275もしくは300アミノ酸を具備するその断片と、少なくとも2コピーのVISTAタンパク質と、IgG1Fc又は非FcR結合IgG1と、を具備する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

50

(15) オリゴマー化ドメインのN-末端に連結される、少なくとも1つの細胞外ドメイン又はVISTAの断片を具備する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

(16) GCN4、COMP、SNARE、CMP、MAT、1個のNLRCを含有するLLR、NOD2ヌクレオチド結合NLRC2、1個のNLRCを含有するLRR、NOD2ヌクレオチド結合NLRC2又はPSORAS1から選択されるオリゴマー化ドメインのN-末端に連結される、少なくとも1つの細胞外ドメイン又はVISTAの断片を具備する、上記の何れかに記載の単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質；

(17) 上記の何れかに記載のVISTA-Ig融合タンパク質を発現する組み換え細胞であって、酵母、細菌、真菌、昆虫、鳥類、ツメガエル又は哺乳動物細胞から選択される細胞；

(18) 上記の何れかに記載のVISTA-Ig融合タンパク質を発現する組み換え細胞であって、酵母、細菌、真菌、昆虫、鳥類、ツメガエル又は哺乳動物細胞から選択され、PD-1、PD-L1、PD-2、PD-L2タンパク質もしくは融合タンパク質、又は、PD-1、PD-L1、PD-2、PD-L2の何れかに特異的に結合する抗体もしくは抗体断片をさらに発現する、細胞。

【請求項2】

請求項1に記載の治療的有効量のVISTA-Ig融合タンパク質又は細胞を含有する、医薬的に許容可能な組成物であって、非経口、静脈内、皮下、経皮、経口、筋肉内、膈内、口内、肛門又は鼻腔投与を含むがこれらに限定されない経路による投与に好適な、前記組成物。

【請求項3】

請求項1又は2に記載のVISTA-Ig融合タンパク質又は組成物又は細胞を含有する医薬であって、必要とする対象において、

(i) T細胞及び／又は好中球及び／又は単球及び／又は白血球増殖を阻害する、又は

(ii) T細胞上のFoxp3の発現を誘導する、又は

(iii) T細胞活性化を阻害する、又は

(iv) 1以上のT細胞活性化マーカーの発現を阻害する、又は

(v) 濾胞過形成を阻害する、又は

(vi) 骨髄造血を阻害する、又は

(vii) T細胞浸潤を阻害する及び／又はTh17細胞増殖を誘導する

ために使用され、

ここで、前記T細胞が、CD4+T細胞、CD8+T細胞、細胞メモリー細胞、エフェクター細胞、休止T細胞及び活性化T細胞の1以上を含む、前記医薬。

【請求項4】

前記対象が、骨髄性白血病、血液リンパ系腫瘍、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性、慢性骨髄性白血病、ヘアリー細胞、T細胞前リンパ球性白血病、若年性骨髄単球性白血病を包含し得る白血病又はリンパ腫などのT細胞障害を有する、又は慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫（ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症など）、脾臓周辺帯リンパ腫、形質細胞新生物、形質細胞性骨髄腫、形質細胞腫、モノクローナル免疫グロブリン沈着症、重鎖疾患、MALTリンパ腫とも呼ばれる節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫（NMZL）、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦隔（胸腺）大B細胞リンパ腫、血管内大B細胞リンパ腫、原発性体液性リンパ腫、パーキットリンパ腫／白血病、成熟T細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞新生物、T細胞前リンパ球性白血病、T細胞大型顆粒リンパ球性白血病、侵襲性NK細胞白血病、成人T細胞白血病／リンパ腫、節外性NK／T細胞リンパ腫、鼻型、腸管症型T細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、芽細胞性NK細胞リンパ腫、菌状息肉腫／セザリー症候群、原発性皮膚CD30-陽性T細胞リンパ増殖性障害、原発性皮膚

10

20

30

40

50

未分化大細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症、血管免疫芽細胞性芽細胞性T細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、古典的ホジキンリンパ腫、結節硬化型、混合細胞型、リンパ球豊富型又はリンパ球減少型又は非減少型、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫から選択されるリンパ腫又は白血病を有する、請求項3に記載の医薬。

【請求項5】

請求項3又は4に記載の医薬であって、

(1) 医薬が自己免疫、炎症性又はアレルギー性障害を有する対象における使用のためのものである；

(2) 医薬が実質的にアポトーシスを促進しない；

(3) 医薬が実質的にB細胞増殖を阻害しない；

(4) 医薬がT細胞免疫性を抑制する；

(5) 医薬が炎症を抑制する；

(6) 医薬がIL-6、CRP、TNF、IL-10、IL-17、IGN-γ、エオタキシン、IP-10、MCP-1及びMIGなどの炎症マーカーの低下をもたらす；

(7) 医薬が自己免疫性を抑制する；

(8) 医薬がアレルギー性反応を抑制する；

(9) 医薬がPD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4又はICOS融合タンパク質又はこれらに特異的な抗体のような別の免疫調節物質の使用をさらに含む；

(10) 医薬が、酸逆流／胸焼け、ざ瘡、尋常性ざ瘡、アレルギー及び過敏症、アルツハイマー病、喘息、アテローム性動脈硬化症及び血管閉塞性疾患、場合によってはアテローム性動脈硬化症、虚血性心疾患、心筋梗塞、脳卒中、末梢血管疾患又は血管ステント再狭窄、自己免疫疾患、気管支炎、癌、心炎、白内障、セリアック病、慢性痛、慢性前立腺炎、肝硬変、大腸炎、結合組織疾患、場合によっては全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、多発性筋炎、皮膚筋炎又はシェーグレン症候群、角膜疾患、クローン病、結晶性関節症、場合によっては痛風、偽痛風、ピロリン酸カルシウム結晶沈着症、認知症、皮膚炎、糖尿病、ドライアイ、湿疹、浮腫、肺気腫、線維筋痛症、胃腸炎、歯肉炎、糸球体腎炎、心疾患、肝炎、高血圧、超過敏症、炎症性腸疾患、外傷又は虚血の結果を含む炎症状態、インスリン抵抗性、間質性膀胱炎、虹彩毛様体炎、虹彩炎、関節痛、関節炎、関節リウマチ、ライム病、メタボリックシンドローム（シンドロームX）、多発性硬化症、筋炎、腎炎、肥満、ブドウ膜炎を含む眼疾患、骨減少、骨粗しょう症、パーキンソン病、骨盤炎症性疾患、歯周病、多発動脈炎、多発性軟骨炎、リウマチ性多発筋痛、乾癬、再かん流傷害、関節リウマチ、リウマチ性疾患、場合によっては関節リウマチ、変形性関節症又は乾癬性関節炎、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、副鼻腔炎、シェーグレン症候群、けいれん性結腸、脊椎関節症、場合によっては強直性脊椎炎、反応性関節炎又はライター症候群、全身性カンジダ症、腱炎、移植拒絶、UTI's、膣炎、アテローム性動脈硬化性の血管疾患を含む血管疾患、血管炎、場合によっては結節性多発動脈炎、ヴェーゲナー肉芽腫、チャグ・ストラウス症候群又は脈管炎から選択される炎症性、アレルギー性、又は自己免疫性状態の治療における使用のためのものである；

(11) 医薬が、細胞介在性又は抗体介在性自己免疫疾患を有する対象における使用のためのものであって、自己免疫疾患が、多発性硬化症、I型糖尿病、II型糖尿病、卵巣炎又は甲状腺炎を含むか、または後天性免疫不全症候群(AIDS)、後天性脾臓萎縮症、急性前部ブドウ膜炎、急性播種性脳脊髄炎(ADDEM)、急性痛風性関節炎、急性壊死性出血性白質脳炎、急性又は慢性副鼻腔炎、急性化膿性髄膜炎(又は他の中枢神経系炎症性障害)、急性の重篤な炎症、アジソン病、副腎炎、成人発症糖尿病(II型糖尿病)、成人発症特発性副甲状腺機能低下症(AOIH)、無ガンマグロブリン血症、無顆粒球症、脈管炎、場合によっては大血管脈管炎を含む血管炎、場合によっては、リウマチ性多発筋痛及び巨細胞(高安)関節炎、アレルギー性状態、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、アレルギー性超過敏性疾患、アレルギー性神経炎、アレルギー反応、円形脱毛症、全頭脱毛症、アルポート症候群、肺炎、場合によ

10

20

30

40

50

てはアレルギー性肺肺炎又は線維性肺肺炎、アルツハイマー病、アミロイドーシス、筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルー・ゲーリック病）、好酸球関連障害、場合によっては好酸球増加症、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、血管拡張症、抗体介在性腎炎、抗GBM／抗TBM腎炎、抗原－抗体複合体介在性疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、抗リン脂質症候群（APS）、アフタ、アフタ性口内炎、再生不良性貧血、不整脈、動脈硬化症、動脈硬化性障害、関節炎、場合によっては関節リウマチ、例えば急性関節炎又は慢性関節リウマチ、進行性慢性関節炎、変形性関節炎、回虫症、アスペルギルス腫、好酸球を含有する肉芽腫、アスペルギルス症、アスペルミオジェネシス、喘息、場合によっては気管支喘息、気管支の喘息又は自己免疫喘息、毛細血管拡張性運動失調、失調性硬化症、アテローム性動脈硬化症、自閉症、自己免疫血管浮腫、自己免疫再生不良性貧血、自己免疫萎縮性胃炎、自己免疫糖尿病、自己免疫精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫疾患、膠原病が関連する自己免疫障害、自己免疫自律神経障害、自己免疫耳疾患、場合によっては自己免疫内耳疾患（AGED）、自己免疫甲状腺炎などの甲状腺炎を含む自己免疫内分泌疾患、自己免疫消化器症候群、自己免疫性腺機能不全、自己免疫難聴、自己免疫溶血、自己免疫肝炎、自己免疫肝臓病学的障害、自己免疫高脂血症、自己免疫不全症、自己免疫内耳疾患（AIED）、自己免疫心筋炎、自己免疫好中球減少症、自己免疫脾炎、自己免疫多腺性内分泌障害、自己免疫多腺性症候群I型、自己免疫網膜症、自己免疫血小板減少性紫斑病（ATP）、自己免疫甲状腺疾患、自己免疫蕁麻疹、自己免疫介在性胃腸疾患、軸索及びニューロンのニューロパチー、バロー病、ベーチェット病、良性家族性及び虚血－再かん流傷害、良性リンパ球性血管炎、ベルガー病（IGA腎症）、愛鳥家肺、失明、ベック病、細気管支炎閉塞性（非移植）vs NSIP、気管支炎、気管支肺アスペルギルス症、バートン症候群、水疱性類天疱瘡、カプラン症候群、心筋症、心血管系虚血、キャスルマン病、セリアック病、セリアックスプルー（グルテン腸症）、小脳変性症、脳虚血及び血管新生を伴う疾患、シャーガス病、チャネル病、場合によってはてんかん、CNSのチャネル病、脈絡網膜炎、脈絡膜炎、自己免疫血液障害、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、慢性接触皮膚炎、慢性好酸球性肺炎、慢性疲労症候群、慢性肝炎、慢性超過敏性肺臓炎、慢性炎症性関節炎、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー（CIDP）、慢性難治性炎症、慢性粘膜皮膚性カンジダ症、慢性ニューロパチー、場合によってはIgM多発性ニューロパチー又はIgM介在性ニューロパチー、慢性閉塞性気道疾患、慢性肺炎症性疾患、慢性再発性多巣性骨髄炎（CRMO）、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）又は亜急性甲状腺炎、チャグ・ストラウス症候群、癰痕性類天疱瘡／良性粘膜類天疱瘡、CNS炎症性障害、CNS脈管炎、セリアック病、コーガン症候群、クリオグロブリン血症、ポリープ性大腸炎、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、潰瘍性大腸炎、膠原線維性大腸炎、T細胞浸潤を含む状態及び慢性炎症反応、先天性心臓ブロック、先天性風疹感染、クームス陽性貧血、冠動脈疾患、コクサッキー心筋炎、CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象）、クローン病、クリオグロブリン血症、クッシング症候群、毛様体炎、場合によっては慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、虹彩毛様体炎又はフックス毛様体炎、嚢胞性線維症、サイトカイン誘導性毒性、聴覚消失、変形性関節炎、脱髄性疾患、場合によっては自己免疫脱髄性疾患、脱髄性ニューロパチー、デング熱、ヘルペス状皮膚炎及びアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎を含む皮膚炎、皮膚筋、急性炎症性要因を伴う皮膚炎、デビック病（視神経脊髄炎）、糖尿病性大動脈障害、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、びまん性間質性肺線維症、拡張型心筋症、円板状狼瘡、白血球漏出を含む疾患、ドレスラー症候群、デュプュイトラン拘縮、エコーウイルス感染、アレルギー性又はアトピー性湿疹を含む湿疹、脳炎、例えばラスマッセン脳炎及び辺縁系及び／又は脳幹脳炎、脳脊髄炎、場合によってはアレルギー性脳脊髄炎又はアレルギー性脳脊髄炎及び実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、動脈内過形成、心内膜炎、内分泌性眼障害、子宮内膜症、心内膜心筋線維症、水晶体過敏性眼内炎、眼内炎、アレルギー性腸炎、好酸球増加症－筋痛症候群、好酸球性筋膜炎、流行性角結膜炎、後天性表皮水疱症（EBA）、上強膜、上強膜炎、エプスタイン－バーウイルス感染、持続性隆起性紅斑、多形性紅斑、癩性結節性紅斑、結節性紅斑、胎児赤芽球症、食道

10

20

30

40

50

運動不全、本態性混合型クリオグロブリン血症、エバンス症候群、実験的アレルギー性脳脊髄炎（E A E）、第V I I I因子欠乏症、農夫肺、フェブリスリウマチ、フェルティー症候群、線維筋痛症、線維性肺炎、フィラリア症、巣状分節性糸球体硬化症（F S G S）、食中毒、胃萎縮、巨細胞関節炎（側頭関節炎）、巨細胞肝炎、巨細胞多発性筋痛、糸球体腎炎、慢性又は急性糸球体腎炎（例えば原発性G N）などのネフローゼ症候群を伴うか又は伴わない糸球体腎炎（G N）、グッドパスチャー症候群、痛風性関節炎、顆粒球輸血関連症候群、リンパ腫様肉芽腫症を含む肉芽腫症、多発性血管炎を伴う肉芽腫症（G P A）、肉芽腫様ブドウ膜炎、グレーブズ病、ギラン・バレー症候群、滴状乾癬、血色素尿症発作、ハーマン＝リッチ症候群、橋本病、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、ヘモクロマトーシス、溶血性貧血又は自己免疫性溶血性貧血（A I H A）を含む免疫性溶血性貧血、溶血性貧血、血友病A、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）感染、痛覚過敏、低ガンマグロブリン血症、性腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、特発性尿崩症、特発性顔面麻痺、特発性甲状腺機能低下症、特発性I g A腎症、特発性膜性G N又は特発性膜性腎症、特発性ネフローゼ症候群、特発性肺線維症、特発性スプルー、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、I g A腎症、I g E介在性疾患、場合によってはアナフィラキシー及びアレルギー性又はアトピー性鼻炎、I g G 4関連硬化性疾患、回腸炎レジオナリス、免疫複合体腎炎、サイトカイン及びTーリンパ球が介在する急性及び遅発性超過敏性を伴う免疫反応、免疫介在性G N、成人又は急性呼吸窮迫症候群（A R D S）を含む免疫調節性リボタンパク質、封入体筋炎、感染性関節炎、抗精子抗体による不妊症、ブドウ膜全体又は一部の炎症、炎症性腸疾患（I B D）炎症性過剰増殖皮膚疾患、炎症性ミオパチー、インスリン依存性糖尿病（I型）、睪島炎、間質性膀胱炎、間質性肺疾患、間質性肺線維症、虹彩炎、虚血再かん流障害、関節の炎症、若年性関節炎、若年性皮膚筋炎、若年性糖尿病、小児インスリン依存性糖尿病（I D D M）を含む若年性発症（I型）糖尿病、若年発症関節リウマチ、若年発症関節リウマチ、川崎病、乾性角結膜炎、キパノソミアシス、ランバート＝イトン症候群、リーシュマニア症、ハンセン病、白血球減少症、白血球接着欠乏症、白血球破碎性脈管炎、白血球減少症、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、直鎖状I g A皮膚炎、直鎖状I g A疾患（L A D）、レフラー症候群、ルポイド肝炎、狼瘡（腎炎、脳炎、小児、非腎臓、腎臓外、円板状、脱毛症を含む。）、狼瘡（S L E）、播種性紅斑性狼瘡、ライム関節炎、ライム病、リンパ球様間質性肺臓炎、マラリア、男性及び女性自己免疫不妊症、中間型血管炎（川崎病及び結節性多発動脈炎を含む。）、I型及びII型を含む膜状又は膜性増殖性G N（M P G N）及び急速進行性G N、膜性G N（膜性腎症）、メニエール病、髄膜炎、顕微鏡的大腸炎、顕微鏡的多発性血管炎、偏頭痛、微小変化型腎症、混合結合組織疾患（M C T D）、伝染性単核球症、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多巣性運動ニューロパチー、多発性内分泌機能不全、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血に続発するもの、多臓器損傷症候群、多発性硬化症（M S）、例えば脊椎一眼M S、多発性硬化症、流行性耳下腺炎、筋障害、重症筋無力症、例えば胸腺腫を伴う重症筋無力症、重症筋無力症、心筋炎、筋炎、ナルコレプシー、壊死性腸炎及び貫壁性大腸炎及び自己免疫炎症性腸疾患、壊死性、皮膚性又は超過敏性脈管炎、新生児狼瘡症候群（N L E）、ネフローゼ、ネフローゼ症候群、神経性疾患、視神経脊髄炎（デビック病）、視神経脊髄炎、神経性筋緊張病、好中球減少症、非癌性リンパ球増加症、非肉芽腫性ブドウ膜炎、非悪性胸腺腫、眼及び眼窩炎症性障害、眼癒痕性類天疱瘡、卵巣炎、交感性眼炎、眼球クローススミオクロースス症候群（O M S）、眼球クロースス又は眼球クローススミオクロースス症候群（O M S）及び感覚ニューロパチー、視神経炎、肉芽腫性精巣炎、変形性関節症、回帰性リウマチ、睪炎、汎血球減少症、P A N D A S（連鎖球菌が関連する小児自己免疫精神神経疾患）、傍腫瘍性小脳変性症、腫瘍随伴症候群、傍腫瘍性神経症候群を含む腫瘍随伴症候群、場合によってはランバート＝イトン症候群又はイトン＝ランバート症候群、寄生虫症、例えばリーシュマニア、発作性夜間血色素尿症（P N H）、パリー＝ロンベルク症候群、毛様体扁平部炎（末梢ブドウ膜炎）、パーソンネージ＝ターナー症候群、パルボウイルス感染、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡及び皮膚類天疱瘡、天疱瘡（尋常性天疱瘡を含む。）、紅

10

20

30

40

50

斑性天疱瘡、落葉状天疱瘡、粘膜類天疱瘡、天疱瘡、消化性潰瘍、周期性四肢麻痺、末梢ニューロパチー、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血（悪性の貧血）、悪性貧血、水晶体抗原性ブドウ膜炎、肺線維症、P O E M S 症候群、結節性多発動脈炎、I、I I および I I I 型、多発性関節炎慢性プリマリア、多発性軟骨炎（例えば難治性又は再発性多発性軟骨炎）、多内分泌自己免疫疾患、多内分泌不全、多腺性症候群、場合によっては自己免疫多腺性症候群（又は多腺性内分泌障害症候群）、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、多発性ニューロパチー、急性多発性神経根炎、開心術後症候群、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、連鎖球菌感染後腎炎、ワクチン接種後症候群、初老期認知症、原発性胆汁性肝硬変、原発性甲状腺機能低下症、原発性特発性粘液水腫、単クローン性B細胞リンパ球増加症を含む原発性リンパ球増加症、場合によっては良性単クローン性高ガンマグロブリン血症及び意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症、M G U S、原発性粘液水腫、原発性進行性M S（P P M S）及び再発寛解型M S（R R M S）、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、進行性全身性硬化症、増殖性関節炎、乾癬、例えばプラーク性乾癬、乾癬、乾癬性関節炎、肺胞タンパク質症、肺浸潤好酸球増加症、赤芽球貧血又は癆（P R C A）、赤芽球癆、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、膿疱性乾癬及び爪の乾癬、腎盂炎、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎、レイノー現象、反応性関節炎

10

、習慣性流産、血圧反応の低下、反射性交感神経性ジストロフィー、難治性スプルー、ロイター病又は症候群、再発性多発性軟骨炎、心筋又は他の組織の再かん流傷害、再かん流傷害、呼吸窮迫症候群、むずむず脚症候群、網膜自己免疫性、後腹膜線維症、レイノー症候群、リウマチ性疾患、リウマチ熱、リウマチ、関節リウマチ、リウマチ性脊椎炎、風疹ウイルス感染、サンプター症候群、サルコイドーシス、住血吸虫症、シュミット症候群、S C I D 及びエプスタイン・バーウイルス関連疾患、強膜、強膜炎、肢端硬化、強皮症、場合によっては全身性強皮症、硬化性胆管炎、播種性硬化症、硬化症、例えば全身性硬化症、感音性難聴、血清反応陰性脊椎関節炎、シーハン症候群、シャルマン症候群、珪肺症、シェーグレン症候群、精子及び精巣自己免疫性、蝶形骨洞炎、スティープンス・ジョンソン症候群、スティッフ・マン（又はスティッフ・パーソン）症候群、亜急性細菌心内膜炎（S B E）、亜急性皮膚性紅斑性狼瘡、突発性難聴、スザック症候群、シドナム舞踏病、交感性眼炎、全身性紅斑性狼瘡（S L E）又は全身性紅斑性狼瘡、皮膚性S L E、全身性壊死性脈管炎、A N C A 関連血管炎、場合によってはチャグ・ストラウス血管炎又は症候群（C S S）、脊髄癆、高安動脈炎、毛細血管拡張症、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、閉塞性血栓性血管炎、血栓性血小板減少性紫斑病（T T P）及び自己免疫又は免疫介在性血小板減少症を含む、血小板減少症、例えば慢性又は急性特発性血小板減少性紫斑病（I T P）を含む特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、血小板減少性紫斑病（T T P）、甲状腺中毒症、組織損傷、トローザ・ハント症候群、中毒性表皮剥離症、毒性ショック症候群、輸血反応、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、横断性脊髄炎、横断性の脊髄炎、熱帯性肺好酸球増加症、結核、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織疾患（U C T D）、蕁麻疹、場合によっては慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性自己免疫蕁麻疹を含む慢性特発性蕁麻疹、ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、網膜ブドウ膜炎、弁膜炎、血管機能不全、脈管炎、椎間体性関節炎、小水疱水疱性皮膚炎、白斑、ヴェーゲナー肉芽腫（多発性血管炎を伴う肉芽腫症（G P A））、ウィスコット・アルドリッチ症候群又はX連鎖高I g M症候群を含む；

20

30

40

（12）医薬がさらに別の免疫調節物質及び／又は抗原、又はT L R アゴニスト（T L R 1、T L R 2、T L R 3、T L R 4、T L R 5、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T L R 10、T L R 11 アゴニスト）、1型インターフェロン、場合によってはαインターフェロン又はβインターフェロン、C D 40 アゴニスト、T N F アンタゴニスト又はI L - 6 アンタゴニストから選択される別の免疫調節物質を含む；

（13）医薬が、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬性関節炎、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ性疾患、アレルギー性障害、喘息、アレルギー性鼻炎、皮膚障害、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植拒絶、移植片対宿主病、連鎖球菌感染後及び自己免疫腎不全

50

、敗血症性ショック、全身性炎症反応症候群（SIRS）、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）及び毒物注入；自己炎症性疾患、変形性関節症、結晶性関節炎、関節包炎、関節症、腱炎、靱帯炎又は外傷性関節損傷から選択される障害の治療における使用のためのものである；

（14）医薬が、多発性硬化症、狼瘡又は関節リウマチの治療における使用のためのものである；

（15）医薬が、移植片対宿主病（GVHD）、例えば、急性移植片対宿主病、慢性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う急性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う慢性移植片対宿主病、骨髄移植に伴う急性移植片対宿主病、同種血液幹細胞移植（HSCT）に伴う急性移植片対宿主病又は骨髄移植に伴う慢性移植片対宿主病を含む、移植片対宿主病（GVHD）の治療における使用のためのものである；

10

（16）医薬が同種幹細胞又は骨髄移植を有するか又は受けようとしている患者の治療における使用のためのものである；

（17）医薬がアレルギー性障害の治療における使用のためのものである；

（18）医薬が、乾癬、皮膚炎、アトピー性皮膚炎；全身性強皮症、硬化症；クローン病、潰瘍性大腸炎；呼吸窮迫症候群、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；湿疹、喘息、アテローム性動脈硬化症；白血球接着欠乏症；関節リウマチ；全身性紅斑性狼瘡（SLE）；糖尿病、場合によってはI型糖尿病又はインスリン依存性糖尿病；多発性硬化症；レイノー症候群；自己免疫甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シェーグレン症候群；若年性発症糖尿病；結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫症及び脈管炎；悪性貧血（アジソン病）；移植片拒絶疾患、GVHD、中枢神経系（CNS）炎症性障害；多臓器損傷症候群；溶血性貧血、クリオグロブリン血症又はクームス陽性貧血；重症筋無力症；抗原-抗体複合体介在性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；グレーブズ病；ランバート・イートン筋無力症候群；水疱性類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫多腺性内分泌障害；ロイター病；スティッフ・マン症候群；ベーチェット病；巨細胞動脈炎；免疫複合体腎炎；IgA腎症；IgM多発性ニューロパチー；免疫血小板減少性紫斑病（ITP）及び自己免疫血小板減少症から選択されるアレルギー性、炎症性又は自己免疫障害の治療における使用のためのものである；及び／又は

20

（19）医薬が、関節炎、関節リウマチ、急性関節炎、慢性関節リウマチ、痛風性関節炎、急性痛風性関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、椎間体性関節炎及び若年発症関節リウマチ、変形性関節炎、進行性慢性関節炎、変形性関節炎、多発性関節炎慢性プリマリア、反応性関節炎及び強直性脊椎炎）、炎症性過剰増殖皮膚疾患、乾癬、例えばプラーク性乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪の乾癬、接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、ヘルペス状皮膚炎及びアトピー性皮膚炎を含む皮膚炎、X連鎖高IgM症候群、蕁麻疹、例えば慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性自己免疫蕁麻疹を含む慢性特発性蕁麻疹、多発性筋炎／皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性表皮剥離症、強皮症、全身性強皮症、硬化症、全身性硬化症、多発性硬化症（MS）、脊椎-眼MS、原発性進行性MS（PPMS）、再発寛解型MS（RRMS）、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、播種性硬化症及び失調性硬化症、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性大腸炎、顕微鏡的大腸炎、膠原線維性大腸炎、ポリープ性大腸炎、壊死性腸炎、貫壁性大腸炎、自己免疫炎症性腸疾患、壊疽性膿皮症、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、上強膜炎、呼吸窮迫症候群、成人又は急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、髄膜炎、ブドウ膜全体又は一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫血液障害、リウマチ性脊椎炎、突発性難聴、IgE介在性疾患、例えばアナフィラキシー及びアレルギー性及びアトピー性鼻炎、脳炎、ラスムッセン脳炎、辺縁系及び／又は脳幹脳炎、ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、急性前部ブドウ膜炎、肉芽腫性ブドウ膜炎、非肉芽腫性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、自己免疫ブドウ膜炎、糸球体腎炎（GN）、特発性膜性GN又は特発性膜性腎症、膜状-又は膜性増殖性GN（MPGN）

30

40

50

、急速進行性GN、アレルギー性状態、自己免疫心筋炎、白血球接着欠乏症、全身性紅斑性狼瘡（SLE）又は全身性紅斑性狼瘡、例えば皮膚性SLE、亜急性皮膚性紅斑性狼瘡、新生児狼瘡症候群（NLE）、播種性紅斑性狼瘡、狼瘡（腎炎、脳炎、小児、非腎臓、腎臓外、円板状、脱毛症を含む。）、小児インスリン依存性糖尿病（IDDM）を含む若年性発症（I型）糖尿病、成人発症糖尿病（II型糖尿病）、自己免疫糖尿病、特発性尿崩症、サイトカイン及びTーリンパ球が介在する急性及び遅発性超過敏性を伴う免疫反応、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、リンパ腫様肉芽腫症、ヴェーグナー肉芽腫、無顆粒球症、脈管炎を含む血管炎、大血管炎、リウマチ性多発筋痛、巨細胞（高安）動脈炎、中間型血管炎、川崎病、結節性多発動脈炎、顕微鏡的多発動脈炎、CNS脈管炎、壊死性、皮膚性、超過敏性脈管炎、全身性壊死性脈管炎及びANCA関連血管炎、例えばチャージ・ストラウス血管炎又は症候群（CSS）、側頭動脈炎、再生不良性貧血、自己免疫再生不良性貧血、クームス陽性貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、溶血性貧血又は自己免疫性溶血性貧血（AIHA）を含む免疫性溶血性貧血、悪性貧血（悪性の貧血）、アジソン病、赤芽球癆貧血又は形成不全（PRCA）、第V I I I因子欠乏症、血友病A、自己免疫好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外漏出を含む疾患、CNS炎症性障害、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血に続発するもの、抗原-抗体複合体介在性疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット又はベーチェット病、キャスルマン病、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡及び皮膚類天疱瘡、天疱瘡、場合によっては尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、粘膜類天疱瘡、紅斑性天疱瘡、自己免疫多腺性内分泌障害、ロイター病又は症候群、免疫複合体腎炎、抗体介在性腎炎、視神経脊髄炎、多発性ニューロパチー、慢性ニューロパチー、IgM多発性ニューロパチー、IgM介在性ニューロパチー、血小板減少症、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、自己免疫精巣炎及び卵巣炎、原発性甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）；亜急性甲状腺炎、自己免疫甲状腺疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブズ病、多腺性症候群、例えば自己免疫多腺性症候群（又は多腺性内分泌障害症候群）、傍腫瘍性神経症候群を含む腫瘍随伴症候群、例えばランバート・イートン筋無力症候群又はイートン・ランバート症候群、スティッフ・マン又はスティッフ・パーソン症候群、脳脊髄炎、アレルギー性脳脊髄炎、実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、重症筋無力症、胸腺腫を伴う重症筋無力症、小脳変性症、神経性筋緊張病、眼球クロオス又は眼球クロオスミオクロオス症候群（OMS）及び感覚ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、ルポイド肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、リンパ球様間質性肺臓炎、細気管支炎閉塞性（非移植）vs NSIP、ギラン・バレー症候群、ベルギー病（IgA腎症）、特発性IgA腎症、直鎖状IgA皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、肺線維症、自己免疫消化器症候群、セリアック病、セリアック病、セリアックスプルー（グルテン腸症）、難治性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルー・ゲーリック病）、冠動脈疾患、自己免疫耳疾患、例えば自己免疫内耳疾患（AGED）、自己免疫難聴、眼球クロオスミオクロオス症候群（OMS）、多発性軟骨炎、例えば難治性又は再発性多発性軟骨炎、肺胞タンパク質症、アミロイドーシス、強膜炎、非癌性リンパ球増加症、単クローン性B細胞リンパ球増加症を含む原発性リンパ球増加症、場合によっては良性単クローン性高ガンマグロブリン血症又は意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症、MGUS、末梢ニューロパチー、腫瘍随伴症候群、チャンネル病、例えばてんかん、偏頭痛、不整脈、筋障害、聴覚消失、失明、周期性四肢麻痺及びCNSのチャンネル病、自閉症、炎症性ミオパチー、巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）、内分泌性眼症、網膜ブドウ膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫肝臓病学的障害、線維筋痛症、多発性内分泌機能不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期認知症、脱髄性疾患、例えば自己免疫脱髄性疾患、糖尿病性ニューロパチー、ドレスラー症候群、円形脱毛症、CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象、食道運動不全、肢端硬化）及び

10

20

30

40

50

毛細血管拡張症)、男性及び女性自己免疫不妊症、混合結合組織疾患、シャーガス病、リウマチ熱、習慣性流産、農夫肺、多形性紅斑、開心術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性血管炎、良性リンパ球性血管炎、アルポート症候群、肺炎、例えばアレルギー性肺炎及び線維性肺炎、間質性肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、キパノソミアシス、住血吸虫症、回虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維症、びまん性間質性肺線維症、間質性肺線維症、特発性肺線維症、嚢胞性線維症、眼内炎、持続性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、シャルマン症候群、フェルティール症候群、フィラリア症、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、虹彩毛様体炎又はフックス毛様体炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染、エコーウイルス感染、心筋症、アルツハイマー病、パルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、ワクチン接種後症候群、先天性風疹感染、エプスタイン・バーウイルス感染、流行性耳下腺炎、エバンス症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、内分泌性眼障害、慢性超過敏性肺臓炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性ネフローゼ症候群、微小変化型腎症、良性家族性及び虚血-再かん流傷害、網膜自己免疫性、関節の炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化性障害、アスペルミオジェネシス、自己免疫溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュブュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、アレルギー性腸炎、癩性結節性紅斑、特発性顔面麻痺、慢性疲労症候群、フェブリスリウマチ、ハーマン・リッチ症候群、感音性難聴、血色素尿症発作、性腺機能低下症、回腸炎レジオナリス、白血球減少症、伝染性単核球症、横断性の脊髄炎、原発性特発性粘液水腫、ネフローゼ、交感性眼炎、肉芽腫性精巣炎、睪炎、急性多発性神経根炎、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎、後天性脾臓萎縮症、抗精子抗体による不妊症、非悪性胸腺腫、白斑、SCID及びエプスタイン・バーウイルス関連疾患、後天性免疫不全症候群(AIDS)、寄生虫症、例えばリーシュマニア、毒性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を含む状態、白血球-接着欠乏症、サイトカイン及びT-リンパ球が介在する急性及び遅発性超過敏性を伴う免疫反応、白血球血管外漏出を含む疾患、多臓器損傷症候群、抗原-抗体複合体介在性疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ性疾患、混合結合組織疾患、ネフローゼ症候群、睪島炎、多内分泌不全、末梢ニューロパチー、自己免疫多腺性症候群I型、成人発症特発性副甲状腺機能低下症(AOIH)、全頭脱毛症、拡張型心筋症、後天性表皮水疱症(EBA)、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、急性又は慢性副鼻腔炎、篩骨洞炎、前頭洞炎、上顎洞炎又は蝶形骨洞炎、好酸球関連障害、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症-筋痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸球性肺炎、熱帯性肺好酸球増加症、気管支肺アスペルギルス症、アスペルギルス腫又は好酸球を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、血清反応陰性脊椎関節炎、多内分泌自己免疫疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性粘膜皮膚性カンジダ症、バートン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコット・アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調、膠原病に伴う自己免疫障害、リウマチ、神経性疾患、虚血再かん流障害、血圧反応の低下、血管機能不全、血管拡張症、組織損傷、心血管系虚血、痛覚過敏、脳虚血及び血管新生を伴う疾患、アレルギー性超過敏性疾患、糸球体腎炎、再かん流傷害、心筋又は他の組織の再かん流傷害、急性炎症性要素を伴う皮膚疾患、急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性障害、眼及び眼窩炎症性障害、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘導性毒性、急性の重篤な炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、肺線維症、糖尿病性網膜症、糖尿病性大動脈障害、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎及び子宮内膜症から選択される疾患の治療における使用のためのものである;

前記医薬。

【請求項6】

請求項1から5の何れか1項に記載の融合タンパク質、組成物、又は医薬であって、

10

20

30

40

50

(1) 前記V I S T A - I gが細胞親和性又は非細胞親和性である；

(2) 医薬が、狼瘡を処置するための別の薬物、例えばナプロキセン、イブプロフェンなどの非ステロイド性抗炎症薬、ヒドロキシクロロキン（プラケニル）などの抗マラリア薬、プレドニゾンなどのコルチコステロイド、シクロホスファミド（サイトキサン）、アザチオプリン（イムラン、アザサン）、ミコフェノール酸（セルセプト）、レフルノミド（アラバ）、メトトレキサート（トレキサール）などの免疫抑制剤をさらに含む；

(3) 医薬が、別の免疫抑制剤、又は腎臓機能を改善する薬剤をさらに含み、前記免疫抑制剤がPD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4又はICOSタンパク質又は、細胞外領域全体もしくは少なくとも50、100、150、200、250もしくは300アミノ酸である前記細胞外領域の断片又は1つのPD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4もしくはICOSの細胞外領域の何れかに対して又は少なくとも50、100、150、200、250もしくは300アミノ酸であるその断片に対して少なくとも80から90又は95%の配列同一性を保持する変異体を具備する少なくとも1つのPD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4もしくはICOS融合タンパク質、又はPD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4もしくはICOSの何れかに対して特異的な抗体もしくは抗体断片を含む；

(4) 医薬が、関節リウマチ、急性関節炎、慢性関節リウマチ、痛風又は痛風性関節炎、急性痛風性関節炎、急性免疫性関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節炎、II型コラーゲン誘発性関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、スティル病、椎間体性関節炎、若年発症関節リウマチ、変形性関節症、進行性慢性関節炎、変形性関節炎、多発性関節炎慢性ブリマリア、反応性関節炎及び強直性脊椎炎を含む、関節炎；炎症性過剰増殖皮膚疾患；乾癬、例えばプラーク性乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪の乾癬；例えば枯草熱及びヨブ症候群などのアトピー性疾患を含むアトピー；接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、剥離性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、ヘルペス状皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、一次刺激性接触皮膚炎及びアトピー性皮膚炎を含む皮膚炎；X連鎖高IgM症候群；アレルギー性眼内炎症性疾患；蕁麻疹、例えば慢性アレルギー性蕁麻疹、慢性特発性蕁麻疹及び慢性自己免疫蕁麻疹；筋炎；多発性筋炎／皮膚筋炎；若年性皮膚筋炎；中毒性表皮剥離症；全身性強皮症を含む強皮症；硬化症、例えば全身性硬化症、多発性硬化症（MS）、脊髄一見MS、原発性進行性MS（PPMS）、再発寛解型MS（RRMS）、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、播種性硬化症及び失調性硬化症；視神経脊髄炎（NMO）；クローン病、自己免疫介在性胃腸疾患、大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性大腸炎、顕微鏡的大腸炎、膠原線維性大腸炎、ポリープ性大腸炎、壊死性腸炎、貫壁性大腸炎及び自己免疫炎症性腸疾患を含む炎症性腸疾患（IBD）；腸の炎症；壊疽性膿皮症；結節性紅斑；原発性硬化性胆管炎；成人又は急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を含む呼吸窮迫症候群；髄膜炎；ブドウ膜全体又は一部の炎症；虹彩炎；脈絡膜炎；自己免疫血液障害；リウマチ性脊椎炎；リウマチ滑膜炎；先天的血管浮腫；髄膜炎などにおける脳神経損傷；妊娠性疱疹；妊娠性類天疱瘡；陰囊掻痒；自己免疫早発卵巣不全；自己免疫状態による突発性難聴；IgE介在性疾患、例えばアナフィラキシー及びアレルギー性及びアトピー性鼻炎；脳炎、例えばラスマッセン脳炎及び辺縁系及び／又は脳幹脳炎；ブドウ膜炎、例えば前部ブドウ膜炎、急性前部ブドウ膜炎、肉芽腫性ブドウ膜炎、非肉芽腫性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎；ネフローゼ症候群を伴うか又は伴わない糸球体腎炎（GN）、例えば慢性又は急性糸球体腎炎、原発性GN、免疫介在性GN、膜性GN（膜性腎症）、特発性膜性GN又は特発性膜性腎症、I型及びII型を含む膜状又は膜性増殖性GN（MPGN）及び急速進行性GN；増殖性腎炎；自己免疫多腺性内分泌不全；形質細胞限局性亀頭炎を含む亀頭炎；亀頭包皮質炎；遠心性環状紅斑；色素異常性固定性紅斑；多形紅斑；環状肉芽腫；光沢苔癬；硬化性萎縮性苔癬；慢性単純性苔癬；棘状苔癬；扁平苔癬；層状魚鱗癬；表皮剥離性角化症；前がん性角化症；壊疽性膿皮症；アレルギー性状態及び反応；アレルギー反応；アレルギー性又はアトピー性湿疹、乾皮性湿疹、発汗異常性湿疹及び汗疱を含む、湿疹；喘息、例えば、気管支喘息、気管支

10

20

30

40

50

の喘息及び自己免疫喘息；T細胞浸潤及び慢性炎症反応を含む状態；妊娠中の胎児A－B－O血液群などの外来性抗原に対する免疫反応；慢性肺炎炎症性疾患；自己免疫心筋炎；白血球接着欠乏症；狼瘡腎炎、狼瘡脳炎、小児狼瘡、非腎臓狼瘡、腎臓外狼瘡、円板状狼瘡及び円板状紅斑性狼瘡、脱毛症狼瘡、全身性紅斑性狼瘡（SLE）、皮膚性SLE、亜急性皮膚性SLE、新生児狼瘡症候群（NLE）及び播種性紅斑性狼瘡を含む狼瘡；小児インスリン依存性糖尿病（IDDM）を含む若年性発症（I型）糖尿病、成人発症糖尿病（II型糖尿病）、自己免疫糖尿病、特発性尿崩症、糖尿病性網膜症、糖尿病性ニューロパチー及び糖尿病性大動脈障害；サイトカイン及びTーリンパ球が介在する急性及び遅発性超過敏性を伴う免疫反応；結核；サルコイドーシス；リンパ腫様肉芽腫症を含む肉芽腫症；ヴェーゲナー肉芽腫；無顆粒球症；脈管炎、大型血管炎、リウマチ性多発筋痛及び巨細胞（高安）動脈炎、中型血管炎、川崎病、結節性多発動脈炎／結節性動脈周囲炎、顕微鏡的多発動脈炎、免疫血管炎、CNS脈管炎、皮膚性脈管炎、超過敏性脈管炎、壊死性脈管炎、全身性壊死性脈管炎、ANCA関連血管炎、チャグ・ストラウス血管炎又は症候群（CSS）及びANCA関連小血管炎を含む血管炎；側頭動脈炎；再生不良性貧血；自己免疫再生不良性貧血；クームス陽性貧血；ダイヤモンド・ブラックファン貧血；自己免疫性溶血性貧血（AIHA）、悪性貧血（悪性の貧血）を含む、溶血性貧血又は免疫性溶血性貧血；アジソン病；赤芽球癆貧血又は形成不全（PRCA）；第VII因子欠乏症；血友病A；自己免疫好中球減少症；汎血球減少症；白血球減少症；白血球血管外漏出を含む疾患；CNS炎症性障害；多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血に続発するもの；抗原－抗体複合体介在性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質抗体症候群；アレルギー性神経炎；ベーチェット病／症候群；キャッスルマン症候群；グッドパスチャー症候群；レイノー症候群；シェーグレン症候群；スティーブンス・ジョンソン症候群；類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡及び皮膚類天疱瘡、天疱瘡、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、粘膜類天疱瘡及び紅斑性天疱瘡；自己免疫多腺性内分泌障害；ロイター病又は症候群；熱傷；子癇前症；免疫複合体障害、例えば免疫複合体腎炎及び抗体介在性腎炎；多発性ニューロパチー；慢性ニューロパチー、例えばIgM多発性ニューロパチー及びIgM介在性ニューロパチー；血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、輸血後紫斑病（PTP）、ヘパリン誘発性血小板減少症、自己免疫又は免疫介在性血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）及び慢性又は急性ITPを含む血小板減少症（例えば心筋梗塞患者に発症する場合）；強膜炎、例えば特発性角膜強膜炎及び上強膜炎；自己免疫精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫疾患；原発性甲状腺機能低下症；副甲状腺機能低下症；甲状腺炎、自己免疫甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）又は亜急性甲状腺炎、自己免疫甲状腺疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブズ病、多腺性症候群、自己免疫多腺性症候群及び多腺性内分泌障害症候群を含む自己免疫内分泌疾患；傍腫瘍性神経症候群を含む腫瘍随伴症候群；ランバート・イートン筋無力症候群又はイートン・ランバート症候群；スティッフ・マン又はスティッフ・パーソン症候群；脳脊髄炎、例えばアレルギー性脳脊髄炎、アレルギー性脳脊髄炎及び実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）；重症筋無力症、例えば胸腺腫を伴う重症筋無力症；小脳変性症；神経性筋緊張病；眼球クロオス又は眼球クロオスミオクロオス症候群（OMS）；感覚ニューロパチー；多巣性運動ニューロパチー；シーハン症候群；自己免疫肝炎、慢性肝炎、ルポイド肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎及び自己免疫慢性活動性肝炎を含む肝炎；リンパ球様間質性肺臓炎（LIP）；細気管支炎閉塞性（非移植）vs NSIP；ギラン・バレー症候群；バージャー病（IgA腎症）；特発性IgA腎症；直鎖状IgA皮膚炎；急性発熱性好中球皮膚炎；角層下膿疱性皮膚炎；一過性棘融解性皮膚炎；肝硬変、例えば原発性胆汁性肝硬変及び肺線維症；自己免疫消化器症候群；セリアック又はセリアック病；セリアックスプルー（グルテン腸症）；難治性スプルー；特発性スプルー；クリオグロブリン血症；筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルー・ゲーリック病）；冠動脈疾患；自己免疫耳疾患、例えば自己免疫内耳疾患（AIED）；自己免疫難聴；多発性軟骨炎、例えば難治性又は再燃性又は再発性多発性軟骨炎；肺胞タンパク質症；コーガン症候群／非梅毒性間質性角膜炎；ベル麻痺；スイート病／症候群；酒さ自己免疫；带状疱疹関連痛；アミロイドーシス；非

10

20

30

40

50

癌性リンパ球増加症；単クローン性B細胞リンパ球増加症を含む原発性リンパ球増加症（例えば良性単クローン性高ガンマグロブリン血症及び意義不明のモノクローナル免疫グロブリン異常症、MGUS）；末梢ニューロパチー；チャネル病、例えばてんかん、偏頭痛、不整脈、筋障害、聴覚消失、失明、周期性四肢麻痺及びCNSのチャネル病；自閉症；炎症性ミオパチー；巣状又は分節性又は巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）；内分泌性眼症；網膜ブドウ膜炎；脈絡網膜炎；自己免疫肝臓病学的障害；線維筋痛症；多発性内分泌機能不全；シュミット症候群；副腎炎；胃萎縮；初老期認知症；脱髄性疾患、例えば自己免疫脱髄性疾患及び慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー；ドレスラー症候群；円形脱毛症；全頭脱毛症；CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象、食道運動不全、手指硬化症及び毛細血管拡張症）；男性及び女性自己免疫不妊症（例えば抗精子抗体による。）；混合結合組織疾患；シャーガス病；リウマチ熱；習慣性流産；農夫肺；多形性紅斑；開心術後症候群；クッシング症候群；愛鳥家肺；アレルギー性肉芽腫性血管炎；良性リンパ球性血管炎；アルポート症候群；肺炎、例えばアレルギー性肺炎及び線維性肺炎；間質性肺疾患；輸血反応；ハンセン病；マラリア；サンター症候群；カプラン症候群；心内膜炎；心内膜心筋線維症；びまん性間質性肺線維症；間質性肺線維症；肺線維症；特発性肺線維症；嚢胞性線維症；眼内炎；持続性隆起性紅斑；胎児赤芽球症；好酸球性筋膜炎；シャルマン症候群；フェルティール症候群；フィラリア症；毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、虹彩毛様体炎（急性又は慢性）又はフックス毛様体炎；ヘノッホ・シェーンライン紫斑病；敗血症；内毒素血；脾炎；甲状腺中毒症；エバンス症候群；自己免疫性腺機能不全；シデナム舞踏病；連鎖球菌感染後腎炎；閉塞性血栓性血管炎；甲状腺中毒症；脊髄瘍；脈絡膜炎；巨細胞多発性筋痛；慢性超過敏性肺臓炎；乾性角結膜炎；流行性角結膜炎；特発性ネフローゼ症候群；微小変化型腎症；良性家族性及び虚血一再かん流傷害；移植臓器再かん流；網膜自己免疫性；関節の炎症；気管支炎；慢性閉塞性気道／肺疾患；珪肺症；アフト；アフト性口内炎；動脈硬化性障害；アスペルミオジェネス；自己免疫溶血；ベック病；クリオグロブリン血症；デュピュイトラン拘縮；水晶体過敏性眼内炎；アレルギー性腸炎；癩性結節性紅斑；特発性顔面麻痺；フェブリスリウマチ；ハマンリッチ症候群；感音性難聴；血色素尿症発作；性腺機能低下症；回腸炎レジオナリス；白血球減少症；伝染性単核球症；横断性の脊髄炎；原発性特発性粘液水腫；ネフローゼ；交感性眼炎；肉芽腫性精巣炎；脾炎；急性多発性神経根炎；壊疽性膿皮症；ケルバン甲状腺炎；後天性脾臓萎縮症；非悪性胸腺腫；白斑；毒性ショック症候群；食中毒；T細胞浸潤を含む状態；白血球一接着欠乏症；サイトカイン及びTーリンパ球が介在する急性及び遅発性超過敏性を伴う免疫反応；白血球血管外漏出を含む疾患；多臓器損傷症候群；抗原－抗体複合体介在性疾患；抗糸球体基底膜疾患；アレルギー性神経炎；自己免疫多腺性内分泌障害；卵巣炎；原発性粘液水腫；自己免疫萎縮性胃炎；交感性眼炎；リウマチ性疾患；混合結合組織疾患；ネフローゼ症候群；脾臓炎；多内分泌不全；自己免疫多腺性症候群I型；成人発症特発性副甲状腺機能低下症（AOIH）；心筋症、例えば拡張型心筋症；後天性表皮水疱症（EBA）；ヘモクロマトーシス；心筋炎；ネフローゼ症候群；原発性硬化性胆管炎；化膿性又は非化膿性副鼻腔炎；急性又は慢性副鼻腔炎；篩骨洞炎、前頭洞炎、上顎洞炎又は蝶形骨洞炎；好酸球関連障害、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症－筋痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸球性肺炎、熱帯性肺好酸球増加症、気管支肺アスペルギルス症、アスペルギルス腫又は好酸球を含有する肉芽腫；アナフィラキシー；血清反応陰性脊椎関節炎；多内分泌自己免疫疾患；硬化性胆管炎；慢性粘膜皮膚性カンジダ症；ブルトン症候群；乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症；ウィスコット・アルドリッチ症候群；毛細血管拡張性運動失調症候群；血管拡張；膠原病に伴う自己免疫障害、リウマチ、神経性疾患、リンパ節炎、血圧反応の低下、血管機能不全、組織損傷、心血管系虚血、痛覚過敏、腎臓虚血、脳虚血及び血管新生を伴う疾患；アレルギー性超過敏性疾患；糸球体腎炎；再かん流傷害；虚血再かん流障害；心筋又は他の組織の再かん流傷害；リンパ腫気管気管支炎；炎症性皮膚疾患；急性炎症性要素を伴う皮膚疾患；多臓器不全；水疱症；腎臓皮質壊死；急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性障害；眼及び眼窩炎症性障害；顆粒球輸血関連症候群；サイト

10

20

30

40

50

カイン誘導性毒性；ナルコレプシー；急性の重篤な炎症；慢性難治性炎症；腎盂炎；動脈内過形成；消化性潰瘍；弁膜炎；及び子宮内膜症から選択される状態を処置するために使用される；

(5) 医薬が、糖尿病、狼瘡、多発性硬化症、乾癬、炎症性腸疾患、クローン病、甲状腺炎、関節リウマチ、多発性硬化症又はアレルギー性現象に關与する I V 型超過敏性を含む I V 型超過敏性及び、慢性炎症性疾患の、及び病原体の感染により生じる病態、例えばハンセン病、結核、リーシュマニア症又はリステリア症を処置するために使用される；

(6) V I S T A - I g 融合タンパク質が、配列番号 2、4、5、16 から 25、36 又は 37 のポリペプチド配列の細胞外ドメインに対して少なくとも約 90 % 又は 95 % の配列同一性がある少なくとも 1 つのポリペプチドと、免疫グロブリン (I g) タンパク質と、を具備し、前記 I g タンパク質が、I g G、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g G 2 a、I g M、I g E 又は I g A である；

(7) V I S T A - I g 融合タンパク質が、配列番号 2、4、5、16 から 25、36 又は 37 のポリペプチド配列の細胞外ドメインに対して少なくとも約 90 % 又は 95 % の配列同一性がある少なくとも 1 つのポリペプチドと、免疫グロブリン (I g) タンパク質と、を具備し、前記 I g タンパク質が、I g G、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g G 2 a、I g M、I g E 又は I g A であり、前記 I g が補体結合及び／又は F c R 結合を減少させるか又は排除するように突然変異されている、又は前記 I g が補体結合及び／又は F c R 結合を増加させるか又は変化させるように突然変異されている、及び／又は前記 I g タンパク質がヒト I g G 1 の定常及びヒンジ領域を具備する；

(8) 医薬が、多発性硬化症の処置又は予防を必要とする対象において多発性硬化症を処置するか又は予防するために使用され、該対象が多発性硬化症と診断されている、及び／又は遺伝的に多発性硬化症を発現するリスクがある；

(9) V I S T A - I g 融合タンパク質が多量体である；

(10) 医薬が、アレルギー性呼吸器障害と診断されている、及び／又は遺伝的に遺伝子型及び／又は家族歴に基づいて喘息のようなアレルギー性呼吸器障害を発現するリスクがある対象における使用のための；又は、該呼吸器障害がアトピー性鼻炎又はアトピー性湿疹であるか、又は β ブロッカーで処置されたことがあるか、喫煙者であるか、又は、ホルムアルデヒド、煙吸入、R S V 又はライノウイルス感染、内毒素曝露又はフタル酸など、アレルギー性呼吸器障害及び／又は喘息の発症と相関する環境因子もしくは感染体に曝露されたことがあるか、又は以前枯草熱、蕁麻疹、脈管炎もしくはチャージ・ストラウス症候群に罹患したことがある対象における使用のためのものである；

(11) 医薬が、G S T M 1、I L 1 0、C T L A - 4、S P I N K 5、L T C 4 S、I L 4 R 及び A D A M 3 3 のような喘息発症に相関する遺伝子変異又はタンパク質発現プロファイルを有する対象における使用のためのものである；及び／又は

(12) 医薬が、喘息を有する対象における使用のためであり、プロピオン酸フルチカゾン、コルチコステロイド、例えばベクロメタゾン、長時間作用型 β - アドレナリン受容体アゴニスト (L A B A)、例えばサルメテロール又はホルモテロール、場合によっては吸入コルチコステロイドと併用、ロイコトリエンアンタゴニスト、例えばモンテルカスト又はザフィルルカスト、場合によっては L A B A と併用、肥満細胞安定化剤、例えばクロモリンナトリウム又は β - 2 - アドレナリン受容体アゴニスト (S A B A)、例えばサルブタモール、エピネフリン、抗コリン薬、例えば臭化イプラトロピウムから選択される、吸入器又は薬物のような、喘息を処置又は予防するために及び／又は喘息発作の発症又は重症度を軽減するために使用される別の薬物をさらに含む、融合タンパク質、組成物、又は医薬。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の有効量の V I S T A - I g 融合タンパク質を含有する、自己抗原又は外来抗原又はアレルゲン、例えば吸入アレルゲン、に対する耐性を誘導するため、及び／又は F o x p 3 + 細胞の誘導を起こすために使用される組成物。

【請求項 8】

VISTA-Ig 融合タンパク質が、配列番号 68、69、72 及び 73 の何れかにおける VISTA ポリペプチドに対して少なくとも 90%、95%、又は 98% の配列同一性を保持する、請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の VISTA-Ig 融合タンパク質、組成物、又は医薬。

【請求項 9】

リンカーが配列番号 71、又は配列番号 68 のアミノ酸残基 181-198 を含む、請求項 1 から 8 の何れか 1 項に記載の VISTA-Ig 融合タンパク質又は VISTA-Ig 融合タンパク質を含有する組成物若しくは医薬。

【請求項 10】

リンカーが配列番号 71 を含む、請求項 9 に記載の VISTA-Ig 融合タンパク質又は VISTA-Ig 融合タンパク質を含有する組成物若しくは医薬。

10

【請求項 11】

リンカーが配列番号 68 のアミノ酸残基 181-198 を含む、請求項 9 に記載の VISTA-Ig 融合タンパク質又は VISTA-Ig 融合タンパク質を含有する組成物若しくは医薬。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本願は、2012 年 6 月 22 日提出の、題名「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」の米国仮出願第 61/663, 431 号、2012 年 6 月 25 日提出の、題名「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」の米国仮出願第 61/663, 969 号、2012 年 12 月 11 日提出の、題名「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」の米国仮出願第 61/735, 799 号、2013 年 3 月 11 日提出の、題名「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」の米国仮出願第 61/776, 234 号、及び 2013 年 4 月 1 日提出の、題名「VISTA-Ig for Treatment of Autoimmune and Inflammatory Disorders」の、米国仮出願第 61/807, 135 号に対する優先権を主張し、これらの仮出願の全ての内容が、それらの全体において参照により組み込まれる。

20

30

【技術分野】

【0002】

発明の分野

VISTA [T 細胞活性化の V 領域免疫グロブリン含有抑制因子 (VISTA) 又は PD-L3] は、免疫性を負の方向に制御する分子である。本発明は、自己免疫、アレルギー性及び炎症状態の処置及び／又は予防を必要とする対象において自己免疫、アレルギー性及び炎症状態を処置及び／又は予防するために全身的に投与され得る高い効力を保持するリンカーポリペプチドを具備する多量体型を含む、VISTA-Ig の最適化形態を含む VISTA (例えば VISTA-Ig) の可溶性形態の使用に関する。代表的な状態としては、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬性関節炎、狼瘡障害、例えば全身性紅斑性狼瘡 (SLE)、円板状狼瘡、薬物誘発性狼瘡及び新生児狼瘡及びアレルギー性又は炎症性呼吸器障害、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、枯草熱、蕁麻疹、脈管炎及びチャグ・ストラウス症候群ならびに他のアレルギー性、炎症性及び自己免疫状態、例えば上記で開示されるようなものが挙げられる。

40

【背景技術】

【0003】

発明の背景

免疫系は、同時刺激及び同時阻害性リガンド及び受容体によって厳しく調節されている。

50

これらの分子は、自己に対する免疫性を制限しながら感染に対する免疫反応を最大化するために、T細胞活性化に対する第二のシグナルだけでなく、正及び負のシグナルのバランスの取れたネットワークも提供する。

【0004】

免疫反応の誘導には、T細胞拡大、分化、縮小及びT細胞メモリーの確立が必要である。T細胞は、抗原提示細胞（APC）と遭遇し、APCにおいてT細胞受容体（TCR）／主要組織適合遺伝子複合体（MHC）相互作用を介して連絡しなければならない。TCR／MHC相互作用が確立されたら、他の一連の受容体－リガンドがT細胞間で接触し、APC即ちCD154／CD40及びCD28／B7. 1－B7. 2を介した同時刺激が必要となる。これらの接触の間の相乗作用の結果、増殖性の免疫反応が病原体及び腫瘍を排除可能となり、自己免疫性を誘導できるようになり得る。

10

【0005】

別のレベルの調節、即ち制御T細胞（T_{reg}）が同定されている。この特異的なT細胞のサブセットは胸腺で産生され、末梢に運ばれ、T細胞反応の定常的及び誘導性調節が可能となる。Sakaguchi (2000) Cell 101 (5) : 455－8 ; Shevach (2000) Annu. Rev. Immunol. 18 : 423－49 ; Bluestone 及び Abbas (2003) Nat. Rev. Immunol. 3 (3) : 253－7。T_{reg}は、CD4＋CD25＋表現型により表され、高レベルの細胞毒性Tリンパ球－関連抗原－4（CTLA-4）、OX-40、4-1BB及びグルココルチコイド誘導性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日齢新生児胸腺摘出又は抗CD25を用いた抗体枯渇によるT_{reg}細胞の排出の結果、抗腫瘍反応増大を含め、外来及び自己抗原に対するT細胞反応の自己免疫病変及び悪化の誘導が起こる。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。さらに、抗CD25モノクローナル抗体でのT_{reg}の枯渇の結果、移植寛容が消失し、急速に移植片拒絶が起こるので、T_{reg}はまた、移植寛容の誘導及び維持にも関連付けられている。Jarvinen, et al. (2003) Transplantation 76 : 1375－9。アゴニスト性のモノクローナル抗体とT_{reg}表面上のGITRを連結するとT_{reg}活性が急速に停止し、その結果、自己免疫病変が生じ、移植寛容がなくなるので、T_{reg}により発現される受容体の中でもGITRは重要な構成要素であると思われる。

20

30

【0006】

同時刺激及び同時阻害性リガンド及び受容体は、T細胞活性化に対する「第二のシグナル」を提供するだけでなく、自己に対する免疫性を制限しながら感染に対する免疫反応を最大化するために正及び負のシグナルのバランスの取れたネットワークも提供する。最もよく特徴が分かっている同時刺激リガンドはB7. 1及びB7. 2であり、これらは専門的なAPCにより発現され、これらの受容体はCD28及びCTLA-4である。Greenwald, et al. (2005) Annu Rev Immunol 23, 515－548 ; Sharpe 及び Freeman (2002) Nat Rev Immunol 2, 116－126。CD28は、ナイーブ及び活性化T細胞により発現され、最適なT細胞活性化に非常に重要である。一方、CTLA-4はT細胞活性化時に誘導され、B7. 1／B7. 2に対する結合によってT細胞活性化を阻害し、このようにしてCD28介在性同時刺激が損なわれる。CTLA-4はまた、その細胞質ITIMモチーフを通じて負のシグナルも伝達する。Teft, et al. (2006). Annu Rev Immunol 24, 65－97。B7. 1／B7. 2 KOマウスは適応免疫反応が損なわれており (Borriello, et al. (1997) Immunity 6, 303－313 ; Freeman, et al. (1993) Science

40

50

262, 907-909)、一方で、CTLA-4 KOマウスは、炎症を正しく調節することができず、全身性の自己免疫疾患を発現する。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、同時刺激B7-H2 (ICOSリガンド) 及びB7-H3、ならびに同時阻害B7-H1 (PD-L1)、B7-DC (PD-L2)、B7-H4 (B7S1又はB7x) 及びB7-H6を含むようになっている。Brandt, et al. (2009) *J Exp Med* 206, 1495-1503; Greenwald, et al. (2005) *Annu Rev Immunol* 23: 515-548 参照。

10

【0007】

誘導性同時刺激 (ICOS) 分子は、活性化T細胞上で発現され、B7-H2と結合する。Yoshinaga, et al. (1999) *Nature* 402, 827-832 参照。ICOSは、T細胞活性化、分化及び機能に重要であり、また、Tヘルパー細胞誘導性B細胞活性化、Igクラススイッチング及び胚中心 (GC) 形成に必須である。Dong, et al. (2001) *Nature* 409, 97-101; Tafuri, et al. (2001) *Nature* 409, 105-109; Yoshinaga, et al. (1999) *Nature* 402, 827-832。一方でプログラム細胞死1 (PD-1) はT細胞反応を負に制御する。PD-1 KOマウスは、遺伝的背景によって、狼瘡様の自己免疫疾患又は自己免疫拡張型心筋症を発現する。Nishimura, et al. (1999) *Immunity* 11, 141-151。Nishimura, et al. (2001) *Science* 291: 319-322。自己免疫性はおそらくは、両リガンドPD-L1及びPD-L2によるシグナル伝達喪失の結果であると思われる。最近、CD80が、阻害シグナルをT細胞に伝達するPD-L1に対する第二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に対する受容体は未だ不明である。

20

【0008】

最もよく特徴が分かっている同時刺激リガンドは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、専門的なAPC上で発現され、これらの受容体はCD28及びCTLA-4である。Greenwald, et al. (2005) *Annu Rev Immunol* 23: 515-548。CD28はナイーブ及び活性化T細胞により発現され、最適なT細胞活性化に非常に重要である。一方、CTLA-4は、T細胞活性化時に誘導され、B7. 1/B7. 2への結合によってT細胞活性化を阻害し、CD28介在性同時刺激が損なわれる。B7. 1及びB7. 2 KOマウスは適応免疫反応を損なっており (Borriello, et al. (1997) *Immunity* 6: 303-313)、一方でCTLA-4 KOマウスは炎症を正しく調節することができず、全身性自己免疫疾患を発現する。Tivol, et al. (1995) *Immunity* 3: 541-547; Waterhouse, et al. (1995) *Science* 270: 985-988; Chambers, et al. (1997) *Immunity* 7: 885-895。

30

40

【0009】

B7ファミリーリガンドは拡大しており、同時刺激B7-H2 (誘導性T細胞同時刺激物質 [ICOS] リガンド) 及びB7-H3、ならびに同時阻害B7-H1 (PD-L1)、B7-DC (PD-L2)、B7-H4 (B7S1又はB7x) 及びB7-H6を含むようになっている。Greenwald, et al. (2005) *Annu Rev Immunol* 23: 515-548; Brandt, et al. (2009) *J Exp Med* 206: 1495-1503。従って、さらなるCD28ファミリー受容体が同定された。ICOSは、活性化T細胞上で発現され、B7-H2に結合する。ICOSは、正の同時制御因子であり、T細胞活性化、分化及び機能に重要である。Yo

50

shinaga, et al. (1999) *Nature* 402:827-832; Dong, et al. (2001) *J. Mol. Med.* 81:281-287。一方、PD-1 (プログラム死1) はT細胞反応を負に制御する。PD-1 KOマウスは狼瘡様自己免疫疾患又は自己免疫拡張型心筋症を発現した。Nishimura, et al. (1999) *Immunity* 11:141-151; Nishimura, et al. (2001) *Science* 291:319-322。自己免疫性はおそらくは、両リガンドPD-L1及びPD-L2によるシグナル伝達喪失の結果であると思われる。最近、CD80が、阻害シグナルをT細胞に伝達するPD-L1に対する第二の受容体として同定された。Butte, et al. (2007) *Immunity* 27:111-122。

10

【0010】

この2つの阻害B7ファミリーリガンド、PD-L1及びPD-L2の発現パターンは異なる。PD-L2はDC及びマクロファージ上で誘導性に発現され、一方でPD-L1は、造血細胞及び非造血細胞型の両方で広く発現される。Okazaki及びHonjo (2006) *Trends Immunol.* 27(4):195-201; Keir, et al. (2008) *Ann Rev Immunol.* 26:677-704。PD-1受容体の免疫抑制的な役割と一致して、PD-L1^{-/-}及びPD-L2^{-/-}マウスを用いた研究から、両リガンドがT細胞増殖及びサイトカイン産生の阻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 Immunol.* 175(11):7372-9。PD-L1欠乏症は、自己免疫糖尿病の非肥満糖尿病性モデル及び多発性硬化症(実験的自己免疫脳脊髄炎[EAE])のマウスモデルの両方において疾患進行を促進する。Ansari, 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。PD-L1^{-/-}T細胞は、両疾患モデルにおいてプロ炎症性サイトカインレベルを上昇させる。さらに、BMキメラ実験から、PD-L1の組織発現(即ち脾臓内)が、炎症を局所性に調節するその能力に唯一寄与することが明らかになっている。Keir, et al. (2006) *J. Exp. Med.* 203:883-895; Keir, et al. (2007) *J. Immunol.* 179:5064-5070; Grabie, et al. (2007) *Circulation* 116:2062-2071。PD-L1はまた、胎盤合体栄養細胞上で高度に発現され、同種胎児に対する母子免疫反応を慎重に調節する。Guleria, et al. (2005) *J. Exp. Med.* 202:231-237。

20

30

【0011】

その免疫抑制的な役割と一致して、PD-L1は、抗腫瘍免疫反応を強力に抑制し、腫瘍が免疫監視を逃れるのを促す。PD-L1は、高レベルのPD-1を発現する、浸潤性の細胞毒性CD8⁺T細胞のアポトーシスを誘導し得る。Dong, et al. (2002) *Nat. Med.* 8:793-800; Dong及びChen (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-287。他の免疫療法と組み合わせてPD-L1-PD-1シグナル伝達経路を遮断することにより、抗腫瘍CTL活性及びサイトカイン産生を促進することによって腫瘍進行が阻止される。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。DC上でのPD-L1発現は、適応Foxp3⁺CD4⁺制御T細胞(T_{reg}細胞)の誘導を促進し、PD-L1は、腫瘍微小環境内でのT_{reg}細胞の強力な誘導因子である。Wang, et al. (2008) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 105:9331-9336。B7ファミリー制御分子を

40

50

標的とすることにおける最近の進歩は、自己免疫性などの免疫関連疾患及び癌の処置における明るい見通しを示す。Keir, et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 26: 677-704; Zou及びChen (2008) Nat. Rev. Immunol. 8: 467-477。

【0012】

自己免疫疾患

〔0012〕 自己免疫障害は、免疫系が誤って健康な身体組織を攻撃し、破壊する際に起こる状態である。80を超える様々なタイプの自己免疫障害がある。通常、免疫系の白血球は、抗原と呼ばれる有害物質からの身体の防御を助ける。抗原の例としては、細菌、ウイルス、毒素、癌細胞及び別の人間もしくは種からの血液もしくは組織が挙げられる。免疫系は、これらの有害物質を破壊する抗体を産生する。しかし自己免疫障害がある患者において、免疫系は、自己と非自己（例えば健康な組織と外来抗原）とを区別できない。その結果、正常な身体組織を免疫反応が破壊する。この反応は、アレルギー性状態における反応と同様の超過敏性反応である。アレルギーにおいて、免疫系は、それが通常は無視する外部物質に反応する。自己免疫障害により、免疫系は、それが通常は無視する正常身体組織に反応し、その原因は不明である。

10

【0013】

自己免疫障害の結果、1以上の型の身体組織の破壊、器官の異常な成長及び器官機能の変化が起こり得、1以上の器官又は組織型に影響を与え得る。自己免疫障害により一般に影響を受ける器官及び組織としては、血管、結合組織、内分泌腺（例えば甲状腺又は膵臓）、関節、筋肉、赤血球細胞及び皮膚が挙げられる。ヒトは同時に複数の自己免疫障害を有し得る。

20

【0014】

自己免疫疾患の症状は、疾患及び異常な免疫反応の位置に基づき変動する。自己免疫疾患に伴い生じることが多い一般的な症状としては、疲労、発熱及び全身違和感（不快感）が挙げられる。自己免疫障害を診断するために行われ得る検査としては、抗核抗体検査、自己抗体検査、CBC、C-反応性タンパク質（CRP）及び赤血球沈降速度（ESR）が挙げられ得る。

【0015】

免疫系の反応を調節するか又は低下させるために、薬物が処方されることが多い。これらは、免疫抑制薬と呼ばれることが多い。このような薬剤としては、コルチコステロイド（プレドニゾンなど）及びアザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノール酸、シロリムス又はタクロリムスなどの非ステロイド薬が挙げられる。

30

【0016】

合併症は普通であり、疾患に依存する。免疫系を抑制するために使用される薬物の副作用は重篤であり得、例えば調節困難であり得る感染などである。「Autoimmune disorders.」Medline Plus-U. S. National Library of Medicine (2012年4月19日)。

【0017】

炎症状態

〔0017〕 炎症は、病原体、損傷細胞又は刺激などの有害刺激に対する血管組織の複雑な生体反応の一部である。炎症は、有害な刺激を除去し、治癒過程を開始するための生物による防御的な試みである。炎症なくしては創傷及び感染は治癒しない。同様に、組織の進行性の破壊により生物を生命の危険にさらす。しかし、慢性炎症は、枯草熱、歯周炎、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ及びさらに癌（例えば膀胱癌）など、多くの疾患へともつながり得る。

40

【0018】

炎症は、急性又は慢性の何れかに分類され得る。急性炎症は有害刺激に対する身体の最初の反応であり、血液から損傷組織への血漿及び白血球（特に顆粒球）の移動の増加により達成される。生化学的事象のカスケードは、損傷組織内の局所の血管系、免疫系及び様

50

々な細胞を伴う炎症反応を伝搬させ、成熟させる。慢性炎症として知られる長引く炎症は、炎症部位に存在する細胞型における進行性の変遷につながり、炎症性過程からの組織の同時に起こる破壊及び治癒を特徴とする。Kindt, et al. (2006) Kuby Immunology [6th Ed.]。

【0019】

T細胞は、炎症の広がりに関与する。ナイーブT細胞の分化は、様々な免疫機能を発揮するためにそれぞれが異なるサイトカイン発現プロファイルを保持するT細胞サブセットの産生につながる。個々のシグナル伝達経路の活性化を通じて、この過程の結果、Th1、Th2及びTh17と呼ばれる分化したヘルパーT (Th) 細胞が生じ、Th細胞を抑制する制御T細胞が誘導される。これらの異なる細胞は、感染性疾患及び癌に対処するために重要であるが；異常である場合、これらは慢性炎症性疾患の原因となり得る。あるこのような疾患が炎症性腸疾患 (IBD) であり、各T細胞サブセットが疾患において役割を有し得る。Zenewicz, et al. (2009) Trends in Molecular Medicine 15 (5) : 199-207。従って、T細胞は、自己免疫障害及び炎症状態の両方に関与し、当技術分野で自己免疫障害及び炎症状態の処置のためのT細胞の活性を調整し得る新規分子が必要とされている。

【発明の概要】

【0020】

本発明は、自己免疫、アレルギー性及び炎症状態の処置及び／又は予防を必要とする対象において自己免疫、アレルギー性及び炎症状態を処置及び／又は予防するために全身的に投与され得る高い効力を保持するリンカーポリペプチドを具備する多量体型を含む、VISTA-Igの最適化形態を含むVISTA (例えばVISTA-Ig) の可溶性形態の使用に関する。代表的な状態としては、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬性関節炎、狼瘡障害、例えば全身性紅斑性狼瘡 (SLE)、円板状狼瘡、薬物誘発性狼瘡及び新生児狼瘡及びアレルギー性又は炎症性呼吸器障害、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、枯草熱、蕁麻疹、脈管炎及びチャグ・ストラウス症候群ならびに他のアレルギー性、炎症性及び自己免疫状態、例えば上記で開示されるものなどが挙げられる。

【0021】

本発明はまた、1以上の (即ち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12以上のコピーの、配列番号2、4、5、16から25、36又は37のポリペプチド配列の細胞外ドメイン又は少なくとも50、100、150、200、250、275もしくは300アミノ酸である断片に対して少なくとも約90%の配列同一性を有するポリペプチドと、1以上の免疫グロブリン (Ig) タンパク質と、場合によっては、融合ポリペプチド中でVISTAポリペプチドに介入するリンカーペプチドと、別のポリペプチド、好ましくはIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域などのIgポリペプチド又はIgポリペプチドが場合によっては補体結合及び／又はFcR結合を変化 (増加、変化又は減少) させるように突然変異されているものであり得る断片と、を具備する、改善されたVISTA融合タンパク質も提供する。

【0022】

ある実施形態において、本ポリペプチドは、配列番号2、4、5、16から25、36もしくは37のポリペプチド配列又は少なくとも50、100、150、200、250、275もしくは300アミノ酸である断片に対して少なくとも約95%の配列同一性を有し得る。

【0023】

ある実施形態において、Igタンパク質は、場合によっては補体結合及び／又はFcR結合を変化 (増加、変化又は減少) させるように突然変異されているものであり得る、IgG、IgG1、IgG2、IgG2a、IgM、IgE又はIgAであり得る。ある実施形態において、Igタンパク質は、ヒトIgG1の定常及びヒンジ領域であり得、場合によっては補体結合及び／又はFcR結合を変化 (増加、変化又は減少) させるように突然変異されているものであり得る。

【0024】

ある実施形態において、融合ポリペプチド中のVISTAの細胞外ドメインは、アミノ酸残基32から190に対して又はアミノ酸16から194を具備し得るVISTAの細胞外IgVドメインに対して少なくとも90、95、96、97、98、99又は100%同一であるポリペプチドを具備する。ある実施形態において、本融合タンパク質は、少なくとも2コピーのVISTAタンパク質又は少なくとも50、100、150、200、250、275もしくは300アミノ酸である断片と、IgG1又はIgG2aと、を具備する。別の実施形態において、本融合タンパク質は、場合によってはペプチドリンカー、例えば得られる融合ポリペプチドの効力を向上させるセリン及び／又はグリシン残基を具備するリンカーにより介入される、少なくとも3又は4コピーのVISTAタンパク質及びIgG1又はIgG2aを具備する。

10

【0025】

ある実施形態において、本融合タンパク質は少なくとも2コピーのVISTAタンパク質と、IgG1 Fc又は非FcR-結合IgG1と、を具備する。ある実施形態において、本融合タンパク質は、少なくとも4、5又は6コピーのISTAタンパク質と、IgG1又はIgG2aと、を具備する。ある実施形態において、本融合タンパク質は、少なくとも4コピーのVISTAタンパク質と、IgG1 Fc又は非FcR-結合IgG1と、を具備する。

【0026】

ある実施形態において、単離多量体VISTAタンパク質は、配列番号2、4又は25のポリペプチド配列を具備し得る細胞外ドメイン又は少なくとも50、100、150、200、250、275もしくは300アミノ酸である断片に対して少なくとも約90%の配列同一性である、少なくとも2コピーのポリペプチドを具備し得る。別の実施形態において、本ポリペプチドは、配列番号2、4、5、16から25、36もしくは37のポリペプチド配列又は少なくとも50、100、150、200、250、275もしくは300アミノ酸である断片に対して少なくとも約95%の配列同一性を有し得る。別の実施形態において、本ポリペプチドは、少なくとも50アミノ酸長であり得る、このVISTAポリペプチドの細胞外ドメインの断片又は少なくとも75、100、150、200、250、275もしくは300アミノ酸である断片に対して、少なくとも約90%の配列同一性を有し得る。

20

30

【0027】

別の実施形態において、本VISTAポリペプチドの細胞外ドメインの断片は、少なくとも約75アミノ酸長であり得る。別の実施形態において、本VISTAポリペプチドの細胞外ドメインの断片は、少なくとも約100アミノ酸長であり得る。別の実施形態において、本VISTAポリペプチドの細胞外ドメインの断片は、少なくとも約125アミノ酸長であり得る。

【0028】

別の実施形態において、多量体VISTAタンパク質は、少なくとも3コピーの本細胞外ドメイン又はその断片を具備する。別の実施形態において、多量体VISTAタンパク質は、少なくとも4コピーの本細胞外ドメイン又はその断片を具備する。別の実施形態において、多量体VISTAタンパク質は、少なくとも5コピーの本細胞外ドメイン又はその断片を具備する。別の実施形態において、多量体VISTAタンパク質は、少なくとも6コピーの細胞外ドメイン又はその断片を具備する。

40

【0029】

別の実施形態において、細胞外ドメイン又はVISTAの断片は、オリゴマー化ドメインのN-末端に連結され得る。別の実施形態において、オリゴマー化ドメインは、GCN4、COMP、SNARE、CMP、MAT、1個のNLRCを含有するLLR、NOD2ヌクレオチド-結合NLRC2、1個のNLRCを含有するLLR NOD2ヌクレオチド-結合NLRC2又はPSORAS1である。

【0030】

50

ある実施形態において、組成物は、V I S T A融合タンパク質を具備し得る。ある実施形態において、組成物は多量体V I S T Aタンパク質を具備し得る。別の実施形態において、本組成物は医薬組成物であり得る。別の実施形態において、本医薬組成物は、医薬的に許容可能な担体、賦形剤、アジュバント又は溶液を具備し得る。別の実施形態において、本組成物は、少なくとも1つの他の免疫抑制剤をさらに具備し得る。別の実施形態において、本免疫抑制剤は、P D-1、P D-L 1、P D-L 2、C T L A 4、I C O Sタンパク質又は少なくとも50、100、150、200、250、275もしくは300アミノ酸である断片又は前述のものの何れかに特異的な抗体であり得る。

【0031】

ある実施形態において、炎症の処置又は予防を必要とする対象において炎症を処置又は予防する方法は、有効量のV I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g又は多量体V I S T Aタンパク質を投与することを具備し得る。

10

【0032】

ある実施形態において、炎症を処置又は予防するための組成物は、有効量のV I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g又は多量体V I S T Aタンパク質を投与することを具備し得る。

【0033】

別の実施形態において、炎症を処置するための薬剤の製造のための有効量のV I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g又は多量体V I S T Aタンパク質の使用。

20

【0034】

別の実施形態において、対象は炎症性状態を有し得る。

【0035】

別の実施形態において、炎症性状態は、酸逆流／胸焼け、ざ瘡、尋常性ざ瘡、アレルギー及び過敏症、アルツハイマー病、喘息、アテローム性動脈硬化症及び血管閉塞性疾患、場合によってはアテローム性動脈硬化症、虚血性心疾患、心筋梗塞、脳卒中、末梢血管疾患又は血管ステント再狭窄、自己免疫疾患、気管支炎、癌、心炎、白内障、セリアック病、慢性痛、慢性前立腺炎、肝硬変、大腸炎、結合組織疾患、場合によっては全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、多発性筋炎、皮膚筋炎又はシェーグレン症候群、角膜疾患、クロール病、結晶性関節症、場合によっては痛風、偽痛風、ピロリン酸カルシウム結晶沈着症、認知症、皮膚炎、糖尿病、ドライアイ、湿疹、浮腫、肺気腫、線維筋痛症、胃腸炎、歯肉炎、糸球体腎炎、心疾患、肝炎、高血圧、超過敏症、炎症性腸疾患、外傷又は虚血の結果を含む炎症状態、インスリン抵抗性、間質性膀胱炎、虹彩毛様体炎、虹彩炎、関節痛、関節炎、関節リウマチ、ライム病、メタボリックシンドローム（シンドロームX）、多発性硬化症、筋炎、腎炎、肥満、ブドウ膜炎を含む眼疾患、骨減少、骨粗しょう症、パーキンソン病、骨盤炎症性疾患、歯周病、多発動脈炎、多発性軟骨炎、リウマチ性多発筋痛、乾癬、再かん流傷害、関節リウマチ、リウマチ性疾患、場合によっては関節リウマチ、変形性関節症又は乾癬性関節炎、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、副鼻腔炎、シェーグレン症候群、けいれん性結腸、脊椎関節症、場合によっては強直性脊椎炎、反応性関節炎又はライター症候群、全身性カンジダ症、腱炎、移植拒絶、U T I ' s、膣炎、アテローム性動脈硬化性の血管疾患を含む血管疾患、血管炎、場合によっては結節性多発動脈炎、ヴェーゲナー肉芽腫、チャグ・スト劳斯症候群又は脈管炎であり得る。

30

40

【0036】

ある実施形態において、自己免疫疾患を処置する方法は、有効量のV I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g又は多量体V I S T Aタンパク質を投与することを具備し得る。

【0037】

ある実施形態において、自己免疫疾患を処置するための組成物は、有効量のV I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g又は多量体V I S T Aタンパク質を投与することを具備し得る。

50

【0038】

別の実施形態において、自己免疫疾患の治療の薬剤の製造のための有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質の使用。

【0039】

別の実施形態において、自己免疫疾患は細胞介在性自己免疫疾患であり得る。

【0040】

別の実施形態において、細胞介在性自己免疫疾患は、多発性硬化症、I型糖尿病、卵巣炎又は甲状腺炎であり得る。

【0041】

別の実施形態において、自己免疫疾患は、後天性免疫不全症候群(AIDS)、後天性脾臓萎縮症、急性前部ブドウ膜炎、急性播種性脳脊髄炎(ADEM)、急性痛風性関節炎、急性壊死性出血性白質脳炎、急性又は慢性副鼻腔炎、急性化膿性髄膜炎(又は他の中枢神経系炎症性障害)、急性の重篤な炎症、アジソン病、副腎炎、成人発症糖尿病(II型糖尿病)、成人発症特発性副甲状腺機能低下症(AOIH)、無ガンマグロブリン血症、無顆粒球症、血管炎を含む脈管炎、場合によっては大血管脈管炎、場合によってはリウマチ性多発筋痛及び巨細胞(高安)関節炎、アレルギー性状態、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、アレルギー性超過敏性疾患、アレルギー性神経炎、アレルギー反応、円形脱毛症、全頭脱毛症、アルポート症候群、肺炎、場合によってはアレルギー性肺炎又は線維性肺炎、アルツハイマー病、アミロイドーシス、筋萎縮性側索硬化症(ALS;ルー・ゲーリック病)、好酸球関連障害、場合によっては好酸球増加症、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、血管拡張症、抗体介在性腎炎、抗GBM/抗TBM腎炎、抗原-抗体複合体介在性疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、抗リン脂質症候群(APS)、アフタ、アフタ性口内炎、再生不良性貧血、不整脈、動脈硬化症、動脈硬化性障害、関節炎、場合によっては関節リウマチ、例えば急性関節炎又は慢性関節リウマチ、進行性慢性関節炎、変形性関節炎、回虫症、アスペルギルス腫、好酸球を含有する肉芽腫、アスペルギルス症、アスペルミオジェネス、喘息、場合によっては気管支喘息、気管支の喘息又は自己免疫喘息、毛細血管拡張性運動失調、失調性硬化症、アテローム性動脈硬化症、自閉症、自己免疫血管浮腫、自己免疫再生不良性貧血、自己免疫萎縮性胃炎、自己免疫糖尿病、自己免疫精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫疾患、膠原病に伴う自己免疫障害、自己免疫自律神経障害、自己免疫耳疾患、場合によっては自己免疫内耳疾患(AGED)、甲状腺炎、例えば自己免疫甲状腺炎を含む自己免疫内分泌疾患、自己免疫消化器症候群、自己免疫性腺機能不全、自己免疫難聴、自己免疫溶血、自己免疫肝炎、自己免疫肝臓病学的障害、自己免疫高脂血症、自己免疫不全症、自己免疫内耳疾患(AIED)、自己免疫心筋炎、自己免疫好中球減少症、自己免疫脾炎、自己免疫多腺性内分泌障害、自己免疫多腺性症候群I型、自己免疫網膜炎、自己免疫血小板減少性紫斑病(ATP)、自己免疫甲状腺疾患、自己免疫蕁麻疹、自己免疫介在性胃腸疾患、軸索及びニューロンのニューロパチー、バロー病、ベーチェット病、良性家族性及び虚血-再かん流傷害、良性リンパ球性血管炎、ベルガー病(IgA腎症)、愛鳥家肺、失明、ベック病、細気管支炎閉塞性(非移植)vs NSIP、気管支炎、気管支肺アスペルギルス症、バートン症候群、水疱性類天疱瘡、カプラン症候群、心筋症、心血管系虚血、キャッスルマン病、セリアック病、セリアックスプルー(グルテン腸症)、小脳変性症、脳虚血及び血管新生を伴う疾患、シャーガス病、チャネル病、場合によってはてんかん、CNSのチャネル病、脈絡網膜炎、脈絡膜炎、自己免疫血液障害、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、慢性接触皮膚炎、慢性好酸球性肺炎、慢性疲労症候群、慢性肝炎、慢性超過敏性肺臓炎、慢性炎症性関節炎、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー(CIDP)、慢性難治性炎症、慢性粘膜皮膚性カンジダ症、慢性ニューロパチー、場合によってはIgM多発性ニューロパチー又はIgM介在性ニューロパチー、慢性閉塞性気道疾患、慢性肺炎症性疾患、慢性再発性多巣性骨髄炎(CRMO)、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)又は亜急性甲状腺炎、チャージ・ストラウス症候群、癩痕性類

10

20

30

40

50

天疱瘡／良性粘膜類天疱瘡、CNS炎症性障害、CNS脈管炎、セリアック病、コーガン症候群、寒冷凝集素症、ポリープ性大腸炎、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、潰瘍性大腸炎、膠原線維性大腸炎、T細胞浸潤及び慢性炎症反応を含む状態、先天性心臓ブロック、先天性風疹感染、クームス陽性貧血、冠動脈疾患、コクサッキー心筋炎、CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象）、クローン病、クリオグロブリン血症、クッシング症候群、毛様体炎、場合によっては慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、虹彩毛様体炎又はフックス毛様体炎、嚢胞性線維症、サイトカイン誘導性毒性、聴覚消失、変形性関節炎、脱髄性疾患、場合によっては自己免疫脱髄性疾患、脱髄性ニューロパチー、デング熱、ヘルペス状皮膚炎及びアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎を含む皮膚炎、皮膚筋炎、急性炎症性要素を伴う皮膚疾患、デビック病（視神経脊髄炎）、糖尿病性大動脈障害、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、びまん性間質性肺線維症、拡張型心筋症、円板状狼瘡、白血球血管外漏出を含む疾患、ドレスラー症候群、デュブイトラン拘縮、エコーウイルス感染、アレルギー性又はアトピー性湿疹を含む湿疹、脳炎、例えばラスムッセン脳炎及び辺縁系及び／又は脳幹脳炎、脳脊髄炎、場合によってはアレルギー性脳脊髄炎又はアレルギー性脳脊髄炎及び実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、動脈内過形成、心内膜炎、内分泌性眼障害、子宮内膜症、心内膜心筋線維症、水晶体過敏性眼内炎、眼内炎、アレルギー性腸炎、好酸球増加症－筋痛症候群、好酸球性筋膜炎、流行性角結膜炎、後天性表皮水疱症（EBA）、上強膜、上強膜炎、エプスタイン－バーウイルス感染、持続性隆起性紅斑、多形性紅斑、癩性結節性紅斑、結節性紅斑、胎児赤芽球症、食道運動不全、本態性混合型クリオグロブリン血症、篩骨、エバンス症候群、実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、第V I I I因子欠乏症、農夫肺、フェブリスリウマチ、フェルティ－症候群、線維筋痛症、線維性肺炎、フィラリア症、巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）、食中毒、前頭骨、胃萎縮、巨細胞関節炎（側頭関節炎）、巨細胞肝炎、巨細胞多発性筋痛、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群を伴う、及び伴わない糸球体腎炎（GN）、例えば慢性又は急性糸球体腎炎（例えば原発性GN）、グッドパスチャー症候群、痛風性関節炎、顆粒球輸血関連症候群、リンパ腫様肉芽腫症を含む肉芽腫症、多発性血管炎を伴う肉芽腫症（GPA）、肉芽腫性ブドウ膜炎、グレーブズ病、ギラン・バレー症候群、滴状乾癬、血色素尿症発作、ハーマン＝リッチ症候群、橋本病、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、ヘモクロマトーシス、溶血性貧血又は自己免疫性溶血性貧血（AIHA）を含む免疫性溶血性貧血、溶血性貧血、血友病A、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、痛覚過敏、低ガンマグロブリン血症、性腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、特発性尿崩症、特発性顔面麻痺、特発性甲状腺機能低下症、特発性IgA腎症、特発性膜性GN又は特発性膜性腎症、特発性ネフローゼ症候群、特発性肺線維症、特発性スプル－、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、IgE介在性疾患、場合によってはアナフィラキシー及びアレルギー性又はアトピー性鼻炎、IgG4関連硬化性疾患、回腸炎レジオナリス、免疫複合体腎炎、サイトカイン及びT－リンパ球が介在する急性及び遅発性超過敏性を伴う免疫反応、免疫介在性GN、成人又は急性呼吸窮迫症候群（ARDS）を含む免疫調節性リポタンパク質、封入体筋炎、感染性関節炎、抗精子抗体による不妊症、ブドウ膜全体又は一部の炎症、炎症性腸疾患（IBD）炎症性過剰増殖皮膚疾患、炎症性ミオパチー、インスリン依存性糖尿病（I型）

、腓島炎、間質性膀胱炎、間質性肺疾患、間質性肺線維症、虹彩炎、虚血再かん流障害、関節の炎症、若年性関節炎、若年性皮膚筋炎、若年性糖尿病、小児インスリン依存性糖尿病（IDDM）を含む若年性発症（I型）糖尿病、若年発症関節リウマチ、川崎病、乾性角結膜炎、キパノソミアシス、ランバート－イトン症候群、リーシュマニア症、ハンセン病、白血球減少症、白血球接着欠乏症、白血球破碎性脈管炎、白血球減少症、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、直鎖状IgA皮膚炎、直鎖状IgA疾患（LAD）、レフラー症候群、ルポイド肝炎、狼瘡（腎炎、脳炎、小児、非腎臓、腎臓外、円板状、脱毛症を含む。）、狼瘡（SLE）、播種性紅斑性狼瘡、ライム関節炎、ライム病、リンパ球様間質性肺臓炎、マラリア、男性及び女性自己免疫不妊症、上顎、中間型血管炎（川崎病及び結節性多発動脈炎を含む。）、I型及びII型を含む膜状－又は膜性増殖性GN（MP

10

20

30

40

50

GN) 及び急速進行性GN、膜性GN (膜性腎症)、メニエール病、髄膜炎、顕微鏡的大腸炎、顕微鏡的多発性血管炎、偏頭痛、微小変化型腎症、混合結合組織疾患 (MCTD)、伝染性単核球症、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多巣性運動ニューロパチー、多発性内分泌機能不全、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血に続発するもの、多臓器損傷症候群、多発性硬化症 (MS)、例えば脊椎-眼MS、多発性硬化症、流行性耳下腺炎、筋障害、重症筋無力症、例えば胸腺腫を伴う重症筋無力症、重症筋無力症、心筋炎、筋炎、ナルコレプシー、壊死性腸炎及び貫壁性大腸炎及び自己免疫炎症性腸疾患、壊死性、皮膚性又は超過敏性脈管炎、新生児狼瘡症候群 (NLE)、ネフローゼ、ネフローゼ症候群、神経性疾患、視神経脊髄炎 (デビック病)、視神経脊髄炎、神経性筋緊張病、好中球減少症、非癌性リンパ球増加症、非肉芽腫性ブドウ膜炎、非悪性胸腺腫、眼及び眼窩炎症性障害、眼癬痕性類天疱瘡、卵巣炎、交感性眼炎、眼球クローススミオクロースス症候群 (OMS)、眼球クロースス又は眼球クローススミオクロースス症候群 (OMS) 及び感覚ニューロパチー、視神経炎、肉芽腫性精巣炎、変形性関節症、回帰性リウマチ、腭炎、汎血球減少症、PANDAS (連鎖球菌が関連する小児自己免疫精神神経疾患)、傍腫瘍性小脳変性症、腫瘍随伴症候群、傍腫瘍性神経症候群を含む腫瘍随伴症候群、場合によってはランバート・イートン筋無力症候群又はイートン・ランバート症候群、寄生虫症、例えばリーシュマニア、発作性夜間血色素尿症 (PNH)、パリー・ロンベルク症候群、毛様体扁平部炎 (末梢ブドウ膜炎)、パーソンネージ・ターナー症候群、パルボウイルス感染、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡及び皮膚類天疱瘡、天疱瘡 (尋常性天疱瘡を含む。)、紅斑性天疱瘡、落葉状天疱瘡、粘膜類天疱瘡、天疱瘡、消化性潰瘍、周期性四肢麻痺、末梢ニューロパチー、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血 (悪性の貧血)、悪性貧血、水晶体抗原性ブドウ膜炎、肺線維症、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、I、II及びIII型多発性関節炎慢性プリマリア、多発性軟骨炎 (例えば難治性又は再発性多発性軟骨炎)、多内分泌自己免疫疾患、多内分泌不全、多腺性症候群、場合によっては自己免疫多腺性症候群 (又は多腺性内分泌障害症候群)、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性ニューロパチー、急性多発性神経根炎、開心術後症候群、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、連鎖球菌感染後腎炎、ワクチン接種後症候群、初老期認知症、原発性胆汁性肝硬変、原発性甲状腺機能低下症、原発性特発性粘液水腫、単クローン性B細胞リンパ球増加症を含む原発性リンパ球増加症、場合によっては良性単クローン性高ガンマグロブリン血症及び意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症、MGUS、原発性粘液水腫、原発性進行性MS (PPMS) 及び再発寛解型MS (RRMS)、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、進行性全身性硬化症、増殖性関節炎、乾癬、例えばプラーク性乾癬、乾癬、乾癬性関節炎、肺胞タンパク質症、肺浸潤好酸球増加症、赤芽球癆貧血又は形成不全 (PRCA)、赤芽球癆形成不全、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、膿疱性乾癬及び爪の乾癬、腎盂炎、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎、レイノー現象、反応性関節炎、習慣性流産、血圧反応の低下、反射性交感神経性ジストロフィー、難治性スプルー、ロイター病又は症候群、再発性多発性軟骨炎、

心筋又は他の組織の再かん流傷害、再かん流傷害、呼吸窮迫症候群、むずむず脚症候群、網膜自己免疫性、後腹膜線維症、レイノー症候群、リウマチ性疾患、リウマチ熱、リウマチ、関節リウマチ、リウマチ性脊椎炎、風疹ウイルス感染、サンプター症候群、サルコイドーシス、住血吸虫症、シュミット症候群、SCID及びエプスタインバーウイルス関連疾患、強膜、強膜炎、肢端硬化、強皮症、場合によっては全身性強皮症、硬化性胆管炎、播種性硬化症、硬化症、例えば全身性硬化症、感音性難聴、血清反応陰性脊椎関節炎、シーハン症候群、シャルマン症候群、珪肺症、シェーグレン症候群、精子及び精巣自己免疫性、蝶形骨洞炎、スティープンス・ジョンソン症候群、スティッフ・マン (又はスティッフ・パーソン) 症候群、亜急性細菌心内膜炎 (SBE)、亜急性皮膚性紅斑性狼瘡、突発性難聴、スザック症候群、シドナム舞踏病、交感性眼炎、全身性紅斑性狼瘡 (SLE) 又は全身性紅斑性狼瘡、皮膚性SLE、全身性壊死性脈管炎、ANCA関連血管炎、場合によってはチャージ・ストラウス血管炎又は症候群 (CSS)、脊髄癆、高安動脈炎、毛

10

20

30

40

50

細血管拡張症、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、閉塞性血栓性血管炎、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）及び自己免疫又は免疫介在性血小板減少症を含む、血小板減少症、例えば慢性又は急性特発性血小板減少性紫斑病（ITP）を含む特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血小板減少性紫斑病（TTP）、甲状腺中毒症、組織損傷、トロアザ・ハント症候群、中毒性表皮剥離症、毒性ショック症候群、輸血反応、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、横断性脊髄炎、横断性の脊髄炎、熱帯性肺好酸球増加症、結核、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織疾患（UCTD）、蕁麻疹、場合によっては慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性自己免疫蕁麻疹を含む慢性特発性蕁麻疹、ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、網膜ブドウ膜炎、弁膜炎、血管機能不全、脈管炎、椎間体性関節炎、小水疱水疱性皮膚炎、白斑、ヴェーゲナー肉芽腫（多発性血管炎を伴う肉芽腫症（GPA））、ウィスコット・アルドリッチ症候群又はX連鎖高IgM症候群であり得る。

10

【0042】

さらなる実施形態において、本方法、使用又は組成物は、別の免疫調節物質及び／又は抗原の投与をさらに具備し得る。別の実施形態において、本免疫調節物質は、TLRアゴニスト（TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11アゴニスト）であり得、1型インターフェロン、場合によってはαインターフェロン又はβインターフェロン又はCD40アゴニスト又はIL-6アンタゴニスト又はTNFアンタゴニスト、例えば前述のものの何れかに特異的な抗体又は抗体断片であり得る。

【0043】

20

ある実施形態において、炎症性障害を処置するための方法は、有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質を投与することを具備し得る。

【0044】

ある実施形態において、炎症性障害を処置するための組成物は、有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質を具備し得る。

【0045】

ある実施形態において、炎症性障害の処置用の薬剤の製造のための有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質の使用。

30

【0046】

ある実施形態において、処置される障害は、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬性関節炎、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ性疾患、アレルギー性障害、喘息、アレルギー性鼻炎、皮膚障害、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植拒絶、移植片対宿主病、連鎖球菌感染後及び自己免疫腎不全、敗血症性ショック、全身性炎症反応症候群（SIRS）、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）及び毒物注入；自己炎症性疾患、変形性関節症、結晶性関節炎、関節包炎、関節症、腱炎、靱帯炎又は外傷性関節損傷から選択され得る。

【0047】

ある実施形態において、処置される障害は、多発性硬化症、SLEなどの狼瘡状態、呼吸器障害、例えば喘息、蕁麻疹、脈管炎、チャグ・ストラウス症候群、乾癬性関節炎又は関節リウマチであり得る。

40

【0048】

ある実施形態において、移植片対宿主病（GVHD）を処置する方法は、有効量の有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質の投与を具備し得る。

【0049】

ある実施形態において、移植片対宿主病（GVHD）を処置するための組成物は、有効量の有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質の投与を具備し得る。

50

【0050】

ある実施形態において、移植片対宿主病（GVHD）の処置用の薬剤の製造における有効量の有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質の使用。

【0051】

ある実施形態において、移植片対宿主病は、急性移植片対宿主病、慢性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う急性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う慢性移植片対宿主病、骨髄移植に伴う急性移植片対宿主病、同種血液幹細胞移植（HSCT）に伴う急性移植片対宿主病又は骨髄移植に伴う慢性移植片対宿主病であり得る。

【0052】

ある実施形態において、処置される患者は、移植片対宿主病（GVHD）の少なくとも1つの症状を有し得、場合によっては、この患者は、腹痛、腹部けいれん、下痢、発熱、黄疸、皮膚発疹、嘔吐及び体重減少を含むが限定されない急性GVHDを示す。ある実施形態において、処置される患者は、ドライアイ、ドライマウス、脱毛、肝炎、肺障害、消化管障害、皮膚発疹及び皮膚肥厚を含むが限定されない慢性移植片対宿主病（GVHD）の少なくとも1つの症状を有し得る。ある実施形態において、本患者は、同種幹細胞又は骨髄移植を有するか又はこれを受けようとしている。

【0053】

ある実施形態において、患者は自己幹細胞又は骨髄移植を有し得るか又はこれを受けようとしている。

【0054】

ある実施形態において、アレルギー性、炎症性又は自己免疫障害がある個体を処置する方法は、有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質を投与することを具備し得る。

【0055】

ある実施形態において、アレルギー性、炎症性又は自己免疫障害を有する個体を処置するための組成物は、有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質を投与することを具備し得る。

【0056】

ある実施形態において、アレルギー性、炎症性又は自己免疫障害の処置用の薬剤の製造のための有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig又は多量体VISTAタンパク質の使用。

【0057】

別の実施形態において、アレルギー性、炎症性又は自己免疫障害は、乾癬、皮膚炎、アトピー性皮膚炎；全身性強皮症、硬化症；クローン病、潰瘍性大腸炎；呼吸窮迫症候群、成人呼吸窮迫症候群；ARDS；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；湿疹、喘息、アテローム性動脈硬化症；白血球接着欠乏症；関節リウマチ；全身性紅斑性狼瘡（SLE）；糖尿病、場合によってはI型糖尿病又はインスリン依存性糖尿病；多発性硬化症；レイノー症候群；自己免疫甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シェーグレン症候群；若年性発症糖尿病；結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫症及び脈管炎；悪性貧血（アジソン病）；移植片拒絶疾患、GVHD、中枢神経系（CNS）炎症性障害；多臓器損傷症候群；溶血性貧血、クリオグロブリン血症又はクームス陽性貧血；重症筋無力症；抗原-抗体複合体介在性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；グレーブズ病；ランバート・イートン筋無力症候群；水疱性類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫多腺性内分泌障害；ロイター病；スティッフ・マン症候群；ベーチェット病；巨細胞動脈炎；免疫複合体腎炎；IgA腎症；IgM多発性ニューロパチー；免疫血小板減少性紫斑病（ITP）及び自己免疫血小板減少症から選択され得る。

【0058】

別の実施形態において、疾患は、関節炎、関節リウマチ、急性関節炎、慢性関節リウマチ、痛風性関節炎、急性痛風性関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節炎、感染性関節炎

10

20

30

40

50

、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、椎間体性関節炎及び若年発症関節リウマチ、変形性関節症、進行性慢性関節炎、変形性関節炎、多発性関節炎慢性プリマリア、反応性関節炎及び強直性脊椎炎）、炎症性過剰増殖皮膚疾患、乾癬、例えばプラーク性乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪の乾癬、接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、ヘルペス状皮膚炎及びアトピー性皮膚炎を含む皮膚炎、X連鎖高IgM症候群、蕁麻疹、例えば慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性自己免疫蕁麻疹を含む慢性特発性蕁麻疹、多発性筋炎／皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性表皮剥離症、強皮症、全身性強皮症、硬化症、全身性硬化症、多発性硬化症（MS）、脊椎－眼MS、原発性進行性MS（PPMS）、再発寛解型MS（RRMS）、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、播種性硬化症及び失調性硬化症、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性大腸炎、顕微鏡的大腸炎、膠原線維性大腸炎、ポリープ性大腸炎、壊死性腸炎、貫壁性大腸炎、自己免疫炎症性腸疾患、壊疽性膿皮症、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、上強膜炎、呼吸窮迫症候群、成人又は急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、髄膜炎、ブドウ膜全体又は一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫血液障害、リウマチ性脊椎炎、突発性難聴、IgE介在性疾患、例えばアナフィラキシー及びアレルギー性及びアトピー性鼻炎、脳炎、ラスムッセン脳炎、辺縁系及び／又は脳幹脳炎、ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、急性前部ブドウ膜炎、肉芽腫性ブドウ膜炎、非肉芽腫性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、自己免疫ブドウ膜炎、糸球体腎炎（GN）、特発性膜性GN又は特発性膜性腎症、膜状－又は膜性増殖性GN（MPGN）、急速進行性GN、アレルギー性状態、自己免疫心筋炎、白血球接着欠乏症、全身性紅斑性狼瘡（SLE）又は全身性紅斑性狼瘡、例えば皮膚性SLE、亜急性皮膚性紅斑性狼瘡、新生児狼瘡症候群（NLE）、播種性紅斑性狼瘡、狼瘡（腎炎、脳炎、小児、非腎臓、腎臓外、円板状、脱毛症を含む。）、小児インスリン依存性糖尿病（IDDM）を含む若年性発症（I型）糖尿病、成人発症糖尿病（II型糖尿病）、自己免疫糖尿病、特発性尿崩症、サイトカイン及びTーリンパ球が介在する急性及び遅発性超過敏性を伴う免疫反応、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、リンパ腫様肉芽腫症、ヴェーゲナー肉芽腫、無顆粒球症、脈管炎を含む血管炎、大血管炎、リウマチ性多発筋痛、巨細胞（高安）動脈炎、中間型血管炎、川崎病、結節性多発動脈炎、顕微鏡的多発動脈炎、CNS脈管炎、壊死性、皮膚性、超過敏性脈管炎、全身性壊死性脈管炎及びANCA関連血管炎、例えばチャグ・ストラウス血管炎又は症候群（CSS）、側頭動脈炎、再生不良性貧血、自己免疫再生不良性貧血、クームス陽性貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、溶血性貧血又は自己免疫性溶血性貧血（AIHA）を含む免疫性溶血性貧血、悪性貧血（悪性の貧血）、アジソン病、赤芽球癆貧血又は形成不全（PRCA）、第V I I I因子欠乏症、血友病A、自己免疫好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外漏出を含む疾患、CNS炎症性障害、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血に続発するもの、抗原－抗体複合体介在性疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット又はベーチェット病、キャッスルマン病、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡及び皮膚類天疱瘡、天疱瘡、場合によっては尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、粘膜類天疱瘡、紅斑性天疱瘡、自己免疫多腺性内分泌障害、ロイター病又は症候群、免疫複合体腎炎、抗体介在性腎炎、視神経脊髄炎、多発性ニューロパチー、慢性ニューロパチー、IgM多発性ニューロパチー、IgM介在性ニューロパチー、血小板減少症、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、自己免疫精巣炎及び卵巣炎、原発性甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）；亜急性甲状腺炎、自己免疫甲状腺疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブズ病、多腺性症候群、例えば自己免疫多腺性症候群（又は多腺性内分泌障害症候群）、傍腫瘍性神経症候群を含む腫瘍随伴症候群、例えばランバート・イートン筋無力症候群又はイートン・ランバート症候群、スティッフ・マン又はスティッフ・パーソン症候群、脳脊髄炎、アレルギー性脳脊髄炎、実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、重症筋無力症、胸腺腫を伴う重症筋無力症、小脳変性

10

20

30

40

50

症、神経性筋緊張病、眼球クロオス又は眼球クロオスミオクロオス症候群（OMS）及び感覚ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、ルポイド肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、リンパ球様間質性肺臓炎、細気管支炎閉塞性（非移植）vs NSIP、ギラン・バレー症候群、ベルガー病（IGA腎症）、特発性IGA腎症、直鎖状IGA皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、肺線維症、自己免疫消化器症候群、セリアック病、セリアック病、セリアックスプルー（グルテン腸症）、難治性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルー・ゲーリック病）、冠動脈疾患、自己免疫耳疾患、例えば自己免疫内耳疾患（AGED）、自己免疫難聴、眼球クロオスミオクロオス症候群（OMS）、多発性軟骨炎、例えば難治性又は再発性多発性軟骨炎、肺胞タンパク質症、アミロイドーシス、強膜炎、非癌性リンパ球増加症、単クローン性B細胞リンパ球増加症を含む原発性リンパ球増加症、場合によっては良性単クローン性高ガンマグロブリン血症又は意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症、MGUS、末梢ニューロパチー、腫瘍随伴症候群、チャンネル病、例えばてんかん、偏頭痛、不整脈、筋障害、聴覚消失、失明、周期性四肢麻痺及びCNSのチャンネル病、自閉症、炎症性ミオパチー、巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）、内分泌性眼症、網膜ブドウ膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫肝臓病学的障害、線維筋痛症、多発性内分泌機能不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期認知症、脱髄性疾患、例えば自己免疫脱髄性疾患、糖尿病性ニューロパチー、ドレスラー症候群、円形脱毛症、CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象、食道運動不全、肢端硬化）及び毛細血管拡張症）、男性及び女性自己免疫不妊症、混合結合組織疾患、シャーガス病、リウマチ熱、習慣性流産、農夫肺、多形性紅斑、開心術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性血管炎、良性リンパ球性血管炎、アルポート症候群、肺炎、例えばアレルギー性肺炎及び線維性肺炎、間質性肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、キパノソミアシス、住血吸虫症、回虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維症、びまん性間質性肺線維症、間質性肺線維症、特発性肺線維症、嚢胞性線維症、眼内炎、持続性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、シャルマン症候群、フェルティー症候群、フィラリア症、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、虹彩毛様体炎又はフックス毛様体炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、エコーウイルス感染、心筋症、アルツハイマー病、パルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、ワクチン接種後症候群、先天性風疹感染、エプスタイン・バーウイルス感染、流行性耳下腺炎、エバンス症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、内分泌性眼障害、慢性超過敏性肺臓炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性ネフローゼ症候群、微小変化型腎症、良性家族性及び虚血-再かん流傷害、網膜自己免疫性、関節の炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化性障害、アスペルミオジェネシス、自己免疫溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュブユイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、アレルギー性腸炎、癩性結節性紅斑、特発性顔面麻痺、慢性疲労症候群、フェブリスリウマチ、ハーマン=リッチ症候群、感音性難聴、血色素尿症発作、性腺機能低下症、回腸炎レジオナリス、白血球減少症、伝染性単核球症、横断性の脊髄炎、原発性特発性粘液水腫、ネフローゼ、交感性眼炎、肉芽腫性精巣炎、睪炎、急性多発性神経根炎、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎、後天性脾臓萎縮症、抗精子抗体による不妊症、非悪性胸腺腫、白斑、SCID及びエプスタイン・バーウイルス関連疾患、後天性免疫不全症候群（AIDS）、寄生虫症、例えばリーシュマニア、毒性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を含む状態、白血球-接着欠乏症、サイトカイン及びT-リンパ球が介在する急性及び遅発性超過敏性を伴う免疫反応、白血球血管外漏出を含む疾患、多臓器損傷症候群、抗原-抗体複合体介在性疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ性疾患、混合結合組織疾患、ネフローゼ症候群、睪炎、多内分泌不全、末梢ニューロパチー、自己免疫多腺性症候群I型、成人発症特発

10

20

30

40

50

性副甲状腺機能低下症（A O I H）、全頭脱毛症、拡張型心筋症、後天性表皮水疱症（E B A）、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、急性又は慢性副鼻腔炎、篩骨、前頭骨、上顎又は蝶形骨洞炎、好酸球関連障害、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症－筋痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸球性肺炎、熱帯性肺好酸球増加症、気管支肺アスペルギルス症、アスペルギルス腫又は好酸球を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、血清反応陰性脊椎関節炎、多内分泌自己免疫疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性粘膜皮膚性カンジダ症、バートン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコット・アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調、膠原病に伴う自己免疫障害、リウマチ、神経性疾患、虚血再かん流障害、血圧反応の低下、血管機能不全、血管拡張症、組織損傷、心血管系虚血、痛覚過敏、脳虚血及び血管新生に伴う疾患、アレルギー性超過敏性疾患、糸球体腎炎、再かん流傷害、心筋又は他の組織の再かん流傷害、急性炎症性要素を伴う皮膚疾患、急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性障害、眼及び眼窩炎症性障害、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘導性毒性、急性の重篤な炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、肺線維症、糖尿病性網膜症、糖尿病性大動脈障害、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎及び子宮内膜症から選択され得る。

【0059】

ある実施形態において、抗体を作製する方法は、V I S T A エピトープで動物に免疫付与し、この動物の脾臓を摘出し、単一の細胞懸濁液を調製し、脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させ、融合後細胞をハイブリドーマ選択培地中で培養し、得られるハイブリドーマを培養し、特異的な抗体産生についてスクリーニングし、所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択することを具備し得る。

【0060】

別の実施形態において、V I S T A エピトープで動物に免疫付与し、この動物の脾臓を摘出し、単一の細胞懸濁液を調製し、脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させ、融合後細胞をハイブリドーマ選択培地中で培養し、得られるハイブリドーマを培養し、特異的な抗体産生についてスクリーニングし、所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択することを具備する方法により産生される抗V I S T A 又はその抗体断片。

【0061】

別の実施形態において、抗V I S T A 又はその抗体断片はヒト化、キメラ又は1本鎖変異体であり得る。

【0062】

ある実施形態において、単離V I S T A アンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0063】

ある実施形態において、炎症の処置又は予防を必要とする対象において処置又は予防する方法は、有効量の単離V I S T A アンタゴニストを投与することを具備し得、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0064】

ある実施形態において、自己免疫疾患を処置する方法は、有効量の単離V I S T A アンタゴニストを投与することを具備し得、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0065】

ある実施形態において、炎症性障害を処置する方法は、有効量の単離V I S T A アゴニスト又はアンタゴニストを投与することを具備し得、このアゴニスト又はアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイ

10

20

30

40

50

ム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0066】

ある実施形態において、移植片対宿主病（GVHD）を処置する方法は、有効量の有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストの投与を具備し得、このアゴニスト又はアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0067】

ある実施形態において、アレルギー性、炎症性又は自己免疫障害を有する個体を処置する方法は、有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストを投与することを具備し得、このアゴニスト又はアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

10

【0068】

ある実施形態において、炎症の処置又は予防を必要とする対象において炎症を処置又は予防するための組成物は、有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストを投与することを具備し得、このアゴニスト又はアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0069】

20

ある実施形態において、自己免疫疾患を処置するための組成物は、有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストを投与することを具備し得、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0070】

ある実施形態において、炎症性障害を処置するための組成物は、有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストを投与することを具備し得、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0071】

30

ある実施形態において、移植片対宿主病（GVHD）を処置するための組成物は、有効量の有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストの投与を具備し得、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0072】

ある実施形態において、アレルギー性、炎症性又は自己免疫障害を有する個体を処置するための組成物は、有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストを投与することを具備し得、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

40

【0073】

ある実施形態において、炎症を処置又は予防するための薬剤の製造のための、有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストの使用であって、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0074】

ある実施形態において、自己免疫疾患の処置用の薬剤の製造のための、有効量の有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストの使用であって、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム

50

、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0075】

ある実施形態において、炎症性障害の処置用の薬剤の製造のための、有効量の有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストの使用であって、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0076】

ある実施形態において、移植片対宿主病（GVHD）の処置用の薬剤の製造のための、有効量の有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストの使用であって、このアゴニスト又はアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

10

【0077】

ある実施形態において、アレルギー性、炎症性又は自己免疫障害の処置用の薬剤の製造のための、有効量の有効量の単離VISTAアゴニスト又はアンタゴニストの使用であって、このアンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

【0078】

ある実施形態において、試料中でVISTAを検出するための方法は、試料を抗VISTA抗体又は抗体断片と接触させ、抗VISTA抗体-VISTA複合物を検出することを具備し得る。別の実施形態において、試料は生体試料であり得る。別の実施形態において、抗VISTA抗体は配列番号2、3又は5のアミノ酸配列に結合する。

20

【0079】

別の実施形態において、治療用、診断又は免疫調節の使用のための組成物は、配列番号2、4又は5で示されるヒト又はマウスVISTA（PD-L3）ポリペプチドに対して好ましくは少なくとも70から90%同一であり得るアミノ酸配列、オルソログ又はインビボでVISTAを調整する配列番号1もしくは3に対して特異的にハイブリッド形成する遺伝子によりコードされるその断片を具備し得る、単離可溶性VISTA（PD-L3）タンパク質又はVISTA融合タンパク質（例えば可溶性VISTA-Ig融合タンパク質又は多量体VISTAタンパク質）と、医薬的に許容可能な担体と、を具備し得る。いくつかの実施形態において、可溶性又は多量体VISTAタンパク質は、異種（非VISTA）タンパク質に直接又は間接的に連結され得るか、又はウイルスベクター又は含有する細胞（例えばT細胞などの遺伝子移入された免疫細胞）によって発現され得る。

30

【0080】

実施形態において、単離又は組み換えVISTA（PD-L3）ポリペプチド（例えばタンパク質、ポリペプチド、ペプチド又はその断片もしくは一部分又は少なくとも50、100、150、200、250、275もしくは300アミノ酸である断片又は少なくとも50、100、150、200、250、275もしくは300アミノ酸である断片）。ある実施形態において、単離VISTA（PD-L3）ポリペプチド又はVISTA（PD-L3）融合タンパク質は、次のドメイン：シグナルペプチドドメイン、IgVドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン又は細胞質ドメインのうち少なくとも1つを具備する。

40

【0081】

実施形態において、VISTA（PD-L3）ポリペプチドは、次のドメイン：シグナルペプチドドメイン、IgVドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン又は細胞質ドメインのうち少なくとも1つを具備し、配列番号2、4又は5のアミノ酸配列に対して少なくとも約71%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるアミノ酸配列を具備する。別の実施形態において、VISTA（PD-L3）ポリペプチドは、次のドメイン：シグナルペプ

50

チドドメイン、I g Vドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン又は細胞質ドメインのうち少なくとも1つを具備し、(本明細書中で記載のような) V I S T A (P D - L 3) 活性を有し得る。

【0082】

ある実施形態において、単離 V I S T A タンパク質は、配列番号 2、4、5、16 から 25、36 又は 37 のポリペプチド配列の細胞外ドメインに対して少なくとも約 90% の配列同一性があるポリペプチドを具備し得る。さらなる実施形態において、本ポリペプチドは、配列番号 2、4、5、16 から 25、36 又は 37 のポリペプチド配列に対して少なくとも約 95% の配列同一性を有し得る。

【0083】

別の実施形態において、V I S T A ポリペプチドは、次のドメイン：シグナルペプチドドメイン、I g Vドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン又は細胞質ドメインのうち少なくとも1つを具備し、配列番号 1 又は 3 のヌクレオチド配列を具備し得る核酸分子の相補体に対してストリンジेंटなハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされ得る。

【0084】

別の実施形態において、本ポリペプチドの断片又は一部分は、配列番号 2、4 又は 5 のアミノ酸配列を具備し得、この断片は、配列番号 2 又は 4 のアミノ酸配列の少なくとも 15 アミノ酸(即ち連続アミノ酸)を具備する。別の実施形態において、V I S T A (P D - L 3) ポリペプチドは、配列番号 2、4 又は 5 のアミノ酸配列又は少なくとも 50、100、150、200、250、275 もしくは 300 アミノ酸である断片を具備するか又はこれらからなる。別の実施形態において、V I S T A (P D - L 3) ポリペプチドは、配列番号 1 又は 3 のヌクレオチド配列又はその相補体に対して少なくとも約 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 同一であるヌクレオチド配列を具備し得る核酸分子によりコードされ得る。核酸分子の相補体に対してストリンジेंटなハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列からなる核酸分子によりコードされ得る V I S T A (P D - L 3) ポリペプチドは、配列番号 1 又は 3 のヌクレオチド配列を具備し得る。

【0085】

ある実施形態において、V I S T A ポリペプチドは、これらが特に T 細胞免疫性の抑制を誘導するアゴニストであり得る。別の実施形態において、V I S T A ポリペプチドは、これらが抑制を妨害するアンタゴニストであり得る。

【0086】

本発明のポリペプチド又はその一部分、例えば生物学的に活性のあるその一部分は、非 V I S T A (P D - L 3) ポリペプチド(例えば異種アミノ酸配列)に作動可能に連結され、融合ポリペプチドを形成し得る。

【0087】

ある実施形態において、発現ベクターは、場合によっては I g ポリペプチド(例えば F c 領域)又はレポーター分子などの別のタンパク質をコードする配列と融合させ得る、配列番号 2、4 又は 5 で示されるヒト又はマウス V I S T A アミノ酸配列に対して少なくとも約 70 から 99% 同一であり得る V I S T A タンパク質又はその断片もしくはオルソログ又は少なくとも 50、100、150、200、250、275 もしくは 300 アミノ酸である断片をコードする単離核酸；及びそのベクターを含有する宿主細胞を具備し得る。

【0088】

別の実施形態において、V I S T A ポリペプチドをコードする、好ましくは可溶性融合タンパク質及び多量体 V I S T A タンパク質をコードする単離核酸分子ならびに、V I S T A (P D - L 3) をコードする核酸の検出のためのプライマー又はハイブリッド形成プローブとして適切な核酸断片。ある実施形態において、本発明の V I S T A (P D - L 3) 核酸分子は、配列番号 1 又は 3 における V I S T A (P D - L 3) をコードするヌクレ

オチド配列（例えばヌクレオチド配列の全長に対して）又はその相補体に対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一であり得る。

【0089】

別の実施形態において、VISTA（PD-L3）核酸分子は、配列番号2、4又は5のアミノ酸配列に対して特定の%同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を具備する。実施形態において、VISTA（PD-L3）核酸分子は、配列番号2、4又は5のアミノ酸配列の全長に対して又はその細胞外ドメインに対して少なくとも約71%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を具備する。

10

【0090】

別の実施形態において、単離核酸分子は、ヒト又はマウス又はVISTA又は保存的領域又はその中の機能ドメインのアミノ酸配列をコードする。また別の実施形態において、核酸分子は、配列番号2、4又は5のアミノ酸配列を具備し得るポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を具備する。また別の実施形態において、本核酸分子は、少なくとも約50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150ヌクレオチド長であり得る。さらなる実施形態において、本核酸分子は、少なくとも約50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150ヌクレオチド長であり得、VISTA（PD-L3）活性を有するか又はVISTA（PD-L3）機能を調整するポリペプチドをコードする。

20

【0091】

別の実施形態は、非VISTA（PD-L3）ポリペプチドをコードする核酸分子に対してVISTA（PD-L3）核酸分子を特異的に検出する核酸分子、好ましくはVISTA（PD-L3）核酸分子を取り上げる。例えば、ある実施形態において、核酸分子は少なくとも約880、900、950、1000、1050、1100、1150ヌクレオチド長であり得、配列番号2、4又は5で示されるポリペプチドをコードする核酸分子又はその相補体に対してストリンジェントな条件下でハイブリッド形成する。別の実施形態において、核酸分子は、少なくとも20、30、40、50、100、150、200、250、300ヌクレオチド長であり得、VISTA（PD-L3）の断片をコードする核酸分子に対してストリンジェントな条件下でハイブリッド形成し、例えば、少なくとも約20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950ヌクレオチド長を具備し得、配列番号2、4又は5におけるVISTA（PD-L3）ポリペプチドをコードする配列番号1及び3における開示される核酸配列又はその相補体のうち少なくとも15（即ち15連続）ヌクレオチドを具備し、配列番号1又は3で示されるヌクレオチド配列を具備し得る核酸分子又はその相補体に対してストリンジェントな条件下でハイブリッド形成する。

30

40

【0092】

ある実施形態において、本核酸分子は、配列番号2、4又は5のアミノ酸配列を具備し得るポリペプチドの天然の対立遺伝子変異体をコードし、この核酸分子は、ストリンジェントな条件下で配列番号1又は3を具備し得る核酸分子の相補体又はその相補体に対してハイブリッド形成する。

【0093】

本発明の別の実施形態は、VISTA（PD-L3）核酸分子に対する単離アンチセンス（例えば配列番号1又は3のVISTA（PD-L3）核酸分子のコード鎖に対するアンチセンス）を提供する。

50

【0094】

本発明の別の態様は、VISTA (PD-L3) 核酸分子を具備し得るベクターを提供する。ある一定の実施形態において、このベクターは組み換え発現ベクターであり得る。

【0095】

別の実施形態において、宿主細胞は、本発明のベクターを具備する。また別の実施形態において、宿主細胞は、本発明の核酸分子を具備する。本発明はまた、ポリペプチドが産生され得るように、適切な培地中で宿主細胞、例えば組み換え発現ベクターを含有する、本発明の非ヒト哺乳動物細胞などの哺乳動物宿主細胞を培養することによってポリペプチド、好ましくはVISTA (PD-L3) ポリペプチドを作製するための方法も提供する。

10

【0096】

ある実施形態において、VISTA DNAから転写されるVISTA mRNAを標的とするsiRNA分子は、配列番号1又は3の核酸配列を具備し得る。別の実施形態において、配列番号2、4又は5で示されるアミノ酸配列をコードするVISTA DNAから転写されるVISTA mRNAを標的とするsiRNA分子。さらなる実施形態において、VISTAを標的とするsiRNA分子は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列を具備し得る。別の実施形態において、VISTAのORF又はUTR領域の何れかを標的とするsiRNA分子は、配列番号38から47のうち何れか1つのアミノ酸配列を具備し得る。別の実施形態において、VISTAのUTR領域のみを標的とするsiRNA分子は、配列番号48から57の何れか1つのアミノ酸配列を具備し得る。別の実施形態において、VISTAのORF領域のみを標的とするsiRNA分子は、配列番号58から67の何れか1つのアミノ酸配列を具備し得る。ある実施形態において、VISTAを標的とするsiRNA分子は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列からなり得る。ある実施形態において、VISTAのORF又はUTR領域の何れかを標的とするsiRNA分子は、配列番号38から47のうち何れか1つのアミノ酸配列からなり得る。ある実施形態において、VISTAのUTR領域のみを標的とするsiRNA分子は、配列番号48から57の何れか1つのアミノ酸配列からなり得る。ある実施形態において、VISTAのORF領域のみを標的とするsiRNA分子は、配列番号58から67の何れか1つのアミノ酸配列からなり得る。

20

【0097】

さらなる実施形態において、組成物は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列を具備するsiRNA分子を具備し得る。さらなる実施形態において、組成物は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列からなるsiRNA分子を具備し得る。さらなる実施形態において、組成物は医薬組成物であり得る。

30

【0098】

ある実施形態において、自己免疫障害を処置するための方法は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列を具備するVISTAを標的とするsiRNA分子タンパク質の投与を具備し得る。ある実施形態において、自己免疫障害を処置するための方法は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列からなるVISTAを標的とするsiRNA分子タンパク質の投与を具備し得る。さらなる実施形態において、自己免疫障害を処置するための組成物は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列を具備するsiRNA分子を具備し得る。さらなる実施形態において、自己免疫障害を処置するための組成物は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列からなるsiRNA分子を具備し得る。さらなる実施形態において、自己免疫疾患の処置用の薬剤の製造用の、配列番号38から67の核酸配列の何れか1つを具備するsiRNA分子の使用。さらなる実施形態において、自己免疫疾患の処置用の薬剤の製造のための、配列番号38から67の核酸配列の何れか1つからなるsiRNA分子の使用。

40

【0099】

ある実施形態において、炎症性障害を処置するための方法は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列を具備するVISTAを標的とするsiRNA分子タンパク質の投

50

与を具備し得る。ある実施形態において、炎症性障害を処置するための方法は、配列番号 38 から 67 の何れか 1 つの核酸配列からなる V I S T A を標的とする s i R N A 分子タンパク質の投与を具備し得る。さらなる実施形態において、炎症性障害を処置するための組成物は、配列番号 38 から 67 の何れか 1 つの核酸配列を具備する s i R N A 分子を具備し得る。さらなる実施形態において、炎症性障害を処置するための組成物は、配列番号 38 から 67 の何れか 1 つの核酸配列からなる s i R N A 分子を具備し得る。さらなる実施形態において、炎症性疾患の処置用の薬剤の製造のための、配列番号 38 から 67 の核酸配列の何れか 1 つを具備する s i R N A 分子の使用。さらなる実施形態において、炎症性疾患の処置用の薬剤の製造のための、配列番号 38 から 67 の核酸配列の何れか 1 つからなる s i R N A 分子の使用。

10

【0100】

ある実施形態において、移植片対宿主病を処置するための方法は、配列番号 38 から 67 の何れか 1 つの核酸配列を具備する V I S T A を標的とする s i R N A 分子タンパク質の投与を具備し得る。ある実施形態において、移植片対宿主病を処置するための方法は、配列番号 38 から 67 の何れか 1 つの核酸配列からなる V I S T A を標的とする s i R N A 分子タンパク質の投与を具備し得る。さらなる実施形態において、移植片対宿主病を処置するための組成物は、配列番号 38 から 67 の何れか 1 つの核酸配列を具備する s i R N A 分子を具備し得る。さらなる実施形態において、移植片対宿主病を処置するための組成物は、配列番号 38 から 67 の何れか 1 つの核酸配列からなる s i R N A 分子を具備し得る。さらなる実施形態において、移植片対宿主病の処置用の薬剤の製造のための、配列番号 38 から 67 の核酸配列の何れか 1 つを具備する s i R N A 分子の使用。さらなる実施形態において、移植片対宿主病の処置用の薬剤の製造のための、配列番号 38 から 67 の核酸配列の何れか 1 つからなる s i R N A 分子の使用。

20

【0101】

ある実施形態において、アンタゴニストは、配列番号 2、4 又は 5 で示されるアミノ酸配列を具備し得る V I S T A (P D - L 3) タンパク質又はその変異体、断片もしくはオルソログに特異的に結合し得る。実施形態において、結合物質は V I S T A 活性をインビトロ又はインビボで調整する(刺激又は拮抗する)。

【0102】

ある実施形態において、V I S T A アンタゴニストは V I S T A リガンドであり得る。別の実施形態において、V I S T A リガンドはタンパク質であり得る。別の実施形態において、V I S T A アンタゴニストは、抗体又はその抗体断片、ペプチド、グリコアルコイド、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール、低分子又は何らかのそれらの組み合わせであり得る。

30

【0103】

ある実施形態において、V I S T A アンタゴニストは、T C R 活性化におけるそのタンパク質の抑制効果、抗 C D 3 に対する C D 4 T 細胞増殖反応におけるそのタンパク質の抑制効果、同種 C D 4 T 細胞の抗原特異的な増殖反応の抑制、特異的なサイトカイン(例えば I L - 2 及び γ インターフェロン)の発現における V I S T A (P D - L 3) の抑制効果など、免疫性において V I S T A (P D - L 3) の特異的效果を調整することを含むが限定されない機能特性を有し得る。

40

【0104】

ある実施形態において、V I S T A ポリペプチド、多量体 V I S T A ポリペプチド又は V I S T A 融合タンパク質に特異的に結合する、アンタゴニスト、場合によってはタンパク質性アンタゴニスト。別の実施形態において、アンタゴニスト、場合によってはタンパク質性アンタゴニストは、抗腫瘍又は抗転移活性を示し得る。別の実施形態において、アンタゴニスト、場合によってはタンパク質性アンタゴニストは、残基 1 から 20、20 から 40、30 から 50、60 から 80、70 から 90、80 から 100 又は 90 から 110 中に具備されるエピトープに特異的に結合し得る。別の実施形態において、アンタゴニスト、場合によってはタンパク質性アンタゴニストは、I g V、V I S T A タンパク質の

50

ストーク領域、細胞質領域又は膜貫通領域中に具備されるエピトープに結合し得る。別の実施形態において、アンタゴニスト、場合によってはタンパク質性アンタゴニストは、次の活性：（a）サイトカインの上方制御；（b）T細胞拡大の誘導、（c）抗原性特異的T細胞免疫性の促進；又は（d）CD4+及び／又はCD8+T細胞活性化の促進のうち少なくとも1つを引き出し得る。

【0105】

別の実施形態において、単離結合物質、好ましくは抗体又は抗体断片は、配列番号2、4又は5で示されるアミノ酸配列を具備し得るVISTA（PD-L3）タンパク質又はその変異体、断片もしくはオルソログに特異的に結合し得る。実施形態において、結合物質は、インビトロ又はインビボでVISTA活性を調整する（刺激又は拮抗する）。ある実施形態において、結合物質は、アゴニスト性又はアンタゴニスト性の抗VISTA抗体であり得る。

10

【0106】

ある実施形態において、抗VISTA（PD-L3）抗体は、TCR活性化におけるそのタンパク質の抑制効果、抗CD3に対するCD4 T細胞増殖反応におけるそのタンパク質の抑制効果、同種CD4 T細胞の抗原特異的な増殖反応の抑制、特異的なサイトカイン（例えばIL-2及びγインターフェロン）の発現におけるVISTA（PD-L3）の抑制効果など、免疫性においてVISTA（PD-L3）の特異的效果を調整することを含むが限定されない機能特性を有し得る。

【0107】

20

さらなる実施形態において、抗体、場合によってはモノクローナル又はポリクローナル抗体は、ヒトVISTAポリペプチドを含むVISTA（PD-L3）ポリペプチドに特異的に結合し得る。

【0108】

ある実施形態において、VISTAポリペプチド、多量体VISTAポリペプチド又はVISTA融合タンパク質に特異的に結合する単離抗体又はその抗体断片。別の実施形態において、この抗体又はその抗体断片は、抗腫瘍又は抗転移活性を示し得る。別の実施形態において、この抗体又はその抗体断片は、残基1から20、20から40、30から50、60から80、70から90、80から100又は90から110中に具備されるエピトープに特異的に結合し得る。別の実施形態において、この抗体又はその抗体断片は、IgV、VISTAタンパク質のストーク領域、細胞質領域又は膜貫通領域中に具備されるエピトープに特異的に結合し得る。別の実施形態において、この抗体又はその抗体断片は、次の活性：（a）サイトカインの上方制御；（b）T細胞拡大の誘導、（c）抗原性特異的T細胞免疫性の促進；又は（d）CD4+及び／又はCD8+T細胞活性化の促進のうち少なくとも1つを引き出し得る。別の実施形態において、この抗体又は断片は組み換え体であり得る。別の実施形態において、この抗体又は断片は、抗腫瘍活性を有し得る。別の実施形態において、この抗体断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、CDR、パラトープ又は本抗原に結合可能である抗体の一部であり得る。別の実施形態において、この抗体は、キメラ、ヒト化、抗イディオタイプ、1本鎖、二機能性又は同時特異性であり得る。別の実施形態において、この抗体又は断片は、標識、細胞毒性剤、治療剤又は免疫抑制剤に直接又は間接的に複合化され得る。さらなる実施形態において、化学発光標識、常磁性標識、MRI造影剤、蛍光標識、生物発光標識又は放射性標識であり得る。

30

40

【0109】

ある実施形態において、本発明は、抗VISTA抗体及びその抗体断片を提供する。ある実施形態において、この抗体断片はFab、Fab'、F(ab')₂、Fv及びscFv断片である。ある実施形態において、この抗体又はその抗体断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、1本鎖可変断片(scFv)、IgNAR、SMIP、キャメルボディー又はナノボディーを具備し得る。別の実施形態において、組み換えタンパク質は、抗VISTA抗体の超可変領域を具備し得、VISTAに選択的に結合する。別の

50

実施形態において、この抗体断片は、配列番号2、4又は5のアミノ酸配列を具備し得るVISTAに選択的に結合し得る。

【0110】

さらに、VISTA(PD-L3)ポリペプチド(又は生物学的に活性のあるその一部分)又はVISTA(PD-L3)分子の調節物質(例えば抗VISTA抗体)は、場合によっては医薬的に許容可能な担体を具備し得る医薬組成物に組み込まれ得る。

【0111】

別の実施形態において、本発明は、抗原及びVISTA(PD-L3)活性を調整する(促進するか又は阻害する)薬剤を具備し得るワクチンを提供する。実施形態において、ワクチンは、VISTA(PD-L3)とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を阻害する。別の実施形態において、ワクチンは、抗原及びVISTA(PD-L3)とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を阻害する薬剤を具備し得る。別の実施形態において、ワクチンは、抗原及びVISTA(PD-L3)とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を促進する薬剤を具備し得る。ある実施形態において、このワクチンは、賦形剤、アジュバント又は担体を具備する。

【0112】

ある実施形態において、キットはVISTA融合タンパク質を具備し得る。別の実施形態において、キットは多量体VISTAタンパク質を具備し得る。さらなる実施形態において、VISTA融合タンパク質又は多量体VISTAタンパク質は、直接又は間接的に固相支持体に固定され得る。さらなる実施形態において、固相支持体は、ビーズ、試験管、シート、培養皿又は試験片であり得る。別の実施形態において、固相支持体はアレイであり得る。

【0113】

別の実施形態において、免疫細胞は活性化され得、免疫細胞をVISTAポリペプチド、VISTA-Ig融合タンパク質又は抗VISTA抗体と接触させることを具備し得る。別の実施形態において、免疫細胞はT細胞、B細胞又は抗原提示細胞であり得る。本発明の方法により活性化される免疫細胞は、続いてエクスピボで拡大させ得、様々な疾患の処置及び予防において使用され得；例えばインビトロでクローン化し、拡大させたヒトT細胞はそれらの制御活性を維持する。拡大前に、対象(例えば哺乳動物、例えばヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット又はそれらのトランスジェニック種など)からT細胞源を得ることができる。T細胞は、末梢血液単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織及び感染部位由来の組織、脾臓組織、腫瘍又はT細胞株を含む多くの源から得ることができる。T細胞は、FICOLL(登録商標)分離など、当業者にとって公知の何らかの様々な技術を用いて対象から回収された血液単位から得ることができる。

【0114】

別の実施形態において、VISTA(PD-L3)活性を調整するための方法は、その細胞中のVISTA(PD-L3)活性が調節され得るように、VISTA(PD-L3)活性を調節する薬剤、好ましくは抗VISTA(PD-L3)抗体とVISTA(PD-L3)を発現可能な細胞を接触させることを具備し得る。ある実施形態において、本薬剤はVISTA(PD-L3)活性を阻害する。別の実施形態において、本薬剤は、VISTA(PD-L3)活性を刺激する。さらなる実施形態において、本薬剤は、VISTA(PD-L3)ポリペプチドとその天然の結合パートナーとの間の相互作用を妨害又は促進する。ある実施形態において、本薬剤は、VISTA(PD-L3)ポリペプチドに特異的に結合する抗体であり得る。別の実施形態において、本薬剤は、VISTA(PD-L3)ポリペプチドに結合する、ペプチド、ペプチド模倣物又は他の低分子であり得る。

【0115】

別の実施形態において、本薬剤は、VISTA(PD-L3)遺伝子の転写、VISTA(PD-L3)mRNAの翻訳又はVISTA(PD-L3)ポリペプチドの翻訳後修飾を調整することによってVISTA(PD-L3)の発現を調整する。別の実施形態に

において、本薬剤は、VISTA (PD-L3) mRNA又はVISTA (PD-L3) 遺伝子のコード鎖に対してアンチセンスであり得るヌクレオチド配列を有する核酸分子であり得る。さらなる実施形態において、本薬剤は、VISTA (PD-L3) mRNAを標的とする siRNA 分子であり得る。

【0116】

ある実施形態において、自己免疫障害又は炎症性状態を処置するための方法は、対象に対してVISTA (PD-L3) 調節物質であり得る薬剤を投与することを具備し得る。ある実施形態において、VISTA (PD-L3) 調節物質は、上述のような、VISTA (PD-L3) ポリペプチド、好ましくは可溶性融合タンパク質又は多量体VISTAタンパク質又は抗VISTA抗体であり得る。別の実施形態において、VISTA (PD-L3) 調節物質は、例えばアデノウイルスベクター中のVISTA (PD-L3) 核酸分子であり得る。別の実施形態において、本発明は、免疫反応を調整するさらなる薬剤で対象を処置することをさらに提供する。

10

【0117】

ある実施形態において、免疫細胞におけるその天然の結合パートナーとのVISTA (PD-L3) の相互作用を調整するための方法は、免疫細胞におけるその天然の結合パートナーとのVISTA (PD-L3) の相互作用が調整され得るように、VISTA (PD-L3) 又はVISTA (PD-L3) の形態及びその天然の結合パートナーの相互作用を調整する薬剤からなる群から選択される薬剤とVISTA (PD-L3) を発現する抗原提示細胞を接触させ、VISTAとその天然の結合パートナーとの相互作用を評価することを具備し得る。実施形態において、VISTA (PD-L3) 及びその天然の結合パートナーの相互作用を調整する薬剤は、VISTA (PD-L3) に特異的に結合する抗体であり得る。ある実施形態において、VISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用は未制御であり得る。別の実施形態において、VISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用は下方制御され得る。ある実施形態において、本方法は、免疫反応を調整するさらなる薬剤と免疫細胞又は抗原提示細胞を接触させることをさらに具備する。ある実施形態において、接触させる段階はインビトロで行われ得る。別の実施形態において、接触させる段階はインビボで行われ得る。ある実施形態において、免疫細胞は、T細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、B細胞及び骨髄細胞からなる群から選択され得る。

20

30

【0118】

ある実施形態において、免疫細胞において活性化を阻害するための方法は、免疫細胞活性化が阻害され得るように細胞においてVISTA (PD-L3) の活性又は発現を阻害することを具備し得る。ある実施形態において、免疫細胞において活性化を向上させるための方法は、免疫細胞活性化が向上され得るように細胞においてVISTA (PD-L3) の活性又は発現を向上させることを具備し得る。

【0119】

別の実施形態において、免疫反応を上方制御するための方法は、免疫細胞においてVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を阻害する薬剤を投与することを具備し得る。ある実施形態において、本薬剤は、VISTA (PD-L3) に結合し、VISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を阻害する遮断抗体又は低分子を具備する。別の実施形態において、本方法は、対象に対して免疫反応を上方制御する第二の薬剤を投与することをさらに具備する。別の実施形態において、免疫反応を下方制御するための方法は、免疫細胞におけるVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を刺激する薬剤を投与することを具備し得る。

40

【0120】

ある実施形態において、腫瘍、病原性感染、炎症性免疫反応又は状態、好ましくはあまりはっきりしない炎症状態又は免疫抑制性疾患からなる群から選択される状態を処置するための方法は、有効量のVISTAポリペプチド又はVISTA-Ig融合タンパク質タ

50

ンパク質の投与を具備し得る。具体例としては、多発性硬化症、甲状腺炎、関節リウマチ、I I型及びI型糖尿病及びV I S T Aが有効な抗腫瘍反応を抑制する転移性癌を含む進行及び初期型の両方の癌（例えば膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、肺癌）が挙げられる。抗V I S T A抗体又はV I S T A融合タンパク質をコードする核酸を発現する細胞又はウイルスベクターを対象に投与し得る。

【0121】

ある実施形態において、移植、アレルギー、感染性疾患、癌及び炎症性又は自己免疫障害（例えば炎症性免疫障害）からなる群から選択される状態を処置するための方法は、有効量のV I S T A（P D-L 3）タンパク質、結合物質又はV I S T A（P D-L 3）アンタゴニスト又はアゴニストタンパク質の投与を具備し得る。別の実施形態において、1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬性関節炎、全身性紅斑性狼瘡、リウマチ性疾患、アレルギー性障害、喘息、アレルギー性鼻炎、皮膚障害、胃腸障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、移植拒絶、連鎖球菌感染後及び自己免疫腎不全、敗血症性ショック、全身性炎症反応症候群（S I R S）、成人呼吸窮迫症候群（A R D S）及び毒物注入；自己炎症性疾患ならびに、変形性関節症、結晶性関節炎及び関節包炎及び他の関節症を含む変形性骨及び関節疾患を処置し得、有効量のV I S T A（P D-L 3）タンパク質、結合物質又はV I S T A（P D-L 3）アンタゴニスト又はアゴニストタンパク質の投与を具備し得る。さらに、本方法及び組成物は、腱炎、靭帯炎及び外傷性関節損傷を処置するために使用され得る、有効量のV I S T A（P D-L 3）タンパク質、結合物質又はV I S T A（P D-L 3）アンタゴニスト又はアゴニストを具備し得る。ある実施形態において、薬剤は、V I S T A（P D-L 3）とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を刺激する抗体又は低分子を具備する。別の実施形態において、本方法は、P D-L 1、P D-L 2又はC T L A-4融合タンパク質又はそれらに特異的な抗体など、対象に免疫反応を下方制御する第二の薬剤を投与することをさらに具備する。

【0122】

実施形態において、対象V I S T A（P D-L 3）タンパク質、核酸及びV I S T A（P D-L 3）に特異的なリガンド、好ましくはV I S T A（P D-L 3）機能において所望の効果を有する抗体は、癌、自己免疫疾患、アレルギー、炎症性障害又は感染及びより具体的には免疫系障害、例えば、重症の複合型免疫不全、多発性硬化症、全身性紅斑性狼瘡、I型糖尿病、リンパ増殖性症候群、炎症性腸疾患、アレルギー、喘息、移植片対宿主病及び移植拒絶；細菌及びウイルスなどの感染性病原体に対する免疫反応；及び免疫系癌、例えばリンパ腫及び白血病含むが限定されない状態を処置するために使用され得る。ある実施形態において、V I S T Aの活性を調整する薬剤は、T細胞消耗を軽減し、感染性疾患に対する免疫性を促進し得る。

【0123】

ある実施形態において、癌の処置を必要とする患者において癌を処置する方法は、有効量のV I S T Aタンパク質、多量体V I S T Aタンパク質、V I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質を投与することを具備し得、このV I S T Aタンパク質、多量体V I S T Aタンパク質及び／又はV I S T A融合タンパク質は、骨髄樹状サブレッサー細胞により発現されるV I S T Aの免疫抑制活性を抑制することによって抗腫瘍免疫性を促進する。さらなる実施形態において、処置前の患者は、免疫細胞において高レベルのV I S T Aタンパク質を発現することが認められ得る。

【0124】

ある実施形態において、放射線療法、化学療法又は抗癌生物剤の有効性を促進する方法は、放射線療法、化学療法又は抗癌生物剤の投与を含む治療計画において、有効量のV I S T Aタンパク質、多量体V I S T Aタンパク質、V I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質を投与することを具備し得る。さらなる実施形態において、処置前の患者は、前記の放射線療法、化学療法又は抗癌生物剤に反応しない癌を有し得る。

【0125】

ある実施形態において、膀胱、卵巣又はメラノーマ癌を処置する方法は、有効量のV I S T Aタンパク質、多量体V I S T Aタンパク質、V I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質を投与することを具備し得、この癌は、初期（非転移性）又は転移型であり、V I S T A-I gは、その受容体との相互作用を遮断する。

【0126】

ある実施形態において、免疫細胞反応を調整するための方法は、免疫細胞の反応が調整されるように一次シグナルの存在下で有効量のV I S T Aタンパク質、多量体V I S T Aタンパク質、V I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質と免疫細胞を接触させることを具備し得る。

【0127】

ある実施形態において、T r e g細胞の調整を必要とする対象においてT r e g細胞を調整する方法は、有効量のV I S T Aタンパク質、多量体V I S T Aタンパク質、V I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質を投与することを具備し得る。

【0128】

ある実施形態において、免疫性においてV I S T Aの抑制効果を解除させる方法は、有効量のV I S T Aタンパク質、多量体V I S T Aタンパク質、V I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質を投与することを具備し得る。別の実施形態において、処置される患者は、処置前に高レベルのV I S T Aを発現することが認められ得る。別の実施形態において、V I S T Aレベルは、免疫反応が促進されてい得ることを評価するために処置後に監視され得る。

【0129】

ある実施形態において、細胞介在性追加免疫を必要とする対象において細胞介在性免疫を促進する方法は、有効量のV I S T Aタンパク質、多量体V I S T Aタンパク質、V I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質を投与することを具備し得る。

【0130】

ある実施形態において、免疫細胞反応を調整するための方法は、免疫細胞の反応が調整されるように一次シグナルの存在下で免疫細胞を有効量のV I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質又は多量体V I S T Aタンパク質と接触させることを具備し得、投与することを具備し得る。別の実施形態において、接触は、インビトロ、インビボ又はエクスピボで行われ得る。

【0131】

ある実施形態において、T細胞と骨髄由来A P Cとの間での同種相互作用中にT細胞反応を制御する方法は、有効量のV I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質又は多量体V I S T Aタンパク質を投与することを具備し得る。

【0132】

ある実施形態において、免疫抑制の引き出しを必要とする個体において免疫抑制を引き出す方法は、有効量のV I S T A融合タンパク質、場合によってはV I S T A-I g融合タンパク質又は多量体V I S T Aタンパク質を投与することを具備し得る。

【0133】

別の実施形態において、免疫細胞活性化を低下させるための方法は、有効量のV I S T A（P D-L 3）ポリペプチド又はV I S T A-I g融合タンパク質を対象に投与することを具備し得、このV I S T A（P D-L 3）ポリペプチド又はV I S T A-I g融合タンパク質は、免疫細胞活性化を減少させるための阻害シグナルとして作用する。ある実施形態において、免疫細胞活性化が阻害される。別の実施形態において、免疫細胞活性化が顕著に低下する。ある実施形態において、阻害シグナルは、免疫細胞において阻害受容体（例えばC T L A-4又はP D-1）に結合し、それによって活性化受容体に（例えばT C R、C D 3、B C R又はF cポリペプチドを介して）結合する一次シグナルに拮抗する。ある実施形態において、V I S T Aポリペプチド又はV I S T A-I g融合タンパク質

は、第二のメッセンジャー生成を阻害し；免疫細胞増殖を阻害し；免疫細胞においてエフェクター機能を阻害する（例えば食作用低下、抗体産生減少、細胞毒性減少、免疫細胞のメディエーター（サイトカイン（例えばIL-2）及び／又はアレルギー性反応のメディエーター）生成不能；又はアネルギーの発生）。

【0134】

ある実施形態において、一次シグナルは、TCRに結合し、一次刺激シグナルを開始させるリガンド（例えばCD3又は抗CD3）であり得る。TCRリガンドとしては、抗CD3抗体OKT3及び抗CD3モノクローナル抗体G19-4が挙げられるが限定されない。ある実施形態において、一次シグナルは、タンパク質キナーゼC活性化因子、例えばホルボールエステル（例えばホルボールミリスチン酸アセテート）及びカルシウムイオン透過孔（例えば細胞質カルシウム濃度を上昇させるイオノマイシン）を含む他の機構を通じてT細胞に送達され得る。このような薬剤の使用は、TCR/CD3複合体を迂回するが、刺激性シグナルをT細胞に送達する。原発性シグナルとして作用する他の薬剤としては、天然及び合成リガンドが挙げられ得る。天然のリガンドは、ペプチド提示があるか又はないMHCを具備し得る。他のリガンドとしては、ペプチド、ポリペプチド、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、糖ペプチド、可溶性受容体、ステロイド、ホルモン、マイトジェン（例えばPHA）又は他のスーパー抗原、ペプチド-MHC四量体及び可溶性MHC二量体が挙げられ得るが限定されない。

10

【0135】

別の実施形態において、生体試料中のVISTA（PD-L3）核酸分子、タンパク質又はポリペプチドの存在を検出するための方法は、生体試料中でVISTA（PD-L3）核酸分子、タンパク質又はポリペプチドの存在が検出され得るように、VISTA（PD-L3）核酸分子、タンパク質又はポリペプチドを検出可能な薬剤と生体試料を接触させることを具備する。このVISTA（PD-L3）発現は、炎症部位など、ある一定の疾患部位を検出するために使用され得る。

20

【0136】

別の実施形態において、生体試料中のVISTA（PD-L3）活性の存在を検出するための方法は、生体試料中でVISTA（PD-L3）活性の存在が検出されるように、VISTA（PD-L3）活性の指標を検出可能な薬剤と生体試料を接触させることを具備する。さらなる実施形態において、生体試料中の可溶性VISTAを検出するための方法は、生体試料中のVISTA（PD-L3）活性の存在が検出され得るように、VISTA（PD-L3）活性の指標を検出可能な薬剤と生体試料を接触させることを具備し得る。別の実施形態において、生体試料中の可溶性VISTAを検出するための方法は、VISTA（PD-L3）と結合可能な薬剤、場合によっては抗VISTA抗体又は抗体断片と生体試料を接触させ、VISTA-抗体複合体の存在を検出することを具備し得る。さらなる実施形態において、測定は定量的、場合によってはウエスタンブロットデンストメトリー、比色分析又は蛍光定量的であり得る。

30

【0137】

別の実施形態において、VISTA遺伝子における遺伝子変異の有無を同定するための診断アッセイは、核酸を具備し得る試料を入手し、試料をアッセイすることを具備し、この遺伝子変異は、（i）VISTA（PD-L3）ポリペプチドをコードする遺伝子の異常な修飾又は突然変異；（ii）遺伝子の誤制御；及び（iii）VISTA（PD-L3）ポリペプチドの異常な翻訳後修飾のうち少なくとも1つを特徴とし、この遺伝子の野生型は、VISTA（PD-L3）活性があるポリペプチドをコードする。ある実施形態において、核酸はDNA又はmRNAであり得る。

40

【0138】

ある実施形態において、治療又は免疫調節剤として使用できる可能性について抗VISTA抗体に対して選択する方法は、（a）VISTAタンパク質、その免疫原性断片又は複合物を用いて免疫細胞又は宿主に免疫付与し；（b）VISTAに特異的に結合する抗体を発現するリンパ系細胞を選択し；（c）抗VISTA抗体又はその抗体断片を選択し

50

；（d）次のVISTA（PD-L3）又はVISTAの活性のうち少なくとも1つを阻害又は促進する能力：（i）T細胞活性化又は分化の抑制；（ii）CD4+又はCD8+T細胞増殖の抑制又はT細胞によるサイトカイン産生の抑制、についてこの抗VISTA抗体又はその抗体断片をスクリーニングすることを具備し得、（iii）（d）の活性のうち少なくとも1つを有する抗体又はその抗体断片は、治療又は免疫調節剤として利用できる可能性がある。

【0139】

さらなる実施形態において、所望の機能特性を有する抗VISTA（PD-L3）抗体を選択する方法は、TCR活性化におけるそのタンパク質の抑制効果、抗CD3に対するCD4+T細胞増殖反応におけるそのタンパク質の抑制効果、同種CD4+T細胞の抗原特異的な増殖反応の抑制、特異的なサイトカイン（例えばIL-2及びγインターフェロン）の発現におけるVISTA（PD-L3）の抑制効果など、免疫性においてVISTA（PD-L3）の特異的な効果を調整することを含む所望の機能特性に基づいてこのタンパク質又はVISTA（PD-L3）-Ig融合タンパク質に対して作製されるモノクローナル抗体のパネルをスクリーニングし、所望の抗体を選択することを具備し得る。

10

【0140】

別の実施形態において、VISTA（PD-L3）ポリペプチドに結合するか又はその活性を調整する化合物を同定するための方法は、VISTA（PD-L3）活性を有するVISTA（PD-L3）ポリペプチドを具備し得る指標組成物を提供し、指標組成物を試験化合物と接触させ、VISTA（PD-L3）ポリペプチドの活性を調整する化合物を同定するために指標組成物においてVISTA（PD-L3）活性における試験化合物の効果を決定することを具備し得る。

20

【0141】

別の実施形態において、VISTA（PD-L3）の活性を調整する化合物をスクリーニングするための細胞に基づくアッセイは、VISTA（PD-L3）標的分子を発現する細胞を試験化合物と接触させ、試験化合物がVISTA（PD-L3）標的分子の活性を調整する能力を決定することを具備し得る。

【0142】

別の実施形態において、標的分子に対するVISTA（PD-L3）の結合を調整する化合物についてスクリーニングするための細胞不含アッセイは、VISTA（PD-L3）ポリペプチド又は生物学的に活性のあるその一部分を試験化合物と接触させ、試験化合物がVISTA（PD-L3）ポリペプチド又は生物学的に活性のあるその一部分に結合する能力を決定することを具備し得る。

30

【0143】

別の実施形態において、化合物、例えばT細胞活性化又はサイトカイン産生においてVISTA（PD-L3）の効果を調整する抗VISTA（PD-L3）抗体を第一及び第二の抗原濃度で同定する方法は、VISTA（PD-L3）標的分子を発現するT細胞を第一の抗原濃度の試験化合物と接触させ、試験化合物が第一の抗原濃度でT細胞増殖又はサイトカイン産生を調整する能力を決定し、VISTA（PD-L3）標的分子を発現するT細胞を第二の抗原濃度の試験化合物と接触させ、試験化合物が第二の抗原濃度でT細胞増殖又はサイトカイン産生を調整する能力を決定し、それによって第一及び第二の抗原濃度でT細胞活性化又はサイトカイン産生を調整する化合物を同定することを具備し得る。

40

【0144】

他の実施形態において、抗VISTA（PD-L3）抗体及びVISTA（PD-L3）タンパク質のパネルは、CD4+及びCD8+T細胞分化、増殖及び／又はサイトカイン産生において抗VISTA抗体がVISTA（PD-L3）の効果を阻害又は促進することに基づきスクリーニング及び選択され得る。さらなる実施形態において、免疫性の制御における抗ヒトVISTA抗体の機能を試験するために、ヒトVISTAを発現するように改変されているマウスが使用され得る。

50

【0145】

別の実施形態において、移植片対宿主病（GVHD）を処置する方法は、有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig融合タンパク質又は多量体VISTAタンパク質タンパク質の投与を具備し得る。別の実施形態において、移植片対宿主病（GVHD）、急性移植片対宿主病、慢性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う急性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う慢性移植片対宿主病、骨髄移植に伴う急性移植片対宿主病、同種血液幹細胞移植（HSCT）に伴う急性移植片対宿主病又は骨髄移植に伴う慢性移植片対宿主病を処置するための方法は、有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig融合タンパク質又は多量体VISTAタンパク質を投与することを具備し得る。

10

【0146】

別の実施形態において、本発明は、（i）ヒト又はマウスVISTAの細胞外領域又は少なくとも50アミノ酸であるその断片と少なくとも80%の配列同一性を具備する少なくとも1つのVISTAポリペプチドと、（ii）少なくとも5アミノ酸を具備する少なくとも1つのリンカーペプチドと、（iii）少なくとも1つのIgタンパク質、好ましくはIgFc領域又はその断片もしくは変異体と、を具備する、単離又は組み換えVISTA-Ig融合タンパク質又はコード核酸を提供し、このペプチドリンカーは、VISTAポリペプチド及びIgタンパク質に介入し、得られるVISTA-Ig融合タンパク質は、インビボでそのリンカーを欠く同一融合タンパク質より強力な免疫抑制活性を引き出す。代表的な実施形態において、単離VISTA融合タンパク質は、配列番号2、4、5、16から25、36又は37のポリペプチド配列の細胞外ドメイン又は少なくとも50アミノ酸を具備するその断片に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する少なくとも1つのポリペプチドと、（ii）少なくとも5アミノ酸を具備する少なくとも1つのリンカーと、（iii）少なくとも1つのIgFcタンパク質又はその断片と、を具備し得、このリンカーは、VISTAポリペプチド及びIgFcタンパク質に介入し、得られるVISTA-Ig融合タンパク質は、インビボでそのリンカーを欠く同一融合タンパク質よりも強力な免疫抑制活性を引き出す。

20

【0147】

別の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、ヒト又はマウスVISTAの細胞外ドメイン又は少なくとも50、100、150、200、250もしくは300アミノ酸であるその断片に対して少なくとも90又は95%の配列同一性を有する少なくとも1つのポリペプチドを具備し得る。

30

【0148】

別の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合タンパク質は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4Fc領域又はその断片もしくは場合によっては補体結合及び／又はFcR結合又はエフェクター機能を調整する（増加、変化又は減少させる）1以上の修飾を具備する少なくとも1つのFc領域を含有する変異体を具備する。

【0149】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、12、13、14又は15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、50以上のグリシンアミノ酸残基を具備するIgポリペプチドと、を具備し得、この融合物は、配列番号2、4、5、16から25、36又は37のポリペプチド配列の細胞外ドメイン又は少なくとも50、100、150、200、250もしくは300アミノ酸を具備するその断片に対してそれぞれが少なくとも約80%の配列同一性を保持する少なくとも2、3又は4個のポリペプチドを具備し得る。

40

【0150】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、この

50

リンカーのうち少なくとも30、40、50、60、70、80又は90%を具備するリンカー残基のうち少なくとも30、40、50、60、70、80、90、95%又は全てが、グリシン及び／又はセリン残基から構成され、好ましくは少なくとも1つのヒト又はマウスFc領域、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4 Fc領域又はマウスIgG2aもしくはIgG2b定常もしくはFc領域を具備し、場合によっては、これは、グリコシル化、FcR結合、補体結合又はエフェクター機能を調整する（増加又は減少させる）又は変化させるように突然変異している。

【0151】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも30%高い免疫抑制性活性を示す。

10

【0152】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも40%高い免疫抑制性活性を示す。

【0153】

20

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも50%高い免疫抑制性活性を示す。

【0154】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも60%高い免疫抑制性活性を示す。

30

【0155】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも70%高い免疫抑制性活性を示す。

【0156】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも30%高い免疫抑制性活性を示す。

40

【0157】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも80%高い免疫抑制性活性を示す。

【0158】

50

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも90%高い免疫抑制性活性を示す。

【0159】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも100%高い免疫抑制性活性を示す。

10

【0160】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも1.1から2倍高い免疫抑制性活性を示す。

【0161】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも2から3倍高い免疫抑制性活性を示す。

20

【0162】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも3から4倍高い免疫抑制性活性を示す。

【0163】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、VISTAポリペプチドに介入する少なくとも1つのリンカーと、Igポリペプチドと、を具備し得、このVISTA-Ig融合タンパク質は、T細胞増殖を検出するアッセイにおいて、この少なくとも1つのリンカーを欠く同一VISTA-Ig融合タンパク質よりも少なくとも4から5、6から7、8から9、9から10又は少なくとも10倍高い免疫抑制性活性を示す。

30

【0164】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、配列番号2、4、5、16から25、36もしくは37のポリペプチド配列又は、少なくとも50、75、100、125、150、175、200、225、250、275もしくは300アミノ酸を具備し、場合によっては少なくとも1つのIgG、IgG1、IgG2、IgG2a、IgM、IgE又はIgAポリペプチド、例えばヒトIgG1の定常及びヒンジ領域を具備する少なくとも1つのIgタンパク質、を含有し、場合によってはアミノ酸残基32から190を具備するVISTAの少なくとも1つの細胞外ドメイン又はアミノ酸16から194を具備するVISTAの細胞外IgVドメインを具備する断片に対して、少なくとも約90から95%の配列同一性を有する少なくとも1つのVISTAポリペプチドを具備する。

40

【0165】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、少なくとも2コピーの、VISTAタンパク質又は少なくとも50、75、100、125、150、17

50

5、200、225、250、275もしくは300アミノ酸を具備するその断片と、少なくとも2コピーのVISTAタンパク質と、IgG1Fc又は非FcR-結合IgG1と、を具備する。

【0166】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、少なくとも3、4、5、6、7、8以上のコピーの、VISTAタンパク質又は少なくとも50、75、100、125、150、175、200、225、250、275もしくは300アミノ酸を具備するその断片と、少なくとも1つのIgG1又はIgG2aと、を具備する。

【0167】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、少なくとも3、4、5、6、7、8以上のコピーの、VISTAタンパク質又は少なくとも50、75、100、125、150、175、200、225、250、275もしくは300アミノ酸を具備するその断片と、少なくとも1つのIgG1又はIgG2aと、を具備する。

【0168】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、オリゴマー化ドメインのN-末端に連結される、少なくとも1つの細胞外ドメイン又はVISTAの断片を具備し、例えばこのオリゴマー化ドメインは、GCN4、COMP、SNARE、CMP、MAT、1個のNLRCを含有するLLR、NOD2ヌクレオチド-結合NLRC2、1個のNLRCを含有するLR、NOD2ヌクレオチド-結合NLRC2又はPSORAS1である。

【0169】

他の代表的な実施形態において、酵母、細菌、真菌、昆虫、鳥類、ツメガエル又は哺乳動物細胞などの組み換え細胞において上述のVISTA-Ig融合物が発現される。

【0170】

他の代表的な実施形態において、上述のVISTA-Ig融合物は、PD-1、PD-L1、PD-2、PD-L2タンパク質もしくは融合タンパク質又は前述のもののうち何れかに特異的に結合する抗体もしくは抗体と併用して、又は同時に投与される。

【0171】

他の代表的な実施形態において、非経口、静脈内、皮下、経皮、経口、筋肉内、腔内、口内、肛門又は鼻腔投与に適し得る治療的有効量の本発明によるVISTA-Ig融合タンパク質又は細胞を含有する医薬的に許容可能な組成物中に上述のVISTA-Ig融合物が含有される。

【0172】

代表的な実施形態において、既に特定されたものなどの様々なアレルギー性、炎症性又は自己免疫障害を処置又は予防するためにこれらの組成物が使用される。好ましい例としては、GVHD、狼瘡状態、例えばSLE、薬物誘発性狼瘡、乾癬性関節リウマチ及び多発性硬化症、呼吸アレルギー及び炎症状態、例えば喘息、鼻炎、脈管炎及びチャグ・ストラウス症候群が挙げられる。

【0173】

ある実施形態において、移植片対宿主病（GVHD）は、移植片対宿主病（GVHD）、急性移植片対宿主病、慢性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う急性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う慢性移植片対宿主病、骨髄移植に伴う急性移植片対宿主病、同種血液幹細胞移植（HSCT）に伴う急性移植片対宿主病又は骨髄移植に伴う慢性移植片対宿主病であり得る。別の実施形態において、処置される患者は、移植片対宿主病（GVHD）の少なくとも1つの症状を有し、場合によってはこの患者は、腹痛、腹部けいれん、下痢、発熱、黄疸、皮膚発疹、嘔吐及び体重減少を含むが限定されない急性GVHDを呈する。別の実施形態において、処置される患者は、ドライアイ、ドライマウス、脱毛、肝炎、肺障害、消化管障害、皮膚発疹及び皮膚肥厚を含むが限定されない慢性移植片対宿主病（GVHD）の少なくとも1つの症状を有する。別の実施形態において、この患者は、同種幹細胞又は骨髄移植を有するか又は受けようとしている。別の実施形態において、この患者は

、自己幹細胞又は骨髄移植を有するか又は受けようとしている。

【図面の簡単な説明】

【0174】

【図1A】図1A、B、C、D及びEは配列分析を示す。(A)マウスVISTA (PD-L3)の全長アミノ酸配列(配列番号17)。(B)マウスVISTA (PD-L3)(配列番号25)と、B7-H1 (PD-L1)(配列番号26)、B7-DC (PD-L2)(配列番号27)、B7-H3 (CD276)(配列番号28)及びB7-H4 (B7S1)(配列番号29)を含む選択されたB7ファミリーリガンドとの間の細胞外Igドメインのアミノ酸配列アラインメント。(C)PD-1 (配列番号31)、CTLA-4 (配列番号32)、CD28 (配列番号33)、BTLA (配列番号34)及びICOS (配列番号35)を含むB7ファミリー受容体との、VISTA (PD-L3)(配列番号30) Igドメインのアラインメント。Ig-vドメイン、「.」; Ig-cドメイン、「_」。MUSCLEアルゴリズム(ログ期待値による多重配列比較)を用いてアラインメントを行った。(D)ClustalW2プログラムを用いて、VISTA (PD-L3)と他のB7ファミリーリガンド及び受容体との間のIg-Vドメインの配列同一性(%)を計算する。(E)ヒト(配列番号37)とマウスVISTA (PD-L3)(配列番号36)との間の配列相同性を示すための配列アラインメント。同一残基に黒い影を付す。保存性が高い及び半保存的残基にそれぞれ暗色及び明色の影を付す。

【図1B】同上。

【図1C】同上。

【図1D】同上。

【図1E】同上。

【図2】図2は、他の免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーメンバーとのマウスVISTA (PD-L3)のヒロジェニック分析を示す。PhyMLアルゴリズム(系統発生学的最尤法)を用いて、マウスVISTA (PD-L3)及びCD28、CTLA-4、ICOS、BTLA、PD-1、B7-H1 (PD-L1)、B7-DC (PD-L2)、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-1、B7-2、BTNL2、BTN3A3、BTN2A2及びBTN1A1を含む他のIgスーパーファミリーメンバーの全長配列を分析した。系統樹の分岐点で分岐距離を示した。

【図3】図3A、B、C、D、E、F及びGは、VISTA (PD-L3)の組織発現及び造血細胞発現パターンを示す。A. マウス組織からの全長VISTA (PD-L3)のRT-PCR。レーン:(1)筋肉(2)心臓(3)眼(4)胸腺(5)脾臓(6)小腸(7)腎臓(8)肝臓(9)脳(10)乳腺(11)肺(12)卵巣(13)骨髄。B. 精製造血細胞型からの全長VISTA (PD-L3)のRT-PCR。レーン(1)腹膜マクロファージ(2)脾臓CD11b+単球(3)脾臓CD11c+DC(4)脾臓CD4+T細胞(5)脾臓CD8+T細胞(6)脾臓B細胞。C-E. 胸腺及び脾臓(C)、CD11b+単球(D)及び脾臓及び腹膜腔からのCD11c+DCサブセット(E)における、VISTA (PD-L3)発現のフローサイトメトリー分析。(F)脾臓B細胞、NK細胞及び顆粒球も分析する。(G)腸間膜LN、末梢LN、脾臓、血液及び腹膜腔を含む様々な組織部位からの造血細胞におけるVISTA (PD-L3)の差次的発現。少なくとも3回の独立した実験からの代表的データを示す。

【図4】図4は、VISTA、新規及び構造的に区別される、Igスーパーファミリー阻害性リガンドを示し、この細胞外ドメインは、他のCD及びB7ファミリーメンバーと一緒に抗原提示細胞上で示されるように、B7ファミリーリガンドPD-L1に対して最大の相同性を有する。VISTAは、可能性のあるタンパク質キナーゼC結合部位を除き明白なシグナル伝達モチーフがない、93aa細胞質ドメインを有する。

【図5】図5は、VISTA (PD-L3)ハムスターモノクローナル抗体の特異性を示す。ハイブリドーマ培養物からの上清を用いてRFPと融合させたPD-L1又はVISTA (PD-L3)の何れかを過剰発現するマウスEL4細胞株を染色し、フローサイトメトリーによって分析した。2つの代表的陽性クローン、8D8及び6E7を示す。

【図6】図6は、インビトロ培養脾臓細胞での他のB7ファミリーリガンドとのVISTA (PD-L3) 発現の比較を示す。CD4+T細胞、CD11bhi単球及びCD11c+DCを含む造血細胞型でのVISTA (PD-L3) 及び他のB7ファミリーリガンド (即ちPD-L1、PD-L2、B7-H3及びB7-H4) の発現を比較した。細胞は、活性化して、及び活性化せずに、新鮮単離したか又はインビトロで24時間培養した。プレート結合 α CD3 (5 μ g/mL) でCD4+T細胞を活性化し、IFN α (20 ng/mL) 及びLPS (200 ng/mL) でCD11bhi単球及びCD11c+DCを活性化した。3回の独立した実験からの代表的結果を示す。

【図7】図7A及び7Bは、免疫付与中のVISTA (PD-L3) 及び他のB7ファミリーリガンドのインビボ発現パターンの比較を示す。完全フロイントアジュバント (CFA) で乳化させたニワトリオボアルブミン (OVA) を用いてDO11.10 TCRトランスジェニックマウスの側腹部に免疫付与した。免疫付与から24時間後に流入領域及び非流入領域リンパ節細胞を回収し、フローサイトメトリーによってVISTA (PD-L3)、PD-L1及びPD-L2の発現について分析した。少なくとも4回の独立した実験からの代表的結果を示す。(A) 流入領域リンパ節内でCFA単独ではなくCFA/OVAでの免疫付与から24時間後に高レベルのVISTA (PD-L3) を発現するCD11b+細胞集団が誘導された。これらの細胞は、F4/80+マクロファージ及びCD11c+樹状細胞の混合表現型のものである。(B) CD11bhi単球、CD11c+DC及びCD4+T細胞でのVISTA (PD-L3)、PD-L1及びPD-L2の発現を免疫付与から24時間後に分析した。

【図8】図8は、免疫付与に対する反応における、活性化CD4+T細胞、CD11b+及びCD11c+細胞でのVISTA (PD-L3) 発現の喪失を示す。完全フロイントアジュバント (CFA) で乳化させたニワトリオボアルブミン (OVA) を用いてDO11.10マウスの側腹部に免疫付与した。免疫付与から48時間後に、流入領域及び非流入領域リンパ節細胞を回収し、フローサイトメトリーによってVISTA (PD-L3) 発現について分析した。2回の独立した実験から代表的結果を示す。

【図9A】図9A、B、C及びDは、固定化されたVISTA (PD-L3) - Ig融合タンパク質がCD4+及びCD8+T細胞増殖を阻害したことを示す。(A) 同時吸収VISTA (PD-L3) - Igあり又はなしでプレート結合 α CD3によって、CFSE標識されるCD4+及びCD8+T細胞を刺激した。CFSE-低細胞のパーセンテージを定量し、(B) で示した。(C) VISTA (PD-L3) - Igによって、PD-L1 KOマウスからのCD4+T細胞も抑制された。(D) VISTA (PD-L3) - Ig介在性抑制は持続的であり、遅発型に作用する。72時間 (i) 又は24時間 (ii、iii及びiv) の何れかに、VISTA (PD-L3) - Ig又は対照-Ig存在下でCD4+T細胞を活性化した。24時間予め活性化した細胞を回収し、さらに48時間、特定の条件下で再刺激した。72時間の培養終了時に細胞増殖を分析した。(ii) VISTA (PD-L3) - Igでの予活性化及び抗CD3での再刺激；(iii) 抗CD3での予活性化及びVISTA (PD-L3) - Igでの再刺激。(iv) VISTA (PD-L3) - Igでの予活性化及びVISTA (PD-L3) - Igでの再刺激。全条件に対して2つ組のウェルを分析した。4回の実験から代表的結果を示す。

【図9B】同上。

【図9C】同上。

【図10】図10は、CD4+T細胞増殖におけるPD-L1-Ig及びVISTA (PD-L3) - Ig融合タンパク質の同様の阻害効果を示す。バルク精製したCD4+T細胞をCFSE標識し、滴定量のPD-L1-Ig又はVISTA (PD-L3) - Ig融合タンパク質と一緒にプレート結合 α CD3で刺激した。72時間の時点でCFSE希釈液を分析し、CFSE low細胞の%を定量した。2つ組のウェルを全条件について分析した。2回の独立した実験からの代表的結果を示す。

【図11A】図11A及び11Bは、ナイーブ及びメモリーCD4+T細胞の増殖におけるVISTA (PD-L3) - Igの抑制性の影響を示す。(A) ナイーブ (CD25-

CD44^{low}CD62L^{hi})及びメモリー(CD25⁺CD44^{hi}CD62L^{low})CD4⁺T細胞サブセットを選別し、CFSE標識し、指定の比率でVISTA(PD-L3)-Ig又は対照-Igと一緒にプレート結合抗CD3(2.5 µg/mL)で刺激した。CFSE分裂プロファイルを調べることによって、72時間の時点で細胞増殖を分析した。CFSE^{low}細胞の%により決定した場合の増殖細胞の%を計算し、(B)で示す。全条件について2つ組のウェルを分析した。2回の独立した実験からの代表的結果を示す。

【図11B】同上。

【図12】図12A及び12Bは、早期TCR活性化及び細胞増殖を抑制したがアポトーシスを直接誘導しなかったVISTA(PD-L3)-Ig融合タンパク質を示す。1-2の比率で(それぞれ2.5 µg/mL及び5 µg/mL)VISTA(PD-L3)-Ig又は対照-Igと一緒にバルク精製CD4⁺T細胞をプレート結合抗CD3で刺激した。フローサイトメトリーによって24時間及び48時間の時点でCD69、CD62L及びCD44の発現について細胞を分析した。細胞を初期アポトーシスマーカーアネキシン-V及び細胞死マーカー7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD)に対しても染色した。2回の独立した実験からの代表的結果を示す。

【図13A】図13A、B、C、D及びEは、VISTA-IgがCD4⁺及びCD8⁺T細胞によるサイトカイン産生を阻害したことを示す。(A)及び(B)指定の比率でバルク精製CD4⁺T細胞をプレート結合抗CD3及びVISTA-Ig又は対照-Igで刺激した。24時間及び48時間後に培養上清を回収した。ELISAによってIL-2及びIFNγレベルを分析した。(C-D)CD4⁺T細胞をナイーブ(CD25⁺CD44^{low}CD62L^{hi})及びメモリー(CD25⁺CD44^{hi}CD62L^{low})細胞集団に選別した。1:2の比率でプレート結合αCD3及びVISTA(PD-L3)-Ig又は対照-Igで細胞を刺激した。培養上清を48時間の時点で回収し、ELISAによってIL-2及びIFNγのレベルについて分析した。(E)指定の比率でバルク精製CD8⁺T細胞をプレート結合αCD3及びVISTA(PD-L3)-Ig又は対照-Igで刺激した。ELISAによって培養上清中のIFNγを分析した。全条件に対して、6組の2つ組のウェルに対する上清をELISA分析のため集めた。3回の実験からの代表的結果を示す。

【図13B】同上。

【図13C】同上。

【図13D】同上。

【図13E】同上。

【図14-1】図14A、B、C及びDは、VISTA-Ig介在性抑制が、CD28によってもたらされる中レベルの同時刺激を克服し得るが、高レベルの同時刺激によって完全に逆転され、外因性IL-2((A)及び(B))によって部分的にレスキューされたことを示す。1-1の比率及び1-2の比率でVISTA(PD-L3)-Ig又は対照-Igの何れかと一緒にマウスCD4⁺T細胞をプレート結合αCD3によって活性化した。サイトカインレスキューの場合、可溶性mIL-2、mIL7、mIL15及びmIL-23(全て40 ng/mL)を細胞培養物に添加した(A)。同時刺激の効果を調べるために、指定の比率でαCD3及びIgタンパク質と一緒にαCD28(1 µg/mL)を固定化した(B)。CFSE分裂プロファイルを調べることによって、細胞増殖を72時間の時点で分析した。C-D、低レベルの同時刺激存在下でのVISTA(PD-L3)の抑制性活性を調べるために、抗CD3(2.5 µg/mL)及びVISTA-Ig融合タンパク質又は対照-Ig融合タンパク質(10 µg/mL)と一緒に滴定量のαCD28で被覆して、マウスCD4⁺T細胞増殖を刺激した。細胞増殖を72時間の時点で分析した。増殖したCFSE^{low}細胞の%を定量し、Dで示した。2つ組のウェルを全条件について分析した。3回の独立した実験からの代表的CFSEプロファイルを示す。

【図14-2】次14D。

【図15A】図15A、B、C及びDは、抗原提示細胞で発現されるVISTA(PD-

L3)がCD4⁺T細胞増殖を抑制したことを示す((A)、(B)及び(C))。MHC II分子I-A^d及び同時刺激分子B7-2を安定に発現するCHO細胞株を親細胞株として使用した。VISTA-RFP又はRFP対照分子の何れかを発現するレトロウイルスで細胞に対して形質導入した。形質導入細胞を選別し、発現が均一レベルになるようにした。抗原提示細胞としてのその能力を試験するために、CHO-VISTA又はCHO-RFP細胞をマイトマイシンC処理し、滴定量のOVAペプチド存在下でOVA特異的なトランスジェニックCD4⁺T細胞DO11.10と混合した。CFSE分裂プロファイル(A-B)によるか又はトリチウム取り込み(C)によるかの何れかでDO11細胞の増殖を72時間の時点で分析した。(D)10日培養期間中にRFP又はB7B-H5-RFPレトロウイルスを用いて骨髓由来樹状細胞に対して形質導入を行った。形質導入CD11c⁺RFP+DC及び非形質導入CD11c⁺RFP-DCを選別し、滴定量のOVAペプチド存在下でOVA特異的なトランスジェニックCD4⁺T細胞OTIIを刺激するために使用した。CFSE分裂を調べることによって、第3日に細胞増殖を分析した。全実験に対して、2つ組のウェルを全条件について分析し、3回の独立した実験からの代表的結果を示す。

【図15B】同上。

【図15C】同上。

【図15D】同上。

【図16】図16は、レトロウイルスで形質導入した骨髓由来DCにおけるVISTA(PD-L3)の表面発現レベルを示す。骨髓由来DC(BMDC)をGM-CSF(20 ng/mmL)の存在下で培養し、本明細書中で記載のようにRFP又はVISTA-RFPレトロウイルスの何れかをを用いて形質導入した。第10日に、培養BMDCにおいてVISTAの表面発現レベルを分析し、新鮮単離腹膜マクロファージと比較した。

【図17】図17A及びBは、抗PD-L3モノクローナル抗体が受動伝達EAEモデルにおいて有効性を示すことを示す。この養子免疫伝達EAEモデルにおいて、CFA及びPLPペプチドでドナーSJLマウスに免疫付与した。第10日に、流入領域LNからの全リンパ球を単離し、インビトロでPLPペプチド、IL-23(20 ng/mL)及び抗IFN γ (10 μ g/mL)とともに4日間培養した。次に、拡大CD4⁺T細胞を精製し、ナイーブ受容マウスに養子免疫伝達した。疾患進行を監視し、0、疾患なし；0.5 尾部緊張喪失；1：尾部引きずり；2：尾部引きずり+後肢不全麻痺；2.5：片側後肢麻痺；3：両後肢麻痺；3.5：前肢脱力；4：後肢麻痺+一側性前肢麻痺でスコア化した。疾患スコアが4に到達したらマウスを屠殺した。*、マウスを屠殺した。

【図18】図18は、抗原提示細胞において発現されるVISTAがCD4⁺T細胞増殖を抑制したことを示す。

【図19】図19は、MB49腫瘍細胞が移植されたマウスにおいて抗VISTA抗体が腫瘍成長を阻害したことを示す。

【図20A】図20A、B、C、D及びEは、4匹の異なるマウス抗腫瘍モデル(A、B、C及びD)におけるVISTAモノクローナル抗体の抗腫瘍効果を示す。図21Eは、ID8モデルの異なる細胞上でのVISTAの発現を示す。異なる解剖学的位置において骨髓樹状細胞における非常に高い発現。見られ得るように、腫瘍が成長し、白血球が浸潤する部位である腹水細胞中の骨髓樹状細胞において非常に高レベル。

【図20B】同上。

【図20C】同上。

【図20D】同上。

【図20E】同上。

【図21】図21は、CD40/TLRアゴニストワクチン(アゴニスト性の α CD40 mAb、TLRアゴニスト及びOVAペプチドを使用することからなる。)の有効性におけるVISTAモノクローナル抗体の増強効果を示す。

【図22】図22は、健常マウスにおけるか又はEAEを発現しているマウスにおけるCNS細胞上でのVISTA発現を示す。

【図23A】図23A、B及びCは、VISTAの配列及び構造分析を示す。(A)それぞれ太字、斜字体及びTimes New Romanで強調したIg-Vドメイン、スタークセグメント及び膜貫通領域があるマウスVISTAの一次アミノ酸配列。外部ドメイン領域のシステインは下線により示す。(B) 鋳型としてPD-L1 (Protein Data Bank受託番号3BIS)を用いたマウスVISTAの比較タンパク質構造モデル。Ig-Vドメインにおける5個のシステイン残基をスティックとして示す。このモデルに基づき、VISTA Ig-Vドメインは、BとF鎖との間の基準のジスルフィド結合ならびに3個のさらなるシステインを有し、このうち一部は、分子間及び分子内ジスルフィド結合を形成する可能性があり得る。G鎖(示さない。)の後にストーク領域にさらなるインバリエントなシステインが存在する。 β 鎖(A-G)を平らな矢印として示す。C'-Dループに矢印を付す。(C)いくつかのB7ファミリーメンバーのIg-Vドメイン及びVISTAの多重配列アラインメント。予想される二次構造(鎖、ヘリックス及び β -ターンに対してそれぞれ、矢印、スプリング及び「T」を使用)アラインメント上に示し、VISTA構造モデルに基づく。VISTA(配列番号15)、PD1L1(配列番号11)、PD1L2(配列番号12)、B7H4(配列番号13)及びB7H3(配列番号14)。(D) VISTAオルソログの多重配列アラインメント。インバリエントな残基を赤い背景により示し、物理化学的保存的位置を赤字で示す。保存的アミノ酸を青いボックスで示す。36種類のVISTAオルソログタンパク質に基づき保存性を計算するが、9種類の代表的なもののみを示す。殆ど全てのIgスーパーファミリーメンバーにおいて保存的である基準のシステイン対(B及びF鎖)を赤丸で強調し、一方でVISTAに対して特異的であるシステインに青丸を付す。特有のVISTAシステインパターンは、マウス(配列番号17)、ヒト(配列番号16)、カンガルー(配列番号18)、イルカ(配列番号19)、ニワトリ(配列番号20)、ツメガエル(配列番号21)、キンカチョウ(配列番号22)、ゼブラフィッシュ及びフグ(配列番号23)からの全オルソログで保存される。

【図23B】同上。

【図23C】同上。

【図24A】図24A及びBは、腫瘍細胞上でのVISTA過剰発現が、防御的な抗腫瘍免疫性を克服することを示す。レトロウイルス形質導によってVISTA又はRFP対照タンパク質を過剰発現するMCA105腫瘍細胞を作製し、均一性について選別した。防御的免疫性を生成させるために、放射線照射したMCA105腫瘍細胞を用いてナイーブマウスの左側腹部の皮下にワクチン接種した。(A) 14日後、ワクチン接種マウスの右側腹部の皮下に生MCA105VISTA又はMCA105RFP腫瘍細胞を負荷した。腫瘍成長を2日ごとに監視した。腫瘍サイズは平均 $\pm$ SEMとして示す。3回の独立した反復から代表的結果を示す。(B) ワクチン接種マウスを処置しないか、又は生腫瘍負荷前にモノクローナル抗体によってCD4⁺及びCD8⁺T細胞の両方を欠乏させた。Aと同じように腫瘍サイズを監視し、それを平均 $\pm$ SEMとして示した。2回の独立した反復から代表的結果を示す。全実験について、比率は、群あたりのマウス総数中の腫瘍保有マウス数を示す。対応のないマン-ホイットニー検定で統計学的差(p-値)を評価した。

【図24B】同上。

【図25-1】図25A、B、C及びDは、特異的なモノクローナル抗体を用いたVISTA遮断がインビトロ及びインビボでCD4⁺T細胞反応を促進したことを示す。(A)モノクローナル抗体クローン13F3はインビトロでVISTA介在性抑制を中和した。同種OVAペプチド存在下で、CFSE-標識されるDO11.10 CD4⁺T細胞を刺激するために、A20-RFP及びA20-VISTA細胞を使用した。20 μ g/mLのVISTA特異的なモノクローナル抗体13F3又は対照-Igを指定されるとおり添加した。72時間後、CFSE希釈液を分析し、CFSE^{low}細胞の%を平均 $\pm$ SEMとして示す。2つ組のウェルを全条件について分析した。(B及びC) ナーブ脾臓細胞から選別した、総CD11b^{hi}骨髄細胞(B)又はCD11b-CD11c⁻単球(C)及びCD11b^{hi}CD11c⁺骨髄DC(D)に放射線照射し、OVAペプチドの存在下

でCFSE標識されるOT-I IトランスジェニックCD4⁺T細胞を刺激するために使用した。72時間の培養期間のうち最後の8時間中のトリチウム化チミジンの取り込みによって、細胞増殖を測定し、平均±SEMとして示した。全条件において3つ組のウェルを分析した。

【図25-2】図25B。

【図25-3】図25C、D。

【図26】図26は、VISTA-IgG2aが実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）（多発性硬化症のモデル）進行を軽減することを示す。活動性EAEを誘発するために175 μg MOG/CFA及び百日咳毒素（PT）300 ng（第0、2日）を用いてマウスに免疫付与した。第14、17及び20日に、150 μg VISTA-IgG2a（n = 8）又は150 μg 対照IgG2a（n = 8）を投与した。平均±SEMとしてデータを示す。

10

【図27】図27は、実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）進行におけるVISTA-IgG1及びVISTA-IgG2aの治療効果を示す。活動性EAEを誘発するために175 μg MOG/CFA及び百日咳毒素（PT）300 ng（第0、2日）を用いてマウスに免疫付与した。第6日に、150 μg 対照IgG1（n = 3）、150 μg 対照IgG2a（n = 6）、150 μg mVISTA-IgG1（n = 3）又は150 μg mVISTA-IgG2a（n = 6）で週に3回、マウスを処置した（全2週間）。データは平均±SEMとして示す。

【図28】図28は、実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）進行におけるVISTA-IgG2a融合タンパク質の治療効果を示す。活動性EAEを誘発するために175 μg MOG/CFA及び百日咳毒素（PT）300 ng（第0、2日）を用いてマウスに免疫付与した。第14日に、PBS（n = 6）、100 μg 対照IgG2a（n = 6）、300 μg 対照IgG2a（n = 6）、100 μg VISTA-IgG2a（n = 6）又は300 μg mVISTA-IgG2a（n = 6）で週に3回、マウスを処置した（全2週間）。データは平均±SEMとして示す。

20

【図29】図29A及びBは、VISTA健常ヒト組織の発現をcDNA組織パネル（Origene）のリアルタイムPCR分析によって調べたことを示す。（A）VISTAは主に造血組織において又は大量の造血組織を含有する組織において発現された。これは、免疫関連機能におけるVISTAの重要性と一致する。（B）発現の発現パターンは、VISTAの最も近縁の相同PD-L1の場合と同様の傾向を辿ることが分かった。

30

【図30】図30は、単球、樹状細胞における、及びCD4及びCD8 T細胞のおよそ20%によるVISTAタンパク質発現を示す。血液単球の「巡回性」（CD14^{dim}CD16⁺）及び「炎症性」（CD14⁺CD16⁺）サブセットの両方内で、及び樹状細胞のリンパ系及び骨髄サブセットの両方内でVISTA発現が観察された。

【図31】図31A、B、C及びDは、バルク精製CD4（図31A）及びCD8（図31B）T細胞のCFSE希釈液の抑制を示す。VISTAの細胞外ドメイン及びFc受容体結合を減少させるための突然変異を含有するヒトIgGのFc領域からなるIg融合タンパク質を作製した。2.5 μg/mLの抗CD3（OKT3）と一緒に10 μg/mLのVISTA-Ig又は対照Igをプレート上に固定化し、次いでCFSE希釈によって増殖を測定した。

40

【図32】図32A及び32Bは、様々なOKT3濃度にわたるヒトVISTA-Ig及びヒトVISTA-Igの滴定を示し、これは、より高いOKT3濃度がより高いVISTA濃度により克服され得ることを示す。

【図33-1】図33A、B、C及びDは、VISTA-Igの存在下又は非存在下での活性化後、細胞の状況を調べたことを示す。培養2日間で、初期活性化マーカーCD25及びCD69の抗CD3による上方制御がVISTA-Igにより遮断された（図33Aおよび33B）。同様に、培養5日後、抗原経験を示す、CD45RAからCD45ROへの発現のシフトが妨げられた（図33C）。VISTAは、細胞生存能に対して影響がなかった。図34Dは、VISTA-IgがFoxP3変換を増加させたことを示す。

50

【図33-2】図33D。

【図34】図34A及びBは、VISTAにより誘導される抑制を示し、細胞を抗CD3及びVISTA-Ig上で2日間培養し、次いで抗CD3のみの上に移して3日間培養した。このさらなる刺激は、抑制をレスキューできなかった（図34A及び34B）。

【図35】図35A及びBは、VISTA-Igが、CD4（図35A）及びCD8（図35B）T細胞によるIL-10、TNF α 及びIFN γ の産生を顕著に低下させ、IL-17産生の穏やかな減少の傾向があったことを示す。

【図36】図36A、B及びCは、抗CD28アゴニスト性抗体がT細胞に対して強力な同時刺激をもたらすので、VISTA抑制を誘発するために培養物に滴定したことを示す。

【図37】図37は、上記実施例32で使用したフローゲーティングアッセイを示す。

【図38】図38は、上記実施例32で使用したインビトロT細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図39】図39A、B及びCは、2.5 μ g/mLプレート結合抗CD3及び対照Ig又はVISTA-Igの何れかの存在下で5日間培養したCFSE標識ヒトT細胞におけるVISTA-Ig活性に対するリンカーフレキシビリティの影響を示す。a) 配列1からのhuVISTA-Ig。b) 可動性リンカーを欠く配列2からのhuVISTA-Ig。c) セリン/グリシンリンカーを有する配列3からのhuVISTA-Ig。

【図40】図40A、B、C及びDは、1日おきにPBS、150 μ g対照-IgG2a又はmVISTA-IgG2aでNZBWF1雌マウスを8週齢から処置した予防研究を含有する。治療研究の場合は第24週に処置を開始した。体重減少及び蛋白尿によって疾患重症度を毎週監視した。データは平均 $\pm$ SEMとして示す。対照-IgG2aとmVISTA-IgG2aとの間で統計学的有意差を決定し；対応のないマン・ホイットニー検定により $p=0.0027$ （予防）及び $p=0.0156$ （治療）となった。

【図41】図41A、B、C及びDは、Aからの個々の糸球体の腎臓の代表的なH&E染色の高倍率切片を含有する。組織学的に正常なBW糸球体。B. 中等度の糸球体炎症があるVISTA-Ig-処置マウス；C. 強い炎症及びうっ滞がある対照Ig-処置マウス；D. 糸球体の完全に近い閉塞がある別の対照Ig-処置マウス。

【図42】図42は、活動性EAEにおけるVISTA-IgG2aの治療効果を示すEAE動物モデルにおける実験の結果を含有する。

【図43】図43A及びBは、SLE発症を予防することにおけるmVISTA-IgG2aの予防効果を示すSLE動物モデルにおける実験の結果を含有する。

【図44】図44A及びBは、mVISTA-IgG2aの予防的投与が蛋白尿を減少させ、生存を促進することを示す、SLE動物モデルにおける実験の結果を含有する。

【図45】図45は、TCR Tg/VISTA-マウスにおけるEAEに対する易罹患性を向上させることを示すデータを含有する。

【図46】図46は、雌VISTA KOマウスにおけるIgG自己抗体上昇を示すデータを含有する。

【図47】図47は、RAG-/-VISTA-マウスにおける骨髓造血向上を示す実験データを含有する。

【図48】図48は、VISTA-マウスの炎症性表現型を示す実験データを含有する。

【図49】図49は、OVAに対する寛容性および感作の両方が、標的組織においてFoxp3⁺Tregを上昇させ、流入領域リンパ節でTregを活性化することを示す。OVA/ミョウバンアジュバント、ある一定のOVA単独（寛容化）又はPBS処置でマウスを感作した。第7、10、11及び12日に、50 μ g OVA又はPBSを用いて鼻腔内投与を行った。第13日に、 $n=5$ で、肺及び流入領域リンパ節細胞を核内Foxp3又は表面GARPについて染色した。

【図50】図50は、肺Tregはアレルゲンに対して無反応であることを示す。全体を通して図49におけるように、OVA/ミョウバンアジュバント（感作）、OVA単独（

10

20

30

40

50

寛容化)又はPBS処置によりマウスに免疫付与した。第13日に、肺及び流入領域リンパ節細胞をCFSEで標識し、アレルゲンの存在下で4日間培養し、続いて核内Foxp3染色を行った。いくつかの独立した実験で同様のデータが得られた。

【図51】図51は、Foxp3⁺Tregにおけるヘリオス発現が炎症性組織で減少するが、流入領域リンパ節では減少しないことを示す。図2におけるように、核内ヘリオス発現について肺及びリンパ節細胞を染色した。

【図52】図52は、寛容性誘導中及びアレルゲン感作中の両方で肺胞マクロファージ上でVISTAが高発現されることを示す。肺の炎症を誘発するために、マウスにアレルゲン単独(OVA、寛容化)又はアレルゲン+粘膜アジュバント(OVA+TNF-α)の4回のi. n. 投与を行った。最終負荷24時間後に、モノクローナルVISTA Abで、マクロファージ/DC(I-Ab⁺CD11c⁺)又はリンパ球(CD3⁺/B220⁺)のマーカーについて、BAL又は肺組織細胞を染色した。2回の独立した実験で同様のデータが得られた。

10

【図53】図53は、固定化されたVISTA-Ig融合タンパク質がインビトロでのFoxp3-発現TregのTGF-β介在性誘導を促進することを示す。指定されるように、プレート結合抗CD3(5μg/mL)±TGF-β(1ng/mL)及び対照-Ig又はVISTA-Ig(2.5μg/mL)の何れかとともに、Foxp3-レポーターマウスからの選別Foxp3GFP-CD25-ナイーブCD4⁺T細胞を培養した。Foxp3発現細胞の誘導について72時間後に細胞を調べた。

【図54】図54は、様々なシグナル伝達経路におけるVISTAの影響をアッセイするために使用されるホスホプロットアッセイを図式的に示す。

20

【図55】図55は、CD3刺激後の様々な時間点でのpERK活性のホスホプロットを含有する。

【図56】図56は、図55と同じ時間点でのローディング対照を含有する。

【図57】図57は、VISTAがERK1/2活性化を選択的に阻害することを示すデータを含有する。

【図58】図58は、VISTAがJNK活性化を阻害しないことを示すデータを含有する。

【図59】図59は、ヒト及びマウスVISTA-Igの両方がヒト及びマウスMLR反応を抑制することを示す、ヒト及びマウスMLR実験の結果を含有する。

30

【図60】図60は、NZBWF1マウスにおけるVISTA-IgG2aの投与が、炎症性単球及びT細胞の細胞頻度を変化させないことを示すデータを含有する。

【図61】図61は、VISTA-IgG2aで処置される20週NZBWF1マウスにおけるIL-17レベルを示すことを含有する。

【図62】図62及び63は、SLE治療研究における24週齢NZBWF1マウスのサイトカインプロファイルを含有する。

【図63】図62及び63は、SLE治療研究における24週齢NZBWF1マウスのサイトカインプロファイルを含有する。

【発明を実施するための形態】

【0175】

40

〔0203〕 本明細書中で記載する発明が完全に理解され得るようにするために、次の詳細な説明を示す。本発明の様々な実施形態を詳細に記載し、提供される実施例によりさらに説明し得る。

【0176】

定義

〔0204〕 別段の定めがない限り、本明細書中で使用される全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通常の技術者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書中に記載のものと同様又は同等の方法及び材料を本発明又は本発明の試験において使用し得るものの、適切な方法及び材料を本明細書中に記載する。材料、方法及び実施例は単なる説明であり、限定するものではない。

50

【0177】

〔0205〕 本明細書中の記載で、及び続く特許請求の範囲を通じて使用される場合、「a」、「an」及び「the」の意味は、文脈から明らかに別段示されない限り、複数への言及を含む。

【0178】

〔0206〕 「活性化受容体」は、本明細書中で使用される場合、抗原、複合抗原（例えばMHC分子の場合）、I gー融合タンパク質、リガンド又は抗体に結合する免疫細胞受容体を広く指す。しかし活性化受容体は、T細胞受容体（TCR）、B細胞受容体（BCR）、サイトカイン受容体、LPS受容体、補体受容体及びFc受容体に限定されない。例えば、T細胞受容体はT細胞上に存在し、CD3分子と会合する。T細胞受容体は、MHC分子の場合、抗原により（ならびにポリクローナルT細胞活性化試薬により）刺激される。TCRを介したT細胞活性化の結果、数多くの変化、例えばタンパク質リン酸化、膜脂質の変化、イオン流動、環状ヌクレオチド改変、RNA転写変化、タンパク質合成変化及び細胞体積変化が起こる。

10

【0179】

〔0207〕 「抗原提示細胞」は、本明細書中で使用される場合、専門的な抗原提示細胞（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）ならびに他の抗原提示細胞（例えば角化細胞、内皮細胞、星状膠細胞、線維芽細胞及び乏突起膠細胞）を広く指す。

【0180】

〔0208〕 「アミノ酸」は、本明細書中で使用される場合、天然及び合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を広く指す。天然アミノ酸は、遺伝コードによりコードされるものならびに、後に修飾されるアミノ酸である（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-ホスホセリン）。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同じ基本的化学構造を有する化合物（即ち、水素、カルボキシル基、アミノ基と結合する炭素）を指し、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）類似体は、修飾されたR基（例えばノルロイシン）又は修飾されたペプチドバックボーンを有し得るが、天然アミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様に機能する化学的化合物を指す。

20

30

【0181】

〔0209〕 「アネルギー」又は「寛容性」は、本明細書中で使用される場合、受容体介在性刺激の活性化に対するレフラクティビティーを広く指す。レフラクティビティーは、一般に抗原特異的であり、寛容化抗原への曝露が停止された後、持続する。

【0182】

〔0210〕 「抗体」は、本明細書中で使用される場合、抗体の「抗原結合部分」（「抗体部分」、「抗原ー結合断片」、「抗体断片」と交換可能にも使用される。）ならびに抗体分子全体を広く指す。「抗原結合部分」という用語は、本明細書中で使用される場合、抗原（例えばVISTA（PD-L3））への特異的結合能を保持する抗体の1以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって発揮され得る。抗体の「抗原結合部分」という用語内に包含される抗原結合断片の例としては、（a）Fab断片、VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価断片；（b）F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結される2つのFab断片を具備する二価断片；（c）VH及びCH1ドメインからなるFd断片；（d）抗体の単一アームのVL及びVHドメインからなるFv断片；（e）VHドメインからなるdAb断片（Ward, et al. (1989) Nature 341: 544-546）；及び（f）単離相補性決定領域（CDR）が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VL及びVHは個別の遺伝子によりコードされるにも関わらず、これらは、組み換え法を用いて、それらを、VL及びVH領域が対形成して一価分子を形成する単一の蛋白質鎖として作製できるようにする合成リンカーにより連結され得る（1本鎖Fv（scFv）としても知られる。例

40

50

えばBird, et al. (1988) Science 242:423-426; Huston, et al. (1988) Proc Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 及びOsbourne, et al. (1998) Nat. Biotechnol. 16:778を参照。1本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語内に包含されるものとする。完全IgG分子又は他のアイソタイプをコードする発現ベクターを作製するために、特異的なscFvの何らかのVH及びVL配列をヒト免疫グロブリン定常領域cDNA又はゲノム配列に連結させ得る。タンパク質化学又は組み換えDNA技術の何れかを用いた免疫グロブリンのFab、Fv又は他の断片の作製においても、VH及びVLを使用し得る。1本鎖抗体の他の形態、例えばダイアボディーも包含される。ダイアボディーは、1本のポリペプチド鎖上で、しかし同じ鎖上のVH及びVLドメインの2つのドメイン間での対形成を可能にするには短すぎ、それによってそのドメインを別の鎖の相補的ドメインに強制的に対形成させ、2か所の抗原結合部位を生成させるリンカーを用いて、VH及びVLドメインが発現される、二価、二特異性抗体である。例えばHolliger, et al. (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, et al. (1994) Structure 2:1121-1123を参照。

【0183】

〔0211〕 またさらに、抗体又はその抗原結合部分（抗原結合断片、抗体断片、抗体部分）は、1以上の他のタンパク質又はペプチドとの抗体又は抗体部分の共有又は非共有結合により形成される、より大きな免疫接着分子の一部であり得る。免疫接着分子の例としては、四量体scFv分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用（Kipriyanov, et al. (1995) Hum. Antibodies Hybrids 6:93-101）及び二価及びビオチン化scFv分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチド及びC末端ポリヒスチジンタグの使用が挙げられる。Kipriyanov, et al. (1994) Mol Immunol. 31:1047-1058。抗体全体のそれぞれパペイン又はペプシン消化などの従来技術を用いて、Fab及びF(ab')₂断片などの抗体部分を抗体全体から調製し得る。さらに、本明細書中で記載のように標準的な組み換えDNA技術を用いて抗体、抗体部分及び免疫接着分子を得ることができる。

【0184】

〔0212〕 抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、異種、同種、同系又はその修飾型、例えばヒト化、キメラであり得る。好ましくは、本発明の抗体は、VISTA（PD-L3）分子に特異的に又は実質的に特異的に結合する。「モノクローナル抗体」及び「モノクローナル抗体組成物」という用語は、本明細書中で使用される場合、抗原の特定のエピトープと免疫反応可能な1種の抗原結合部位のみを含有する抗体分子の集団を指し、一方で「ポリクローナル抗体」及び「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、特定の抗原と相互作用可能な複数種の抗原結合部位を含有する抗体分子の集団を指す。モノクローナル抗体組成物は、一般的に、それが免疫反応する特定の抗原に対して単一の結合親和性を示す。

【0185】

〔0213〕 「抗原」は、本明細書中で使用される場合、その抗原のエピトープに結合可能な抗体を産生するように動物をさらに誘導可能である抗体により結合可能な分子又は分子の一部分を広く指す。抗原は1つのエピトープを有し得るか又は複数のエピトープを有し得る。本明細書中で言及される特異的反応は、抗原が非常に選択的にその対応する抗体と反応し、他の抗原により惹起され得る多数の他の抗体とは反応しないことを示す。関心のある特定の抗原に対する所望の免疫反応促進の場合、防御的な免疫反応が引き出され得る感染性疾患抗原を含むが限定されない抗原が代表的である。

【0186】

〔0214〕 「アレルギー性疾患」は、本明細書中で使用される場合、アレルギー反応を含む疾患を広く指す。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

10

20

30

40

50

る疾患として定義され、そこにはアレルゲンへの曝露と病理学的変化の発症との間に強い相関があり、その病理学的変化は、免疫学的機構を有することが証明されている。本明細書中で、免疫学的機構は、白血球がアレルゲン刺激に対する免疫反応を示すことを意味する。

【0187】

〔0215〕 「アンチセンス核酸分子」は、本明細書中で使用される場合、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的（例えば2本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的）である、mRNA配列に相補的、又は遺伝子のコード鎖に相補的である、ヌクレオチド配列を広く指す。従って、アンチセンス核酸分子はセンス核酸分子に水素結合し得る。

【0188】

〔0216〕 「喘息」は、本明細書中で使用される場合、炎症、気道狭窄及び吸入性物質に対する気道の反応性の上昇を特徴とする呼吸器系の障害を広く指す。喘息は頻繁に、排他的でないものの、アトピー性又はアレルギー性症状と関連がある。

【0189】

〔0217〕 「アポトーシス」は、本明細書中で使用される場合、当技術分野で公知の技術を用いて特徴評価され得るプログラム細胞死を広く指す。アポトーシス細胞死は、細胞の縮み、膜ブレbbing及びクロマチン凝縮、その結果としての細胞断片化を特徴とし得る。アポトーシスが起きている細胞はまた、ヌクレオソーム間のDNA切断の特徴的パターンも示す。

【0190】

〔0218〕 「自己免疫性」又は「自己免疫疾患又は状態」は、本明細書中で使用される場合、個体それ自身の組織から生じ、それを対象とする疾患又は障害、又はその同時分離もしくは出現又はそこから生じる状態を広く指す。

【0191】

〔0219〕 「B細胞受容体」(BCR)は、本明細書中で使用される場合、B細胞で見られる膜Ig(mIg)と他の膜貫通ポリペプチド(例えばIgα及びIgβ)との間の複合体を広く指す。mIgのシグナル形質導入機能は、オリゴマー性又は多量体抗原による受容体分子の架橋により誘発される。B細胞はまた、抗免疫グロブリン抗体によっても活性化され得る。BCR活性化時に、チロシンリン酸化を含め、B細胞で数多くの変化が起こる。

【0192】

〔0220〕 「癌」は、本明細書中で使用される場合、悪性の成長又は腫瘍(例えば無制御の細胞増殖)を生じさせる異常で無制御の細胞分裂を特徴とする、何らかの(浸潤性であれ又は転移性であれ)新生物疾患を広く指す。

【0193】

〔0221〕 「キメラ抗体」は、本明細書中で使用される場合、抗原結合部位(可変領域)が、異なるか又は改変されたクラスの定常領域、エフェクター機能及び／又は種、又はキメラ抗体に新しい特性を付与する完全に異なる分子、例えば酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物に連結されるように、定常領域又はその一部分が改変、置換又は交換されており、可変領域又はその一部分が、抗原特異性が異なるか又は改変されている可変領域で改変、置換又は交換されている抗体分子を広く指す。

【0194】

〔0222〕 「コード領域」は、本明細書中で使用される場合、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を広く指し、一方で「非コード領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域(例えば5'及び3'非翻訳領域)を指す。

【0195】

〔0223〕 「保存的に修飾された変異体」は、本明細書中で使用される場合、アミノ酸及び核酸配列の両方に適用され、特定の核酸配列に対して、同一であるか又は基本的に同一であるアミノ酸配列をコードする核酸を指すか、又はこの核酸は、基本的に同一である

10

20

30

40

50

配列に対するアミノ酸配列をコードしない、保存的に修飾された変異体を広く表す。遺伝コードの縮重のために、多数の機能的に同一である核酸が所定のタンパク質をコードする。「サイレントな変異」は、ある種の保存的に修飾された核酸変異も指す。ポリペプチドをコードする本明細書中の全ての核酸配列はまた、核酸の全ての可能性のあるサイレントな変異も表す。当業者は、核酸中の各コドン（通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUG及び通常はトリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGコドンを除く。）は、機能的に同一である分子を得るために修飾され得ることを認識するであろう。

【0196】

[0224] 「相補性決定領域」、「超可変領域」又は「CDR」は、本明細書中で使用される場合、抗体の軽又は重鎖の可変領域で見出される超可変又は相補性決定領域（CDR）の1以上を広く指す。Kabat, et al. (1987) “Sequences of Proteins of Immunological Interest” National Institutes of Health, Bethesda, MD. を参照。これらの発現は、Kabat, et al. (1983) “Sequences of Proteins of Immunological Interest” U. S. Dept. of Health and Human Servicesで定義されるような超可変領域又は抗体の3次元構造の超可変ループを含む。Chothia及びLesk (1987) J Mol. Biol. 196:901-917。各鎖のCDRは、フレームワーク領域によって、および他の鎖からのCDRと、近接近して保持され、抗原結合部位の形成に参与する。CDR内で、抗体抗原相互作用においてCDRにより使用される重要な接触残基に相当する選択性決定領域（SDR）として記載されている選択アミノ酸がある。Kashmiri (2005) Methods 36:25-34。

10

20

【0197】

[0225] 「対照量」は、本明細書中で使用される場合、マーカーが、マーカーの試験量に対して比較しようとする何らかの量又は範囲であり得ることを広く指す。例えば、マーカーの対照量は、特定の疾患もしくは状態がある患者又はこのような疾患もしくは状態がない者におけるマーカーの量であり得る。対照量は、絶対量（例えばマイクログラム/mL）又は相対量（例えばシグナルの相対強度）の何れかであり得る。

【0198】

30

[0226] 「同時刺激受容体」は、本明細書中で使用される場合、例えばCD28又はICOSといった、免疫細胞に同時刺激シグナルを伝達する受容体を広く指す。本明細書中で使用される場合、「阻害受容体」という用語は、負のシグナルを免疫細胞に伝達する受容体を含む。

【0199】

[0227] 「同時刺激」は、本明細書中で使用される場合、同時刺激分子が増殖又はエフェクター機能を誘導する第二の非活性化受容体介在性シグナル（「同時刺激シグナル」）を提供する能力を広く指す。例えば、同時刺激シグナルの結果、（例えばT細胞-受容体介在性シグナルを受け取ったT細胞において）サイトカイン分泌が起こり得る。（例えば活性化受容体を介して）細胞受容体介在性シグナルを受け取った免疫細胞は、本明細書中で、「活性化された免疫細胞」と呼ばれ得る。

40

【0200】

[0228] 「細胞質ドメイン」は、本明細書中で使用される場合、細胞の細胞質に伸びるタンパク質の部分を広く指す。

【0201】

[0229] 「診断」は、本明細書中で使用される場合、病的状態の存在又はその性質を同定することを広く指す。診断方法はその感度及び特異性が異なる。診断アッセイの「感度」は、試験で陽性となる病的個体の%（「真の陽性」の%）である。アッセイにより検出されない病的個体は、「偽陰性」である。疾患がなく、アッセイにおいて陰性となる対象は、「真の陰性」と呼ばれる。診断アッセイの「特異性」は、1-偽陽性率であり、「

50

偽陽性」率は、試験で陽性となる疾患のない者の割合として定義される。特定の診断方法が、状態の確定診断を提供し得ない一方で、方法が診断に役立つ陽性の指標を提供すれば十分である。

【0202】

〔0230〕 「診断する」は、本明細書中で使用される場合、疾患又は症状を分類し、疾患の重症度を決定し、疾患進行を監視し、疾患の転帰及び／又は回復の見込みを予想することを広く指す。「検出すること」という用語は、場合によってはまた、前述のもののうち何れかを包含する。本発明による疾患の診断は、いくつかの実施形態において、対象から得られる生体試料中の本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチドのレベルを決定することにより影響を受け得、決定されたレベルは、疾患に対する傾向又は疾患の有無と相関させ得る。なお、「対象から得られる生体試料」はまた、場合によっては対象から物理的に摘出されていない試料も具備し得る。

10

【0203】

〔0231〕 「有効量」は、本明細書中で使用される場合、疾患を処置するために患者に投与される場合、疾患に対するこのような処置を有効にするのに十分である、化合物、抗体、抗原又は細胞の量を広く指す。有効量は、予防法に有効な量及び／又は予防に有効な量であり得る。有効量は、兆候／症状を軽減するために有効な量、兆候／症状の発症を予防するために、兆候／症状の発症の重症度を軽減するために、兆候／症状の発症を排除するために、兆候／症状の発症の発現を遅延させるために、兆候／症状の発症の発現を予防するために及び／又は兆候／症状の発症の有効な予防のために、有効な量であり得る。「有効量」は、処置しようとする患者の疾患及びその重症度及び年齢、体重、病歴、易罹患性及び既存の状態によって変動し得る。「有効量」という用語は、本発明の目的に対して「治療的有效量」と同義語である。

20

【0204】

〔0232〕 「細胞外ドメイン」は、本明細書中で使用される場合、細胞の表面から伸びるタンパク質の一部を広く指す。

【0205】

〔0233〕 「発現ベクター」は、本明細書中で使用される場合、原核、酵母、真菌、植物、昆虫又は哺乳動物細胞を含む何らかの細胞中で構成的に又は誘導性にインビトロ又はインビボで本発明の核酸配列を発現する目的のための何らかの組み換え発現系を広く指す。この用語は直鎖状又は環状発現系を含む。この用語は、エピソーム性のままであるか又は宿主細胞ゲノムに組み込まれる発現系を含む。発現系は、自己複製能を有し得るか又は有しない、つまり、細胞で一過性発現のみを駆動する。この用語は、組み換え核酸の転写に必要な最小エレメントのみを含有する組み換え発現カセットを含む。

30

【0206】

〔0234〕 「ファミリー」は、本明細書中で使用される場合、本発明のポリペプチド及び核酸分子が、共通の構造ドメイン又はモチーフを有し、本明細書中で定義されるような十分なアミノ酸又はヌクレオチド配列相同性を有する2以上のポリペプチド又は核酸分子を意味することを広く指す。ファミリーメンバーは天然又は非天然であり得、同じ又は異なる種の何れか由来であり得る。例えば、ファミリーは、ヒト起源の第一のポリペプチドならびに他の、異なる、ヒト起源のポリペプチドを含有し得るか、又はあるいは、非ヒト起源の相同体（例えばサルポリペプチド）を含有し得る。ファミリーのメンバーは共通の機能特性も有し得る

40

【0207】

〔0235〕 「Fc受容体」(FcR)は、本明細書中で使用される場合、免疫グロブリン分子(Ig)のFc部分に対する細胞表面受容体を広く指す。Fc受容体は、免疫反応に関与する多くの細胞で見られる。今までのところ同定されているヒトFcRの中でも、IgGを認識するもの(FcγRと呼ばれる。)、IgEを認識するもの(FcεR1)、IgAを認識するもの(FcαR)及び重合化IgM/Aを認識するもの(FcμαR)がある。FcRは、次の細胞タイプで見られる：FcεR1(肥満細胞)、FcεRI

50

I (多くの白血球)、Fc α R (好中球) 及びFc μ α R (腺上皮、肝細胞)。Hogg (1988) Immunol. Today 9:185-86。広く研究されているFc γ Rは、細胞免疫防御の中心であり、自己免疫疾患の病変形成に関与する炎症及び加水分解酵素のメディエーター放出を刺激することに関わる。Unkles (1988) Annu. Rev. Immunol. 6:251-87。マクロファージ/単球、多形核白血球及びナチュラルキラー (NK) 細胞Fc γ Rが、IgGが介在する特異的な認識のエレメントを付与するので、Fc γ RIIは、エフェクター細胞とIgを分泌するリンパ球との間の決定的なつながりをもたらす。ヒト白血球は、IgGに対する少なくとも3種類の異なる受容体を有する: hFc γ RI (単球/マクロファージで見られる。)、hFc γ RII (単球、好中球、好酸球、血小板、おそらくB細胞及びK562細胞株上) 及びhFc γ RIII (NK細胞、好中球、好酸球及びマクロファージ上)。

10

【0208】

[0236] T細胞に関して、T細胞への同時刺激シグナルの伝達は、シクロスポリンAにより阻害されないシグナル伝達経路を伴う。さらに、同時刺激シグナルは、T細胞においてサイトカイン分泌 (例えばIL-2及び/又はIL-10) を誘導し得、及び/又はT細胞での抗原の無反応性の誘導、アネルギー誘導又は細胞死誘導を妨害し得る。

【0209】

[0237] 「フレームワーク領域」又は「FR」は、本明細書中で使用される場合、抗体の軽及び重鎖の可変領域内のフレームワーク領域の1以上を広く指す。Kabata (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, MDを参照。これらの発現は、抗体の軽及び重鎖の可変領域内でCDR間に挿入されるアミノ酸配列領域を含む。

20

【0210】

[0238] 「異種」は、本明細書中で使用される場合、核酸が天然では互いに同じ関係では見られない2以上のサブ配列を具備することを示す核酸の一部を広く指す。例えば、この核酸は、一般的には組み換え産生され、新しい機能的核酸機能を生み出すように編成される無関係の遺伝子からの2以上の配列を有する (例えばある1つの起源からのプロモーター及び別の起源からのコード領域)。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が天然では互いに同じ関係では見られない2以上のサブ配列を具備することを示す (例えば融合タンパク質)。

30

【0211】

[0239] 「高親和性」は、本明細書中で使用される場合、標的抗原に対して、少なくとも 10^{-8} M、より好ましくは少なくとも 10^{-9} M及びさらにより好ましくは少なくとも 10^{-10} MであるKDを有する抗体を広く指す。しかし、「高親和性」結合は、他の抗体アイソタイプに対して変動し得る。例えばIgMアイソタイプに対する「高親和性」結合は、少なくとも 10^{-7} M、より好ましくは少なくとも 10^{-8} MのKDを有する抗体を指す。

【0212】

[0240] 「相同性」は、本明細書中で使用される場合、核酸配列と参照核酸配列との間又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、部分的又は完全なものであり得る。完全相同性は、核酸又はアミノ酸配列が同一であることを示す。部分的に相同の核酸又はアミノ酸配列は、参照核酸又はアミノ酸配列に対して同一ではないものである。相同性の程度は、配列比較によって決定され得る。「配列同一性」という用語は、「相同性」と交換可能に使用され得る。

40

【0213】

[0241] 「宿主細胞」は、本明細書中で使用される場合、本発明の組み換え発現ベクターなどの本発明の核酸分子が導入されている細胞を広く指す。宿主細胞は、原核細胞 (例えばE. コリ (E. coli)) 又は真核細胞、例えば酵母、昆虫 (例えばSF9)、両生類又は、CHO、HeLa、HEK-293などの哺乳動物細胞、例えば培養細胞、

50

外植片及びインビボの細胞であり得る。「宿主細胞」及び「組み換え宿主細胞」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫又は潜在的な子孫も指すことを理解されたい。突然変異又は環境の影響の何れかにより世代が続くとともにある種の修飾が起こり得るので、子孫は実際には親細胞と同一でない場合があるが、本明細書中で使用される場合、この用語の範囲内に依然として含まれる。

【0214】

〔0242〕 「ヒト化抗体」は、本明細書中で使用される場合、ヒト細胞により産生されるより密接に類似する抗体に改変されている可変及び定常領域を有する非ヒト細胞により産生される抗体を含むことを広く指す。例えば、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリンで見られる配列アミノ酸を組み込むために非ヒト抗体アミノ酸配列を改変することによって。本発明のヒト化抗体は、例えばCDRにおいてヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基を含み得る（例えばインビトロでのランダム又は部位特異的突然変異誘発によって又はインビボでの体細胞突然変異によって導入される突然変異）。「ヒト化抗体」という用語はまた、本明細書中で使用される場合、マウスなど、別の哺乳動物種の生殖細胞系列由来のCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植されている抗体も含む。

10

【0215】

〔0243〕 「ハイブリッド形成」は、本明細書中で使用される場合、鎖が互いに逆平衡に並べられる場合、相補的ヌクレオチド間での水素結合形成による相補的（部分的に相補的であるものを含む。）ポリヌクレオチド鎖の物理的相互作用を広く指す。

20

【0216】

〔0244〕 「IgVドメイン」及び「IgCドメイン」は、本明細書中で使用される場合、Igスーパーファミリーメンバードメインを広く指す。これらのドメインは、Igフォールドと呼ばれる別個の折り畳みパターンを有する構造単位に対応する。Igフォールドは、殆どであるが全てではないドメインで2個のシート間に保存的ジスルフィド結合がある、それぞれ5から10アミノ酸の逆平行β鎖からなる2個のβシートのサンドイッチから構成される。Ig、TCR及びMHC分子のIgCドメインは、同じタイプの配列パターンを共有し、Igスーパーファミリー内でC1セットと呼ばれる。他のIgCドメインは、他のセット内に入る。IgVドメインはまた配列パターンも共有し、Vセットドメインと呼ばれる。IgVドメインは、Cドメインより長く、β鎖のさらなる対を形成する。

30

【0217】

〔0245〕 「免疫細胞」は、本明細書中で使用される場合、造血系起源であり、免疫反応に関与する細胞を広く指す。免疫細胞としては、リンパ球、例えばB細胞及びT細胞；ナチュラルキラー細胞；及び骨髄細胞、例えば単球、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、好塩基球及び顆粒球が挙げられる。

【0218】

〔0246〕 「免疫アッセイ」は、本明細書中で使用される場合、抗原に特異的に結合する抗体を使用するアッセイを広く指す。免疫アッセイは、抗原を単離し、標的とし、及び／又は定量するための、特定の抗体の特異的な結合特性の使用を特徴とし得る。

40

【0219】

〔0247〕 「免疫反応」は、本明細書中で使用される場合、T細胞同時刺激の調整により影響を受けるT細胞介在性及び／又はB細胞介在性免疫反応を広く指す。代表的な免疫反応としては、B細胞反応（例えば抗体産生）T細胞反応（例えばサイトカイン産生及び細胞毒性）及びサイトカイン反応性細胞、例えばマクロファージの活性化が挙げられる。本明細書中で使用される場合、免疫反応に関して「下方調整」という用語は、何らかの1以上の免疫反応の低減を含み、一方で免疫反応に関して「上方調整」という用語は、何らかの1以上の免疫反応の上昇を含む。あるタイプの免疫反応の上方調整は、別のタイプの免疫反応における対応する下方調整につながり得ることを理解されたい。例えば、ある種

50

のサイトカイン（例えば I L - 1 0）産生の上方調整は、細胞性免疫反応の下方調整につながり得る。

【0220】

〔0248〕 「炎症状態又は炎症性疾患」は、本明細書中で使用される場合、慢性又は急性炎症性疾患を広く指す。

【0221】

〔0249〕 「阻害シグナル」は、本明細書中で使用される場合、免疫細胞上の阻害受容体分子を介して伝達されるシグナルを広く指す。シグナルは、受容体の活性化を介して（例えば T C R、C D 3、B C R 又は F c 分子を介して）シグナルに拮抗し、その結果、例えば、第二のメッセンジャー産生；増殖；又は免疫細胞におけるエフェクター機能の阻害、例えば食作用、抗体産生もしくは細胞毒性の低下又は免疫細胞のメディエーター（例えばサイトカイン（例えば I L - 2）及び／又はアレルギー性反応のメディエーター）産生失敗；又はアネルギーの発現が起こり得る。

【0222】

〔0250〕 「単離」は、本明細書中で使用される場合、それが天然に生じるその起源環境から物質を除去し、従ってその天然の環境から人為的に変化させられていることを広く指す。単離物質は、例えば、ベクター系に含まれる外来核酸、宿主細胞内に含有される外来核酸又はその元の環境から除去されており、従って人為的に変化させられている何らかの物質であり得る（例えば「単離抗体」）。例えば、「単離」又は「精製」は、本明細書中で使用される場合、細胞性物質又はその生物学的物質が由来する細胞又は組織起源からの他の夾雑タンパク質を実質的に含まない、又は化学合成された場合は化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない、タンパク質、D N A、抗体、R N A 又は生物学的に活性のあるその一部を広く指す。「実質的に細胞性物質を含まない」という句は、タンパク質が、それが単離されるか又は組み換え産生される細胞の細胞要素から分離されている、V I S T A（P D - L 3）タンパク質の調製を含む。

【0223】

〔0251〕 「K - a s s o c」又は「 K_a 」は、本明細書中で使用される場合、特定の抗体－抗原相互作用の会合速度を広く指し、「 K_{diss} 」又は「 K_d 」という用語は、本明細書中で使用される場合、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度を指す。「 K_D 」という用語は、本明細書中で使用される場合、解離定数を指すものとし、これは、 K_a に対する K_d の比（即ち K_d / K_a ）から得られ、モル濃度（M）として表される。抗体に対する K_D 値は、当技術分野でよく確立されている方法を用いて決定され得る。

【0224】

〔0252〕 「標識」又は「検出可能部分」は、本明細書中で使用される場合、分光的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的又は他の物理学的手段によって検出可能な組成物を広く指す。

【0225】

〔0253〕 本明細書中での「リンカー」は、一般に、場合によっては F c R 結合及び／又は補体結合及び／又は他のエフェクター機能を増減させるために修飾され得る、V I S T A ポリペプチド及び別の部分、一般的には I g タンパク質、最も一般的には I g F c 領域、例えばヒト又はマウス I g の I g F c 領域、好ましくはヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 のものに介入するペプチド配列を指す。代表的な実施形態において、本リンカーは、V I S T A が直接 I g ポリペプチドに連結されている V I S T A 融合物と比べて、V I S T A 融合物の免疫抑制活性を強化する。本リンカーは、少なくとも約 5 アミノ酸、より一般的には少なくとも 10 から 12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40 以上のアミノ酸のサイズの範囲であり得る。代表的な実施形態におけるリンカーは、グリシン及びセリン残基を具備し、このようなグリシン／セリン残基の数は、リンカーを構成する残基の少なくとも 30、40、50、60、70、80 又は 90 % を具備し得る。代表的なリンカー配列は上記で開示される。

【0226】

〔0254〕 「低ストリンジェンシー」、「中度ストリンジェンシー」、「高ストリンジェンシー」又は「非常に高いストリンジェンシー条件」は、本明細書中で使用される場合、核酸ハイブリッド形成及び洗浄に対する条件を広く指す。ハイブリッド形成反応を行うための指針は、Ausubel, et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology (5th Ed.) John Wiley & Sons, NYで見出すことができる。代表的な具体的ハイブリッド形成条件としては、(1) 約45℃で6X塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム(SSC)での低ストリンジェンシーハイブリッド形成条件、続いて少なくとも50℃での0.2XSSC、0.1%SDS中、2回の洗浄(低ストリンジェンシー条件の場合、洗浄温度を55℃に上昇させ得る。)；(2) 約45℃での6XSSC中で中度ストリンジェンシーハイブリッド形成条件、続いて0.2XSSC、0.1%SDS中、60℃で1回以上の洗浄；(3) 約45℃での6XSSC中の高ストリンジェンシーハイブリッド形成条件、続いて65℃で0.2XSSC、0.1%SDS中での1回以上の洗浄；及び(4) 非常に高いストリンジェンシーハイブリッド形成条件は、65℃で0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDS、続いて65℃で0.2XSSC、1%SDS中での1回以上の洗浄が挙げられるが限定されない。

10

【0227】

〔0255〕 「哺乳動物」は、本明細書中で使用される場合、皮膚が毛で覆われ、雌では幼若仔に栄養を与えるための乳汁産生乳腺があることを特徴とする、ヒトを含む、哺乳類の何らか及び全ての温血脊椎動物を広く指す。哺乳動物の例としては、アルパカ、アルマジロ、カピバラ、ネコ、ラクダ、チンパンジー、チンチラ、ウシ、イヌ、ヤギ、ゴリラ、ハムスター、ウマ、ヒト、キツネザル、ラマ、マウス、非ヒト霊長類、ブタ、ラット、ヒツジ、トガリネズミ、リス、バク及びハタネズミが挙げられるが限定されない。哺乳動物としては、ウシ、イヌ、ウマ、ネコ、マウス、ヒツジ、ブタ、霊長類及びげっ歯類種が挙げられるが限定されない。哺乳動物としてはまた、Washington DCのNational Museum of Natural History, Smithsonian Institutionにより維持されているMammal Species of the Worldで列挙されるあらゆる全てのものが挙げられる。

20

【0228】

〔0256〕 「天然の核酸分子」は、本明細書中で使用される場合、天然で生じる(例えば天然タンパク質をコードする)ヌクレオチド配列を有するRNA又はDNA分子を広く指す。

30

【0229】

〔0257〕 「核酸」又は「核酸配列」は、本明細書中で使用される場合、1本又は2本鎖型の何れかのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドオリゴヌクレオチドを広く指す。この用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含有する、核酸、即ちオリゴヌクレオチドを包含する。この用語はまた、合成バックボーンがある核酸様構造も包含する。別段の断りがない限り、特定の核酸配列はまた、暗黙的に、保存的に修飾されたその変異体(例えば縮重コドン置換)及び相補的配列、ならびに明確に指示される配列も包含する。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交換可能に使用される。

40

【0230】

〔0258〕 「オリゴマー化ドメイン」は、本明細書中で使用される場合、VISTA細胞外ドメイン又はその断片と連結される場合、オリゴマー化を促進するドメインを広く指す。このオリゴマー化ドメインは、さらなるジスルフィド結合によりさらに安定化され得る、自己会合性 α -ヘリックス、例えばロイシンジッパーを具備する。本ドメインは、機能的結合タンパク質へのポリペプチドのインビボでの折り畳みを促進すると考えられている過程である、膜を横切る一定方向の折り畳みと適合するように設計される。その例は当技術分野で公知であり、例としてコイルドGCN4及びCOMPが挙げられる。

【0231】

50

[0259] α -ヘリックスコイルドコイルは、おそらくタンパク質で見られる最も幅広く存在するサブユニットオリゴマー化モチーフである。従って、コイルドコイルは、様々な異なる機能を果たす。いくつかの転写活性化因子ファミリーにおいて、例えば、短いロイシンジッパーは、DNA上のDNA-結合領域の位置決定において重要な役割を果たす。Ellenberger, et al. (1992) Cell 71:1223-1237。コイルドコイルはまた、中間径フィラメントタンパク質のオリゴマーを形成させるために使用される。コイルドコイルタンパク質は、さらに小胞及びウイルス性膜融合の両方で重要な役割を果たすと思われる。Skehel及びWiley (1998) Cell 95:871-874。両ケースにおいて、融合させようとする膜に埋没している疎水性配列は、長い α -ヘリックスの束から構成される棒状の複合体の同じ端部に局在する。この分子配置は、複合体は膜融合のために組み立てられるので、密接した膜並置を生じさせると思われる。コイルドコイルは、オリゴマー化を調節するために使用されることが多い。転写因子を含む多くのタイプのタンパク質において、中でもGCN4、ウイルス性融合ペプチド、SNARE複合体及びある種のtRNAシンテターゼが挙げられるが、限定されないことが分かっている。非常に長いコイルドコイルは、トロポミオシン、中間径フィラメント及び紡錘極体構成要素などのタンパク質中で見出される。コイルドコイルは、平行又は逆平行方向で会合する非常に組織化された方式で互いの周囲で超らせんが形成される多くの α -ヘリックスを伴うが、二量体及び三量体が最も一般的である。ヘリックスは、同じ又は異なるタンパク質由来であり得る。コイルドコイルは、要素となるヘリックスがまとまってそれらの疎水性の溝を埋め込むことにより形成される。疎水性の溝は各ヘリックスの周囲でねじれるので、ヘリックスも互いの周囲でねじれてらせん状になり、疎水性の溝を埋め込み、超らせんを形成する。これは、コイルドコイルとして構造を定める、ノブ-ホール・パッキングとして知られる隣接ヘリックス間の側鎖の特徴的な嵌合である。ヘリックスは、このタイプの相互作用が起こるために同じ方向に向かう必要はないが、平行立体構造がより一般的である。逆平行立体構造は、三量体では非常に稀であり、五量体では未知であるが、分子内二量体ではより一般的であり、この2つのヘリックスは短いループにより連結されることが多い。細胞外空隙において、ヘテロ三量体コイルドコイルタンパク質ラミニンは、基底膜の形成に重要な役割を果たす。他の例は、3（トロンボスポンジン1及び2）又は5（トロンボスポンジン3、4及びCOMP）本の鎖が連結されている、トロンボスポンジン及び軟骨オリゴマートリクスタンパク質（COMP）である。これらの分子は花束型の外観を有し、それらのオリゴマー構造の理由は、おそらく、細胞受容体とのC末端ドメインの多価相互作用である。酵母転写活性化因子GCN4は、塩基性領域ロイシンジッパー（bZIP）DNA-結合モチーフを含有する30を超える同定真核タンパク質の1つである。Ellenberger, et al. (1992) Cell 71:1223-1237。bZIP二量体は、そのカルボキシ末端34残基にわたり平行コイルドコイルを形成し、それらのアミノ末端に向かって徐々に分岐してDNA結合部位の大きな溝を通過する、連続 α -ヘリックスの対である。コイルドコイル二量体化界面は、DNA軸に対して殆ど垂直に向けられ、複合体がT字の外観になる。bZIPは、平行 α -ヘリックスコイルドコイルにおいて一緒に密に詰められる、疎水性及び非極性残基の4から3回の7アミノ酸反復を含有する。Ellenberger, et al. (1992) Cell 71:1223-1237。二量体の安定性は、GCN4ロイシンジッパーペプチドの結晶構造において示される、7アミノ酸反復の位置aおよびdでのロイシン及び非極性残基の互いのパッキング、ならびに限られた数のヘリックス内及びヘリックス間の塩架橋によるものである。Ellenberger, et al. (1992) Cell 71:1223-1237。別の例は、Mr52,000のサブユニットのホモ三量体としてウシ気管軟骨から単離されるCMP（マトリリン-1）であり（Paulsson及びHeinegard (1981) Biochem J. 197:367-375）、ここでは、各サブユニットがvWFA1モジュール、単一のEGFドメイン、vWFA2モジュール及び5回の7アミノ酸反復に広がるコイルドコイルドメインからなる。Kiss, et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:8

10

20

30

40

50

126-8134; Hauser及びPaulsson (1994) J. Biol. Chem. 269:25747-25753。精製CMPの電子顕微鏡から、各サブユニットがコイルドコイルに対応する共通点から出現する楕円体を形成する、花束型三量体構造が示された。Hauser及びPaulsson (1994) J. Biol. Chem. 269:25747-25753。マトリリン-1におけるコイルドコイルドメインはよく研究されている。この三量体構造は、非変性条件下での鎖間ジスルフィド結合の完全還元後に保持される。Hauser及びPaulsson (1994) J. Biol. Chem. 269:25747-25753。また別の例は、軟骨オリゴマーマトリクスタンパク質 (COMP) である。非膠原線維性糖タンパク質、COMPは、軟骨において最初に同定された。Hedbom, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:6132-6136。このタンパク質は、N末端7アミノ酸反復領域 (cc) とそれに続く4個の上皮成長因子 (EGF) 様ドメイン (EF)、7個のカルシウム結合ドメイン (T3) 及びC末端球状ドメイン (TC) からなる5個のサブユニットの524kDaのホモ五量体である。このドメイン組織化に従い、COMPはトロポスポンジンのファミリーに属する。位置aおよびdで優先的に疎水性である残基を伴う7アミノ酸繰り返し (abcdefg)_nはヘリックスコイルドコイルドメインを形成する。Cohen及びParry (1994) Science 263:488-489。最近、COMPの組み換え5本鎖コイルドコイルドメイン (COMPcc) が結晶化され、0.2nm解像度でその構造が解析された。Malashkevich, et al. (1996) Science 274:761-765。

10

20

【0232】

[0260] 「作動可能に連結される (operatively linked)」は、本明細書中で使用される場合、2個のDNA断片が、その2個のDNA断片によりコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように連結される場合を広く指す。

【0233】

[0261] 「パラトープ」は、本明細書中で使用される場合、抗原を認識する抗体の一部 (例えば抗体の抗原結合部位) を広く指す。パラトープは、抗体のFv領域の小さな領域 (例えば15から22アミノ酸) であり得、抗体の重及び軽鎖の一部を含有し得る。Goldsby, et al. Antigen (Chapter 3) Immunology (5th Ed.) New York: W. H. Freeman及びCompany, 57-75頁を参照。

30

【0234】

[0262] 「患者」又は「対象」は、本明細書中で使用される場合、疾患状態を改善するか又は疾患状態の発症もしくは再発を予防するための何れかの処置を必要とする何らかの動物を広く指す。また、「患者」は、本明細書中で使用される場合、リスク因子、病歴、易罹患性、症状、兆候がある、以前疾患の診断を受けた、疾患のリスクがある、又は疾患の患者集団の一員である、何らかの動物を広く指す。患者は、ヒトなどの臨床患者又は、愛玩動物、ペット、家畜、外来動物又は動物園の動物などの患畜であり得る。「対象」という用語は、「患者」という用語と交換可能に使用され得る。

【0235】

[0263] 「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、交換可能に使用され、アミノ酸残基のポリマーを広く指す。この用語は、1以上のアミノ酸残基が対応する天然のアミノ酸の類似体又は模倣体であるアミノ酸ポリマーならびに天然のアミノ酸ポリマーに適用される。この用語は、1以上のアミノ酸残基が、対応する天然のアミノ酸の人工の化学模倣体であるアミノ酸ポリマーならびに天然のアミノ酸ポリマー及び非天然のアミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドは、例えば、糖タンパク質を形成させるための炭水化物残基の付加によって修飾され得る。「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、糖タンパク質ならびに非糖タンパク質を含む。

40

【0236】

[0264] 「プロモーター」は、本明細書中で使用される場合、核酸の転写を支配する

50

一連の核酸配列を広く指す。本明細書中で使用される場合、プロモーターは、ポリメラーゼ I I 型プロモーターの場合は T A T A エLEMENT の場合など、転写開始部位の付近に必要な核酸配列を含む。プロモーターはまた、場合によっては、遠位エンハンサー又はリプレッサーELEMENT も含み、これらは、転写開始部位から数千塩基対程度のところに位置し得る。「構成的」プロモーターは、殆どの環境及び発生条件下で活性があるプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、環境又は発生制御下で活性があるプロモーターである。

【0237】

〔0265〕 「予防的有効量」は、本明細書中で使用される場合、疾患の予防又は疾患再発の予防のために患者に投与された場合に、疾患又は再発に対してこのような予防効果を発揮するのに十分な化合物の量を広く指す。予防的有効量は、兆候及び／又は症状の発生を予防するのに有効な量であり得る。「予防的有効量」は、処置しようとする患者の、疾患及びその重症度及び年齢、体重、病歴、状態になりやすい傾向、既に存在する状態に依存して変動し得る。

10

【0238】

〔0266〕 「予防」は、本明細書中で使用される場合、兆候及び／又は症状が患者において存在しないか、寛解期であるか又は患者において依然存在した場合の、一連の治療を広く指す。予防は、患者において疾患の処置の後に起こる疾患の予防を含む。さらに、予防は、疾患を発症する可能性があり得る患者、特にその疾患に罹患し易い患者（例えば親集団のメンバー、リスク因子があるか又は疾患発症のリスクがある者）を処置することを含む。

20

【0239】

〔0267〕 「組み換え」は、本明細書中で使用される場合、生成物に対して、例えば細胞又は核酸、タンパク質又はベクターを広く指し、異種核酸もしくはタンパク質又はネイティブ核酸もしくはタンパク質の改変の導入によって細胞、核酸、タンパク質又はベクターが修飾されていること又は細胞がそのように修飾された細胞由来であることを示す。従って、例えば、組み換え細胞は、細胞のネイティブ（非組み換え）型内では見られない遺伝子を発現するか又は、その他の点では異常に発現されるか、発現が低いか又は全く発現されないネイティブ遺伝子を発現する。

【0240】

30

〔0268〕 「シグナル配列」又は「シグナルペプチド」は、本明細書中で使用される場合、分泌性及び膜結合ポリペプチドの N 末端で起こり、多数の疎水性アミノ酸残基を含有する、約 15 以上のアミノ酸を含有するペプチドを広く指す。例えば、シグナル配列は、少なくとも約 10 から 30 アミノ酸残基、好ましくは約 15 から 25 アミノ酸残基、より好ましくは約 18 から 20 アミノ酸残基及びさらにより好ましくは約 19 アミノ酸残基を含有し、少なくとも約 35 から 65 %、好ましくは約 38 から 50 % 及びより好ましくは約 40 から 45 % 疎水性アミノ酸残基（例えばバリン、ロイシン、イソロイシン又はフェニルアラニン）を有する。「シグナル配列」はまた、当技術分野で「シグナルペプチド」とも呼ばれ、脂質二重層へとこのような配列を含有するポリペプチドを向けるように作用し、分泌性及び膜結合ポリペプチドにおいて切断される。

40

【0241】

〔0269〕 抗体に「特異的に（又は選択的に）結合する」又は「との特異的（又は選択的）免疫反応性」又は「特異的に相互作用又は結合する」は、本明細書中で使用される場合、タンパク質又はペプチド（又は他のエпитープ）を広く指し、いくつかの実施形態においては、タンパク質及び他の生体物質の不均一集団中のタンパク質の存在の決定要因である結合反応を指す。例えば、指定の免疫アッセイ条件下で、指定の抗体は、バックグラウンド（非特異的シグナル）よりも少なくとも 2 倍多く特定のタンパク質に結合し、試料中に存在する他のタンパク質とは顕著な量では実質的に結合しない。一般的には、特異的又は選択的反応は、バックグラウンドシグナル又はノイズの少なくとも 2 倍、及びより一般的にはバックグラウンドの約 10 から 100 倍超である。

50

【0242】

〔0270〕 「特異的にハイブリッド形成可能な」及び「相補的」は、本明細書中で使用される場合、核酸が、古典的なワトソン・クリック又は他の非古典的なタイプの何れかによって別の核酸配列と水素結合を形成し得ることを広く指す。ある核酸分子の相補的配列とその核酸分子に対する結合自由エネルギーは、核酸の関連機能、例えばRNA i活性を開始するのに十分である。核酸分子に対する結合自由エネルギーの決定は当技術分野で周知である。例えばTurner, et al. (1987) CSH Symp. Quant. Biol. LI: 123-33; Frier, et al. (1986) PNAS 83: 9373-77; Turner, et al. (1987) J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-85を参照。％相補性は、第二の核酸配列と水素結合（例えばワトソン・クリック塩基対形成）を形成し得る核酸分子中の連続残基の％（例えば、10のうち約少なくとも5、6、7、8、9、10とは、約少なくとも50％、60％、70％、80％、90％及び100％相補的である。全てを含む。）を示す。「完全に相補性」又は100％相補性は、核酸配列の連続残基全てが第二の核酸配列中の同じ数の連続残基と水素結合することを広く指す。「実質的な相補性」は、ポリヌクレオチド鎖が、非相補的となるように選択される突出部などのポリヌクレオチド鎖の領域を除き、少なくとも約90％相補性を示すことを指す。特異的な結合は、特異的な結合が所望される条件下で、即ち、インビボアッセイ又は治療的処置の場合は生理的条件下で、又はインビトロアッセイの場合はアッセイが行われる条件下で、非標的配列に対するオリゴマー性化合物の非特異的な結合を回避するために、十分な程度の相補性を必要とする。非標的配列は、一般的には少なくとも5ヌクレオチド異なり得る。

10

20

【0243】

〔0271〕 疾患の「兆候」は、本明細書中で使用される場合、疾患の主観的指標である症状とは逆の、疾患の客観的指標である、患者の検査で発見可能な疾患を示す何らかの異常を広く指す。

【0244】

〔0272〕 「固体支持体」、「支持体」及び「基板」は、本明細書中で使用される場合、平滑な支持体（例えば金属、ガラス、プラスチック、シリコン及びセラミック面）ならびに凹凸がある、及び多孔質の材料を含むが限定されない、別の材料が連結され得る固体又は半固体構造を提供する何らかの材料を広く指す。

30

【0245】

〔0273〕 「対象」は、本明細書中で使用される場合、鳥類及び哺乳動物対象を含むが限定されない、本発明により処置するのに適切な何れかの者を広く指し、好ましくは哺乳動物である。本発明により処置することを必要とするあらゆる哺乳動物対象が適切である。男女両方及びあらゆる発生段階（即ち新生児、幼児、若年、青年、成人）のヒト対象を本発明により処置し得る。本発明はまた、動物対象、特に獣医学的目的に対する、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ及びウマなどの哺乳動物対象においても、薬物スクリーニング及び薬物開発目的のためにも行い得る。「対象」は、「患者」と交換可能に使用される。

【0246】

40

〔0274〕 「実質的に化学的前駆体又は他の化学物質不含」は、本明細書中で使用される場合、VISTAタンパク質合成に参与する化学的前駆体又は他の化学物質からVISTAタンパク質が分離されている、VISTAタンパク質の調製を広く指す。ある実施形態において、「実質的に化学的前駆体又は他の化学物質不含」という語は、約30％（乾燥重量）未満の化学的前駆体又は非VISTA化学物質、より好ましくは約20％未満の化学的前駆体又は非VISTA化学物質、さらにより好ましくは約10％未満の化学的前駆体又は非VISTA化学物質及び最も好ましくは約5％未満の化学的前駆体又は非VISTA（PD-L3）化学物質を有するVISTAタンパク質の調製を含む。

【0247】

〔0275〕 疾患の「症状」は、本明細書中で使用される場合、何らかの病的兆候又は、

50

患者が経験し、疾患を示す、構造、機能もしくは感覚の正常な状態からの逸脱を広く指す。

【0248】

〔0276〕 「T細胞」は、本明細書中で使用される場合、CD4+T細胞及びCD8+T細胞を広く指す。T細胞という用語はまた、Tヘルパー1型T細胞及びTヘルパー2型T細胞の両方も含む。

【0249】

〔0277〕 「治療」、「治療的」、「を処置する」又は「処置」は、本明細書中で使用される場合、疾患を処置すること、疾患もしくはその臨床症状の発現を阻止又は低下させること、及び／又は疾患を軽減すること、疾患又はその臨床症状の軽減を引き起こすことを広く指す。治療は、疾患、兆候及び／又は疾患の症状の、予防、処置、療法、軽減、改善及び／又はその緩和を包含する。治療は、疾患兆候及び／又は症状（例えば炎症、疼痛）が継続している患者における兆候及び／又は症状の改善を包含する。治療はまた、「予防」も包含する。「軽減させる」という用語は、治療の目的に対して、兆候及び／又は症状の臨床的に意義のある軽減を広く指す。治療は、再燃又は再発性の兆候及び／又は症状（例えば炎症、疼痛）を処置することを含む。治療は、いつも兆候及び／又は症状の出現が起こらないようにすることならびに既存の兆候及び／又は症状を軽減すること及び既存の兆候及び／又は症状を排除することを包含するが限定されない。治療は、慢性疾患（「維持」）及び急性疾患を処置することを含む。例えば、処置は、兆候及び／又は症状（例えば炎症、疼痛）の再燃又は再発を処置又は予防することを含む。

【0250】

〔0278〕 「膜貫通ドメイン」は、本明細書中で使用される場合、形質膜を貫通する約15アミノ酸残基長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20、25、30、35、40又は45アミノ酸残基を含み、形質膜を貫通する。膜貫通ドメインは疎水性残基に富み、一般的に α -ヘリックス構造を有する。実施形態において、膜貫通ドメインの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%以上のアミノ酸が疎水性、例えばロイシン、イソロイシン、チロシン又はトリプトファンである。膜貫通ドメインは、例えば、Zagotta, et al. (1996) *Ann. Rev. Neurosci.* 19:235-263に記載されている。

【0251】

〔0279〕 「トランスジェニック動物」は、本明細書中で使用される場合、動物の細胞の1以上が「導入遺伝子」を含む、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスを広く指す。「導入遺伝子」という用語は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれ、成熟動物のゲノム中に残る、外来性DNAを指し、例えばトランスジェニック動物の1以上の細胞型又は組織におけるコードされる遺伝子産物の発現を支配する。

【0252】

〔0280〕 「腫瘍」は、本明細書中で使用される場合、一般に成長が多かれ少なかれ特異的な細胞及び組織機能の顕著な喪失を付随する、内在組織の、多かれ少なかれ脱抑制される、組織新生物の形態の、特に自然発生的な、自律的な及び可逆的な過剰成長の形態の、少なくとも1つの細胞又は細胞塊を広く指す。この細胞又は細胞塊は、例えばメラノーマ又は癌腫など、その増殖についてそれ自身により又は宿主生物の制御機構により効果的に阻害されない。腫瘍抗原は、悪性腫瘍細胞それ自身中又はその上に存在する抗原を含むだけでなく、内皮細胞及び他の血管構成要素を含む腫瘍の間質支持組織上に存在する抗原も含む。

【0253】

〔0281〕 「無反応」は、本明細書中で使用される場合、刺激、例えば活性化受容体又はサイトカインを介した刺激に対する免疫細胞のレフラクティビティーを広く指す。例えば免疫抑制剤又は高用量の抗原への曝露によって無反応となり得る。

【0254】

〔0282〕 「可変領域」又は「V R」は、本明細書中で使用される場合、抗体を抗原に結合させることに直接関与する抗体中の軽及び重鎖の各対内のドメインを広く指す。各重鎖は、片側端で、可変ドメイン（V_H）とそれに続く多くの定常ドメインを有する。各軽鎖は、片側端の可変ドメイン（V_L）及び、他方の端の定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の最初の定常ドメインと並び、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並ぶ。

【0255】

〔0283〕 「ベクター」は、本明細書中で使用される場合、それが連結されている別の核酸分子を輸送可能な核酸分子を広く指す。ベクターのある1つのタイプは、さらなるDNAセグメントが連結され得る環状2本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。ベクターの別のタイプはウイルス性ベクターであり、さらなるDNAセグメントがウイルス性ゲノムに連結され得る。ある種のベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自律的複製可能である（例えば細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソード性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば非エピソード性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに統合され、それによって宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を支配可能である。ベクターは、本明細書中で、「組み換え発現ベクター」又は単純に「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組み換えDNA技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。本明細書中で、プラスミドは最も一般的に使用される形態のベクターであるので、「プラスミド」及び「ベクター」は交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、同等の機能を果たす、このような他の形態の発現ベクター、例えばウイルス性ベクター（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）を含むものとする。技術及び手順は、全般的に、当技術分野で周知の、本願を通じて引用し、論じる様々な一般的及びより特定の参考文献に記載されるとおりの、従来の方法に従い行われる。例えば Sambrook, et al. (2001) Molec. Cloning: Lab. Manual [3rd Ed] Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照。組み換えDNA、オリゴヌクレオチド合成及び組織培養及び形質転換（例えばエレクトロポレーション、リポフェクション）に対して標準的な技術が使用され得る。酵素性反応及び精製技術は、製造者の仕様書に従い、又は当技術分野で一般に遂行されるように、又は本明細書中で記載のように行われ得る。

【0256】

〔0284〕 本明細書中に記載の分析化学、合成有機化学及び医薬及び製薬化学の実験手順及び技術と関連して使用される命名法は、当技術分野で周知のものであり、一般的に使用されるものである。化学合成、化学分析、医薬調製、処方及び送達及び患者の処置に対しては、標準的な技術を使用し得る。

【0257】

VISTA又はPD-L3

〔0285〕 本願は、造血細胞で選択的に発現される、T細胞活性化のV領域免疫グロブリン含有抑制因子（VISTA）又はPD-L3と呼ばれる、新規の構造的に異なるIgスーパーファミリー阻害性リガンドに関する。細胞外ドメインは、B7ファミリーリガンドPD-L1に対して相同性を有し、PD-L1のように、VISTAは免疫性に強い影響を有する。しかし、PD-L1とは異なり、VISTAは、造血区画内で選択的に発現される。発現は骨髄抗原提示細胞（APC）で最も強いが、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞での発現及びFoxp3⁺制御T細胞（Treg）のサブセットでのさらに強い発現も非常に興味深い。APCにおける可溶性VISTA-Ig融合タンパク質又はVISTA発現は、インビトロでT細胞増殖、サイトカイン産生を強力に阻害し、T細胞においてFoxp3発現を誘導する。逆に、新規に開発された抗VISTAモノクローナル抗体は、インビトロでVISTA+APCによるT細胞反応のVISTA-誘発性免疫抑制を妨害した。さらに、インビボで抗VISTAは、T細胞介在性自己免疫疾患実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）の発現を増強し、防御的な腫瘍特異的免疫反応の発現を促進し、続

いて腫瘍の寛解が起こった。VISTA—マウスの最初の研究は、自然発生的な炎症性疾患の初期兆候を明らかにし、例えばTNF α 、IFN γ 、IL-17F、エオタキシン、IP-10、MCP-1及びMIG及びCD4+及びCD8+T細胞のレベル上昇を特徴とする炎症性表現型を示し、これらは、EAEなどの自己免疫性に対する易罹患性の傾向向上、IgG自己抗体の発現上昇、骨髓造血増加を示す。また、VISTAノックアウトは、肺、肝臓及び脾臓でのリンパ球浸潤、肺及び脾臓での濾胞過形成、胃での好中球浸潤の増加を示し、腎臓、副腎、食道、小腸及び結腸では明確な変化は全く示されない。

【0258】

〔0286〕 全ての他のPD—リガンド関連分子（例えばB7—H3、H4、H6）とは異なり、VISTAは、その強い抑制性の活性及び特有の構造特性と一緒に、造血細胞選択的に発現され、これは、VISTAが新規の機能的に重複しない中心となる免疫性の負の制御因子であり、その発現が、主にT細胞及び骨髓に限定されるものであることを説明する。WO2011/120013を参照。

【0259】

〔0287〕 最もよく特徴が分かっている同時刺激リガンドはB7.1及びB7.2であり、これらは、B7ファミリーリガンド及び受容体などの多くの非常に重要な免疫制御因子からなるIgスーパーファミリーに属する。Igスーパーファミリーメンバーは、専門的な抗原提示細胞（APC）で発現され、それらの受容体はCD28及びCTLA-4である。CD28は、ナイーブ及び活性化T細胞により発現され、最適T細胞活性化に非常に重要である。一方、CTLA-4は、T細胞活性化後に誘導され、B7.1/B7.2への結合によってT細胞活性化を阻害し、CD28介在性同時刺激が損なわれる。B7.1及びB7.2ノックアウト（KO）マウスは適応免疫反応が損なわれており、一方でCTLA-4 KOマウスは炎症を的確に調節できず、全身性自己免疫疾患を発現する。時間とともに、B7ファミリーリガンドは、B7—H2（ICOSリガンド）及びB7—H3などの同時刺激リガンド及びB7—H1（PD—L1）、B7—DC（PD—L2）、B7—H4（B7S1又はB7x）及びB7—H6などの同時阻害性リガンドを含むように拡大してきた。従って、さらなるCD28ファミリー受容体が同定されている。ICOSは、活性化T細胞上で発現され、B7—H2に結合する。ICOSは、T細胞活性化、分化及び機能に重要な正の同時制御因子である。一方で、プログラム死1（PD—1）は、T細胞反応を負に制御する。PD—1 KOマウスは、狼瘡様自己免疫疾患又はT拡張型心筋症を発現した。VISTAとは逆に、この2つの阻害性B7ファミリーリガンド、PD—L1及びPD—L2は、異なる発現パターンを有する。PD—L2は、DC及びマクロファージで誘導性に発現され、一方、PD—L1は造血細胞及び非造血細胞型の両方で広く発現される。PD—1受容体の免疫抑制的な役割と一致して、PD—L1—/—及びPD—L2—/—マウスを使用した研究から、T細胞増殖及びサイトカイン産生の阻害において両リガンドが重複する役割を有することが示された。PD—L1欠乏症は、自己免疫糖尿病の非肥満糖尿病性（NOD）モデル及び多発性硬化症（実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）のマウスモデルの両方において疾患進行を促進する。PD—L1—/—T細胞は、両疾患モデルにおいて、プロ炎症性サイトカインレベルが上昇する。さらに、NODマウスでの研究から、PD—L1の組織発現（即ち脾臓内）が炎症を領域的に調節するその能力に意図的に関与することが明らかになった。PD—L1はまた胎盤合体栄養細胞でも高く発現され、これは同種胎仔に対する母子免疫反応を強く調節する。

【0260】

〔0288〕 抗CTLA-4抗体は、メラノーマのマウスモデル及び臨床治験において高い治療的有用性を示す。B16—GM—CSF（Gvax）でワクチン接種されたマウスは、CTLA-4の抗体遮断と組み合わせた場合、B16メラノーマの拒絶を促進する。PD—1ならびにPD—L1に対する抗体もまた、多岐にわたるマウス腫瘍モデルにおいて抗腫瘍免疫性及び宿主生存性向上を明らかにする。最後に、CTLA-4及びPD—1は、同じ同時阻害分子ファミリーに属するものの、T細胞活性化を阻害するためにそれらが異なる重複しない機構を使用することを示唆する証拠があり、併用した場合、マウスメ

10

20

30

40

50

ラノーマで、宿主生存性促進能において抗CTLA-4及び抗PD-1/L1の相乗効果がある。

【0261】

[0289] 免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーは、B7ファミリーリガンド及び受容体を含む多くの非常に重要な免疫制御因子からなる。VISTAは、新規の構造的に異なるIgスーパーファミリー阻害性リガンドであり、その細胞外ドメインは、B7ファミリーリガンドPD-L1に対して相同性を有する。この分子は、T細胞活性化のVドメインIg抑制因子(VISTA)と呼ばれる。VISTAは主に造血細胞で発現され、VISTA発現は、骨髄抗原提示細胞(APC)及びT細胞で高度に制御される。APCでの可溶性VISTA-Ig融合タンパク質又はVISTA発現は、インビトロでT細胞増殖及びサイトカイン産生を阻害する。VISTA特異的なモノクローナル抗体は、インビトロでVISTA発現APCによってT細胞反応のVISTA誘導性抑制を妨害する。さらに、抗VISTA処置は、マウスでのT細胞介在性自己免疫疾患の実験的自己免疫脳脊髄炎の発現を悪化させる。最後に、腫瘍細胞でのVISTA過剰発現は、マウスにおいてインビボで防御的な抗腫瘍免疫性を妨害する。これらの知見から、新規免疫制御分子であるVISTAが、他のIgスーパーファミリーメンバーと重複しない機能活性を有し、癌における自己免疫性及び免疫監視の発現に関与し得ることが示される。Wang, et al. (2011) The Journal of Experimental Medicine 208(3): 577-92を参照。

【0262】

[0290] ヒトVISTA(PD-L3)又はVISTAは、T細胞転写プロファイリングスクリーニングにおいて上方制御される分子として同定された。マウスCD4⁺T細胞cDNAライブラリから回収された同一である930bp遺伝子産物の発明者らの特徴評価から、そのサイズ及び配列が確認された。シリコーン配列及び構造分析から、成熟時に309アミノ酸のI型膜貫通タンパク質が予想される。その細胞外ドメインは、23アミノ酸ストーク領域と連結される136アミノ酸の1個の細胞外Ig-Vドメイン、21残基膜貫通セグメント及び97アミノ酸細胞質ドメインを含有する。VISTAの細胞質テールは、シグナル伝達ドメインを含有しない。VISTA-Ig-VドメインとのBLAST配列検索から、境界域の有意性e値スコアで進化的に最も近縁の関連タンパク質としてB7ファミリーのPD-L1が同定された。B7ファミリーメンバー、PD-L1、PD-L2、B7-H3及びB7-H4とのVISTAの構造に基づく配列アラインメントから、全てのIg-Vドメインタンパク質において系統的に保存的であるいくつかのアミノ酸が強調される。

【0263】

[0291] VISTAの発現は、造血区画で選択的に発現されると思われ、このタンパク質は、成熟骨髄細胞(CD11b^{bright})上では高度に発現され、CD4⁺T細胞、T^{reg}及びCD8⁺T細胞上では発現レベルが低い。APCでの可溶性VISTAタンパク質、例えば可溶性VISTA-Ig融合タンパク質又はVISTA発現は、インビトロでCD4⁺及びCD8⁺T細胞増殖及びサイトカイン産生を抑制する。抗VISTA抗体、例えば抗VISTAモノクローナル抗体(13F3)がインビトロでVISTA⁺APCによるT細胞反応のVISTA誘導性抑制を遮断したことも観察される。また、抗VISTAモノクローナル抗体がEAEを悪化させ、インビボで脳炎誘発性のTh17の頻度を上昇させたことも発見されている。またさらに、発明者らは、驚くべきことに、抗VISTAモノクローナル抗体が複数のマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍寛解を誘発することを発見した。これらのモデルにおける骨髄由来抑制細胞(MDSC)でのVISTA発現は非常に高く、このことから、VISTA⁺MDSCが腫瘍特異的な免疫性を抑制することが示唆される。VISTAは、マウスにおいてインビトロ及びインビボの両方で、及びヒト(インビトロのみ)において、T細胞で免疫抑制活性を発揮し、自己免疫性及び癌に対する免疫反応の発現を調節することにおいて重要なメディエーターである。具体的に、このデータは、VISTAがIgスーパーファミリーの新しいメンバーであり、PD-L1と同様

に遠位配列とともに I g-Vドメインを含有することを示す。V I S T A-I g 融合タンパク質又は、人工 A P C で過剰発現される場合、V I S T A は、マウス及びヒト C D 4+及び C D 8+ T 細胞増殖及びサイトカイン産生の両方を阻害する。さらに、骨髓 A P C での V I S T A 発現は、インビトロでの T 細胞反応に対して阻害性である。

【0264】

〔0292〕 腫瘍微小環境における M D S C 上での V I S T A 発現は非常に高い。多くの細胞表面分子の表現型及び機能分析から、以前、T 細胞の M D S C 介在性抑制に与ることが示唆され：M D S C によって C D 115、C D 124、C D 80、P D-L1 及び P D-L2 が発現されたが、M D S C と免疫抑制性の活性を欠く腫瘍のないマウス由来の細胞との間で、それらの発現レベル又は陽性細胞の割合に差がないことが見出された。従って V I S T A は、M D S C 上での一次 B 7 陰性制御因子である。

10

【0265】

抗体介在性 V I S T A 遮断は、自己腫瘍に対する防御的な免疫性を誘導する。

【0266】

〔0293〕 V I S T A は、防御的な抗腫瘍免疫性の発現を妨害する M D S C 上の優性阻害免疫制御分子である。従って、抗 V I S T A 抗体でこの分子の活性を遮断することは、哺乳動物（例えばヒト）において防御的な抗腫瘍免疫性を誘導するために使用され得る。

【0267】

〔0294〕 複数コピーの V I S T A 細胞外ドメイン又はその断片及び、免疫調節物質として及び様々な癌、例えば膀胱、卵巣及びリンパ腫、自己免疫疾患、アレルギー、感染及び炎症状態、例えば多発性硬化症及び関節炎の処置のために、V I S T A に結合するか又は V I S T A の活性を調整する（刺激するか又は拮抗する）、V I S T A 結合物質、例えば低分子及び抗体又はその断片を具備する、可溶性 V I S T A タンパク質、例えば融合タンパク質及び多量体 V I S T A タンパク質を使用する方法。

20

【0268】

〔0295〕 V I S T A は、細胞外 I g-Vドメインは、2つの既知の B 7 ファミリーリガンドプログラム死リガンド 1 及び 2（P D-L1 及び P D-L2）に対して相同性を有し、A P C 及び T 細胞のサブセット上でインビトロ及びインビボで特有の配列特性及び特徴的な発現パターンを示す（これは、P D-L3 又は V I S T A と他の B 7 ファミリーリガンドを区別する。）、新規阻害性リガンドである。V I S T A は、C D 4+及び C D 8+ T 細胞増殖及び分化に対して機能的影響を有する（C D 4+及び C D 8+ T 細胞増殖、ならびにサイトカイン産生を抑制する。）。T 細胞上でのその発現パターン及び阻害的影響に基づき、P D-L3 又は V I S T A は、T 細胞と骨髓由来 A P C との間の同種相互作用の間、T 細胞反応を負に制御する制御リガンドとして明らかに機能する。

30

【0269】

〔0296〕 V I S T A（P D-L3）はリガンドの B 7 ファミリーのメンバーであると思われるものの、他の B 7 ファミリーリガンドとは異なり、この分子は、I g-Cドメインはなく I g-Vドメインのみを含有し、B 7 ファミリー受容体プログラム死-1（P D-1）に系統発生的により近い。それに基づく、T 細胞活性化及び分化を制御し、より広くは免疫反応を調節する制御ネットワークを調整するために、V I S T A（P D-L3）及びそれに特異的なアゴニスト又はアンタゴニストを使用することができる。特に V I S T A（P D-L3）タンパク質及び V I S T A（P D-L3）アゴニスト又はアンタゴニスト、好ましくは V I S T A（P D-L3）に特異的な抗体は、自己免疫性、炎症反応及び疾患、アレルギー、癌、感染性疾患及び移植における免疫反応の調整において有用である。

40

【0270】

〔0297〕 T 細胞でのアネルギー（無反応とは対照的に）は、サイトカイン産生、例えば I L-2 を欠くことを特徴とする。T 細胞が抗原に曝露され、第二のシグナル（同時刺激シグナル）の非存在下で最初のシグナル（T 細胞受容体又は C D-3 介在性シグナル）を受容するときに T 細胞アネルギーが起こる。これらの条件下で、同じ抗原への細胞の再

50

曝露（同時刺激分子の存在下で再曝露が起こる場合でも）の結果、サイトカインを産生することができず、従って増殖できない。しかし、アネルギーT細胞は、無関係の抗原に対して反応を開始し得、サイトカイン（例えばIL-2）とともに培養される場合、増殖し得る。例えば、T細胞アネルギーはまた、ELISAによって又は指標細胞株を用いた増殖アッセイによって測定される場合、Tリンパ球によるIL-2産生の欠損によっても観察され得る。あるいは、レポーター遺伝子コンストラクトを使用し得る。例えば、アネルギーT細胞は、5' IL-2 遺伝子エンハンサーの調節下で異種プロモーターにより、又はエンハンサー内で見られ得るAP1配列の多量体により誘導されるIL-2 遺伝子転写を開始できない。Kang, et al. (1992) Science 257:1134。

10

【0271】

[0298] 本発明のVISTA (PD-L3) 分子は、ポリペプチド又は対応する核酸分子中での「細胞外ドメイン」の存在に基づき同定される。別の実施形態において、本発明のVISTA (PD-L3) 分子は、ポリペプチド又は対応する核酸分子中での「細胞質ドメイン」の存在に基づき同定される。

【0272】

[0299] 「免疫細胞反応を調整するための方法」は、本明細書中で、免疫細胞の反応が調整されるように、一次シグナルの存在下でインビトロ又はインビボで免疫細胞をVISTAタンパク質又はそれに特異的な結合物質と接触させることを意味する。(VISTA又はその調節物質の相互作用は、免疫細胞へシグナルを伝達し、免疫反応を制御する。VISTA (PD-L3) タンパク質は、骨髄樹状細胞(DC)及びマクロファージを含む骨髄抗原提示細胞において高レベルに発現され、CD4+及びCD8+T細胞ではより低密度である。免疫活性化時、VISTA (PD-L3) 発現は、骨髄APC上で上方制御されるが、CD4+T細胞上では下方制御される。)。従って、本発明のVISTA (PD-L3) 核酸及びポリペプチド及びそのアゴニスト又はアンタゴニストは、例えば免疫反応を調整することにおいて有用である。

20

【0273】

[0300] 本明細書中で交換可能に使用される場合、「VISTA (PD-L3) 活性」、「VISTA (PD-L3) の生物学的活性」又は「VISTA (PD-L3) の機能的活性」は、標準的な技術に従いインビボ又はインビトロで調べた場合に、VISTA (PD-L3) -反応性細胞又は組織上で又はVISTA (PD-L3) ポリペプチド結合パートナー上で、VISTA (PD-L3) タンパク質、ポリペプチド又は核酸分子により発揮される活性を指す。これらの活性は、CD4+及びCD8+T細胞増殖及びサイトカイン産生を調整することを示す。別の実施形態において、VISTA (PD-L3) 活性は、VISTA (PD-L3) 結合パートナーとの会合など、直接的な活性である。本明細書中で使用される場合、「標的分子」又は「結合パートナー」は、VISTA (PD-L3) 介在性機能が達成されるように、天然でVISTA (PD-L3) ポリペプチドが結合するか又は相互作用する、即ちT細胞上で発現される分子である。あるいは、VISTA (PD-L3) 活性は、VISTA (PD-L3) ポリペプチドが介在する細胞シグナル伝達活性など、間接的な活性である。VISTA (PD-L3) の生物学的な活性は、本明細書中に記載されている。例えば、VISTA (PD-L3) ポリペプチド及び本発明のVISTA (PD-L3) アゴニスト又はアンタゴニストは、次の活性のうち1以上を有し得る：(1) CD4+及びCD8+T細胞ならびにメモリー及びエフェクター細胞の増殖を抑制又は促進する、(2) サイトカイン産生を抑制又は促進し、特に炎症性サイトカイン、例えばIL-6、TNF- α 、 γ インターフェロン、MCP-1、エオタキシン、IP-10、MIG、IL-17など抑制する、(3) T細胞と骨髄由来APCとの間の同種相互作用中にT細胞反応を負に制御する制御リガンドとして機能する、(4) 初期TCR活性化を抑制し、細胞分裂を停止させることによってCD4+T細胞反応を負に制御するが、アポトーシスに対する直接的な影響は最小限である、(5) APCとT細胞との間の同種相互作用中に抗原特異的なT細胞活性化を抑制又は促進する、及び／

30

40

50

又は(6) T細胞介在性免疫反応を抑制又は促進する、(7) 免疫細胞、例えばTリンパ球の活性化を調整する(増加又は減少させる)、(8) 生物、例えばマウス又はヒト生物の免疫反応、例えば炎症性又は自己免疫又はアレルギー性免疫反応を調整する(増加又は減少させる)、(9) CD44など、T細胞における活性化マーカーの発現を増加又は減少させる、(10) 骨髄造血を増加又は減少させる、及び(11) T細胞又は好中球浸潤及びTh17を阻害又は増加させる、(11) Foxp3+細胞を誘導するか又は阻害する、(12) 濾胞過形成を阻害するか又は増加させる。一方、VISTA-IgなどのVISTAアゴニストは、B細胞増殖に影響を与えない。

【0274】

[0301] 「1以上のVISTA(PD-L3)活性を調整する単離VISTA(PD-L3)タンパク質及びポリペプチド」。これらのポリペプチドは、次のドメイン：シグナルペプチドドメイン、IgVドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの1以上を有するVISTA(PD-L3)ポリペプチド及び好ましくはVISTA(PD-L3)活性を含む。

【0275】

[0302] 同時刺激シグナルの調整の結果、免疫細胞のエフェクター機能の調整が起り得る。従って、「VISTA活性」という用語は、VISTAポリペプチドがその天然の結合パートナーと結合する能力、免疫細胞同時刺激又は阻害シグナルを調整する能力及び免疫反応を調整する能力を含む。

【0276】

[0303] 免疫細胞における阻害シグナルの調整の結果、免疫細胞による増殖及び／又はサイトカイン分泌の調整が起こる。例えば、本発明のVISTA(PD-L3)ポリペプチドのファミリーは、好ましくは、少なくとも1つの「シグナルペプチドドメイン」を具備する。上述のように、ネイティブヒトVISTA(PD-L3)のアミノ酸配列においてシグナル配列が同定され、ネイティブマウスVISTA(PD-L3)のアミノ酸配列においても同定された。

【0277】

[0304] VISTA(PD-L3)活性の刺激は、VISTA(PD-L3)が異常に下方制御される、及び／又はVISTA(PD-L3)活性上昇が有用な効果を有すると思われる状況において望ましい。同様に、VISTA(PD-L3)活性の阻害は、VISTA(PD-L3)が異常に上方制御される、及び／又はVISTA(PD-L3)活性低下が有用な効果を有すると思われる状況において望ましい。VISTA(PD-L3)を下方調整するのに使用するための代表的な物質(即ちVISTA(PD-L3)アンタゴニスト)としては、例えばアンチセンス核酸分子、VISTA(PD-L3)を認識し、遮断する抗体、VISTA(PD-L3)を認識し、遮断する抗体の組み合わせ及びVISTA(PD-L3)の逆受容体を認識し、遮断する抗体及び免疫細胞上でVISTA(PD-L3)とその天然の結合パートナーとの相互作用を遮断する化合物(例えば可溶性、一価VISTA(PD-L3)分子；抗原提示細胞上でFc受容体に結合しないVISTA(PD-L3)分子の可溶性型；VISTA(PD-L3)結合パートナーの可溶性型；及び対象スクリーニングアッセイにおいて同定される化合物)が挙げられる。VISTA(PD-L3)を上方調整するのに使用するための代表的な物質(即ちVISTA(PD-L3)アゴニスト)としては、例えば、VISTA(PD-L3)ポリペプチドをコードする核酸分子、VISTA(PD-L3)の多価型、VISTA(PD-L3)の発現を向上させる化合物、VISTA(PD-L3)とその天然の結合パートナーとの相互作用を促進する化合物及びVISTA(PD-L3)を発現する細胞が挙げられる。

【0278】

[0305] 受容体に結合するVISTA(PD-L3)分子の形態に依存して、シグナルは、例えば受容体への結合についてVISTA(PD-L3)分子の活性化型と競合することによって、(例えば、その結果、受容体の架橋が起こるVISTA(PD-L3))

分子の多価型によって、又は抗原提示細胞上でFc受容体に結合するVISTA（PD-L3）の可溶性型によって）伝達され得るか、又は（例えば、抗原提示細胞上でFc受容体に結合しないように当技術分野で公知の方法を用いて改変されている、VISTA（PD-L3）分子の可溶性の一価型又はVISTA（PD-L3）の可溶性型によって）阻害され得るかの何れかである。しかし、可溶性分子が刺激性であり得る例がある。様々な調節物質の効果は、本明細書中で記載のような通常のスクリーニングアッセイを用いて容易に明らかにされ得る。

【0279】

免疫反応の下方制御

[0306] VISTA（PD-L3）ポリペプチドの阻害機能の上方制御は、免疫反応を下方制御するために使用され得る。下方制御は、既に進行している免疫反応を阻害するか又は遮断する形態であり得るか、又は免疫反応の誘導を予防することを伴い得る。活性化された免疫細胞の機能は、免疫細胞反応を下方制御することにより、又は免疫細胞において特異的なアネルギーを誘導することにより、又は両方により阻害され得る。例えば、VISTA（PD-L3）は、阻害受容体に結合し得、阻害受容体に結合するVISTA（PD-L3）の形態、例えば細胞表面上の多価VISTA（PD-L3）は、免疫反応を下方調整するために使用され得る。VISTA（PD-L3）活性を刺激するために使用され得る活性化抗体は、二特異性抗体である。例えば、このような抗体は、免疫細胞、例えばT細胞、B細胞又は骨髄細胞上の細胞表面受容体を標的とするVISTA（PD-L3）結合部位及び別の結合部位を具備し得る。このような抗体は、VISTA（PD-L3）結合部位を具備することに加えて、特異的な細胞集団にその分子を標的化するための、B細胞抗原受容体、T細胞抗原受容体又はFc受容体に結合する結合部位をさらに具備し得る。二特異性抗体に対するこの第二の抗原の選択によって、阻害のために標的としようとする細胞集団の選択において柔軟性がもたらされる。VISTA（PD-L3）活性を促進するか、又はVISTA（PD-L3）とその天然の結合パートナーとの相互作用を促進する薬剤（例えばVISTA（PD-L3）活性化抗体又はVISTA（PD-L3）活性化低分子）は、その免疫細胞増殖及び／又はエフェクター機能阻害能又は、インビトロアッセイに添加した場合のアネルギー誘導能により同定され得る。例えば、活性化受容体を介してシグナル伝達を刺激する薬剤の存在下で細胞を培養し得る。例えば活性化物質の存在下で細胞増殖又はエフェクター機能（例えば抗体産生、サイトカイン産生、食作用）を測定するために、細胞活性化の当技術分野で認められている多くのリードアウトを使用し得る。試験物質のこの活性化の阻害能は、その物質が、測定されている増殖又はエフェクター機能の低下に影響を与える能力を測定することによって、容易に決定され得る。ある実施形態において、低抗原濃度で、VISTA（PD-L3）免疫細胞相互作用は、強いB7-CD28シグナルを阻害する。別の実施形態において、高抗原濃度でVISTA（PD-L3）免疫細胞相互作用はサイトカイン産生を低下させ得るが、T細胞増殖を阻害しない。従って、試験化合物の活性化遮断能は、抗原の様々な濃度でサイトカイン産生及び／又は増殖を測定することによって決定され得る。

【0280】

[0307] 寛容性は、抗原をVISTA（PD-L3）アゴニストと同時に投与することによって、特異的な抗原に対して誘導され得る。例えば、寛容性は、特異的なポリペプチドに対して誘導され得る。免疫反応が好ましくないアレルゲン又は外来ポリペプチドに対する免疫反応が阻害され得る。例えば、第VIL1因子を与えられる患者は頻繁に、この凝固因子に対して抗体を産生する。VISTA（PD-L3）活性又はその天然の結合パートナーとの相互作用を刺激する薬剤と組み換え第VIL1因子（又は例えば架橋により第VIL1因子に物理的に連結されるVISTA（PD-L3））の同時投与の結果、免疫反応が下方調整され得る。

【0281】

[0308] 免疫反応を下方調整するために、VISTA（PD-L3）アゴニスト及び免疫細胞上で同時刺激受容体の活性を遮断し得る別の薬剤を使用し得る。代表的な分子と

しては、他のPDリガンドのアゴニスト形態、CTLA-4、抗B7-1抗体、抗B7-2抗体の可溶性型又はそれらの組み合わせが挙げられる。あるいは、対象において免疫細胞介在性免疫反応を下方制御するために、2個の個別のペプチド（例えば、VISTA（PD-L3）ポリペプチドとB7-2及び／又はB7-1ポリペプチドの遮断形態と）又は抗体（例えばVISTA（PD-L3）に対する活性化抗体と遮断抗B7-2及び／又は抗B7-1モノクローナル抗体）ポリペプチドの組み合わせを単一の組成物として合わせ得るか、又は個別に（同時に又は連続的に）投与し得る。さらに、免疫反応に影響を及ぼすために、他の下方調整試薬と組み合わせ、B7-1及び／又はB7-1活性を有する1以上のポリペプチドとともに、VISTA（PD-L3）ポリペプチド活性を有する、治療的活性量の1以上のペプチドを使用し得る。他の免疫調整試薬の例としては、同時刺激シグナルを遮断する抗体（例えばCD28又はICOSに対するもの）、CTLA4を介して阻害シグナルを活性化する抗体及び／又は他の免疫細胞マーカーに対する抗体（例えば、CD40、CD40リガンド又はサイトカインに対するもの）、融合タンパク質（例えばCTLA4-Fc又はPD-1-Fc）及び免疫抑制薬（例えばラパマイシン、シクロスポリンA又はFK506）が挙げられる。細胞の破壊により免疫細胞機能を遮断する治療剤の構築においてもまた、VISTA（PD-L3）ポリペプチドは有用であり得る。例えば、それが結合する細胞の破壊を誘発可能な細胞毒性剤を作製するために、VISTA（PD-L3）ポリペプチドの一部を毒素と連結させ得る。

【0282】

〔0309〕このような細胞毒性剤（例えばVISTA（PD-L3）リシン（単独又はPD-L1-リシンとの組み合わせ）のうち1つ又はその組み合わせの患者への点滴の結果、特に、活性化された免疫細胞がより高量のVISTA（PD-L3）結合パートナーを発現するという事実を踏まえると、免疫細胞死が起こり得る。例えば、活性化されたリンパ球の表面上でPD-1が誘導されるので、VISTA（PD-L3）ポリペプチドは、Fc-R依存性機構によって、又はVISTAに対する受容体を発現する細胞を死滅させるための、細胞毒性薬（例えばリシン、サボリン又はカリケアマイシン）とVISTA（PD-L3）ポリペプチドとの複合化による消失によって、これらの特異的な細胞の枯渇を標的化するために使用し得る。死滅VISTA（PD-L3）発現抗原提示細胞を標的とするために、抗VISTA（PD-L3）抗体に毒素を複合化し得る。さらなる実施形態において、VISTA（PD-L3）-抗体-毒素は二特異性抗体であり得る。このような二特異性抗体は、例えばある一定のタイプの細胞、例えばBリンパ球、単球、樹状細胞又はランゲルハンス細胞でのみ見られるマーカーを使用して特異的な細胞集団を標的化するために有用である。VISTA（PD-L3）活性又はVISTA（PD-L3）-免疫細胞相互作用を活性化すること（及び、従ってVISTA（PD-L3）の負のシグナル伝達機能を刺激すること）によって免疫反応を下方制御することは、例えば、組織、皮膚及び臓器移植の状況で、移植片対宿主病（GVHD）もしくはアレルギーで、又は自己免疫疾患、例えば全身性紅斑性狼瘡及び多発性硬化症で、免疫反応を下方調整することにおいて有用である。例えば、免疫細胞機能の遮断の結果、組織移植において組織破壊が減少する。一般的には、組織移植において、免疫細胞による外来物としてのその認識とそれに続く移植片を破壊する免疫反応を通じて移植片の拒絶が開始される。移植前又は移植時の、免疫細胞上でのVISTA（PD-L3）の活性又はVISTA（PD-L3）とその天然の結合パートナーとの相互作用を促進する分子（VISTA（PD-L3）ポリペプチドの可溶性、多量体型など）単独の又は別の下方調整物質と併用した投与によって、同時刺激シグナルの産生が阻害され得る。さらに、VISTA（PD-L3）活性の促進はまた、免疫細胞をアネルギー化し、それによって対象での寛容性を誘導するためにも十分であり得る。

【0283】

〔0310〕対象において十分な免疫抑制又は寛容性を達成するために、他の分子の同時刺激機能を遮断することも所望され得る。例えば、移植前又は移植時に、これらの抗原のそれぞれの活性を有するペプチド又はこれらの抗原に対する遮断抗体の組み合わせの可溶

10

20

30

40

50

性型を投与することによって（個別に又は単一組成物中で一緒に）、B7-1及びB7-2の機能を遮断することが所望され得る。あるいは、VISTA（PD-L3）の阻害活性を促進し、B7-1及び／又はB7-2の同時刺激活性を阻害することが所望され得る。本発明の下方調整法と組み合わせて使用され得る他の下方調整剤としては、例えば、CTLA4を介して阻害シグナルを伝達する薬剤、CTLA4の可溶性型、CTLA4を介して阻害シグナルを活性化する抗体、他の免疫細胞マーカーに対する遮断抗体又は他の受容体リガンド対の可溶性型（例えばCD40とCD40リガンドとの間の相互作用を破壊する薬剤（例えば抗CD40リガンド抗体））、サイトカインに対する抗体又は免疫抑制薬が挙げられる。例えば、VISTA（PD-L3）活性又はVISTA（PD-L3）とその天然の結合パートナーとの相互作用を活性化することは、自己免疫疾患を処置することにおいて有用である。多くの自己免疫障害は、自己組織に対して反応性となり、サイトカイン及び疾患の病変に関与する自己抗体の産生を促進する、免疫細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性免疫細胞の活性化の予防によって、疾患症状が軽減又は排除され得る。VISTA（PD-L3）（PD-L3）の活性又はVISTAとその天然の結合パートナーとの相互作用を促進する薬剤の投与により、疾患からの長期にわたる緩和に導き得る自己反応性免疫細胞の抗原特異的な寛容性が誘導され得る。さらに、B7分子と同時刺激受容体との受容体-リガンド相互作用を破壊することにより免疫細胞の同時刺激を遮断する薬剤の同時投与は、疾患進行に関与し得る自己抗体又はサイトカイン産生を防ぐために免疫細胞活性化を阻害することにおいて有用であり得る。自己免疫障害を防ぐか又は緩和することにおける試薬の有効性は、ヒト自己免疫疾患の、多くの特徴がよく分かっている動物モデルを用いて決定され得る。例としては、マウス実験的自己免疫脳炎、MRL/lpr/lprマウス又はNZBハイブリッドマウスにおける全身性紅斑性狼瘡、マウス自己免疫コラーゲン関節炎、NODマウス及びBBラットにおける糖尿病及びマウス実験的重症筋無力症が挙げられる。Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, 840-856頁を参照。

【0284】

[0311] 免疫細胞活性化の阻害は、例えばIgE産生を阻害することによって、アレルギー及びアレルギー反応の処置において治療的に有用である。対象において免疫細胞介在性アレルギー性反応を阻害するために、アレルギー性対象に、VISTA（PD-L3）活性又はVISTA（PD-L3）とその天然の結合パートナーとの相互作用を促進する薬剤を投与し得る。刺激VISTA（PD-L3）活性又はその天然の結合パートナーとの相互作用は、適切なMHC分子と組み合わせてアレルゲンへの曝露とともに行われ得る。アレルギー反応は、実際は、アレルゲン侵入経路及び肥満細胞又は好塩基球でのIgE蓄積パターンに依存して、全身性又は局所性であり得る。従って、VISTA（PD-L3）活性又はVISTA（PD-L3）-免疫細胞相互作用を促進する薬剤の投与によって、免疫細胞介在性アレルギー性反応が局所的又は全身的に阻害され得る。

【0285】

[0312] VISTA（PD-L3）活性又はVISTA（PD-L3）とその天然の結合パートナーとの相互作用の刺激を介した免疫反応の下方制御はまた、自己組織の自己免疫攻撃を処置することにおいても有用であり得る。従って、VISTA（PD-L3）活性又はその天然の結合パートナーへのVISTA（PD-L3）結合を向上させることによって、自己免疫攻撃によって引き起こされるか又は悪化する状態（例えば心疾患、心筋梗塞又はアテローム性動脈硬化症）を良くするか又は改善させ得る。従って、VISTA（PD-L3）活性又はVISTA（PD-L3）とその逆受容体との相互作用を刺激することによって、自己免疫攻撃により悪化する状態、例えば自己免疫障害（ならびに心疾患、心筋梗塞及びアテローム性動脈硬化症などの状態）を調整することは、本発明の範囲内である。

【0286】

免疫反応の上方制御

〔0313〕 免疫反応を上方制御する手段としての、V I S T A (P D - L 3) 活性又はV I S T A (P D - L 3) とその天然の結合パートナーとの相互作用の阻害も、治療において有用である。免疫反応の上方制御は、既存の免疫反応を促進するか又は最初の免疫反応を引き出す形態であり得る。例えば、V I S T A (P D - L 3) 活性の阻害を通じて免疫反応を促進することは、微生物、例えば細菌、ウイルスもしくは寄生生物の感染の場合に、又は免疫抑制の場合に有用である。例えば、V I S T A (P D - L 3) 活性を阻害する薬剤、例えばV I S T A (P D - L 3) に対する非活性化抗体（即ち遮断抗体）又はV I S T A (P D - L 3) の可溶性型は、抗体及び細胞介在性反応の上方制御の結果、より迅速又は完全にウイルス、細菌又は寄生生物が排除され、有益である状況において、治療的に有用である。これらの状態としては、ウイルス性皮膚疾患、例えばヘルペス又は帯状疱疹が挙げられ、この場合、このような薬剤は皮膚に局所的に送達され得る。さらに、このような薬剤の全身的投与によって、全身性ウイルス性疾患、例えばインフルエンザ、一般的な風邪及び脳炎が緩和され得る。ある一定の例において、免疫反応をさらに増大させるために、免疫反応を上方制御する他の物質、例えば、同時刺激受容体を介してシグナルを伝達する、B 7 ファミリーメンバーの形態をさらに投与することが所望され得る。

10

【0287】

〔0314〕 患者から免疫細胞を取り出し、インビトロでV I S T A (P D - L 3) 活性又はV I S T A (P D - L 3) とその天然の結合パートナーとの相互作用を阻害する薬剤と免疫細胞を接触させ、インビトロで刺激された免疫細胞を患者に再導入することによって、感染患者において免疫反応が促進され得る。別の実施形態において、免疫反応を促進する方法は、感染細胞、例えばウイルス感染細胞、を患者から単離し、細胞がそれらの表面上でV I S T A (P D - L 3) 分子の全て又は一部を発現するように、それらにその天然の結合パートナーと結合できないV I S T A (P D - L 3) の形態をコードする核酸分子を遺伝子移入し、遺伝子移入細胞を患者に再導入することを伴う。遺伝子移入細胞は、インビボで阻害シグナルを妨害し、それによって免疫細胞を活性化することが可能であり得る。

20

【0288】

〔0315〕 V I S T A (P D - L 3) 活性又はV I S T A (P D - L 3) とその天然の結合パートナーとの相互作用を阻害する薬剤は、様々なポリペプチド、例えば病原体由来のポリペプチドに対するワクチンにおいて予防的に使用され得る。適切なアジュバント中でV I S T A (P D - L 3) 活性を阻害する薬剤と一緒にウイルス性ポリペプチドをワクチン接種することによって、病原体、例えばウイルスに対する免疫性が誘導され得る。交互に、病原性抗原及び免疫細胞とのV I S T A (P D - L 3) 相互作用を遮断するV I S T A (P D - L 3) の形態の両方をコードする遺伝子を具備するベクターをワクチン接種のために使用し得る。核酸ワクチンは、様々な手段、例えば注射（例えば皮膚に粒子を注入するために粒子加速物質又は圧縮ガスを使用する遺伝子銃での、表皮へのDNA被覆金粒子の、筋肉内、皮内又は微粒子銃注射によって、投与され得る。（Haynes, et al. (1996) J. Biotechnol. 44: 37.）。あるいは、非侵襲性手段によって核酸ワクチンを投与し得る。例えば、DNAの経口送達によって、純粋な、又は脂質処方DNAを呼吸器系又は他の標的、例えばパイエル板に送達させ得る。Schubbert (1997) Proc Natl. Acad. Sci. USA 94: 961。粘膜表面への送達のために弱毒化微生物を使用し得る。Sizemore, et al. (1995) Science 270: 29。

30

40

【0289】

〔0316〕 ワクチンにおける抗原は自己抗原であり得る。このようなワクチンは、生物における寛容性の調整において有用である。自己抗原及びV I S T A (P D - L 3) 活性又はV I S T A (P D - L 3) とその天然の結合パートナーとの相互作用を遮断する薬剤での免疫付与は、寛容性を破壊（即ち自己抗原の寛容性を妨害）し得る。このようなワクチンはまた、ミョウバン又はサイトカイン（例えばGM-CSF、IL-12、B7-1又はB7-2）などのアジュバントも含み得る。ある実施形態において、例えば、T細胞

50

を活性化し、感染から免疫性をもたらすために、VISTA (PD-L3) ポリペプチド又は遮断抗体及びMHCクラスI α 鎖ポリペプチド及び β 2ミクログロブリンを同時発現するように遺伝子移入された細胞によって、VISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用を阻害する薬剤をクラスI MHCポリペプチドとともに投与し得る。例えば、ワクチンが有用であるウイルス性病原体としては、B型肝炎、C型肝炎、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、HIV-1、HIV-2、結核、マラリア及び住血吸虫症が挙げられる。

【0290】

[0317] VISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用の阻害は、腫瘍免疫性の処置において有用であり得る。VISTA (PD-L3) 活性を阻害する核酸分子を腫瘍細胞（例えば肉腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病、神経芽腫又は癌腫）に遺伝子移入し得る。これらの分子は、例えばVISTA (PD-L3) に対してアンチセンスである核酸分子であり得るか、又は非活性化抗VISTA (PD-L3) 抗体をコードし得る。これらの分子はまた、抗VISTA (PD-L3) 抗体の可変領域でもあり得る。必要に応じて、同時刺激を活性化する他のポリペプチド（例えばB7-1又はB7-2）ともに腫瘍細胞に遺伝子移入することもできる。遺伝子移入された腫瘍細胞は患者に戻され、その結果、VISTA (PD-L3) 活性の阻害（例えば局所的阻害）が起こるか、あるいは、インビボでの遺伝子移入のために腫瘍細胞を標的化するために遺伝子治療技術を使用し得る。

【0291】

[0318] 腫瘍細胞に対する免疫反応の刺激は、VISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用を阻害することによって、VISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用を阻害する薬剤で患者を処置することによっても達成され得る。このような薬剤の好ましい例としては、例えばアンチセンス核酸分子、VISTA (PD-L3) を認識し、遮断する抗体及び、免疫細胞上でVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用を遮断する化合物（例えば可溶性、一価VISTA (PD-L3) 分子；抗原提示細胞上でFc受容体と結合しないVISTA (PD-L3) 分子の可溶性型；VISTA (PD-L3) 結合パートナーの可溶性型；及び対象スクリーニングアッセイにおいて同定される化合物）が挙げられる。さらに、MHCクラスI又はMHCクラスII分子を欠くか、又は十分な量のMHCクラスI又はMHCクラスII分子を発現できない腫瘍細胞に、MHCクラスI α 鎖ポリペプチド及び β 2ミクログロブリンポリペプチド又はMHCクラスII α 鎖ポリペプチド及びMHCクラスII、 β 鎖ポリペプチドの全て又は一部（例えば細胞質ドメイン短縮部）をコードする核酸を遺伝子移入し、それにより細胞表面上にMHCクラスI又はMHCクラスIIポリペプチドを発現させることができる。ポリペプチド又はアンチセンス核酸を阻害するVISTA (PD-L3) と組み合わせた適切なクラスI又はクラスII MHCの発現は、遺伝子移入腫瘍細胞に対してT細胞介在性免疫反応を誘導する。場合によっては、インバリエント鎖など、MHCクラスII-関連ポリペプチドの発現を遮断するアンチセンスコンストラクトをコードする遺伝子も、腫瘍関連抗原の提示を促進し、腫瘍特異的な免疫性を誘導するために、VISTA (PD-L3) 阻害ポリペプチド又はアンチセンス核酸をコードするDNAとともに同時遺伝子移入され得る。B7-陰性マウス腫瘍細胞によるB7-1の発現は、腫瘍拒絶に付随するT細胞介在性の特異的免疫性及びマウスでの腫瘍負荷に対する長期の防御を誘導することが示されている。Chen, et al. (1992) Cell 71: 1093-1102; Townsend及びAllison (1993) Science 259: 368-370; Baskar, et al. (1993) Proc Natl. Acad. Sci. 90: 5687-5690。従って、ヒト対象における免疫細胞介在性免疫反応の誘導は、対象において腫瘍特異的な寛容性を克服するのに十分であり得る。別の実施形態において、既に存在する寛容性が克服されるように、VISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用

の阻害によって免疫反応を刺激し得る。例えば、VISTA (PD-L3) の活性又はVISTA (PD-L3) のその天然の結合パートナーへの結合能を阻害する薬剤を投与することによって、対象が顕著な免疫反応を開始できない抗原、例えば腫瘍特異的な抗原に対する免疫反応が誘導され得、能動的な免疫付与の過程において外来抗原への反応を強化するためにアジュバントとして使用され得る。

【0292】

[0319] 対象から免疫細胞を得て、免疫細胞集団を拡大するために、VISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用を阻害する薬剤の存在下でエクスピボで培養し得る。さらなる実施形態において、次に、免疫細胞を対象に投与する。当技術分野で公知であるように、例えば一次活性化シグナル及び同時刺激シグナルを免疫細胞にもたらすことによって、インビトロで増殖させるために免疫細胞を刺激し得る。免疫細胞の増殖を同時刺激するために、様々な形態のVISTA (PD-L3) ポリペプチド又はVISTA (PD-L3) 活性を阻害する薬剤も使用され得る。ある実施形態において、WO 94/29436 に記載の方法に従い、免疫細胞がエクスピボで培養される。同時刺激分子は、可溶性であり、細胞膜に連結されるか、又はビーズなどの固体表面に連結され得る。

10

【0293】

[0320] 本明細書中に記載の方法の何れかを行うことにおいて、1以上のさらなる薬剤を投与することによって免疫反応を上方制御することは、本発明の範囲内である。例えば、VISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用を阻害する薬剤と組み合わせて、サイトカイン、アジュバント又は同時刺激分子の刺激性型又はそれらのリガンドなど、免疫反応を刺激することが知られている他の薬剤の使用を使用し得る。

20

【0294】

T細胞上でのVISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその逆受容体との相互作用の調整により調節されるサイトカインの同定

[0321] VISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの相互作用の調整に対する反応において、免疫細胞により産生されるか又は免疫細胞においてその産生が促進もしくは阻害されるサイトカインを同定するために、本明細書中に記載のVISTA (PD-L3) 分子を使用し得、一次活性化シグナルで免疫細胞がインビトロで準最適に刺激され得、例えば、MHCクラスII分子とともに、T細胞をホルボールエステル、抗CD3抗体又は好ましくは抗原で、及び同時刺激シグナルを考えると、例えばB7ファミリー抗原の刺激性型により、例えばB7ポリペプチドをコードする核酸を遺伝子移入し、その表面上でそのペプチドを発現する細胞により、又はそのペプチドの可溶性の刺激性型により、T細胞を刺激し得る。次に、この細胞と、VISTA (PD-L3) (例えばVISTA (PD-L3) に対する抗体) を発現する細胞とを接触させ得る。ELISAによって又はサイトカインを遮断して、サイトカインにより誘導される免疫細胞増殖又は他の細胞型の増殖を阻害するという抗体の能力によって、培地に放出される既知のサイトカインを同定し得る。例えば、IL-4 ELISAキットは、Genzyme (Cambridge, MA.) より、IL-7遮断抗体であるものとして入手可能である。IL-9及びIL-12に対する遮断抗体は、Genetics Institute (Cambridge, MA.) より入手可能である。次に、サイトカインプロファイルにおいてVISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) とその結合パートナーとの相互作用を刺激又は遮断する効果を決定し得る。上記のとおり、及び実施例で示されるように、VISTA (PD-L3) は、明らかに免疫細胞によるIL-2及びγインターフェロンの発現を抑制する。

30

40

【0295】

[0322] VISTA (PD-L3) 活性の調整によって調整され得る新規サイトカインを同定するための方法においても、上述のようなインビトロでの免疫細胞同時刺激アッセイが使用され得る。例えば、CD28/CTLA4経路の刺激がIL-2分泌を促進す

50

と思われる場合、ICOS経路の刺激は、IL-10分泌を促進と思われる。Hutloff, et al. (1999) Nature 397:263。特定の活性が同時刺激時に誘導される場合、例えば、既知のサイトカインの遮断抗体の添加によって免疫細胞増殖を阻害することができず、この活性は、未知のサイトカインの作用によるものであり得る。同時刺激後、従来の方法によって培地からこのサイトカインを精製し、その免疫細胞増殖誘導能によってその活性を測定し得る。

【0296】

〔0323〕寛容性誘導に関わり得るサイトカインを同定するために、上記のようなインビトロT細胞同時刺激アッセイを使用し得る。この場合、T細胞に一次活性化シグナルを与え、選択したサイトカインと接触させるが、同時刺激シグナルは与えない。免疫細胞を洗浄し、休止させた後、一次活性化シグナル及び同時刺激シグナルの両方を細胞に再負荷する。免疫細胞が反応（例えば増殖又はサイトカインを産生）しない場合、これらは、寛容化されており、サイトカインは寛容性誘導を妨げていない。しかし、免疫細胞が反応する場合、寛容性の誘導がサイトカインにより妨げられている。寛容性誘導を防御可能なサイトカインは、移植受容者又は自己免疫疾患対象での寛容性を誘導するためのより効率的な手段として、Bリンパ球抗原を遮断する試薬と組み合わせて、インビボで遮断に対する標的となり得る。例えば、VISTA (PD-L3) 活性又はVISTA (PD-L3) と結合パートナーとの相互作用を促進する薬剤と一緒に対象にサイトカイン遮断抗体を投与し得る。

【0297】

〔0324〕従って、まとめると、今回、Treg細胞によって発現されるプログラム死リガンド (PDL) ファミリーの新規メンバーが同定された。この新規タンパク質はVISTA (PD-L3) と名付けられた。このPD-Lファミリーの受容体は、単一IgVドメインを含有するI型膜貫通タンパク質であり、一方でリガンドはIgV及びIgC細胞外ドメインの両方を発現するI型膜貫通タンパク質である。PDLファミリーの他のメンバーと同様に、VISTA (PD-L3) は、インビトロでT細胞のαCD3増殖を同時刺激する。さらに、VISTA (PD-L3) の発現は、αCD3活性化Tregにおいて上昇し、αGITRの存在下で減少する。

【0298】

〔0325〕第二の、TNF様のタンパク質もαCD3/αGITR刺激時に上方制御されるものと同定された。このタンパク質はTreg-sTNFと名付けられた。これらのタンパク質は、免疫性の接触依存性及び傍分泌抑制に関与し得、従って、免疫反応を調整する（例えば阻害する又は刺激する）ために、及びTregシグナル伝達を伴う疾患及び状態の処置において有用である。例えば、免疫細胞活性化を刺激又は促進するために、同時刺激シグナルとしてVISTA (PD-L3) タンパク質を使用し得る。VISTA (PD-L3) タンパク質及びVISTA (PD-L3) 結合物質及びVISTA (PD-L3) アゴニスト及びアンタゴニストは、T細胞免疫性の制御、例えばT細胞活性化、分化及び増殖の調整、及び特にT細胞と骨髄由来APCとの間の同種相互作用中のCD4+及びCD8+T細胞増殖、サイトカイン産生及びT細胞反応の調整、同種相互作用が所望される免疫状態を処置することにおいて特に有用である。

【0299】

VISTA及びVISTA複合ポリペプチド

〔0326〕本発明は、VISTA及びVISTA複合ポリペプチドを提供する。発明者らは、驚くべきことにVISTA及びVISTA複合ポリペプチドが負の免疫調節物質として作用することを発見した。代表的なVISTAポリペプチドは配列番号2、4及び5で提供される。本発明のVISTA (PD-L3) 分子は、次のドメイン：シグナルペプチドドメイン、IgVドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン又は細胞質ドメインのうち少なくとも1以上を含む。本発明の単離ポリペプチド、好ましくはVISTA (PD-L3) ポリペプチドは、配列番号2、4もしくは5のアミノ酸配列に対して十分に同一であるか、又は配列番号1もしくは3に対して十分に同一であるヌクレオチド配列又はその

断片もしくは相補体によりコードされるアミノ酸配列を具備し得る。本明細書中で使用される場合、「十分に同一である」という用語は、第一及び第二のアミノ酸又はヌクレオチド配列が共通の構造ドメイン又はモチーフ及び／又は共通の機能活性を共有するように、第一のアミノ酸又はヌクレオチド配列が、第二のアミノ酸又はヌクレオチド配列に対して、十分な又は最小数の同一又は同等のアミノ酸残基（例えば同様の側鎖を有するアミノ酸残基）又はヌクレオチドを含有することを指す。例えば、そのドメインのアミノ酸配列にわたり、少なくとも30%、40%又は50%相同性、好ましくは60%相同性、より好ましくは70から80%、及びさらにより好ましくは90から95%の相同性を有し、少なくとも1及び好ましくは2つの構造ドメイン又はモチーフを含有する、共通構造ドメインを共有するアミノ酸又はヌクレオチド配列は、本明細書中で十分に同一であると定義される。さらに、少なくとも30%、40%又は50%、好ましくは60%、より好ましくは70から80%又は90から95%の相同性を共有し、共通の機能活性を共有するアミノ酸又はヌクレオチド配列は、本明細書中で十分に同一であると定義される。VISTAポリペプチドの細胞外ドメインは、IgVドメインを具備し得、シグナルペプチドドメインを含み得る。図AからE1及び23AからCを参照。

10

【0300】

[0327] VISTA(PD-L3)ポリペプチドは、少なくとも1つの細胞外ドメイン及びシグナルペプチドドメイン、IgVドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインのうち1以上を有し得、好ましくは、本明細書中の配列番号1又は3のヌクレオチド配列の相補体を具備する核酸分子とストリンジェントなハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされる。代表的な単離ヒト及びマウスVISTA(PD-L3)cDNAのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列及びヒトVISTA(PD-L3)ポリペプチドの予想アミノ酸配列は、本明細書中で列挙される配列に含有される。

20

【0301】

[0328] 本発明のVISTA(PD-L3)ポリペプチドは、「膜貫通ドメイン」の存在に基づき同定され得る。PDL3の膜貫通ドメイン領域が本明細書中で同定される。例えば図1A-E及び23A-Cを参照。本発明のVISTA(PD-L3)分子は、ポリペプチド又は対応する核酸分子において、「IgCドメイン」がないこと及び「IgVドメイン」があることに基づき同定され得る。IgVドメインを構成するネイティブヒト及びマウスVISTA(PD-L3)ポリペプチドのアミノ酸残基は、図1A-E及び23A-Cで見ることができる。IgVドメインの存在は、VISTA(PD-L3)のその天然の結合パートナーに対する結合に必要であると思われる。

30

【0302】

[0329] VISTAポリペプチドをコードする核酸は、VISTA及びVISTA複合物の特異的な抗原性（例えばVISTAポリペプチドが抗VISTA抗体により結合される。）を保持する、アミノ酸配列における欠失、付加及び置換を含むが限定されない、少なくとも1つのVISTA及びVISTA複合物を具備する変異体ポリペプチドが得られる標準的な分子生物学的技術を用いて修飾され得る。さらに、少なくとも1つのVISTAポリペプチドを具備する変異体ポリペプチドはまた、VISTAポリペプチドの抗原性も保持し得る（例えば対象での免疫付与時にそれぞれVISTAポリペプチド及び変異体VISTAポリペプチドに対して特異的な免疫反応を生じさせる。）。「癌ワクチン」（例えば対象における免疫付与後に、抗腫瘍抗体を産生させる、VISTA及びVISTA複合物に対する特異的な免疫反応を引き出す医薬組成物）として有用な抗原組成物を製造するために、医薬担体とともにVISTA及びVISTA複合ポリペプチドを処方し得る。本明細書中に記載のVISTAポリペプチド及びVISTA複合物は、自己免疫障害及び炎症性疾患を処置するために使用され得る。

40

【0303】

ポリペプチド誘導体及び類似体

[0330] 当然のことながら、本明細書中に記載のポリペプチドは、分解産物、合成ペ

50

チド又は組み換えペプチドならびにペプチド模倣物、合成ペプチド、ペプトイド及びセミペプトイド（例えば、体内ではペプチドをより安定させるか、又は細胞への浸透能をより高くする修飾を有し得るペプチド類似体）であり得る。本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合ポリペプチドの修飾としては、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 又は CF=CH ）、バックボーン修飾及び残基修飾が挙げられるが限定されない。ペプチド模倣化合物を調製するための方法は当技術分野で周知である。Martin, (2010) Quantitative Drug Design: A Critical Introduction [2nd Ed.] CRC Press.

10

【0304】

[0331] ペプチド内のペプチド結合（ -CO-NH- ）は、例えばN-メチル化結合（ $\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$ ）、エステル結合（ $\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$ ）、ケトメチレン結合（ $\text{-CO-CH}_2\text{-}$ ）、 α -アザ結合（ -NH-N(R)-CO- ）（式中、Rは何らかのアルキル、例えばメチル、カルバ結合（ $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ）、ヒドロキシエチレン結合（ $\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ ）、チオアミド結合（ -CS-NH- ）、オレフィン二重結合（ -CH=CH- ）、レトロアミド結合（ -NH-CO- ）、ペプチド誘導体（ $\text{-N(R)-CH}_2\text{-CO-}$ ）（式中、Rは、炭素原子上に天然で提示される「正常」側鎖である。）である。）で置換され得る。これらの修飾は、ペプチド鎖に沿った結合の何れか、及び、同時にいくつか（2から3）でも起こり得る。

20

【0305】

[0332] 天然の芳香族アミノ酸、Trp、Tyr及びPheは、合成非天然酸、例えばフェニルグリシン、TIC、ナフチルエラニン(Nol)、フェニルアラニンの環-メチル化誘導体、フェニルアラニンのハロゲン化誘導体又は α -メチルーチロシンによって置換され得る。上記に加えて、本発明のポリペプチドはまた、1以上の修飾アミノ酸又は1以上の非アミノ酸単量体（例えば脂肪酸、複合糖質）、例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリン及びホスホスレオニン；及び、2-アミノアジピン酸、ヒドロキシリジン、イソデスモシン、ノルーバリン、ノルーロイシン及びオルニチンを含むが限定されない他の通常のものではないアミノ酸も含む。さらに、「アミノ酸」という用語は、D-及びL-アミノ酸の両方を含む。

30

【0306】

[0333] 本発明のポリペプチドは好ましくは、ペプチドが可溶性型であることが必要な治療薬において利用されるので、本発明のポリペプチドは、それらのヒドロキシル含有側鎖ゆえにペプチド溶解度を上昇させることが可能なセリン及びスレオニン含むが限定されない1以上の非天然又は天然の極性アミノ酸を具備し得る。

【0307】

[0334] 本発明のポリペプチドは直鎖状の形態であり得るが、当然のことながら、場合により利用され得る。

【0308】

[0335] 本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合ポリペプチドは、それを発現させるために改変されている（例えば組み換え）細胞から精製され得る。VISTA及びVISTA複合ポリペプチドをコードするDNA配列は、発現ベクターに挿入され、次いで適切な宿主細胞において形質転換され（又は遺伝子移入され）、及び／又はトランスジェニック動物で発現され得る。次いで、当技術分野で公知の方法によって、そのように発現されるVISTA及びVISTA複合ポリペプチドが単離され得る。例えばManiatis, et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照。

40

【0309】

[0336] 本発明のポリペプチドは、標準的な固相技術を使用することなどによって、

50

生化学的に合成され得る。これらの方法としては、排他的固相合成、部分的固相合成方法、断片濃縮、古典的溶液合成が挙げられる。これらの方法は、好ましくは、ペプチドが比較的短い（即ち10kDa）場合、及び／又はそれが組み換え技術により産生され得ない場合（即ち核酸配列によりコードされない。）に使用され、従って、様々な化学を伴う。固相ペプチド合成手順は当技術分野で周知であり、Stewart（1984）Solid Phase Peptide Syntheses [2nd Ed.] Pierce Chemical Company及びBenoiton（2005）Chemistry of Peptide Synthesis CRC Pressによってさらに記載される。合成ペプチドは、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製され得、この組成物はアミノ酸配列決定を介して確認され得る。Creighton（1992）[2nd Ed.] Proteins, Structures and Molecular Principles W. H. Freeman及びCompany; Aguilar（2004）[Ed.] HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols Humana Press; Simpson（2002）Protein Sequencing Protocols [2nd Ed.] Humana Pressを参照。

【0310】

〔0337〕 大量の本発明のポリペプチドが所望される場合、本発明のポリペプチドは、Invitrogen（2002）“Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVs) and Insect Culture Techniques” Instruction Manual; Hatti-Kaul及びMattiasson（2003）[Eds] Isolation and Purification of Proteins; Ahmed（2004）Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization CRC Pressにより記載されるものなどの組み換え技術を用いて作製され得る。例えば、Bitter, et al.（1987）Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier, et al.（1990）Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson, et al.（1984）Nature 310:511-514, Takamatsu, et al.（1987）EMBO J. 6:307-311, Coruzzi, et al.（1984）EMBO J. 3:1671-1680及びBrogli, et al.（1984）Science 224:838-843, Gurley, et al.（1986）Mol. Cell. Biol. 6:559-565及びWeissbach及びWeissbach（1988）Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, 421-463頁により記載されるものなどのさらなる組み換え技術。

【0311】

ポリペプチド配列変異体

〔0338〕 本明細書中に記載の何らかのVISTA及びVISTA複合物配列の場合、より長い又はより短いペプチドを作製するためにアミノ酸残基を系統的に付加するか又は除去するか何れかを行い、その点から抗原を上下する、より長い又はより短いサイズの枠を歩行することによりこれら及び作製される配列を試験することによって、さらなる特徴評価又は最適化が達成され得る。当技術分野で公知又は本明細書中で記載のように、免疫原性アッセイにおいて配列に基づき抗原性分子の有効性について試験することと新しい候補標的を作製することに対するこのアプローチを組み合わせることは、抗原のさらなる操作につながり得る。さらにまた、VISTA及びVISTA複合物をさらに最適化するために（例えば血清安定性上昇又は循環半減期延長、熱安定性向上、送達促進、免疫原性促進、溶解度上昇、特定のインビボ位置又は細胞型に対する標的化）、当技術分野で公知であり、及び／又は本明細書中で論じられるように、例えば付加、欠失又は他の突然変

異によって、このような最適化配列を調整し得る。

【0312】

〔0339〕 本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合ポリペプチドは、保存的置換突然変異、(即ち同様のアミノ酸による1以上のアミノ酸の置換)を具備し得る。例えば、保存的置換は、同じ一般クラス内の別のものによるアミノ酸の置換、例えばある酸性アミノ酸を別の酸性アミノ酸で、ある塩基性アミノ酸を別の塩基性アミノ酸で、又はある中性アミノ酸を別の中性アミノ酸で置換するもの、を指す。

【0313】

〔0340〕 VISTA及びVISTA複合ポリペプチド配列は、配列番号2、4又は5のポリペプチド配列のうち何らかの1以上に対して少なくとも約60、65、70、75、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100%の配列相同性を有し得る。より好ましくは、本発明は、配列番号2、4又は5のVISTA及びVISTA複合ポリペプチド配列のポリペプチド配列の何れか1以上に対して、少なくとも約95%の配列相同性、さらにより好ましくは少なくとも約98%の配列相同性及びさらにより好ましくは少なくとも約99%の配列相同性を有するポリペプチド配列を企図する。アミノ酸配列、ならびに核酸配列間で相同性を決定するための方法は、当業者にとって周知である。例えばNedelkov及びNelson(2006) New and Emerging Proteomic Techniques Humana Pressを参照。

【0314】

〔0341〕 従って、VISTA及びVISTA複合ポリペプチドは、ポリペプチド配列と少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列相同性を有し得る。例えば、VISTA及びVISTA複合ポリペプチドは、配列番号2、4又は5と少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列相同性を有し得る。

【0315】

〔0342〕 相同性又は同一性という用語は、%で表される、他のタンパク質と一致するアミノ酸の数(同一性)を意味するものと理解される。同一性は、好ましくは、コンピュータプログラムを利用してある配列を他のタンパク質と比較することによって決定される。互いに比較される配列の長さが異なる場合、同一性は、短い配列がより長い配列と共有するアミノ酸数が%同一性を決定するようにして決定されるものである。同一性は、例えばClustalWなど、公開されている既知のコンピュータプログラムの手段によって通常決定され得る。Thompson, et al. (1994) Nucleic Acids Research 22:4673-4680。ClustalWは、European Molecular Biology Laboratoryから公開されており、様々なインターネットページ、とりわけIGBMC(Institut de Genetique et de Biologie Molculaire et Cellulaire)及びEBI及び全てのミラーEBIインターネットページ(European Bioinformatics Institute)からダウンロードされ得る。例えば本願の参照タンパク質と他のタンパク質との間の同一性を決定するためにClustalWコンピュータプログラムVersion 1.8を使用する場合、次のパラメーターを設定するものとする:KTUPLE=1、TOPDIAG=5、WINDOW=5、PAIRGAP=3、GAPOPEN=10、GAPEXTEND=0.05、GAPDIST=8、MAXDIV=40、MATRIX=GONNET、ENDGAPS(OFF)、NOPGAP、NOHGAP。オンラインで入手可能なEuropean Bioinformatics Institute(EBI)ツールボックス及びSmith(2002) Protein Sequencing Protocols [

2nd Ed.] Humana Pressも参照のこと。

【0316】

〔0343〕 同様の配列を見出すある可能性は、配列データベース検索を行うことである。ここで、1以上の配列をクエリーとして知られているものとして入れ得る。次に、統計学的コンピュータプログラムを用いて、このクエリー配列を、選択データベース中に存在する配列と比較する。このようなデータベースクエリー (blast 検索) は当業者にとって公知であり、様々な供給者で実行され得る。例えばNCBI (National Center for Biotechnology Information) においてこのようなデータベースクエリーが実行される場合、個々の比較クエリーに対する標準的な設定を使用すべきである。タンパク質配列比較 (blastp) の場合、これらの設定は、Limit entrez=作動させず；フィルター=低演算量作動；期待値=10；語長=3；マトリクス=BLOSUM62；ギャップコスト：Existence=11、Extension=1である。このようなクエリーの結果は、パラメーターの中でもとりわけ、クエリー配列とデータベースで見られる同様の配列との間の同一性の程度である。

10

【0317】

〔0344〕 VISTA及びVISTA複合物は、そのポリペプチドの機能断片を含む。そのポリペプチドの「機能断片」は、このVISTA及びVISTA複合物をコードする遺伝子又はcDNAの断片を含み、この断片は、免疫反応 (例えば液性又は細胞性免疫反応) を引き出すことが可能である。従って、例えば、抗原及びその断片の免疫原性に関連するアミノ酸残基に対応する、本発明によるVISTA及びVISTA複合物の断片は、免疫反応 (例えば液性又は細胞性免疫反応) を引き出すため、抗原として機能するために作用し得る。本発明のこの態様はまた、本発明によるポリペプチドの、差次的にスプライシングされたアイソフォーム及び転写開始も含む。本発明によるポリペプチドはまた、VISTA及びVISTA複合物の断片、誘導体及び対立遺伝子変異体も具備し得る。VISTAの断片及びVISTA複合ポリペプチドを作製するための方法及び材料は当技術分野で周知である。例えばManiatis, et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.] (Cold Spring Harbor Laboratory Press) を参照。

20

【0318】

〔0345〕 変異体VISTA及びVISTA複合ポリペプチドは、それらの個々の抗体を結合させる (例えば変異体VISTAポリペプチドと抗VISTA抗体が結合させられる。) ために、それらの抗原性特異性を保持し得る。完全に抗原性の変異体は、保存的变化又は重要でない残基もしくは重要でない領域における変化のみを含有し得る。抗原変異体はまた、抗原性を変化させないか又は顕著に変化させない同様のアミノ酸の置換も含有し得る。あるいは、このような置換は、ある程度まで抗原性に正又は負に影響を与え得る。非抗原性変異体は、一般的に、エピトープの重要な残基又は重要な領域において、1以上の非保存的アミノ酸置換、欠失、挿入、転位もしくは短縮化又は置換、挿入、転位もしくは欠失を含有する。それらの個々の抗体に対するポリペプチドの特異的な抗原性を保存しながらVISTA及びVISTA複合ポリペプチドを修飾するための分子生物学及び生化学技術は当技術分野で周知である。例えばHo, et al. (1989) Gene 77 (1): 51-59; Landt, et al. (1990) Gene 96 (1): 125-128; Hopp及びWoods (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (6): 3824-3828; Kolaskar及びTongonkar (1990) FEBS Letters 276 (1-2): 172-174; 及びWelling, et al. (1985) FEBS Letters 188 (2): 215-218を参照。

30

40

【0319】

〔0346〕 「VISTAアゴニスト (模倣体) 又はVISTAアンタゴニストの何れかとして機能するVISTAポリペプチドの変異体」。

50

【0320】

[0347] VISTAポリペプチドの変異体は、突然変異誘発、例えばVISTAポリペプチドの別々の点突然変異又は短縮化によって作製され得る。VISTAポリペプチドのアゴニストは、VISTAポリペプチドの天然型の生物学的活性の実質的に同じもの又はサブセットを保持し得る。VISTAポリペプチドのアンタゴニストは、例えば競合的にVISTAポリペプチドのVISTA介在性活性を調整することによって、VISTAポリペプチドの天然型の活性のうち1以上を阻害し得る。従って、特異的な生物学的効果は、限定機能の変異体での処置によって引き出され得る。例えば、VISTAポリペプチドの天然型での処置に関して対象においてあまり副作用がない、ポリペプチドの天然型の生物学的活性のサブセットを有する変異体で対象を処置し得る。

10

【0321】

[0348] VISTAアゴニスト（模倣体）又はVISTAアンタゴニストの何れかとして機能するVISTAポリペプチドの変異体は、VISTAポリペプチドアゴニスト又はアンタゴニスト活性に対してVISTAポリペプチドの突然変異体、例えば短縮化突然変異体、のコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって同定され得る。対象VISTA（PD-L3）結合物質で処置可能な疾患は既に同定されており、様々な炎症性、自己免疫、癌、アレルギー性及び感染性障害を含む。特に好ましい適応症は多発性硬化症である。

【0322】

ペプチド模倣物

20

[0349] 天然のアミノ酸のみからなるVISTAポリペプチドに加えて、VISTAペプチド模倣物も提供される。ペプチド類似体は、鋳型ペプチドの特性と類似した特性を有する非ペプチド薬として医薬工業において一般的に使用される。これらのタイプの非ペプチド化合物は「ペプチド模倣体」又は「ペプチド模倣物」と呼ばれ（Fauchere（1986）*Adv. Drug Res.* 15:29; *Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics* (Volume 2) Andrew Abell (Ed.) (1999) JAI Press, Inc. 及びEvans, et al. (1987) *J. Med. Chem.* 30:1229）、通常、コンピュータ化分子モデリングを利用して開発される。治療的に有用なペプチドと構造的に類似するペプチド模倣体は、同等の治療的又は予防効果を生じさせるために使用され得る。一般に、ペプチド模倣物は、ヒト又はマウスVISTAなど、パラダイムのポリペプチド（即ち生物学的又は薬理学的活性を有するポリペプチド）と構造的に類似するが、当技術分野で公知であり、次の参考文献中でさらに記載される方法によって、 $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ （シス及びトランス）、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 及び $-CH_2SO-$ からなる群から選択される連結により場合によっては置換される1以上のペプチド連結を有する：*Spatola in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins* Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); *Spatola, Vega Data* (March 1983), Vol. 1, Issue 3, “Peptide Backbone Modifications”; Morley (1980) *Trends. Pharm. Sci.* pp. 463-468; Hudson, et al. (1979) *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-185 ($-CH_2NH-$ 、 CH_2CH_2-); *Spatola, et al.* (1986) *Life. Sci.* 38:1243-1249 ($-CH_2-S-$); Hann, (1982) *J. Chem. Soc Perkin. Trans. I* 307-314 ($-CH-CH-$ 、シス及びトランス); *Almqvist, et al.* (1980) *J. Med. Chem.* 23:1392-1398 ($-COCH_2-$); *Jennings-White, et al.* (1982) *Tetrahedron Lett.* 23:2533 ($-COCH_2-$); ($-CH(OH)CH_2-$); *Holladay, et al.* (19

30

40

50

83) Tetrahedron. Lett. 24:4401-4404 (—C(OH)CH₂—); 及び Hruby (1982) Life Sci. 31:189-199 (—CH₂—S—)。特に好ましい非ペプチド連結は、—CH₂NH—である。このようなペプチド模倣体は、例えばより経済的な産生、より高い化学安定性、薬理特性向上（半減期、吸収、効力及び有効性）、特異性の変化（例えば広域スペクトルの生物学的活性）、抗原性低下などを含む、ポリペプチド実施形態を上回る重要な長所を有し得る。ペプチド模倣物の標識付加は通常、定量的構造—活性データ及び／又は分子モデリングにより予想されるペプチド模倣物上の非干渉位置に対する、直接的又はスパーサー（例えばアミド基）を通じた、1以上の標識の共有結合を伴う。このような非干渉位置は、一般にペプチド模倣物が結合して治療効果を生じさせる巨大分子との直接的接触を形成しない位置である。ペプチド模倣物の誘導体化（例えば標識付加）は、ペプチド模倣物の所望の生物学的又は薬理学的活性に実質的に干渉すべきではない。

10

【0323】

〔0350〕 より安定的なペプチドを生成させるために、同じタイプのD-アミノ酸でのVISTAアミノ酸配列の1以上のアミノ酸の系統的置換（例えばL-リジンの代わりにD-リジン）を使用し得る。さらに、VISTAアミノ酸配列又は実質的に同一である配列変異を具備する拘束ペプチドは、当技術分野で公知の方法により（Rizo及びGierasch (1992) Annu. Rev. Biochem. 61:387）、例えばペプチドを環状化させる分子内ジスルフィド架橋を形成可能な内部システイン残基を付加することによって、作製され得る。本明細書中で同定されるVISTAポリペプチドのアミノ酸配列によって、当業者はVISTAペプチド配列及びその配列変異体に対応するポリペプチドを作製できるようになる。このようなポリペプチドは、VISTAペプチド配列をコードするポリヌクレオチドの発現によって、多くはより大きいポリペプチドの一部として、原核又は真核宿主細胞中で産生され得る。あるいは、このようなペプチドは、化学的方法によって合成され得る。組み換え宿主中での異種ポリペプチドの発現のための方法、ポリペプチドの化学合成及びインビトロ翻訳は当技術分野で周知である。ある種のアミノ末端及び／又はカルボキシ末端修飾及び／又はコア配列に対するペプチド伸長によって、有益な物理学的、化学的、生化学的及び薬理学的特性、例えば安定性向上、効力及び／又は有効性増強、血清プロテアーゼに対する耐性、所望の薬物動態学的特性などがもたらされる。例えば患者において同時刺激を変化させることによって、疾患を処置するためにペプチドを治療的に使用し得る。

20

30

【0324】

〔0351〕 部位特異的突然変異誘発又はアラニンスキャニング突然変異誘発など、当技術分野で公知の方法によって、機能に必須であるアミノ酸が同定され得る。Cunningham, et al. (1989) Sci. 244:1081-85。後者の手順は、分子中の全残基で1個のアラニン突然変異を導入する。次に、エピトープ結合又はインビトロADCC活性などの生物学的活性について、得られる突然変異体分子を試験する。リガンド—受容体結合に重要である部位はまた、結晶学、核磁気共鳴又は光親和性標識などの構造分析によっても決定され得る。Smith, et al. (1992) J. Mol. Biol. 224:899-904; de Vos, et al. (1992) Sc

40

【0325】

〔0352〕 例えば、あるクラスの置換は、保存的アミノ酸置換である。このような置換は、VISTA及びVISTA複合ポリペプチド中のある種のアミノ酸を特徴が似ている別のアミノ酸で置換するものである。一般的には保存的置換として見られるものは、脂肪族アミノ酸Ala、Val、Leu及びIleの中であるものを別のもので置換すること；ヒドロキシル残基Ser及びThrの互換、酸性残基Asp及びGluの交換、アミド残基AsnとGlnとの間の置換、塩基性残基Lys及びArgの交換、芳香族残基Phe、Tyrの中での置き換えである。アミノ酸変化が表現型の面で変化しないと思われることに関する指針は、例えば、Bowie, et al. (1990) Sci. 247:

50

1306-10で見出される。ゆえに、当業者にとって当然のことながら、発明者らは、特異的な変異体全ての描写なく、ペプチド変異体を保持する。アミノ酸配列に関して、コードされる配列中の、1個のアミノ酸、アミノ酸の小さい割合を変化させるか、付加するか又は欠失させる、核酸、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質配列に対する個々の置換、欠失又は付加は、変化の結果、アミノ酸の化学的に類似したアミノ酸での置換が起こる、「保存的に修飾された変異体」であることを当業者は認めるであろう。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換表は当技術分野で周知である。このような保存的に修飾された変異体は、さらに、及び本発明の、多型性変異体、種間相同体及び対立遺伝子を排除しない。例えばCreighton(1992), *Proteins: Structures and Molecular Properties* [2nd Ed.] W. H. Freemanを参照。

10

【0326】

[0353] さらに、ポリペプチドは、20種類の「天然」アミノ酸以外のアミノ酸を含むことが多い。さらに、末端アミノ酸を含む多くのアミノ酸は、プロセッシング及び他の翻訳後修飾などの天然の過程により、又は当技術分野で周知の化学修飾技術により、修飾され得る。既知の修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスホチジイルノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニン化などのタンパク質へのアミノ酸のトランスファー-RNA介在性付加及びユビキチン化が挙げられるが限定されない。Creighton(1992) *Proteins: Structure and Molecular Properties* [2nd Ed.] 及びLundblad(1995) *Techniques in Protein Modification* [1st Ed.] を参照。多くの詳細な概説がこの対象において利用可能である。例えばWold(1983) *Posttranslational Covalent Modification of Proteins* Acad. Press, NY; Seifter, et al. (1990) *Meth. Enzymol.* 182: 626-46; 及びRattan, et al. (1992) *Ann. NY Acad. Sci.* 663: 48-62を参照。

20

30

【0327】

断片

[0354] VISTAポリペプチドの生物学的活性部分は、VISTA分子と非VISTA分子、例えばVISTAの天然のリガンドとの間の相互作用に関与するVISTAポリペプチドの断片を含む。VISTAポリペプチドの生物学的活性部分は、全長VISTAポリペプチドよりも少ないアミノ酸を含み、VISTAポリペプチドの少なくとも1つの活性を示す、VISTAポリペプチドのアミノ酸配列に対して十分に同一であるか又はそれ由来であるアミノ酸配列、例えば配列番号2、4又は5で示されるアミノ酸配列を具備するペプチドを含む。一般的には、生物学的活性部分は、少なくとも1つのVISTAポリペプチドの活性、例えば、抗CD3に対するCD4T細胞増殖反応を調整する(抑制する)、抗原特異的な方式での同種CD4T細胞の増殖反応の抑制、特異的なサイトカインの発現に対して影響があるドメイン又はモチーフを具備する。VISTAポリペプチドの生物学的活性部分は、例えば、25、50、75、100、125、150、175、200、225以上のアミノ酸長であるポリペプチドであり得る。VISTAポリペプチドの生物学的活性部分は、VISTA介在性活性、例えば免疫細胞活性化を調整する薬剤を開発するための標的として使用され得る。

40

【0328】

[0355] VISTAポリペプチドの生物学的活性部分は、細胞外ドメインの少なくとも

50

も一部分を具備し得る。V I S T Aポリペプチドの生物学的活性部分は、細胞外ドメイン少なくとも一部分（例えばI g Vを具備する。）及び次のドメインのうち1以上：シグナルペプチドドメイン、膜貫通ドメイン又は細胞質ドメインを含有し得る。さらに、組み換え技術によってポリペプチドの他の領域が欠失している他の生物学的活性部分を調製し、ネイティブV I S T Aポリペプチドの機能活性の1以上について評価し得る。

【0329】

〔0356〕 V I S T Aポリペプチドは、配列番号2、4又は5において示されるアミノ酸配列を有し得る。本明細書中で記載のように、V I S T Aポリペプチドは、配列番号2、4又は5に対して実質的に同一であり得、配列番号2、4又は5のポリペプチドの機能活性を保持し、さらに、天然の対立遺伝子変異又は突然変異誘発ゆえにアミノ酸配列が異なる。

10

【0330】

融合タンパク質

〔0357〕 V I S T A及びV I S T A複合ポリペプチドを具備する融合物もまた、本発明の範囲内である。例えば、この融合タンパク質は、V I S T A及びV I S T A複合ポリペプチド配列がG S T配列のC-末端に融合されているG S T融合タンパク質に連結され得る。このような融合タンパク質は、組み換えV I S T A及びV I S T A複合ポリペプチドの精製を容易にし得る。あるいは、V I S T A及びV I S T A複合ポリペプチドは、B細胞濾胞に結合し、従って液性免疫反応及びT細胞活性化の両方を開始させるタンパク質と融合させ得る。Berney, et al. (1999) J. Exp. Med. 190: 851-60。あるいは、例えば、V I S T A及びV I S T A複合ポリペプチドは、免疫系に抗原を送達し、細胞性免疫反応を刺激するために、抗樹状細胞抗体と遺伝学的にカップリングさせ得る。He, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 1920-27。標準的な組み換えDNA技術によって本発明のキメラ又は融合タンパク質を作製し得る。例えば、従来技術に従い、例えばライゲーションのための平滑末端化又は突出末端化、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて付着末端の充填、不要な連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理及び酵素ライゲーションを利用することによって、様々なポリペプチド配列をコードするDNA断片がインフレーションと一緒に連結される。自動DNA合成装置を含む従来技術によって融合遺伝子を合成し得る。

20

30

【0331】

〔0358〕 融合タンパク質は、C末端又はN末端転座配列を含み得る。さらに、融合タンパク質は、例えばタンパク質検出、精製又は他の適用のために、さらなるエレメントを具備し得る。検出及び精製を促進するドメインとしては、金属キレートペプチド、例えばポリヒスチジントラクト、ヒスチジントリプトファンモジュール又は固定化金属上での精製を可能とする他のドメイン；マルトース結合タンパク質；固定化免疫グロブリン上での精製を可能とするプロテインAドメイン；又はF L A G伸長／親和性精製系において利用されるドメイン（ImmuneX Corp, Seattle WA.）が挙げられるが限定されない。

【0332】

40

〔0359〕 融合タンパク質は、免疫グロブリンの定常領域を具備する免疫グロブリンの一部分との融合によって本発明のタンパク質から調製され得る。より好ましくは、この免疫グロブリンの一部分は、場合によっては及びより好ましくはヒト重鎖定常領域である重鎖定常領域を具備する。重鎖定常領域は、最も好ましくはI g G重鎖定常領域であり、場合によっては及び最も好ましくはF c鎖であり、最も好ましくはC H 2及びC H 3ドメインを具備するI g G F c断片である。あらゆるI g Gサブタイプを場合によっては使用し得るものの、I g G 1サブタイプが好ましい。F c鎖は、場合によっては既知の又は「野生型」F c鎖であり得るか、又はあるいは突然変異されているものであり得る。例えば米国特許出願公開第2006/0034852号を参照。「F c鎖」という用語はまた、場合によってはあらゆるタイプのF c断片も具備する。I g Gサブクラスにおける抗体定

50

常領域介在性活性に關与する特異的なアミノ酸残基のいくつかが同定されている。従って、これらの特異的なアミノ酸の組み入れ、置換又は排除によって、特異的な免疫グロブリン定常領域介在性活性の組み入れ又は排除が可能となる。さらに、特異的な変化の結果、例えばアグリコシル化及び／又はFc鎖に対する他の所望の変化が起こり得る。少なくとも一部の变化は、場合によっては、好ましくない免疫系効果など、好ましくないと考えられるFcの機能を遮断するために行われ得る。McCafferty, et al. (2002) *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Eds.) Oxford University Pressを参照。

【0333】

[0360] 転座ドメイン（効率的な形質膜発現のため）と新規翻訳ポリペプチドの残りの部分との間の、第Xa因子などの切断可能なリンカー配列の組み入れ（例えばOttavi, (1998) *Biochimie* 80:289-93を参照）、スブチリシンプロテアーゼ認識モチーフ（例えばPolyak (1997) *Protein Eng.* 10:615-19を参照）；エンテロキナーゼ（Invitrogen, San Diego, CA.）は、精製を容易にするために有用であり得る。例えば、あるコンストラクトは、チオレドキシンが続く6個のヒスチジン残基に連結される核酸配列をコードするポリペプチド、エンテロキナーゼ切断部位（例えばWilliams (1995) *Biochemistry* 34:1787-97を参照）及びC末端転座ドメインを含み得る。ヒスチジン残基は、検出及び精製を容易にし、一方でエンテロキナーゼ切断部位は、所望のタンパク質を融合タンパク質の残りの部分から精製するための手段を提供する。融合タンパク質をコードするベクター及び融合タンパク質の適用に属する技術は、科学文献及び特許文献で詳細に記載されている。例えばKroll (1993) *DNA Cell. Biol.* 12:441-53を参照。

【0334】

[0361] 融合タンパク質は、VISTA配列がGST配列のC-末端に融合されているGST-VISTA融合タンパク質であり得る。このような融合タンパク質は、組み換えVISTAの精製を促進し得る。別の実施形態において、融合タンパク質は、そのN-末端に異種シグナル配列を含有するVISTAポリペプチドである。ある種の宿主細胞（例えば哺乳動物宿主細胞）において、異種シグナル配列の使用を通じてVISTAの発現及び／又は分泌を向上させ得る。実施形態において、融合タンパク質は、VISTA配列がIg分子の一部分に融合されているIg-VISTA融合タンパク質である。融合タンパク質のIg部は、免疫グロブリン定常領域、例えばヒトCγ1ドメイン又はCγ4ドメイン（例えばヒトIgCγ1又はヒトIgCγ4の、ヒンジ、CH2及びCH3領域（例えば米国特許第5,116,964号；同第5,580,756号；同第5,844,095号を参照））を含み得る。得られる融合タンパク質は、VISTA溶解度、結合親和性、安定性及び／又は結合価（即ち分子あたりの結合部位数）が変化している場合があり、タンパク質精製の効率が上昇し得る。

【0335】

[0362] 特に好ましいVISTA-Ig融合タンパク質は、免疫グロブリン定常領域（例えばFc領域）にカップリングされたVISTAの細胞外ドメイン部分を含む。免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリン構造に固有のエフェクター活性を低下させるか又は排除する遺伝子修飾を含有し得る。例えば、VISTAポリペプチドの細胞外部分をコードするDNAは、例えばWO97/28267で教示されるように、部位特異的突然変異誘発により修飾されているヒトIgGγ1及び／又はIgGγ4のヒンジ、CH2及びCH3領域をコードするDNAに連結され得る。本発明のVISTA融合タンパク質は、医薬組成物に組み込まれ、インビボで対象に投与され得る。VISTA融合タンパク質は、VISTA結合パートナーのバイオアベイラビリティに影響を及ぼすために使用され得る。VISTA融合タンパク質の使用は、免疫反応の調整から恩恵を受ける状態又は障害の処置に対して治療的に有用であり得る。さらに、本発明のVISTA-融合タンパク質は、対象において抗VISTA抗体を産生させるために、VISTA-結合タンパク質を

精製するために、及びVISTAとその天然の結合パートナーとの相互作用を阻害する分子を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて、免疫原として使用され得る。

【0336】

複合物 (conjugates)

[0363] VISTA及びVISTA複合物、VISTA及びVISTA複合物に結合する抗体及びそれらの断片を他の部分と複合化させ得る。このような複合物は、ワクチンの調製において使用されることが多い。VISTA及びVISTA複合ポリペプチドを、樹状細胞及びマクロファージ上に存在するマンノース受容体により認識される炭水化物（例えばマンノース、フコース、グルコース、GlcNA、マルトース）に対して複合化させ得る。結果として生じる結合、凝集及び受容体介在性エンドサイトーシス及び食作用機能により、自然及び適応免疫性が促進される。Mahnke, et al. (2000) J. Cell Biol. 151:673-84; Dong, et al. (1999) J. Immunol. 163:5427-34を参照。

10

【0337】

[0364] 免疫反応を引き出すための複合化に適切な他の部分としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH)、ジフテリアトキシノイド、コレラトキシノイド、シェードモナスエキソプロテインA及び細菌外膜タンパク質 (OMPS) が挙げられるが限定されない。

【0338】

ポリペプチド単離

20

[0365] 本発明はまた、VISTA及びVISTA複合ポリペプチドの単離のための方法も提供する。例えば、関連細胞株又は腫瘍試料を癌患者から入手し得る。界面活性剤中でのホモジェナイズ処理及び可溶化後、抗原をクロマトグラフィーにより精製する。このためにサイズ排除又はアフィニティークロマトグラフィーを使用し得、抗VISTA及び抗VISTA-Ig複合抗体と合わせて使用し得る。例えば、抗VISTA又は抗VISTA-Ig複合抗体は、単純な抗原吸着、洗浄及び固体支持体からの溶出のために、固体支持体上に固定化（例えばレジン、磁気ビーズにカップリング）され得る。次に、溶出されたタンパク質をさらに抗原の存在、特徴評価及び同一性について決定する。Walker (2002) Protein Protocols Handbook [2nd Ed.] Humana Press and Culture (2003) [Ed.] Protein Purification Protocols Humana Pressを参照。

30

【0339】

[0366] このようにして単離された抗原は、従来の医薬賦形剤及び担体物質を使用して医薬を調製するために使用され得る。例えば、生理的NaCl溶液中での精製抗原のインビボ投与。

【0340】

[0367] さらに、本発明によるVISTA及びVISTA複合ポリペプチドは、ハイスループットスクリーニングの一部としての活性の同定において抗原となり得る。ハイスループットスクリーニング法は当業者にとって公知である。Wells (2002) High Throughput Bioanalytical Sample Preparation Elsevier Health Sciences。

40

【0341】

VISTA及びVISTA複合物をコードするポリヌクレオチド

[0368] 本発明はまた、VISTA及びVISTA複合物をコードするヌクレオチドも提供する。本発明はまた、VISTAポリペプチドをコードする配列番号1及び3の核酸配列を具備するポリヌクレオチドも提供する。本発明はまた、断片、本明細書中に記載のポリヌクレオチド配列とハイブリッド形成可能であり、本明細書中に記載のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、9

50

6 %、97 %、98 %、99 %又は100 %の配列相同性を有する配列も提供する。

【0342】

〔0369〕 本発明はまた、様々なコドン使用がある類似のポリペプチドをコードする少なくとも1つのVISTA及びVISTA複合物配列、無作為に又は標的を定めての何れかの、天然の又は人工的に誘導したかの何れかの1以上のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換など、突然変異を特徴とする改変配列を具備するポリヌクレオチドも提供する。本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドに特有である配列領域を含む、（例えば本発明のポリヌクレオチド配列の一部を形成する）相同核酸配列も包含する。

【0343】

〔0370〕 本発明はまた、VISTA及びVISTA複合ポリペプチドの相同体をコードする核酸も包含し、このような相同体は、初期設定パラメーターを使用して、National Center of Biotechnology Information (NCBI) のBlastPソフトウェアを用いて決定され得る場合、本明細書中で示されるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %又は100 %の同一相同性があり得る。本発明はまた、無作為に又は標的を定めての何れかの、天然の又は人工的に誘導したかの何れかの、1以上の核酸の欠失、挿入又は置換など、突然変異を有する上記のポリヌクレオチド及びポリペプチドの断片も包含する。

【0344】

〔0371〕 核酸分子は、VISTA及びVISTA複合物又はこの核酸分子の機能断片をコードし得る。この核酸の「機能断片」としては、このVISTA及びVISTA複合物をコードする遺伝子又はcDNAの断片が挙げられ、この断片は、免疫反応（例えばVISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する抗体）を引き出すことが可能であるVISTA及びVISTA複合物を産生させるために発現させることが可能である。従って、例えば、抗原の免疫原性に寄与するアミノ酸残基に対応する、及び、断片が、免疫反応（例えば液性又は細胞性免疫反応）を引き出すために抗原として機能するために役立ち得る、本発明によるVISTA及びVISTA複合物の断片。本発明のこの態様はまた、本発明による核酸の、差次的にスプライシングされるアイソフォーム及び転写開始も含む。本発明による核酸分子は、本発明によるVISTA及びVISTA複合物をコードする上記の核酸分子の断片、誘導体及び対立遺伝子変異体も具備する。VISTAの断片及びVISTA複合物をコードする核酸を作製するための方法及び材料は、当技術分野で周知である。例えばManiatis, et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照。

【0345】

〔0372〕 配列番号1、2、3、4又は5の配列に基づき設計された合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、配列番号1、3又はオルソログ又は変異体の全て又は一部を包含する核酸分子を単離し得る。

【0346】

〔0373〕 標準的なPCR増幅技術に従い、鋳型及び適切なオリゴヌクレオチドプライマーとしてcDNA、mRNA又は、あるいはゲノムDNAを用いて本発明の核酸分子を増幅させ得る。このように増幅された核酸分子を適切なベクターにクローニングし、DNA配列分析によって特徴評価し得る。さらに、標準的な合成技術によって、例えば自動DNA合成装置を用いて、VISTA（PD-L3）ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドを調製し得る。

【0347】

〔0374〕 一実施形態において、本発明の単離VISTAコード核酸分子は、配列番号1又は3で示されるヌクレオチド配列又はその断片を具備する。別の実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号1又は3で示されるヌクレオチド配列の相補体又はこれら

のヌクレオチド配列の何れかの一部である核酸分子を具備する。配列番号1又は3で示されるヌクレオチド配列と相補的である核酸分子は、それが、それぞれ配列番号1又は3で示されるヌクレオチド配列とハイブリッド形成し、それにより安定な2本鎖を形成し得るように、配列番号1又は3で示されるヌクレオチド配列に対して十分に相補的であるものである。

【0348】

〔0375〕 別の実施形態において、本発明の単離核酸分子は、配列番号1又は3で示されるヌクレオチド配列の全長又はこれらのヌクレオチド配列の何れかの一部と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%同一であるヌクレオチド配列を具備する。

10

【0349】

〔0376〕 さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1又は3の核酸配列の一部のみ、例えばプローブ又はプライマーとして使用され得る断片、又はVISTAポリペプチドの一部、例えばVISTAポリペプチドの生物学的活性部分をコードする断片のみを具備し得る。ヒトPD-L2遺伝子のクローニングから決定されるヌクレオチド配列によって、他のPD-L2ファミリーメンバーならびに他の種由来のVISTA相同体を同定し及び／又はクローニングすることにおける使用のために設計されるプローブ及びプライマーの作製が可能となる。プローブ／プライマーは、一般的に、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを具備する。オリゴヌクレオチドは、一般的に、配列番号1又は3のセンス配列；配列番号1、3又は、配列番号1又は3の天然の対立遺伝子変異体もしくは突然変異体のアンチセンス配列の少なくとも約12又は15、好ましくは約20又は25、より好ましくは約30、35、40、45、50、55、60、65又は75連続ヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリッド形成するヌクレオチド配列の領域を具備する。

20

【0350】

〔0377〕 ある実施形態において、本発明の核酸分子は、約50から100、100から150、150から200、200から250、250から300、300から350、350から400、400から450、450から500、500から550、550から600、600から650、650から700、700から750、750から800、800から850、850から900、900から950以上のヌクレオチド長より長いヌクレオチド配列を具備し、ストリンジェントなハイブリッド形成条件下で配列番号1又は3の核酸分子又はその相補体とハイブリッド形成する。さらなる実施形態において、本発明の核酸分子は、約880から900、900から950、950から1000、1000から1050、1050から1100、1100から1150以上のヌクレオチド長より長く、配列番号1又は3の核酸分子又はその相補体とストリンジェントなハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成する、ヌクレオチド配列を具備する。また別の実施形態において、本発明の核酸分子は、50から100、100から150、150から200、200から250、250から300以上のヌクレオチド長より長く、配列番号1又は3におけるコード領域を具備する核酸分子又はその相補体とストリンジェントなハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成する、ヌクレオチド配列を具備する。またさらなる実施形態において、本発明の核酸分子は、約50から100、100から150、150から200、200から250、250から300、300から350、350から400、400から450、450から500、500から550、550から600、600から650、650から700、700から750、750から800、850から900、900から950以上のヌクレオチド長より長いヌクレオチド配列を具備し、配列番号1又は3のコード領域を具備する配列又はその相補体の少なくとも約15（即ち15連続）ヌクレオチドを含み、配列番号1又は3で示されるヌクレオチド配列を具備する核酸分子、その相補体とストリンジェントな条件下でハイブリッド形成する。

30

40

【0351】

〔0378〕 転写産物又はそれと同じもしくは相同のポリペプチドをコードするゲノム配

50

列を検出するために、V I S T Aヌクレオチド配列に基づくプローブを使用し得る。実施形態において、このプローブは、それに連結される標識基をさらに具備し、例えば標識基は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素又は酵素補因子であり得る。このようなプローブは、対象からの細胞試料中のV I S T Aコード核酸のレベルを測定する、例えばV I S T A m R N Aレベルを検出するか又はゲノムV I S T A遺伝子に突然変異があるか又は欠失しているか否かを決定することなどによって、V I S T Aポリペプチドを誤って発現する細胞又は組織を同定するための診断検査キットの一部として使用され得る。

【0352】

〔0379〕 配列番号1及び3のV I S T Aヌクレオチド配列に加えて、当業者にとって当然のことながら、集団（例えばヒト集団）内には、V I S T Aポリペプチドのアミノ酸配列の変化につながるDNA配列多型性が存在し得る。V I S T A遺伝子におけるこのような遺伝子多型性は、天然の対立遺伝子変異により集団内の個体間で存在し得る。本明細書中で使用される場合、「遺伝子」及び「組み換え遺伝子」という用語は、V I S T Aポリペプチド、好ましくは哺乳動物V I S T Aポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子を指し、非コード制御配列及びイントロンをさらに含み得る。

10

【0353】

〔0380〕 ヒト又はマウスV I S T Aの対立遺伝子変異体は、機能的及び非機能的V I S T Aポリペプチドの両方を含む。機能的対立遺伝子変異体は、天然のV I S T A結合パートナーへの結合能及び／又はC D 4 +及びC D 8 + T細胞増殖及びサイトカイン産生及びリンパ球活性化の調節能を維持する、ヒト又はマウスV I S T Aポリペプチドの天然アミノ酸配列変異体である。機能的対立遺伝子変異体は、一般に配列番号2、4又は5の1以上のアミノ酸の保存的置換又は、そのポリペプチドの重要でない領域の重要でない残基の置換、欠失もしくは挿入のみを含有する。

20

【0354】

〔0381〕 非機能的対立遺伝子変異体は、天然のV I S T A結合パートナーへの結合能及び／又は本明細書中に記載のV I S T A活性の何れかの調節能の何れも持たない、ヒト又はマウスV I S T Aポリペプチドの天然アミノ酸配列変異体である。非機能的対立遺伝子変異体は、一般に配列番号2、4又は5のアミノ酸配列の、非保存的置換、欠失もしくは挿入又は未成熟の短縮化又は、そのポリペプチドの重要な残基又は重要な領域、例えばI g Vドメインにおける、置換、挿入又は欠失を含有する。

30

【0355】

〔0382〕 本発明は、ヒト又はマウスV I S T Aポリペプチドの非ヒト、非マウスオルソログをさらに提供する。ヒト又はマウスV I S T Aポリペプチドのオルソログは、非ヒト、非マウス生物から単離され、本明細書中で開示されるヒト及びマウスV I S T Aポリペプチドと同じ結合活性及び／又はリンパ球活性化—調整活性及びC D 4 +及びC D 8 + T細胞増殖及びサイトカイン産生の調整能を保持するポリペプチドである。ヒト又はマウスP D - L 3ポリペプチドのオルソログは、配列番号2、4又は5と実質的に同一であるアミノ酸配列を具備するので容易に同定され得る。

【0356】

〔0383〕 天然のV I S T A結合パートナーとの結合能及び／又は天然のV I S T A結合パートナーの活性調節能、細胞内又は細胞間シグナル伝達調整能、Tリンパ球の活性化調整能及び／又は生物の免疫反応調整能について突然変異体V I S T Aポリペプチドをアッセイし得る。

40

【0357】

〔0384〕 V I S T A又はV I S T A融合タンパク質をコードする単離核酸分子。少なくとも、非V I S T Aタンパク質、ポリペプチド又はペプチドをコードする第二のヌクレオチド配列に作動可能に連結されるV I S T A又はV I S T Aタンパク質、ポリペプチド又はペプチドをコードする第一のヌクレオチド配列を具備するこのような核酸分子は標準的な組み換えDNA技術によって調製され得る。

50

【0358】

〔0385〕 さらに、同一性は、関心のある核酸分子又はそれらによりコードされるタンパク質間に存在する機能的及び／又は構造的同等性を広く指す。上記の分子及びこれらの分子の構成誘導体と相同である核酸分子は、一般に、同じ生物学的機能を排除する修飾を構成するこれらの分子の変異体である。同時に、変異が天然に起こり得、例えばこれらは他の種からの配列であり得るか、又はこれらは突然変異体であり得、これらの突然変異体は、天然に生じたものであり得るか、又は目的とする突然変異誘発により誘導されたものであり得る。変異はまた合成により作製された配列でもあり得る。対立遺伝子変異体は、天然の変異体及びまた合成により作製された変異体の両方又は組み換えDNA技術により作製された変異体であり得る。遺伝コードの縮重により本発明による核酸分子から逸脱する核酸分子は、誘導体の特別な型を構成する。

10

【0359】

〔0386〕 VISTA及びそのVISTA複合物のアミノ酸配列をコードする何らかのヌクレオチド配列も、本発明の範囲内に含まれる。遺伝コードが縮重しているので、特定のアミノ酸をコードするために複数のコドンが使用され得る。遺伝コードを用いて、それぞれがアミノ酸をコード可能である、1以上の様々なヌクレオチドを同定し得る。特定のヌクレオチドが実際に実際のコドンコード配列を構成する可能性は、異常な塩基対形成関係及びVISTA及びそのVISTA複合物を発現する真核又は原核細胞において（特定のアミノ酸をコードするために）特定のコドンが実際に使用される頻度を考慮することにより推定され得る。このような「コドン使用規則」は、Lathé, et al. (1985) J. Molec. Biol. 183:1-12により開示される。

20

【0360】

修飾VISTA及びVISTA複合ポリヌクレオチド

〔0387〕 本発明のヌクレオチドは、修飾ポリヌクレオチドであり得る。一部の適用において、非修飾ヌクレオチドは最適性が低いことが多く、例えば細胞性ヌクレアーゼにより分解され易い傾向がある。オリゴヌクレオチドのサブユニットの1以上に対する化学的修飾は、特性向上を付与し得、例えばポリヌクレオチドをヌクレアーゼに対してより安定にし得る。典型的なオリゴヌクレオチド修飾は当技術分野で周知であり、(i) 改変、例えば、ホスホジエステル糖間結合における、非連結リン酸酸素の一方又は両方の及び／又は連結リン酸酸素の1以上の置き換え；(ii) 改変、例えばリボース糖の成分の置き換え、例えばリボース糖上の2'ヒドロキシルの修飾又は置き換え；(iii) リン酸部分の大規模な置き換え；(iv) 非天然塩基での天然塩基の修飾又は置き換え；(v) 例えばペプチド核酸(PNA)でのリボースーリン酸バックボーンの置き換え又は修飾；(vi) オリゴヌクレオチドの3'末端又は5'末端の修飾；及び(vii) 糖、例えば六員環の修飾のうち1以上を含み得る。本発明に従い使用されるポリヌクレオチドは、当技術分野で周知のあらゆる多くの手段により合成され得るか、又は様々な市販業者から購入し得る(LC Sciences, Houston, TX; Promega, Madison, WI; Invitrogen, Carlsbad, CA)。

30

【0361】

アンチセンス

40

〔0388〕 上記のVISTAポリペプチドをコードする核酸分子に加えて、本発明の別の実施形態は、それに対してアンチセンスである単離核酸分子に属する。「アンチセンス」核酸は、ポリペプチドをコードする「センス」核酸に相補的である、例えば2本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的である、又はmRNA配列に相補的である、ヌクレオチド配列を具備する。従って、アンチセンス核酸はセンス核酸に水素結合し得る。アンチセンス核酸は、VISTAコード鎖全体に、又はその一部にのみ相補的であり得る。ある実施形態において、アンチセンス核酸分子は、VISTAをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。「コード領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを具備するヌクレオチド配列の領域を指す。別の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、PD-Lをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「

50

非コード領域」に対してアンチセンスである。「非コード領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されないコード領域（5'及び3'非翻訳領域とも呼ばれる。）に隣接する5'及び3'配列を指す。ヒト又はマウスVISTA又は本明細書中で開示されるVISTAをコードするコード鎖配列を考えると、ワトソン及びクリック塩基対形成の規則に従い、本発明のアンチセンス核酸を設計し得る。アンチセンス核酸分子は、VISTA mRNAのコード領域全体に対して相補的であり得るが、より好ましくは、VISTA mRNAのコード又は非コード領域の一部に対してのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、VISTA又はVISTA mRNAの翻訳開始部位の周囲の領域に対して相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45又は50ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸分子は、当技術分野で公知の手順を使用して、化学合成及び酵素性ライゲーション反応を用いて構築され得る。例えば、天然のヌクレオチド又は、分子の生物学的安定性を向上させるために、もしくはアンチセンスとセンス核酸との間で形成される2本鎖の物理学的安定性を向上させるために設計された、様々に修飾されたヌクレオチドを用いて、アンチセンス核酸分子（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）が化学的に合成され得、例えばホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチドを使用し得る。アンチセンス核酸を作製するために使用され得る修飾ヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン-e、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β-D-ガラクトシルクエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキシン、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、(acp3)w及び2, 6-ジアミノプリンが挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクロニングされている（即ち挿入された核酸から転写されるRNAは関心のある標的核酸のアンチセンス方向のものである。次のサブセクションでさらに記載）発現ベクターを用いて生物学的に産生され得る。

【0362】

[0389] 本発明のアンチセンス核酸分子は、一般的に、対象に対して投与されるか、又はそれらがVISTA又はVISTAポリペプチドをコードする細胞性mRNA及び／又はゲノムDNAとハイブリッド形成するか又は結合するようにインシトゥで作製され、それにより、例えば転写及び／又は翻訳を阻害することによってポリペプチドの発現を阻害する。ハイブリッド形成は、安定的な2本鎖を形成するための従来のヌクレオチド相補性によるもの、又は、例えばDNA2本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝における特異的な相互作用を通じたものであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位への直接的な注射が挙げられる。あるいは、選択細胞を標的とするためにアンチセンス核酸分子を修飾し、次いで全身的に投与し得る。例えば、全身性投与の場合、例えばアンチセンス核酸分子を、細胞表面受容体又は抗原に結合するペプチド又は抗体と連結させることによって、アンチセンス分子が選択された細胞の表面上で発現される受容体又は抗原に特異的に結合するように、アンチセンス分子を修飾し得る。本明細書中に記載のベクターを用いてアンチセンス核酸分子を細胞に送達することもできる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、強いpol

10

20

30

40

50

II又はpol IIIプロモーターの調節下にアンチセンス核酸分子が置かれるベクターコンストラクトが好ましい。

【0363】

[0390] VISTAアンチセンス核酸分子は α -アノマー核酸分子であり得る。 α -アノマー核酸分子は、通常の β -ユニットと異なり、鎖が互いに平行に伸びる相補的RNAと特異的な2本鎖ハイブリッドを形成する。Gaultier, et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 6625-6641。アンチセンス核酸分子はまた、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoue, et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 6131-6148)又はキメラRNA-DNA類似体(Inoue, et al. (1987) FEBS Lett. 215: 327-330)も具備し得る。

10

【0364】

[0391] VISTAアンチセンス核酸はリボザイムであり得る。リボザイムは、それらが相補的領域を有する1本鎖核酸、例えばmRNAなど、を切断可能であるリボヌクレアーゼ活性がある触媒性RNA分子である。従って、VISTA mRNA転写産物を触媒的に切断し、それによりVISTA mRNAの翻訳を阻害するために、リボザイム(例えばハンマーヘッド型リボザイム(Haseloff及びGerlach (1988) Nature 334: 585-591において記載))を使用し得る。本明細書中で開示されるVISTA cDNAのヌクレオチド配列(即ち配列番号1又は3)に基づき、VISTAコード核酸に対する特異性を有するリボザイムを設計し得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、VISTAコードmRNAにおいて切断されるべきヌクレオチド配列に対して相補的である、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体を構築し得る。例えば米国特許第4,987,071号及び米国特許第5,116,742号を参照。あるいは、RNA分子のプールから特異的なリボヌクレアーゼ活性を有する触媒的RNAを選択するために、VISTA mRNAを使用し得る。例えばBartel及びSzostak (1993) Science 261: 1411-1418を参照。

20

【0365】

[0392] あるいは、VISTAの制御領域(例えばVISTAプロモーター及び/又はエンハンサー)に対して相補的なヌクレオチド配列を標的化して標的細胞においてPD-L3遺伝子の転写を妨害する三重らせん構造を形成させることによって、VISTA遺伝子発現を阻害し得る。全般的に、Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, et al. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; 及びMaher, L. J. (1992) Bioessays 14(12): 807-15を参照。

30

【0366】

ペプチド核酸

[0393] また別の実施形態において、例えば分子の、安定性、ハイブリッド形成又は溶解度を向上させるために、塩基部分、糖部分又はリン酸バックボーンにおいて本発明のVISTA核酸分子を修飾し得る。例えば、ペプチド核酸を作製するために、核酸分子のデオキシリボースリン酸バックボーンを修飾し得る。Hyrup及びNielsen (1996) Bioorg. Med. Chem. 4(1): 5-23を参照。本明細書中で使用される場合、「ペプチド核酸」又は「PNA」という用語は、デオキシリボースリン酸バックボーンがシュードペプチドバックボーンにより置き換えられ、4個の天然の核酸塩基のみが保持される、核酸模倣物、例えばDNA模倣物を指す。PNAの中性バックボーンは、低イオン強度の条件下でDNA及びRNAとの特異的なハイブリッド形成を可能にすることが示された。Hyrup及びNielsen (1996) 上出及びPerry-O'Keefe, et al. (1996) Proc Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675に記載のような標準的な固相ペプチド合成プロトコルを用いてPNAオリゴマーの合成を行い得る。

40

【0367】

50

〔0394〕 治療及び診断適用においてV I S T A核酸分子のP N Aを使用し得る。例えば、例えば転写又は翻訳停止を誘導するか又は複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的な調整のために、アンチセンス又は抗原物質としてP N Aスキャンを使用し得る。V I S T A核酸分子のP N Aは、他の酵素（例えばS 1ヌクレアーゼ）と組み合わせて使用される場合、「人工的制限酵素」として（H y r u p及びN i e l s e n（1996）上出）；又はDNA配列決定又はハイブリッド形成のためのプローブ又はプライマーとして（H y r u p及びN i e l s e n（1996）上出；P e r r y-O'K e e f e, et al.（1996）上出）、遺伝子における1塩基対突然変異の分析（例えばP N Aに対するP C Rクランピングによって）においても使用し得る。

【0368】

〔0395〕 脂溶性又は他のヘルパー基をP N Aに連結することによって、P N A-D N Aキメラの形成によって、又は当技術分野で公知の薬物送達のリボソームもしくは他の技術の使用によって、V I S T AのP N Aを修飾し得る（例えばそれらの安定性又は細胞性取り込みを促進するために）。例えば、P N A及びD N Aの有利な特性を組み合わせ得るV I S T A核酸分子のP N A-D N Aキメラを作製し得る。このようなキメラは、P N A部分が高い結合親和性及び特異性を提供しながら、D N A認識酵素（例えばR N A s e H及びD N Aポリメラーゼ）がD N A部分と相互作用することを可能とする。P N A-D N Aキメラは、塩基スタック、核酸塩基間の結合数及び方向に関して選択される適切な長さのリンカーを用いて連結され得る（H y r u p及びN i e l s e n（1996）上出）。P N A-D N Aキメラの合成は、H y r u p及びN i e l s e n（1996）上出及びF i n n P. J., et al.（1996）N u c l e i c A c i d s R e s. 24（17）：3357-63に記載のように行われ得る。例えば、標準的なホスホラミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上でD N A鎖を合成し得、修飾ヌクレオチド類似体、例えば5'-（4-メトキシトリチル）アミノ-5'-デオキシチミジンホスホラミダイトをP N AとD N Aの5'末端との間で橋として使用し得る（M a g, M., et al.（1989）N u c l e i c A c i d s R e s. 17：5973-88）。次に、5' P N Aセグメント及び3' D N Aセグメントを用いてキメラ分子を作製するために、段階的にP N A単量体をカップリングする（F i n n P. J., et al.（1996）上出）。あるいは、5' D N Aセグメント及び3' P N Aセグメントを用いてキメラ分子を合成し得る（P e t e r s e r, et al.（1975）B i o o r g a n i c M e d. C h e m. L e t t. 5：1119-11124）。

【0369】

オリゴヌクレオチド

〔0396〕 オリゴヌクレオチドは、ペプチド（例えばインビボで宿主細胞受容体を標的化するため）又は細胞膜（例えばL e t s i n g e r, et al.（1989）P r o c N a t l. A c a d. S c i. U S A 86：6553-6556；L e m a i t r e, et al.（1987）P r o c N a t l. A c a d. S c i. U S A 84：648-652；P C T公開番号W O 88/09810を参照）又は脳血管関門（例えばP C T公開番号W O 89/10134を参照）を横切る輸送を促進する薬剤などの他の追加基を含み得る。さらに、ハイブリッド形成を誘発する切断剤（例えばK r o l, et al.（1988）B i o t e c h n i q u e 6：958-976を参照）又は挿入剤（例えばZ o n（1988）P h a r m. R e s. 5：539-549を参照）でオリゴヌクレオチドを修飾し得る。この目的のために、別の分子（例えばペプチド、ハイブリッド形成誘発架橋剤、輸送剤又はハイブリッド形成誘発切断剤）にオリゴヌクレオチドを複合化し得る。

【0370】

s i R N A

〔0397〕 低分子干渉RNA（s i R N A）は、特異的なm R N Aに結合し、それをm R N A分解に向け、従って遺伝子の転写（例えば発現）を抑制する、通常約20から25ヌクレオチド長の2本鎖RNA分子のクラスである。H a m i l t o n及びB a u l c o m

10

20

30

40

50

be (1999) Science 286 (5441): 950-2 及び Elbashir, et al. (2001) Nature 411 (6836): 494-8 を参照。メッセンジャーRNAを破壊することによって遺伝子が機能タンパク質を産生するのを阻止する、リボザイム又はRNA干渉 (siRNA) 技術を利用することも可能である。siRNA分子は、配列番号1又は3の核酸配列を具備するVISTA DNAから転写されるVISTA mRNAに結合し得る。siRNA分子は、配列番号2、4又は5で示されるアミノ酸配列をコードするVISTA DNAから転写されるVISTA mRNAに結合し得る。

【0371】

[0398] VISTA DNAから転写されるVISTA mRNAを標的とするsiRNA分子は、配列番号1又は3の核酸配列を具備し得る。配列番号2、4又は5で示されるアミノ酸配列をコードするVISTA DNAから転写されるVISTA mRNAを標的とするsiRNA分子。VISTAを標的とするsiRNA分子は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列を具備し得る。VISTAのORF又はUTR領域の何れかを標的とするsiRNA分子は、配列番号38から47の何れか1つのアミノ酸配列を具備し得る。VISTAのUTR領域のみを標的とするsiRNA分子は、配列番号48から57の何れか1つのアミノ酸配列を具備し得る。VISTAのORF領域のみを標的とするsiRNA分子は、配列番号58から67の何れか1つのアミノ酸配列を具備し得る。VISTAを標的とするsiRNA分子は、配列番号38から67の何れか1つの核酸配列からなり得る。VISTAのORF又はUTR領域の何れかを標的とするsiRNA分子は、配列番号38から47の何れか1つのアミノ酸配列からなり得る。VISTAのUTR領域のみを標的とするsiRNA分子は、配列番号48から57の何れか1つのアミノ酸配列からなり得る。VISTAのORF領域のみを標的とするsiRNA分子は、配列番号58から67の何れか1つのアミノ酸配列からなり得る。

10

20

【表 1】

表 1 : ヒト V I S T A に対する s i R N A

siRNA配列	VISTAの標的領域	配列番号
GGGCACGATGTGACCTTCTACAAGA	ORF	38
CAGATGCCAAATGACTTACATCTTA	UTR3	39
GAGATGGATTGTAAGAGCCAGTTTA	UTR3	40
GGGCTTTGAGGAGAGGGTAAACATA	UTR3	41
CCTATCTCCTGACATTCACAGTTTA	UTR3	42
CAGTTTAATAGAGACTTCCTGCCTT	UTR3	43
CAGGGAGAGGCTGAAGGAATGGAAT	UTR3	44
GGAATGTGTTGAGAGGGATTCTGAA	UTR3	45
GAGAGGGATTCTGAATGATCAATAT	UTR3	46
CACAGAGGGCAATAGAGGTTCTGAA	UTR3	47
CAGATGCCAAATGACTTACATCTTA	UTR3	48
GAGATGGATTGTAAGAGCCAGTTTA	UTR3	49
GGTGAGTCCTCTGTGGAATTGTGAT	UTR3	50
GGGCTTTGAGGAGAGGGTAAACATA	UTR3	51
CCTATCTCCTGACATTCACAGTTTA	UTR3	52
CAGTTTAATAGAGACTTCCTGCCTT	UTR3	53
CAGGGAGAGGCTGAAGGAATGGAAT	UTR3	54
GGAATGTGTTGAGAGGGATTCTGAA	UTR3	55
GAGAGGGATTCTGAATGATCAATAT	UTR3	56
CACAGAGGGCAATAGAGGTTCTGAA	UTR3	57
ACAAAGGGCAGATGTGACCTTCTA	ORF	58
GGGCACGATGTGACCTTCTACAAGA	ORF	59
GACCACCATGGCAACTTCTCCATCA	ORF	60
CAGACAGGCAAAGATGCACCATCCA	ORF	61
GGCAAAGATGCACCATCCAAGTGTG	ORF	62
CCATCCAAGTGTGTTGTTACCAT	ORF	63
GGATGGACAGCAACATTCAAGGGAT	ORF	64
GACAGCAACATTCAAGGGATTGAAA	ORF	65
CCCTGTCCCTGACTCTCCAACTTT	ORF	66
CCTGACTCTCCAACTTTGAGGTCA	ORF	67

発現

〔0399〕 本発明の V I S T A 及び V I S T A 複合物の単離及び発現は、本願で開示される V I S T A 及び V I S T A 複合物核酸配列に基づいて構築されるプローブ又はプライマーを用いて確立したクローニング手順によってなされ得る。本明細書中で開示される配列及び既知のコンピュータに基づく検索技術、例えば B L A S T 配列検索を使用して、ヒト又は他の種のゲノムデータベースから、関連 V I S T A 及び V I S T A 複合物配列も同定され得る。機能対立遺伝子又は関連遺伝子を同定するために、本明細書中で開示される偽遺伝子を使用し得る。

【 0 3 7 2 】

〔0400〕 次に、これらの配列の機能発現のために宿主細胞に感染させるか又は遺伝子移入するために、発現ベクターを使用し得る。これらの遺伝子及びベクターをインビトロ又はインビボで作製し、発現させ得る。本発明のベクター内の遺伝子及び核酸（例えばプロモーター、エンハンサー）の発現又は活性を調整することによって、核酸発現を改変し、調節するための所望の表現型を得ることができることを当業者は認めるであろう。発現又は活性を増減させるために記載されるあらゆる公知の方法を使用し得る。

【0373】

〔0401〕 別の実施形態において、組み換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において選択的に核酸の発現を支配可能である（例えば組織特異的な制御エレメントを使用して、核酸を発現させる。）。組織特異的な制御エレメントは当技術分野で公知である。適切な組織特異的なプロモーターの非限定例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkert, et al. (1987) *Genes Dev.* 1:268-277）、リンパ系特異的なプロモーター（Calame及びEaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275）、T細胞受容体（Winoto及びBaltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733）及び免疫グロブリン（Banerji, et al. (1983) *Cell* 33:729-740；Queen及びBaltimore (1983) *Cell* 33:741-748）の特定のプロモーター、ニューロン特異的なプロモーター（例えば神経フィラメントプロモーター；Byrne及びRuddle (1989) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477）、膵臓特異的なプロモーター（Edlund, et al. (1985) *Science* 230:912-916）及び乳腺特異的なプロモーター（例えば乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号及び欧州出願公開第264,166号）が挙げられる。発生的に制御されるプロモーターはまた、例えばマウスホックスプロモーター（Kessel及びGruss (1990) *Science* 249:374-379）及びα-フェトタンパク質プロモーター（Campey及びTilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546）によっても包含される。

10

20

【0374】

〔0402〕 本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列は、酵素性合成又は固相合成など、当技術分野で公知の何らかのオリゴヌクレオチド合成方法に従い作製され得る。固相合成を実行するための装置及び試薬は、例えば、Applied Biosystemsから市販されている。このような合成のための何らかの他の手段も使用し得；ポリヌクレオチドの実際の合成は十分に当業者の能力の範囲内である。例えばManiatis, et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3rd Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press；Swamy (2008) *Laboratory Manual on Biotechnology* Rastogi Publications；Herdewijn (2005) [Ed.] *Methods in Molecular Biology: Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications Volume 288* Humana Press；及びRapley (2000) [Ed.] *The Nucleic Acid Protocols Handbook* Humana Pressを参照。次に、相補鎖を合成し、適切な条件下でその鎖と一緒にアニーリングするか又は適切なプライマー配列を用いてDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を付加するかの何れかによって、2本鎖DNA断片を得ることができる。

30

【0375】

〔0403〕 核酸の操作のための、例えば配列において突然変異を生成させる、サブクローニング、プローブへの標識付加、配列決定、ハイブリッド形成のための技術は科学文献及び特許文献で詳細に記載されている。例えばSambrook, et al. (2001) (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory；Ausubel, et al. (2011) Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York；Tijssen (1993) [Ed.] *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I, Theory and Nucleic*

40

50

Acid Preparation, Elsevier, NYを参照。

【0376】

[0404] ハイブリッド形成及びハイブリッド形成強度（例えばポリヌクレオチド間の会合強度）は、塩濃度、他の要素の存在（例えばポリエチレングリコールの有無）、ハイブリッド形成鎖のモル濃度及びポリヌクレオチド鎖のG+C含量などの条件によって影響を受ける、ポリヌクレオチド間の相補性の度合い及び、関与する条件のストリンジェンシー含む当技術分野で周知の多くの要因により影響を及ぼされ得、これらの要因全てから、形成されるハイブリッドの特徴となる溶融温度（ T_m ）がもたらされる。核酸ハイブリッド形成の技術は、Sambrook, et al. (2001) (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3rd Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory及びHaynes, et al. (1985) in *Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach* (IRL Press, DC)によって開示される。ハイブリッド形成洗浄条件としては、0.2xSSC/0.1%SDSの洗浄溶液及び室温で10分間の回転を伴う温置（低ストリンジェンシー洗浄）、予め温めた（42℃）0.2xSSC/0.1%SDSの洗浄溶液及び42℃で15分間の回転を伴う温置（中程度のストリンジェンシー洗浄）及び予め温めた（68℃）0.1xSSC/0.1%SDSの洗浄溶液及び68℃で15分間の回転を伴う温置（高ストリンジェンシー洗浄）が挙げられ得る。Ausubel, et al. (2011) [Ed.] *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Incを参照。

【0377】

[0405] VISTA及びVISTA複合物をコードする核酸を増幅するために、オリゴヌクレオチドプライマーを使用し得る。増幅技術を用いて本明細書中に記載の核酸をクローニング又は定量的に測定することもできる。増幅方法は当技術分野で周知であり、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（Innis (1990) [Ed.] *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, NY.; Innis (1995) [Ed.] *PCR Strategies*, Academic Press, Inc., NY.); リガーゼ連鎖反応（LCR）（Wu (1989) *Genomics* 4:560; Landegren (1988) *Science* 241:1077; Barringer (1990) *Gene* 89:117); 転写増幅（Kwoh (1989) *PNAS* 86:1173); 自律的配列複製（Guatelli (1990) *PNAS* 87:1874); Q-βレプリカーゼ増幅（Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35:1477-91); 自動化Q-βレプリカーゼ増幅アッセイ（Burg (1996) *Mol. Cell. Probes* 10:257-71); 及び他のRNAポリメラーゼ介在技術（例えばNASBA, Cengage, Mississauga, Ontario）が挙げられる。Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:307-16; Sambrook, et al. (2001) (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011) [Ed.] *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York; Maniatis, et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3rd Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press; 米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号; Sooknanan (1995) *Biot technology* 13:563-64も参照。

【0378】

[0406] 変性プライマー対を設計するためのパラダイムは当技術分野で周知である。

例えば、共通縮重ハイブリッドオリゴヌクレオチドプライマー (CODEHOP) ストラテジーコンピュータプログラムは容易に利用可能であり、本明細書中で提供される VISTA 及び VISTA 複合物配列など、一連の関連タンパク質配列で開始して、ハイブリッドプライマー予測のために BlockMaker 多重配列アラインメントサイトから直接リンクする。例えば Rose (1998) Nucleic Acids Res. 26: 1628-35; Singh (1998) Biotechniques 24: 318-19 を参照。

【0379】

[0407] 上記の核酸プローブを用いて、本明細書中で開示される VISTA 及び VISTA 複合物と実質的に同一である、多型性変異体、対立遺伝子及び種間相同体を単離し得る。あるいは、VISTA 又は VISTA 複合物相同体も認識し、それと選択的に結合する、VISTA 及び VISTA 複合物に対して作製された抗血清又は精製抗体を用いて免疫学的に発現される相同体を検出することによって、VISTA 及び VISTA 複合物及び、その多型性変異体、対立遺伝子及び種間相同体をクローニングするために、発現ライブラリを使用し得る。

10

【0380】

[0408] 適切な (完全又は縮重) プライマー対を用いて適切な核酸配列の増幅 (例えば PCR) によって、VISTA 及び VISTA 複合物をコードする核酸を作製し得る。増幅された核酸は、何らかの細胞もしくは組織由来のゲノム DNA 又は、VISTA 又は VISTA 複合物発現細胞由来の mRNA もしくは cDNA であり得る。宿主細胞中での異種配列の発現のための方法は当技術分野で周知である。例えば Maniatis, et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3rd Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press を参照。

20

【0381】

VISTA 及び VISTA 複合物を具備する融合プロテイン

[0409] 転座配列に融合された VISTA 及び VISTA 複合物をコードする核酸を具備するハイブリッドタンパク質コード配列を構築し得る。モチーフ及び抗原性領域を具備するハイブリッド VISTA 及び VISTA 複合物も提供される。これらの核酸配列は、転写又は翻訳調節エレメント、例えば転写及び翻訳開始配列、プロモーター及びエンハンサー、転写及び翻訳終結因子、ポリアデニル化配列及び DNA を RNA に転写するのに有用な他の配列に作動可能に連結され得る。組み換え発現カセットの構築において、全ての所望の細胞又は組織における所望の核酸の発現を支配するために、ベクター及びトランスジェニック、プロモーター断片を使用し得る。

30

【0382】

[0410] 融合タンパク質は、C 末端又は N 末端転座配列を具備し得る。さらに、融合タンパク質は、例えばタンパク質検出、精製又は他の適用のための付加的エレメントを具備し得る。検出及び精製を容易にするドメインとしては、例えば金属キレートペプチド、例えばポリヒスチジントラクト、ヒスチジン-トリプトファンモジュール又は固定化金属上での精製を可能にする他のドメインなど; マルトース結合タンパク質; 固定化免疫グロブリン上での精製を可能とするプロテイン A ドメイン; 又は FLAG 伸長/親和性精製系において利用されるドメイン (ImmuneX Corp, Seattle WA.) が挙げられる。

40

【0383】

[0411] 転座ドメイン (効率的な形質膜発現のため) と新規翻訳ポリペプチドの残りの部分との間の、第 Xa 因子などの切断可能なリンカー配列の組み入れ (例えば Ottavio, (1998) Biochimie 80: 289-93 を参照)、スプチリシンプロテアーゼ認識モチーフ (例えば Polyak (1997) Protein Eng. 10: 615-19 を参照); エンテロキナーゼ (Invitrogen, San Diego, CA.) は、精製を容易にするために有用であり得る。例えば、あるコンストラク

50

トは、チオレドキシンが続く6個のヒスチジン残基に連結される核酸配列をコードするポリペプチド、エンテロキナーゼ切断部位（例えばWilliams (1995) Biochemistry 34:1787-97を参照）及びC末端転座ドメインを含み得る。ヒスチジン残基は、検出及び精製を容易にし、一方でエンテロキナーゼ切断部位は、所望のタンパク質を融合タンパク質の残りの部分から精製するための手段を提供する。融合タンパク質をコードするベクター及び融合タンパク質の適用に属する技術は、科学文献及び特許文献で詳細に記載されている。例えばKroll (1993) DNA Cell. Biol. 12:441-53を参照。

【0384】

VISTA及びVISTA複合物の組み換え発現のための系

10

[0412] リガンドー結合領域コード配列を具備する、個別の発現ベクターとして、又は発現ベクターのライブラリとしての何れかの発現ベクターは、科学文献及び特許文献において詳細に記載されている様々な従来技術によって、ゲノム又は細胞質又は細胞核に導入され、発現され得る。例えばSambrook, et al. (2001) [Eds.] Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011) [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. を参照。

【0385】

20

[0413] 細胞において安定して又は一過性に発現される発現カセット、ベクター又はウイルスにおいて、核酸を発現させ得る（例えばエピソーム性発現系）。形質転換された細胞及び配列に選択可能な表現型を付与するために、発現カセット及びベクターに選択マーカーが組み込まれ得る。例えば、宿主ゲノムへの統合が必要でないように、選択マーカーは、エピソーム維持及び複製をコードし得る。例えば、マーカーは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の選択を可能にするために、抗生物質耐性（例えばクロラムフェニコール、カナマイシン、G418、ブレオマイシン、ハイグロマイシン）又は除草剤耐性（例えばクロロスルフロン又はBasta）をコードし得る。例えばAusubel, et al. (2011) [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.; 及びWalker及びPapley (2009) Molecular Biology and Biotechnology [5th Ed.] Royal Society of Chemistryを参照。ネオマイシン又はハイグロマイシンのような基質に耐性を付与する選択可能マーカー遺伝子は組織培養でのみ利用され得るので、インビトロ及びインビボで選択可能マーカーとして化学療法耐性遺伝子も使用される。

30

【0386】

[0414] 本発明のポリヌクレオチドの細胞性発現を可能にするために、上記核酸配列のうち1つの少なくともコード領域を含み、さらに少なくとも1つのシス作用性制御エレメントを含む本発明による核酸コンストラクトを使用し得る。好ましくは、本発明の核酸コンストラクトにより利用されるプロモーターは、形質転換された特異的な細胞集団において活性がある。細胞型特異的な及び／又は組織特異的なプロモーターの例は、当技術分野で周知である。Bernardi (2003) [Ed.] Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells Volume 38 Elsevier Science B.V. を参照。本発明の核酸コンストラクトは、プロモーター配列に隣接するか又は遠位にあり得、そこからの転写を上方制御することにおいて機能し得るエンハンサーをさらに含み得る。

40

【0387】

[0415] 本発明の核酸コンストラクトは、好ましくは適切な選択可能マーカー及び／または複製起点をさらに含む。好ましくは、利用される核酸コンストラクトは、（コンストラクトが適切な選択可能マーカー及び複製起点を具備する）E. コリにおいて両方を増殖

50

させ得、細胞における増殖又は遺伝子における統合及び最適の組織に適合性であり得る、シャトルベクターである。本発明によるコンストラクトは、例えば、プラスミド、バクミド、ファージミド、コスミド、ファージ、ウイルス又は人工染色体であり得る。

【0388】

[0416] 適切なコンストラクトの例としては、それぞれ *Invitrogen Co.* (*Carlsbad, CA.*) から市販されている *pcDNA3*、*pcDNA3.1 (+/-)*、*pGL3*、*PzeoSV2 (+/-)*、*pDisplay*、*pEF/myc/cyto*、*pCMV/myc/cyto* が挙げられるが限定されない。レトロウイルスベクター及びパッケージング系の例は、多重クローニング部位へのクローニングを可能にする *Retro-X* ベクター *pLNCX* 及び *pLXSN* を含め、*Clontech (San Diego, CA.)* により販売されるものであり、導入遺伝子は *CMV* プロモーターから転写される。導入遺伝子が *5' LTR* プロモーターから転写される、*pBabe* など、*Moo-MuLV* 由来のベクターも挙げられる。

10

【0389】

[0417] 本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞での核酸の発現に適切な形態の本発明の核酸を具備し、これは、組み換え発現ベクターが、発現させようとする核酸配列に作動可能に連結される、発現のために使用しようとする宿主細胞に基づき選択される、1以上の制御配列を含むことを意味する。組み換え発現ベクター内で、「作動可能に連結される」は、(例えば、ベクターが宿主細胞に導入されるとき、インビトロ転写／翻訳系において又は宿主細胞において、)ヌクレオチド配列の発現を可能にするように、関心のあるヌクレオチド配列が制御配列に連結されることを意味するものとする。

20

【0390】

[0418] 「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー及び他の発現調節エレメント (例えばポリアデニル化シグナル) を含むものとする。このような制御配列は、例えば *Goeddel (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA* に記載されている。制御配列としては、多くのタイプの宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を支配するもの及びある一定の宿主細胞でのみヌクレオチド配列の発現を支配するもの (例えば組織特異的な制御配列) が挙げられる。当業者にとって当然のことながら、発現ベクターの設計は、形質転換しようとする宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの要因に依存し得る。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入し、それによって、本明細書中で記載のような核酸によりコードされる融合タンパク質又はペプチドを含め、タンパク質又はペプチドを産生させ得る。

30

【0391】

[0419] 原核又は真核細胞における変異体タンパク質の産生のために、本発明の組み換え発現ベクターを設計し得る。例えば、本発明のタンパク質は、*Escherichia coli* (例えば *Escherichia coli*) などの細菌細胞、昆虫細胞 (例えばバキュロウイルス発現ベクターを使用)、酵母細胞又は哺乳動物細胞で発現され得る。適切な宿主細胞は、*Goeddel (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA* でさらに論じられている。あるいは、例えば *T7* プロモーター制御配列及び *T7* ポリメラーゼを用いて、インビトロで組み換え発現ベクターを転写し、翻訳させ得る。

40

【0392】

[0420] 原核生物におけるタンパク質の発現は、融合又は非融合タンパク質の何れかの発現を支配する構成的又は誘導性プロモーターを含有するベクターを用いて *Escherichia coli* (例えば *Escherichia coli*) で行われることが最も多い。融合ベクターは、そこにおいてコードされるタンパク質に対して、組み換えタンパク質のアミノ又は C 末端に、多くのアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは一般的に 3 つの目的に

50

役立つ：(i) 組み換えタンパク質の発現を上昇させること；(ii) 組み換えタンパク質の溶解度を向上させること；及び(iii) 親和性精製においてリガンドとして作用することにより組み換えタンパク質の精製に役立つこと。しばしば、融合発現ベクターにおいて、融合タンパク質の精製の後、融合部から組み換えタンパク質を分離可能にするために、融合部及び組み換えタンパク質の接合部にタンパク質分解性切断部位が導入される。このような酵素及びそれらの同種認識配列としては、第Xa因子、トロンピン、PreScission、TEV及びエンテロキナーゼが挙げられる。典型的な融合発現ベクターとしては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質又はプロテインAをそれぞれ標的組み換えタンパク質に融合させる、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith及びJohnson (1988) Gene 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA.) 及びpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.) が挙げられる。

10

【0393】

[0421] 組み換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型にあり得る核酸の発現を支配可能である（例えば、核酸を発現させるために組織特異的な制御エレメントが使用される。）。組織特異的な制御エレメントは当技術分野で公知である。タンパク質の効率的な産生のために、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を所望の宿主での発現に対して最適化された発現調節配列の調節下に置くことが好ましい。例えば、この配列は、最適化された転写及び／又は翻訳制御配列（例えば改変コザック配列）を含み得る。

20

【0394】

[0422] E. コリ (E. coli) において組み換えタンパク質発現を最大化するためのある戦略は、組み換えタンパク質をタンパク質分的に切断能が欠損している宿主細菌中でタンパク質を発現させることである。例えばGottesman (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology Academic Press, San Diego, CA. 185:119-128を参照。別の戦略は、各アミノ酸に対する個々のコドンがE. コリ (E. coli) で選択的に利用されるものであるように、発現ベクターに挿入しようとする核酸の核酸配列を改変することである。例えばWada, et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:2111-2118を参照。本発明の核酸配列のこのような改変は、標準的なDNA合成技術によって行い得る。コドンバイアスを解決するための別の戦略は、BL21-コドン+細菌株 (Invitrogen) 又はRosetta細菌株 (Novagen) を使用することによるものであり、これらの株は、稀少なE. コリ (E. coli) tRNA遺伝子の余分なコピーを含有する。

30

【0395】

[0423] 本発明のタンパク質をコードする発現ベクターは酵母発現ベクターであり得る。酵母サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) における発現のためのベクターの例としては、pYepSec1 (Baldari, et al. (1987) EMBO J. 6:229-234)、pMFa (Kurjan及びHerskowitz (1982) Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultz, et al. (1987) Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA.) 及びpicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA.) が挙げられる。

40

【0396】

[0424] あるいは、本発明のポリペプチドは、バキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞中で産生され得る。培養昆虫細胞（例えばSF9細胞）でのタンパク質発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAcシリーズ (Smith, et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165) 及びpVLシリーズ (Lucklow及びSummers (1989) Virology 170:3

50

1-39) が挙げられる。また別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8 (Seed (1987) Nature 329: 840) 及び pMT2PC (Kauffman, et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195)、pIRE Spuro (Clontech)、pUB6 (Invitrogen)、pCEP4 (Invitrogen) pREP4 (Invitrogen)、pcDNA3 (Invitrogen) が挙げられる。哺乳動物細胞で使用される場合、ウイルス性制御エレメントによって発現ベクターの調節機能が与えられることが多い。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、ラウス肉腫ウイルス及びサルウイルス40由来である。原核及び真核細胞の両方に対する他の適切な発現系については、例えば Sambrook, et al. (2001) (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory を参照。

10

【0397】

[0425] 宿主細胞は何らかの原核又は真核細胞であり得る。例えば、本発明のタンパク質は、E. コリ (E. coli) などの細菌細胞、昆虫細胞、酵母、植物又は哺乳動物細胞 (例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、COS、HEK293細胞) において産生され得る。他の適切な宿主細胞は当業者にとって公知である。

【0398】

[0426] 従来の形質転換又は遺伝子移入技術を介して原核又は真核細胞にベクターDNAを導入し得る。本明細書中で使用される場合、「形質転換」及び「遺伝子移入」という用語は、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン介在性遺伝子移入、リポフェクション又はエレクトロポレーションを含め、外来核酸 (例えばDNA) を宿主細胞に導入するための様々な当技術分野で認められている技術を指すものとする。宿主細胞に形質転換又は遺伝子移入するための適切な方法は、Sambrook, et al. (2001) [Eds.] Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory 及び他の実験マニュアルで見出すことができる。

20

【0399】

[0427] 外来ヌクレオチド配列を宿主細胞に導入するために周知の手順の何れをも使用し得る。これらには、リン酸カルシウム遺伝子移入、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム、マイクロインジェクション、プラスマベクター、ウイルス性ベクター及びクローニングされたゲノムDNA、cDNA、合成DNA又は他の外来遺伝物質を宿主細胞に導入するための他の周知の方法の何れかの使用が挙げられる。例えば Sambrook, et al. (2001) (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory 及び Walker 及び Papley (2009) Molecular Biology and Biotechnology [5th Ed.] Royal Society of Chemistry を参照。使用される特定の遺伝子操作手順が、VISTA 及び VISTA 複合物、断片又は関心のある変異体を発現可能な宿主細胞に少なくとも1つの核酸分子を首尾よく導入可能であることのみ必要である。

30

40

【0400】

[0428] 哺乳動物細胞の安定的な遺伝子移入の場合、使用される発現ベクター及び遺伝子移入技術に依存して、それらのゲノムに外来DNAを組み込み得る細胞はごく一部であることが知られている。これらの組み込み体を同定し、選択するために、一般に関心のある遺伝子とともに選択可能マーカー (例えば抗生物質に対する耐性) をコードする遺伝子が宿主細胞に導入される。様々な選択可能マーカーとしては、G418、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジン及びメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与するものが挙げられる。本発明のタンパク質をコードするものと同じベクター上

50

で選択可能マーカーをコードする核酸を宿主細胞に導入し得るか、又は別個のベクター上で導入し得る。導入核酸で安定的に遺伝子移入された細胞は、薬物選択により同定される。（例えば選択可能マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存し、一方で他の細胞は死滅）。

【0401】

〔0429〕 本発明のタンパク質を産生させる（即ち発現させる）ために、培養中の原核又は真核宿主細胞などの本発明の宿主細胞を使用し得る。従って、本発明は、本発明の宿主細胞を用いて本発明のタンパク質を産生させるための方法をさらに提供する。ある実施形態において、本方法は、本発明のタンパク質が産生されるように適切な培地中で（本発明のタンパク質をコードする組み換え発現ベクターが導入されている）本発明の宿主細胞を培養することを具備する。別の実施形態において、本方法は、本発明のタンパク質を培地又は宿主細胞から単離することをさらに具備する。

10

【0402】

〔0430〕 細胞に発現ベクターを導入した後、受容体、断片又は関心のある変異体の発現に都合がよい条件下で遺伝子移入された細胞を培養し、次いで標準的な技術を用いてこれを培養物から回収する。このような技術の例は当技術分野で周知である。例えばWO 00/06593を参照。

【0403】

VISTA又はVISTA複合物に結合する抗体

〔0431〕 本発明はまた、モノクローナル及びヒト化モノクローナル抗体を含むが限定されないVISTA及びVISTA複合物を選択的に結合する抗体も提供する。VISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する抗体は、組成物中で医薬担体及びさらなる抗体（例えば抗PD-L1、PD-L2又はCTLA-4抗体）と混合され得る。

20

【0404】

〔0432〕 ポリクローナル及びモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を用いてVISTAに結合する抗体を作製するために、免疫原として単離VISTAポリペプチド又はそれらの一部もしくは断片を使用し得る。全長VISTAポリペプチドが使用され得るか又は、あるいは、本発明は、免疫原としての使用のために、VISTAの抗原性ペプチド断片を提供する。ある実施形態において、VISTAの抗原性ペプチドは、配列番号2、4又は5で示されるアミノ酸配列の少なくとも8アミノ酸残基を具備し、ペプチドに対して産生された抗体がVISTAポリペプチドと特異的な免疫複合体を形成するように、VISTAのエピトープを包含する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15アミノ酸残基、さらにより好ましくは少なくとも20アミノ酸残基及び最も好ましくは少なくとも30アミノ酸残基を具備する。本抗原性ペプチドにより包含される好ましいエピトープは、本ポリペプチドの細胞外ドメインに位置するVISTAの領域、例えば親水性領域ならびに高抗原性がある領域である。

30

【0405】

〔0433〕 一般的に、適切な対象（例えばウサギ、ヤギ、マウス又は他の哺乳動物）に免疫原で免疫付与することによって、抗体を調製するためにVISTA免疫原が使用される。適切な免疫原性調製物は、例えば、組み換え発現VISTAポリペプチド又は化学合成VISTAポリペプチドを含有し得る。この調製物は、アジュバント、例えばフロイント完全又は不完全アジュバント又は同様の免疫賦活剤などをさらに含み得る。免疫原性VISTA調製物による適切な対象の免疫付与は、ポリクローナル抗VISTA抗体反応を誘導する。

40

【0406】

〔0434〕 抗体は、分子量およそ23,000ダルトンの2本の同一の軽ポリペプチド鎖（「軽鎖」）及び分子量53,000から70,000の2本の同一の重鎖（「重鎖」）を具備し得る。Edelman（1971）Ann. NY. Acad. Sci. 190:5を参照。この4本の鎖は、「Y」字型の入り口から伸びる重鎖を軽鎖が取り囲む「Y」字型でジスルフィド結合によって連結される。「Y」字型の「分枝」部分はF_{ab}領域と

50

呼ばれ；「Y」字型の幹部分はF_C領域と呼ばれる。アミノ酸配列方向は、「Y」字型の最上部のN末端から各鎖の下部のC末端へ向かう。N末端は、それを引き出した抗原に対する特異性を有し、約100アミノ酸長である可変領域を有し、抗体ごとに軽鎖と重鎖との間に僅かな変異がある。

【0407】

〔0435〕 可変領域は、各鎖において、その鎖の残りの長さを伸ばし、特定の抗体クラス内で抗体の特異性（即ちそれを引き出す抗原）に伴って変動しない定常領域に連結される。免疫グロブリン分子のクラスを決定する、5種類の既知の主要な定常領域クラスがある（例えばγ、μ、α、δ及びε重鎖定常領域に対応するIgG、IgM、IgA、IgD及びIgE）。定常領域又はクラスは、補体の活性化（Kabat（1976）*Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry* [2nd Ed.] 413-436頁；Holt, Rinehart, Winston）及び他の細胞性反応（Andrews, et al.（1980）*Clinical Immunobiology* 1-18；Kohl, et al.（1983）*Immunology* 48:187）を含む、抗体の続くエフェクター機能を決定し、一方で可変領域は、それが反応する抗原を決定する。軽鎖は、κ（カッパ）又はλ（ラムダ）の何れかとして分類される。各重鎖クラスは、κ又はλ軽鎖の何れかとともに調製され得る。軽及び重鎖は互いに共有結合され、2本の重鎖の「テール」部は、ハイブリドーマ又はB細胞の何れかにより免疫グロブリンが産生されるとき、共有ジスルフィド結合により互いに結合される。

【0408】

〔0436〕 このような条件下での抗体に対する特異的な結合は、特定のタンパク質に対するその特異性について選択される抗体を必要とし得る。例えば、精子塩基性タンパク質に特異的に免疫反応性であり、精子塩基性タンパク質の多型性変異体及び対立遺伝子を除き、他のタンパク質には反応性でないポリクローナル抗体のみを得るために、ラット、マウス又はヒトなどの特異的な種由来の精子塩基性タンパク質に対して産生されるポリクローナル抗体を選択し得る。この選択は、他の種からの精子塩基性タンパク質分子と交差反応する抗体を除くことにより達成され得る。特定のタンパク質と特異的な免疫反応性がある抗体を選択するために、様々な免疫アッセイ方式を使用し得る。例えば、タンパク質と特異的な免疫反応性がある抗体を選択するために、固相ELISA免疫アッセイが通常のように使用される。免疫アッセイ方式の説明及び特異的な免疫反応性を決定するために使用することができる条件については、例えば、Harlow及びLane（1998）*USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Laboratoryを参照。一般的には、特異的又は選択的反応は、バックグラウンドシグナル又はノイズの少なくとも2倍、より一般的にはバックグラウンドの約10から100倍を超える。

【0409】

〔0437〕 例えばIgVドメイン又は他の特異的なドメインにおけるVISTAの特異的エピトープに結合するものを同定するために、及び／又はVISTAタンパク質に対する高親和性及び結合力を保持する抗体を選択するために、抗体をスクリーニングし得る。さらに、インビトロ及びインビボでの免疫性及び免疫細胞上でのVISTAの特異的な機能及び効果を調節するものを同定するために、これらの抗体をスクリーニングする。例えば、もしあれば、CD4+又はCD8+T細胞によるサイトカイン産生、CD28同時刺激、CD4+T細胞増殖及びナイーブ及びメモリーCD4+T細胞の増殖などを含むVISTAにより負の方向に制御される免疫機能における特定の抗VISTA抗体の調節性の効果を確認するために、アッセイを行い得る。実施形態において、これらの抗VISTA抗体はインビボで逆の挙動を示すので、インビトロで、VISTA-Igの存在がVISTA-Igによる抑制を促進する場合、即ちこれらが免疫抑制性である、潜在的な治療用抗VISTA抗体を同定するためにアッセイを行い得る。本発明は、136アミノ酸細胞外ドメインに、例えばアミノ酸1から50、50から100、100から136に特異的

に結合する抗VISTA抗体及びその使用、IgVに特異的に結合する抗体、ストーク領域に特異的に結合する抗体、膜貫通領域に特異的に結合する抗体及びVISTAの細胞質領域に特異的に結合する抗体を包含する。本適用においてこれらの特異的な領域が同定される。

【0410】

[0438] 別の実施形態において、本組み換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において選択的に核酸の発現を支配可能である（例えば、核酸を発現するために、組織特異的な制御エレメントを使用する。）。組織特異的な制御エレメントは当技術分野で公知である。適切な組織特異的なプロモーターの非限定例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkert, et al. (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277）、リンパ系特異的なプロモーター（Calame及びEaton (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275）、T細胞受容体の特定のプロモーター（Winoto及びBaltimore (1989) *EMBO J.* 8: 729-733）及び免疫グロブリン（Banerji, et al. (1983) *Cell* 33: 729-740；Queen及びBaltimore (1983) *Cell* 33: 741-748）、ニューロン特異的なプロモーター（例えば神経フィラメントプロモーター；Byrne及びRuddle (1989) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477）、膵臓特異的なプロモーター（Edlund, et al. (1985) *Science* 230: 912-916）及び乳腺特異的なプロモーター（例えば乳清プロモーター；米国特許第4, 873, 316号及び欧州出願公開第264, 166号）が挙げられる。発生的に制御されるプロモーターはまた、例えばマウスホックスプロモーター（Kessel及びGruss (1990) *Science* 249: 374-379）及び α -フェトプロテインプロモーター（Campes及びTilghman (1989) *Genes Dev.* 3: 537-546）によっても包含される。

【0411】

ポリクローナル抗体

[0439] ポリクローナル抗体は、抗原を用いて免疫付与した動物の血清由来の抗体分子の不均一集団である。VISTA及びVISTA複合物に選択的に結合するポリクローナル抗体は、当技術分野で周知の方法によって作製され得る。例えばHoward及びKaser (2007) *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* CRC Pressを参照。

【0412】

モノクローナル抗体

[0440] モノクローナル抗体は、抗原に特異的な抗体の実質的に均一な集団を含有し、この集団は、実質的に同様のエピトープ結合部位を含有する。モノクローナル抗体は、当業者にとって公知の方法によって入手され得る。例えばKohler及びMilstein (1975) *Nature* 256: 495-497；米国特許第4, 376, 110号；Ausubel, et al. [Eds.] (2011) *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing Assoc. 及びWiley Interscience, NY.；及びHarlow及びLane (1998) *USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Laboratory；Colligan, et al. (2005) [Eds.] *Current Protocols in Immunology* Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, NYを参照。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、GILD及びその何らかのサブクラスを含め、何らかの免疫グロブリンクラスのものであり得る。本発明の抗体を産生するハイブリドーマはインビトロ、インシトゥ又はインビボで培養され得る。

【0413】

キメラ抗体

〔0441〕 キメラ抗体は、適用において免疫原性を低下させ、産生において収量を増加させるために最初に使用される、マウス抗体由来の可変領域及びヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなど、その異なる部分が異なる動物種由来である分子であり、例えば、マウスモノクローナル抗体は、ハイブリドーマからより高い収量があるが、ヒトにおいて免疫原性がより高いので、ヒトマウスキメラモノクローナル抗体が使用される。キメラ抗体及びそれらの産生のための方法は当技術分野で公知である。C a b i l l y, e t a l. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277; Morrison, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855、Boulianne, et al. (1984) Nature 312:643-646; Neuberger, et al. (1985) Nature 314:268-270; 欧州特許出願第173494号(1986); WO86/01533(1986); 欧州特許出願第184187号(1986); 欧州特許出願第73494号(1986); Sahagan, et al. (1986) J. Immunol. 137:1066-1074; Liu, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Sun, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Better, et al. (1988) Science 240:1041-1043; 及び Harlow 及び Lane (1998) USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory; 米国特許第5,624,659号を参照。

【0414】

ヒト化抗体

〔0442〕 ヒト化抗体は、さらにいっそうヒト様である免疫グロブリンドメインを含有し、動物由来抗体の相補性決定領域のみを組み込むように操作される。これは、モノクローナル抗体の可変領域の超可変ループの配列を調べ、それらをヒト抗体鎖の構造に合わせるにより遂行され得る。例えば米国特許第6,187,287号を参照。同様に、ヒト化抗体を作製する他の方法が現在、当技術分野で周知である。例えば米国特許第5,225,539号; 同第5,530,101号; 同第5,585,089号; 同第5,693,762号; 同第6,054,297号; 同第6,180,370号; 同第6,407,213号; 同第6,548,640号; 同第6,632,927号; 及び同第6,639,055号; Jones, et al. (1986) Nature 321:522-525; Reichmann, et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen, et al. (1988) Science 239:1534-36; 及び Zhiqiang An (2009) [Ed.] Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic John Wiley & Sons, Inc. を参照。

【0415】

抗体断片

〔0443〕 免疫グロブリン全体(又はそれらの組み換え対応物)に加えて、エピトープ結合部位を具備する免疫グロブリン断片(例えば Fab', F(ab')₂ 又は他の断片)を合成し得る。「断片」又は最小免疫グロブリンは、組み換え免疫グロブリン技術を利用して設計し得る。例えば、融合可変軽鎖領域及び可変重鎖領域を合成することによって、本発明における使用のための「Fv」免疫グロブリンを作製し得る。抗体の組み合わせ、例えば2つの異なるFv特異性を具備するダイアボディーにも関心がある。免疫グロブリンの抗原-結合断片としては、SMIP(低分子免疫薬)、キャメルボディー、ナノボディー及び IgNAR が挙げられるが限定されない。

【0416】

抗イディオタイプ抗体

〔0444〕 抗イディオタイプ(抗 Id)抗体は、一般に抗体の抗原-結合部位と会合させ

られる特有の決定基を認識する抗体である。I d抗体は、抗I dが調製されている抗体を用いて、抗体の供給源と同じ種及び遺伝子型の動物（例えばマウス系統）に対して免疫付与を行うことによって調製され得る。免疫付与動物は、イディオタイプ決定基に対する抗体（抗I d抗体）を産生することによって、免疫付与抗体のイディオタイプ決定基を認識し、それに反応する。例えば米国特許第4, 699, 880号を参照。抗I d抗体はまた、また別の動物において免疫反応を誘導し、いわゆる抗抗I d抗体を産生させるために「免疫原」としても使用され得る。抗抗I dは、抗I dを誘導した元の抗体とエピトープ的に同一であり得る。従って、抗体のイディオタイプ決定基に対する抗体を使用することによって、同一である特異性の抗体を発現する他のクローンを同定することができる。

【0417】

10

操作及び修飾抗体

[0445] 修飾抗体を操作するために、抗体出発材料由来のVH及び／又はVL配列の1以上を有する抗体を用いて本発明の抗体をさらに調製し得、この修飾抗体は、出発抗体から特性が変更されているものであり得る。一方又は両方の可変領域（即ちVH及び／又はVL）内、例えば1以上のCDR領域内及び／又は1以上のフレームワーク領域内、の1以上の残基を修飾することによって、抗体を操作し得る。さらに又はあるいは、例えば抗体のエフェクター機能を変化させるために、定常領域内の残基を修飾することによって抗体を操作し得る。

【0418】

[0446] 行われ得る可変領域操作のあるタイプは、CDR移植である。抗体は、主に、6個の重及び軽鎖相補性決定領域（CDR）に位置するアミノ酸残基を通じて標的抗原と相互作用する。このために、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外側の配列よりも個々の抗体間で多様である。CDR配列は殆どの抗体-抗原相互作用に関与するので、異なる特性を有する異なる抗体からのフレームワーク配列上に移植された特異的な天然抗体からのCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特異的な天然の抗体の特性を模倣する組み換え抗体を発現させることが可能である。例えばRiechmann, et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. U. S. A. 86:10029-10033; 米国特許第5, 225, 539号; 同第5, 530, 101号; 同第5, 585, 089号; 同第5, 693, 762号; 及び同第6, 180, 370号を参照。

20

30

【0419】

[0447] 生殖細胞系列抗体遺伝子配列を含む公開DNAデータベース又は公開参考文献から、適切なフレームワーク配列を得ることができる。例えば、ヒト重及び軽鎖可変領域遺伝子に対する生殖細胞系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖細胞系列配列データベース（インターネットで利用可能）、ならびにKabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest [5th Ed.] U. S. Department of Health and Human Services NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; 及びCox, et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:827-836で見出すことができる。

40

【0420】

[0448] 別のタイプの可変領域修飾は、それによって関心のある抗体の1以上の結合特性（例えば親和性）を向上させるために、VH及び／又はVL CDR1、CDR2及び／又はCDR3領域内でアミノ酸残基を成熟させることである。突然変異を導入するために、部位特異的突然変異誘発又はPCR介在性突然変異誘発を行い得、適切なインビト

50

ロ又はインビボアッセイにおいて抗体結合又は関心のある他の機能特性における影響を評価し得る。好ましくは（本明細書中で論じるような）保存的修飾を導入し得る。この突然変異は、アミノ酸置換、付加又は欠失であり得るが、好ましくは置換である。さらに、一般に、C D R領域内の、1、2、3、4又は5残基を超えないものが改変される。

【0421】

〔0449〕 本発明の改変抗体には、例えば抗体の特性を向上させるために、V H及び／又はV L内のフレームワーク残基に対して修飾がなされているものが含まれる。一般に、抗体の免疫原性を低下させるために、このようなフレームワーク修飾がなされる。例えば、あるアプローチは、対応する生殖細胞系列配列に対して1以上のフレームワーク残基を「復帰突然変異」させることである。より具体的に、体細胞突然変異が起こった抗体は、抗体が由来するものからの生殖細胞系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有し得る。このような残基は、抗体フレームワーク配列をその抗体が由来する生殖細胞系列配列と比較することによって同定され得る。

10

【0422】

〔0450〕 フレームワーク又はC D R領域内でなされた修飾に加えて又はその代わりに、一般には抗体の1以上の機能特性、例えば血清半減期、補体結合反応、F c受容体結合及び／又は抗原依存性細胞毒性など、を変化させるために、F c領域内で修飾を含むように本発明の抗体を操作し得る。さらに、本発明の抗体を化学的に修飾するか（例えば1以上の化学部分を抗体に連結し得る。）、又はそのグリコシル化を変化させるために、繰り返すが、抗体の1以上の機能特性を変化させるために修飾し得る。このような実施形態は下記で詳述する。F c領域中の残基の付番は、K a b a tのE Uインデックスのものである。

20

【0423】

〔0451〕 ヒンジ領域中のシステイン残基数が変化するように、例えば増減するように、C H 1のヒンジ領域を修飾し得る。米国特許第5, 677, 425号を参照。例えば、軽及び重鎖の組み立てを促進するために、又は抗体の安定性を向上させるかもしくは低下させるために、C H 1のヒンジ領域中のシステイン残基数を変化させ得る。

【0424】

〔0452〕 抗体の生物学的半減期を短縮するために、抗体のF cヒンジ領域を成熟させ得る。より具体的には、ネイティブF c－ヒンジドメインS p A結合と比較して、その抗体がブドウ球菌プロテインA（S p A）結合を損なうように、F c－ヒンジ断片のC H 2－C H 3ドメイン界面領域に1以上のアミノ酸突然変異を導入し得る。例えば米国特許第6, 165, 745号を参照。

30

【0425】

〔0453〕 その生物学的半減期を延長させるために抗体を修飾し得る。様々なアプローチが可能である。例えば、次の突然変異のうち1以上を導入し得る：T 252 L、T 254 S、T 256 F。米国特許第6, 277, 375号を参照。あるいは、生物学的半減期を延長させるために、I g GのF c領域のC H 2ドメインの2本ループから取られるサルベージ受容体結合エピトープを含有させるため、抗体をC H 1又はC L領域内で改変し得る。米国特許第5, 869, 046号及び同第6, 121, 022号参照。

40

【0426】

〔0454〕 抗体のエフェクター機能を変化させるために少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えることによって、F c領域を改変し得る。例えば、エフェクターリガンドに対する抗体の親和性が変化したが、親抗体の抗原－結合能を保持するように、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320及び322から選択される1以上のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換え得る。親和性が変化させられ得るエフェクターリガンドは、例えばF c受容体又は補体のC 1成分であり得る。米国特許第5, 624, 821号及び同第5, 648, 260号を参照。

【0427】

〔0455〕 抗体のグリコシル化を修飾し得る。例えば、アグリコシル化抗体（即ち抗体

50

がグリコシル化を欠く。)を作製し得る。例えば抗原に対する抗体の親和性を向上させるために、グリコシル化を変化させ得る。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1以上の部位を変化させることによって遂行され得る。例えば、1以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位が除去され、それによってその部位のグリコシル化を排除することになる1以上のアミノ酸置換をなし得る。このようなアグリコシル化によって、抗原に対する抗体の親和性が向上し得る。例えば米国特許第5,714,350号及び同第6,350,861号を参照。

【0428】

[0456] さらに又はあるいは、フコシル残基の量が減少している低フコシル化抗体又は2分されるGlcNAc構造が増加している抗体など、グリコシル化のタイプが変化している抗体を作製し得る。このようなグリコシル化パターンの変化によって、抗体のADCC能が上昇することが明らかになっている。例えば、グリコシル化機構が変化した宿主細胞において抗体を発現させることによって、このような炭水化物修飾を遂行し得る。グリコシル化機構が変化した細胞は、当技術分野で記載されており、それによってグリコシル化が変化した抗体を産生させるために本発明の組み換え抗体を発現する宿主細胞として使用され得る。米国特許出願公開第2004/0110704号及びYamane-Ohnuki, et al. (2004) Biotechnol Bioeng. 87:614-22; EP1,176,195; WO2003/035835; Shields, et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; WO99/54342; Umana, et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180; 及びTarentino, et al. (1975) Biochem. 14:5516-23を参照。

【0429】

[0457] 例えば抗体の生物学的(例えば血清)半減期を延長させるために、抗体をペグ化し得る。抗体をペグ化するために、一般的には、1以上のPEG基が抗体又は抗体断片に連結するようになる条件下で、抗体又はその断片を、PEGの反応性エステル又はアルデヒド誘導体など、ポリエチレングリコール(PEG)と反応させる。好ましくは、反応性PEG分子(又は類似した反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応又はアルキル化反応を介してPEG化が行われる。

【0430】

[0458] 本発明はまた、本明細書中で示される、抗体、抗体断片、ダイアボディー、SMIP、キャメルボディー、ナノボディー、IgNAR、ポリペプチド、可変領域及びCDRに実質的に相同である変異体及び同等物も提供する。これらは、例えば保存的置換突然変異(即ち1以上のアミノ酸の同様のアミノ酸による置換)を含有し得る。例えば、保存的置換は、同じ一般クラス内の別のもののアミノ酸の置換、例えばある酸性アミノ酸を別の酸性アミノ酸で、ある塩基性アミノ酸を別の塩基性アミノ酸で、又はある中性アミノ酸を別の中性アミノ酸で置換することを指す。

【0431】

抗体複合物

[0459] さらに、細胞毒素、治療剤又は放射性金属イオンなどの治療的部分に抗体(又はその断片)を複合化し得る。細胞毒素又は細胞毒性剤としては、細胞に対して有害である何らかの薬剤が挙げられる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミジシンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミスラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール及びピューロマイシン及びその類似体又は相同体が挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗剤(例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えばメクロレタミン、チオエパ・クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)及びロ

ムスチン（CCNU）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC及びシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えばダウノルビシン（旧名ダウノマイシン）及びドキシソルビシン）、抗生物質（例えばダクチノマイシン（旧名アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミスラマイシン及びアントラマイシン（AMC））及び抗有糸分裂薬（例えばビンクリスチン及びビンブラスチン）が挙げられるが限定されない。

【0432】

抗体を操作する方法

〔0460〕 VH及び／又はVL配列又はそれに連結される定常領域を修飾することによって、新規の変異体抗体を作製するために、本明細書中で開示されるVH及びVL配列を有する抗体を使用し得る。従って、VISTA及びVISTA複合物への結合など、少なくとも1つの本発明の抗体の機能特性を保持する構造的に関連のある変異体抗体を作製するために、本発明の変異体抗体の構造特性を使用する。例えば、本明細書中で論じられるように、さらなる組み換え操作された、本発明の抗VISTA又は抗VISTA複合物抗体（例えばVISTA及びVISTA複合物に結合する抗体）を作製するために、1つの抗VISTA変異体抗体又は抗VISTA複合物変異体抗体又はその突然変異の1以上のCDR領域を既知のフレームワーク領域及び／又は他のCDRと組み換えにより組み合わせ得る。本操作方法に対する出発材料は、本明細書中で提供されるVH及び／又はVK配列の1以上又はその1以上のCDR領域であり得る。改変抗体を作製するために、本明細書中で提供されるVH及び／又はVK配列の1以上又は1以上のそのCDR領域を有する抗体を実際に調製する（即ちタンパク質として発現させる）必要はない。むしろ、元の配列由来の「第二世代」配列を作製するために、出発材料として配列中に含有される情報を使用し、次に「第二世代」配列を調製し、タンパク質として発現させる。改変抗体配列を調製し、発現させるために、標準的な分子生物学技術を使用し得る。

【0433】

〔0461〕 改変抗体配列によりコードされる抗体は、本明細書中で提供される方法によって、及び配列を用いて産生される抗VISTA又は抗VISTA複合物抗体の機能特性のうち1つ、一部又は全てを保持し得、この機能特性としては、特異的なKDレベル以下での変異体VISTA又は変異体VISTA複合物に対する結合及び／又は免疫細胞活性の調整及び／又は例えば、結腸直腸癌腫、肺癌、前立腺癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌及び肝臓癌など所望の標的細胞への選択的な結合が挙げられる。当技術分野で利用可能であり、及び／又は本明細書中に記載の標準的なアッセイを用いて、改変抗体の機能特性を評価し得る。

【0434】

〔0462〕 抗VISTA又は抗VISTA複合物抗体コード配列の全て又は一部に沿って、突然変異を無作為に又は選択的に導入し得、得られる修飾抗VISTA又は抗VISTA複合物抗体を結合活性及び／又は他の所望の機能特性についてスクリーニングし得る。WO2011/120013を参照。

【0435】

VISTA又はVISTA複合物に選択的に結合する抗体をコードする核酸

〔0463〕 本発明の別の実施形態は、VISTA及びVISTA複合物に結合する本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。この核酸は全細胞で、細胞溶解液中で、又は部分的に精製されているか又は実質的に純粋な形態で存在し得る。アルカリ／SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動及び当技術分野で周知の他のものを含む標準的な技術により、精製によって核酸を他の細胞性構成要素又は他の夾雑物（例えば他の細胞性核酸又はタンパク質）から単離し得る。Ausubel, et al. (2011) Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. を参照。本発明の核酸は、例えば、DNA又はRNAであり得、イントロン配列を含有していても、又はしていなくてもよい。本核酸はcDNA分子であり得る。

【0436】

[0464] 標準的な分子生物学技術を用いて本発明の核酸を得ることができる。ハイブリドーマ（例えば下記でさらに記載するヒト免疫グロブリン遺伝子を担持するトランスジェニックマウスから調製されるハイブリドーマ）により発現される抗体に対して、標準的なPCR増幅又はcDNAクローニング技術によって、ハイブリドーマにより作製された抗体の軽及び重鎖をコードするcDNAを得ることができる。（例えばファージディスプレイ技術を用いて）免疫グロブリン遺伝子ライブラリから得られる抗体に対して、抗体をコードする核酸をライブラリから回収し得る。

【0437】

[0465] 具体的に、例えば、1以上の選択コドンの3番目の位置が混合塩基及び／又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を作製することによって、縮重コドン置換を達成し得る。Batzler, et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:5081; Ohtsuka, et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-08; Rossolini, et al. (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98。

【0438】

[0466] VH及びVLセグメントをコードするDNA断片を得たら、例えば可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子に、Fab断片遺伝子に又はscFv遺伝子に変換するために、標準的な組み換えDNA技術によってこれらのDNA断片をさらに操作し得る。これらの操作において、VL-又はVHをコードするDNA断片は、抗体定常領域又は可動性リンカーなど別のタンパク質をコードする別のDNA断片に作動可能に連結される。

【0439】

[0467] VHをコードするDNAを重鎖定常領域（CH1、CH2及びCH3）をコードする別のDNA分子に作動可能に連結することによって、VH領域をコードする単離DNAを全長重鎖遺伝子に変換し得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野で公知であり（例えばKabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照）、これらの領域を包含するDNA断片は標準的なPCR増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM又はIgD定常領域であり得るが、最も好ましくはIgG1又はIgG4定常領域である。Fab断片重鎖遺伝子に対して、VHをコードするDNAは、重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に作動可能に連結され得る。

【0440】

[0468] 軽鎖定常領域、CLをコードする別のDNA分子にVLをコードするDNAを作動可能に連結することによって、VL領域をコードする単離DNAを全長軽鎖遺伝子（ならびにFab軽鎖遺伝子）に変換し得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野で公知であり（例えばKabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照）、これらの領域を包含するDNA断片は標準的なPCR増幅により得ることができる。軽鎖定常領域はκ又はλ定常領域であり得るが、最も好ましくはκ定常領域である。

【0441】

[0469] scFv遺伝子を作製するために、VH及びVL配列が、可動性リンカーにより連結されるVL及びVH領域とともに連続1本鎖タンパク質として発現され得るよう、可動性リンカーをコードする、例えばアミノ酸配列（Gly4-Ser）₃をコードする別の断片に、VH及びVLをコードするDNA断片を作動可能に連結する。例えばB

ird, et al. (1988) Science 242:423-426; Huston, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty, et al. (1990) Nature 348:552-554を参照。

【0442】

抗体及びその断片を作製する方法

[0470] 本発明はまた、抗体及びその断片を作製するための方法も提供する。抗体を作製する方法は当業者にとって周知である。例えば、キメラ抗体を作製する方法は現在、当技術分野で周知である。例えば米国特許第4,816,567号; Morrison, et al. (1984) PNAS USA 81:8651-55; Neuberger, et al. (1985) Nature 314:268-270; Boulianne, et al. (1984) Nature 312:643-46を参照。

10

【0443】

[0471] 例えば、遺伝子操作によって抗体又は抗原結合断片を作製し得る。この技術において、他の方法と同様に、抗体産生細胞を所望の抗原又は免疫原に感作させる。PCR増幅を用いてcDNAを作製するために、抗体産生細胞から単離されるメッセンジャーRNAを鋳型として使用する。増幅した免疫グロブリンcDNAの適切なセクションを発現ベクターに挿入することによって、それぞれが最初の抗原特異性を保持する1つの重鎖遺伝子及び1つの軽鎖遺伝子を含むベクターのライブラリを作製する。重鎖遺伝子ライブラリを軽鎖遺伝子ライブラリと組み合わせることによって、コンビナトリアルライブラリを構築する。この結果、重及び軽鎖（抗体分子のFab断片又は抗原結合断片と類似する。）を同時発現するクローンのライブラリが得られる。これらの遺伝子を担持するベクターを宿主細胞に同時遺伝子移入する。遺伝子移入宿主において抗体遺伝子合成が誘導される場合、重及び軽鎖タンパク質が自己集合して、抗原又は免疫原を用いてスクリーニングにより検出され得る活性のある抗体が産生される。

20

【0444】

[0472] 本発明の抗体及びその断片はまた、当業者にとって周知の従来技術を用いて、オペロン及び、抗体特異性に必要とされるCDRをコードするDNA配列が非ヒト細胞源由来であり、一方で抗体鎖の残りの部分をコードするDNA配列がヒト細胞源由来である抗体重鎖をコードするDNA配列を含む発現ベクターを構築することによって作製することもできる。さらに、本発明は、上述の本発明の核酸分子を含むベクター、特にプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ及び遺伝子操作で一般的な他のベクターに関する。ベクターに含有される核酸分子は、原核及び真核細胞における転写を確実にする制御エレメントに連結され得る。

30

【0445】

[0473] ベクターは、標的宿主細胞内での外来タンパク質の発現のための操作を容易にするエレメントを含む。都合よく、形質転換用のDNAの配列及び産生の操作は最初に細菌宿主（例えばE. coli (E. coli)）において行われ、通常、ベクターは、細菌複製起点及び適切な細菌選択マーカを含め、このような操作を容易にするための配列を含む。選択マーカは、選択培地中で増殖させられる形質転換宿主細胞の生存又は増殖に必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を含むベクターで形質転換されていない宿主細胞はその培地中で生存しない。典型的な選択遺伝子は、抗生物質に対する耐性又は他の毒素、補完的栄養要求性欠損を付与するか又は複合培地から入手できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。酵母の形質転換のための代表的なベクター及び方法は当技術分野で記載される。例えばBurke, et al. (2000) Methods in Yeast Genetics Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照。

40

【0446】

[0474] 関心のあるポリペプチドコード配列は、酵母細胞中でのポリペプチドの発現を提供する転写及び翻訳制御配列に作動可能に連結され得る。これらのベクター構成要素

50

としては、次のもののうち1以上が含まれ得るが限定されない：エンハンサーエレメント、プロモーター及び転写終結配列。ポリペプチドの分泌のための配列も含まれ得る（例えばシグナル配列）。

【0447】

〔0475〕 核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれる場合、「作動可能に連結される」。例えば、シグナル配列のためのDNAは、それがポリペプチド分泌に関与するタンパク質前駆体として発現される場合、ポリペプチドに対するDNAに作動可能に連結され；プロモーター又はエンハンサーは、それが配列の転写に影響を与える場合、コード配列に作動可能に連結される。一般に、「作動可能に連結される」は、連続する連結される、及び分泌性リーダーの場合、連続し、読み枠どおりに連結される、DNA配列を広く指す。しかし、エンハンサーは連続する必要はない。

10

【0448】

〔0476〕 プロモーターは、それらが作動可能に連結される特定の核酸配列の転写及び翻訳を調節する、構造遺伝子の開始コドンに対して上流（5'）にある非翻訳配列（一般に約100から1000bp内）である。このようなプロモーターはいくつかのクラスに分類される：誘導性、構成的及び抑制性プロモーター（例えばリプレッサーがないことに対して反応して転写レベルを上昇させる。）。誘導性プロモーターは、培養条件（例えば栄養素の有無又は温度変化）におけるある程度の変化に反応してそれらの調節下でDNAからの転写レベル上昇を開始し得る。

【0449】

〔0477〕 当業者にとって周知の同じ従来の手段を用いて、第二の発現ベクターを作製し得、この発現ベクターは、オペロン及び、抗体特異性に必要とされるCDRをコードするDNA配列が非ヒト細胞源、好ましくはウサギB細胞源由来であり、一方で抗体鎖の残りの部分をコードするDNA配列がヒト細胞源由来である、抗体軽鎖をコードするDNA配列を含有する。

20

【0450】

〔0478〕 遺伝子移入宿主細胞を作製するために、当業者にとって周知の従来技術によって発現ベクターを宿主細胞に遺伝子移入し、当業者にとって周知の従来技術によってこの遺伝子移入宿主細胞培養物にこの抗体ポリペプチドを産生させる。

【0451】

〔0479〕 上記の2つの発現ベクター、オペロン及び軽鎖由来ポリペプチドをコードするDNAを含有する第一の発現ベクター及びオペロン及び重鎖由来ポリペプチドをコードするDNAを含有する第二のベクターを宿主細胞に同時遺伝子移入し得る。この2つのベクターは、異なる選択可能マーカ含有するが、好ましくは重及び軽鎖ポリペプチドの実質的に同等の発現を達成する。あるいは、単一ベクター、重及び軽鎖ポリペプチドの両方をコードするDNAを含むベクターを使用し得る。重及び軽鎖のためのコード配列は、cDNA、ゲノムDNA又は両方を具備し得る。

30

【0452】

〔0480〕 抗体及びその断片を発現させるために使用される宿主細胞は、E. コリ（E. coli）などの細菌細胞又は真核細胞の何れかであり得る。この目的のための明確に定義されたタイプの哺乳動物細胞、例えば骨髓腫細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）、NSO又はHEK293細胞株などを使用し得る。

40

【0453】

〔0481〕 ベクターを構築し得る一般的方法、宿主細胞を作製するために必要な遺伝子移入方法及びその宿主細胞から抗体及びその断片を作製するために必要な方法は全て従来技術を含む。好ましくは抗体を作製するために使用される細胞株は哺乳動物細胞株であるものの、何らかの他の適切な細胞株、例えばE. コリ（E. coli）由来細菌株などの細菌細胞株又は酵母細胞株などを使用し得る。

【0454】

〔0482〕 同様に、抗体が作製されたら、例えばクロスフローろ過、硫酸アンモニウム

50

沈殿及びアフィニティーカラムクロマトグラフィーなど、当技術分野の標準的な手順に従い精製し得る。

【0455】

動物を用いたVISTA又はVISTA複合物に結合する抗体の作製

[0483] VISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する本発明の抗体は、ヒトモノクローナル抗体であり得る。VISTA及びVISTA複合物に対するこのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を担持するトランスジェニック又はトランスクロモソミックマウスを用いて作製され得る。これらのトランスジェニック及びトランスクロモソミックマウスとしては、本明細書中でそれぞれHuMAbマウス（登録商標）及びKMマウス（登録商標）と呼ばれるマウスが挙げられ、本明細書中でま
 10
 とめて「ヒトIgマウス」と呼ぶ。HuMAbマウス（登録商標）（Medarex, Inc.）は、内因性 μ 及び κ 鎖遺伝子座を不活性化する標的とされる突然変異と一緒に非再編成ヒト重（ μ 及び γ ）及び κ 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含有する。例えばLonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859を参照。従って、このマウスは、マウスIgM又は κ の発現低下を示し、免疫付与に対する反応が低下し、導入されたヒト重及び軽鎖導入遺伝子でクラススイッチング及び体細胞突然変異が起こり、高親和性ヒトIgG κ モノクローナルが産生される。Lonberg (1994) Handbook of
 20
 Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg及びHuszar (1995) Intern. Rev. Immunol. 13
 : 65-93及びHarding及びLonberg (1995) Ann. NY. Acad. Sci. 764: 536-546。HuMAbマウス（登録商標）の調製及び使用ならびにこのようなマウスにより担持されるゲノム修飾は、Taylor, et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295
 ; Chen, et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724; Choi, et al.
 . (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon, et
 30
 al. (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Taylor, et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; 及びFishwild, et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851でさらに記載される。さらに、米国特許第5, 545, 806号; 同第5, 569, 825号; 同第5, 625, 126号; 同第5, 633, 425号; 同第5, 789, 650号; 同第5, 877, 397号; 同第5, 661, 016号; 5, 814, 318号; 同第5, 874, 299号; 同第5, 770, 429号; 及び同第5, 545, 807号; WO92/03918、WO93/12227、WO94/25585; WO97/13852; WO98/24884; WO99/45962; 及びWO01/14424を参照。

【0456】

[0484] ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入染色体を担持するマウスなど、導入遺伝子及び導入染色体上でヒト免疫グロブリン配列を担持するマウスを用いて、本発明のヒト抗VISTA及び抗VISTA-Ig複合物抗体（例えばVISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する抗体）を産生させ得る。このようなマウスは、本明細書中で「KMマウス（登録商標）」と呼ばれ、WO02/43478で詳述される。

【0457】

[0485] またさらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスジェニック動物系は当技術分野で利用可能であり、本発明の抗VISTA及び抗VISTA-Ig複合物抗体を産生させるために使用され得る。例えば、Xenomouse (Abgenix, Inc.) と呼ばれる代替トランスジェニック系を使用し得; このようなマウスは、
 50

例えば米国特許第5, 939, 598号; 同第6, 075, 181号; 同第6, 114, 598号; 同第6, 150, 584号及び同第6, 162, 963号に記載される。

【0458】

〔0486〕 さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替導入染色体動物系は当技術分野で利用可能であり、本発明の抗VISTA及び抗VISTA-Ig複合物抗体を産生させるために使用され得る。例えば、「TCマウス」と呼ばれるヒト重鎖導入染色体及びヒト軽鎖導入染色体の両方を担持するマウスが使用され得る。Tomizuka, et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727を参照。さらに、ヒト重及び軽鎖導入染色体を担持するウシが当技術分野で記載されており (Kuroiwa, et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894)、本発明の抗VISTA及び抗VISTA-Ig複合物抗体を産生させるために使用され得る。

10

【0459】

〔0487〕 本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のスクリーニングライブラリに対してファージディスプレイ法を使用して調製することもできる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法は当技術分野で確立されている。例えば、米国特許第5, 223, 409号; 同第5, 403, 484号; 同第5, 571, 698号; 同第5, 427, 908号同第5, 580, 717号; 同第5, 969, 108号; 同第6, 172, 197号; 同第5, 885, 793号; 同第6, 521, 404号; 同第6, 544, 731号; 同第6, 555, 313号; 同第6, 582, 915号及び同第6, 593, 081号を参照。

20

【0460】

〔0488〕 本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫付与時にヒト抗体反応を生じさせ得るように、ヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを使用して調製することもできる。例えば米国特許第5, 476, 996号及び同第5, 698, 767号を参照。

【0461】

〔0489〕 本発明のヒト抗体を産生させるためにヒトIgマウスを使用する場合、Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474):856-859; Fishwild, et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851; WO98/24884及びWO01/14424に記載のように、VISTA及びVISTA複合ポリペプチドの精製又は濃縮調製物でこのようなマウスに免疫付与し得る。好ましくは、マウスは、最初の注入時に6から16週齢である。例えば、ヒトIgでマウス腹腔内に免疫付与するために、VISTA及びVISTA複合物の精製又は組み換え調製物(5から50 µg)を使用し得る。

30

【0462】

〔0490〕 他者による様々な抗原での以前の経験から、最初に完全フロイントアジュバント中で腹腔内に(IP)免疫付与し、続いて隔週で不完全フロイントアジュバント中で抗原でIP免疫付与(全部で6回以下)した際にトランスジェニックマウスが反応することが示されている。しかし、フロイント以外のアジュバントもまた有効であることが分かっている。さらに、アジュバント非存在下で全細胞は免疫原性が非常に高いことが分かっている。後眼窩出血により得られた血漿試料を用いて、一連の免疫付与プロトコールにわたり、免疫反応を監視し得る。(下記のように)ELISAによって血漿をスクリーニングし得、抗VISTA又は抗VISTA-Igヒト免疫グロブリンの十分な力価があるマウスを注射のために使用し得る。屠殺及び脾臓摘出の3日前に抗原を用いて静脈内からマウスに追加免疫し得る。各免疫付与に対して2から3回の注射を行う必要があり得ると予想される。一般的には各抗原に対して6から24匹のマウスに免疫付与する。通常、HC07及びHC012系統の両方を使用する。さらに、2種類の異なるヒト重鎖導入遺伝子(HC07/HC012)を有する1匹のマウスにHC07及びHC012導入遺伝子の両方を一緒に生成させ得る。あるいは又はさらに、KMマウス(登録商標)系統を使用し

40

50

得る。

【0463】

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

[0491] 本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、免疫付与マウスから脾臓細胞及び／又はリンパ節細胞を単離し、マウス骨髄腫細胞株などの適切な不死化細胞株に融合させ得る。抗原特異的な抗体の産生について、得られたハイブリドーマをスクリーニングし得る。例えば、免疫付与マウスからの脾臓リンパ球の単一細胞懸濁液を50%PEGを用いてP3X63-Ag8.653非分泌性マウス骨髄腫細胞(ATCC、CRL 1580)数の6分の1と融合させ得る。平底マイクロタイタープレート中におよそ 2×10^{-5} 個の細胞を播種し、続いて20%胎児クローン血清、18%「653」馴化培地、5%オリジェン(IGEN)、4mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055mM 2-メルカプトエタノール、50単位/mLペニシリン、50mg/mLストレプトマイシン、50mg/mLゲンタマイシン及び1X HAT(Sigma;融合から24時間後にHATを添加)を含有する選択培地中で2週間温置し得る。およそ2週間後、HATをHTで置き換えた培地中で細胞を培養し得る。次に、ヒトモノクローナルIgM及びIgG抗体に対して、ELISAによって個々のウェルをスクリーニングし得る。大規模なハイブリドーマ増殖が起こったら、通常10から14日後に培地を観察し得る。抗体分泌ハイブリドーマを再び播種し、再びスクリーニングし得、ヒトIgGに対して陽性のままである場合、モノクローナル抗体を限界希釈により少なくとも2倍にサブクロニングし得る。次に、特徴評価のために組織培養液中で少量の抗体を産生させるために、安定的なサブクローンをインビトロで培養し得る。

【0464】

[0492] ヒトモノクローナル抗体を精製するために、モノクローナル抗体精製の2Lスピナーフラスコ中で選択されたハイブリドーマを増殖させ得る。プロテインA-セファロース(Pharmacia, Piscataway, N. J.)でのアフィニティークロマトグラフィー前に、上清をろ過し、濃縮し得る。純度を確保するために、ゲル電気泳動及び高速液体クロマトグラフィーによって、溶出させたIgGを決定し得る。緩衝溶液をPBSに交換し得、1.43という吸光係数を用いて、OD280で濃度を測定し得る。モノクローナル抗体を分注し、-80℃で保存し得る。

【0465】

トランスジェニック動物

[0493] 本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するためにも使用され得る。例えば、ある実施形態において、本発明の宿主細胞は、VISTAコード配列が導入されている受精卵又は胚幹細胞である。次に、外来性VISTA配列がそれらのゲノムに導入されている非ヒトトランスジェニック動物又は内在性VISTA配列が改変されている相同組み換え動物を作製するために、このような宿主細胞を使用し得る。このような動物は、VISTAの機能及び／又は活性を研究するために、及びVISTA活性の調節物質を同定及び／又は評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、動物の細胞の1以上が導入遺伝子を含む、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラット又はマウスなどのげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれ、成熟動物のゲノムに残り、それによりトランスジェニック動物の1以上の細胞型又は組織におけるコードされる遺伝子産物の発現を支配する外来性DNAである。本明細書中で使用される場合、「相同組み換え動物」は、内在性遺伝子と動物の発生前に動物の細胞、例えば動物の胚性細胞、に導入される外来性DNA分子との間での相同組み換えによって内在性VISTA遺伝子が改変されている、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスである。VISTAをコードする核酸を受精卵の雄性前核に導入することによって、例えばマイクロインジェクション、レトロウイルス感染に

よって、本発明のトランスジェニック動物を作製し得、これにより卵母細胞が偽妊娠雌代理母動物中で発生できるようになる。非ヒト動物のゲノムに導入遺伝子として配列番号1又は4のVISTA cDNA配列を導入し得る。あるいは、サル又はラットVISTA遺伝子など、ヒトVISTA遺伝子の非ヒト相同体を導入遺伝子として使用し得る。あるいは、配列番号1又は3のVISTA cDNA配列に対するハイブリッド形成に基づき、別のVISTAファミリーメンバーなど、VISTA遺伝子相同体を単離し、導入遺伝子として使用し得る。導入遺伝子の発現効率を向上させるために、導入遺伝子においてイントロン配列及びポリアデニル化シグナルも含まれ得る。特定の細胞に対してVISTAポリペプチドの発現を支配するために、VISTA導入遺伝子に組織特異的な制御配列を作動可能に連結し得る。胚操作を介したトランスジェニック動物を作製するための方法及びマイクロインジェクション、特にマウスなどの動物は、当技術分野で通常のものとなっており、例えば、Leder, et al. による、米国特許第4,736,866号及び同第4,870,009号、Wagner, et al. による米国特許第4,873,191号、及びHogan, B., Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986)に記載されている。他のトランスジェニック動物の作製のために、同様の方法が使用される。トランスジェニック樹立動物は、そのゲノムにおけるVISTA導入遺伝子の存在及び／又は動物の組織又は細胞におけるVISTA mRNAの発現に基づき同定され得る。次に、導入遺伝子を担持するさらなる動物を繁殖させるために、トランスジェニック樹立動物を使用し得る。さらに、VISTAポリペプチドをコードする導入遺伝子を担持するトランスジェニック動物を他の導入遺伝子を担持する他のトランスジェニック動物とさらに交配させ得る。

【0466】

〔0494〕 相同組み換え動物を作製するために、それによりVISTA遺伝子を改変する、例えば機能的に破壊するために欠失、付加又は置換が導入されているVISTA遺伝子の少なくとも一部を含有するベクターを調製する。VISTA遺伝子は、ヒト又はマウス遺伝子（例えば配列番号1又は3のcDNA）であり得る。

【0467】

〔0495〕 別の実施形態において、導入遺伝子の制御された発現を可能にする選択された系を含有するトランスジェニック非ヒト動物を作製し得る。このような系の一例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の説明については、例えばLaksó, et al. (1992) Proc Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236を参照。リコンビナーゼ系の別の例は、S. セレビシエ (S. cerevisiae) のFLPリコンビナーゼ系である (O'Gorman, et al. (1991) Science 251:1351-1355)。導入遺伝子の発現を制御するためにcre/loxPリコンビナーゼ系を使用する場合、Creリコンビナーゼ及び選択されたポリペプチドの両方をコードする導入遺伝子を含有する動物が必要である。このような動物は、例えば、1匹は選択されるポリペプチドをコードする導入遺伝子を含有し、他方はリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含有する、2匹のトランスジェニック動物を交配することによって、「二重」トランスジェニック動物の構築を通じて提供され得る。

【0468】

〔0496〕 本明細書中に記載の非ヒトトランスジェニック動物のクローンは、Wilmut, et al. (1997) Nature 385:810-813; WO97/07668; 及びWO97/07669において記載の方法によっても作製され得る。簡潔に述べると、トランスジェニック動物からの細胞、例えば体細胞を単離し、増殖サイクルから出てG0期に入るように誘導し得る。次に、例えば電気パルスの使用を通じて、休止細胞を、休止細胞が単離される同じ種の動物からの除核卵母細胞に融合させ得る。次いで、再構築された卵母細胞を、その細胞が桑実胚又は胚盤胞段階まで発生するように培養し、次に偽妊娠雌代理母動物に移す。この雌代理母動物から生まれた子孫は、細胞、例えば

体細胞が単離される動物のクローンである。

【0469】

標識

〔0497〕 化学リンカーなどのエフェクター部分、例えば蛍光色素などの検出可能部分、酵素、基質、生物発光物質、放射性物質、化学発光部分、細胞毒性剤、放射性物質又は機能部分を付加するために、本明細書中に記載のポリペプチド、複合物及び抗体を翻訳後に修飾し得る。

【0470】

〔0498〕 当技術分野で公知のようにオリゴヌクレオチドに多岐にわたる部分、例えばリガンドをカップリングし得る。リガンドとしては、天然の分子又は組み換えもしくは合成分子が挙げられ得る。代表的なリガンドとしては、アバジン、ビオチン、ペプチド、ペプチド模倣物、ポリリジン（PLL）、ポリエチレングリコール（PEG）、mPEG、陽イオン基、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、サイロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤 プロテインA、ムチン、グリコシル化ポリアミノ酸、トランスフェリン、アプタマー、免疫グロブリン（例えば抗体）、インスリン、トランスフェリン、アルブミン、糖、脂溶性分子（例えばステロイド、胆汁酸、コレステロール、コール酸及び脂肪酸）、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンB、葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサル、ビタミン補因子、リポ多糖、ホルモン及びホルモン受容体、レクチン、炭水化物、多価炭水化物、放射性マーカー、蛍光色素及びその誘導体が挙げられるが限定されない。例えば米国特許第6,153,737号；同第6,172,208号；同第6,300,319号；同第6,335,434号；同第6,335,437号；同第6,395,437号；同第6,444,806号；同第6,486,308号；同第6,525,031号；同第6,528,631号；及び同第6,559,279号を参照。

【0471】

〔0499〕 さらに、インビボで（例えば血流からの排除までの時間を延長させることにより）半減期を延長させるための部分を抗原又はエピトープに付加し得る。このような技術としては、例えば、PEG部分を付加すること（ペグ付加とも呼ばれる。）が挙げられ、当技術分野で周知である。米国特許出願公開第2003/0031671号を参照。

【0472】

〔0500〕 非ランダム化学又は物理学的相互作用を通じてそれが固体標識と会合させられている場合、本明細書中に記載の抗原、抗体又はその抗原結合断片を基板に「連結」させ得る。この連結は共有結合を通じ得る。しかし、連結は共有又は永久的である必要はない。「スペーサー分子」又は「リンカー基」を通じて標識に物質を連結させ得る。このようなスペーサー分子は、生体物質に連結する第一の部分と標識に連結する第二の部分とを有する分子である。従って、標識に連結される場合、スペーサー分子は、標識と生体物質とを分離するが、両方に連結される。生体物質（例えば標識）を標識に連結する方法は当技術分野で周知であり、化学カップリングが挙げられるが限定されない。

【0473】

検出可能標識

〔0501〕 化学リンカーなどのエフェクター部分、例えば蛍光色素などの検出可能標識、酵素、基質、生物発光物質、放射性物質及び化学発光標識又は例えばストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、細胞毒、細胞毒性剤及び放射性物質などの機能部分を付加するために、本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合物を翻訳後に修飾し得る。さらなる代表的な酵素としては、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、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ及びルシフェラーゼが挙げられるが限定されない。さらなる代表的な蛍光物質としては、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、フィコエリスリン及び塩化ダンシルが挙げられるが限定されない。さらなる代表的な化学発光標識としては、ルミノールが挙げられるが限定されない。さらなる代表的な生物発

10

20

30

40

50

光物質としては、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンが挙げられるが限定されない。さらなる代表的な放射性物質としては、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)、セレンウム-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)、イオウ-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) 及びイッテルリウム-90 (^{90}Y) が挙げられるが限定されない。

10

【0474】

20

細胞毒性剤

〔0502〕 細胞毒性剤を作製するために、当技術分野で公知の技術を用いて、本発明のVISTAポリペプチド及びVISTA複合物を毒素に連結又は作動可能に連結させ得る。本発明のポリペプチド又は抗体に複合化させ得る多岐にわたる毒素が知られている。例としては、多くの有用な植物、真菌又はさらに細菌由来の毒素が挙げられ、この例として、様々なA鎖毒素、特にリシンA鎖；リボソーム不活性化タンパク質、例えばサポリン又はゲロニン； α -サルシン；アスペルギリン；レストリクトシン；及びリボヌクレアーゼ、例えば胎盤リボヌクレアーゼ、血管新生の、ジフテリア毒素又はシュードモナス外毒素が挙げられる。本発明と関連する使用のための好ましい毒素部分は、炭水化物残基、脱グリコシル化されたA鎖を修飾又は除去するために処理されている毒素A鎖である。米国特許第5,776,427号。

30

【0475】

〔0503〕 本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合物は、メトトレキサート、アミノプテリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン；アルキル化剤、例えばメクロレタミン、チオエパクロラムシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、マイトマイシンC、ロムスチン(CCNU)、1-メチルニトロソウレア、シクロトスファミド、メクロレタミン、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、シス-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン及びカルボプラチン(パラプラチン)；ダウノルビシン(旧ダウノマイシン)、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、デトルビシン、カルミノマイシン、イダルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン及びビスアントレンを含む、アントラサイクリン；ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、ブレオマイシン、カリケアマイシン、ミスラマイシン及びアントラマイシン(AMC)を含む抗生物質；及びアンチマイトティック剤、例えばピンカアルカロイド、ピンクリスチン及びビンブラスチンなどを含むが限定されない細胞毒性剤と複合化させ得る。他の細胞毒性剤としては、パクリタキセル(タキソール(登録商標))、リシン、シュードモナス外毒素、ゲムシタビン、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、エトポシド、テノポシド、コルヒチン、ジヒドロキシアントラセンジオン、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、コルチ

40

50

コステロイド、ミトタン（O，P'ー（DDD））、インターフェロン及びこれらの細胞毒性剤の混合物が挙げられる。

【0476】

〔0504〕さらなる細胞毒性剤としては、化学療法剤、例えば、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、ドキソルビシン、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、シクロホスファミド、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、ロイコボリン、ステロイド、シクロホスファミド、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調節物質、選択的エストロゲン受容体調節物質、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又はIL-2）、IL-12Rアンタゴニスト、毒素複合化モノクローナル抗体、腫瘍抗原特異的なモノクローナル抗体、アービタックス（登録商標）、アバスチン（登録商標）、ペルツズマブ、抗CD20抗体、リツキサン（登録商標）、オクレリズマブ、オフアツムマブ、DXL625、ハーセプチン（登録商標）又は何らかのそれらの組み合わせが挙げられるが限定されない。細胞型特異的な死滅試薬を作製するために、リシン、ジフテリア毒素及びシュードモナス毒素などの植物及び細菌からの毒性酵素をヒト化抗体又はその結合断片に対して複合化し得る。Youle, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5483; Gilliland, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:4539; Krollick, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5419。他の細胞毒性剤としては、細胞毒性リボヌクレアーゼが挙げられる。米国特許第6,653,104号を参照。

【0477】

〔0505〕 α 又は β 粒子を放射する放射性核種に対して本明細書中に記載のVISTAタンパク質を複合化させ得る（例えば放射免疫複合体）。このような放射性同位体としては、 β -放射体、例えば、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) など、及び α -放射体、例えば、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) 又はアクチニウム-225 (^{225}Ac) が挙げられるが限定されない。

【0478】

〔0506〕本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合物を標識に複合化させるための方法は当技術分野で公知であり、例えば、Hunter, et al. (1962) Nature 144:945; David, et al. (1974) Biochemistry 13:1014; Pain, et al. (1981) J. Immunol. Meth. 40:219; 及びNygren (1982) Histochem and Cytochem, 30:407により記載されている方法である。

【0479】

基板

〔0507〕本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合物は基板に連結され得る。当技術分野で公知の多くの基板（例えば固体支持体）が本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合物との使用に適切である。チャンネル又は他の構造を含有するように基板を修飾し得る。Fung (2004) [Ed.] Protein Arrays: Methods and Protocols Humana Press及びKambham pati (2004) [Ed.] Protein Microarray Techno

10

20

30

40

50

logy John Wiley & Sonsを参照。

【0480】

〔0508〕 基板材料としては、アクリル、アガロース、ホウケイ酸ガラス、炭素（例えば炭素ナノ繊維シート又はペレット）、酢酸セルロース、セルロース、セラミック、ゲル、ガラス（例えば無機、コントロールド・ポア、修飾、ソーダ石灰又は官能性ガラス）、ラテックス、磁気ビーズ、膜、金属、半金属、ニトロセルロース、N Y L O N（登録商標）、光ファイバー束、有機ポリマー、紙、プラスチック、ポリアクリロイルモルホリド、ポリ（４－メチルブテン）、ポリ（エチレンテレフタル酸）、ポリ（ビニルブチレート）、ポリアクリルアミド、ポリブチレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリエチレングリコールテレフタル酸、ポリホルムアルデヒド、ポリメタクリレート、ポリメチルメタクリレート、ポリプロピレン、多糖類、ポリスチレン、ポリウレタン、ポリビニルアセテート、ポリビニルクロリド、ポリビニリデンジフルオリド（P V D F）、ポリビニルピロリジノン、レーヨン、レジン、ゴム、半導体材料、セファロース（登録商標）、シリカ、シリコン、スチレンコポリマー、T E F L O N（登録商標）及び様々な他のポリマーが挙げられるが限定されない。

10

【0481】

〔0509〕 基板は平板である必要はなく、球状（例えばビーズ）又は円筒状（例えば繊維）を含むあらゆるタイプの形状を含み得る。固体支持体に連結される材料を固体支持体の何らかの部分に連結し得る（例えば多孔性の固体支持体材料の内部に連結し得る。）。

【0482】

20

〔0510〕 基板本体は、ビーズ、箱、カラム、シリンダー、ディスク、皿（例えばガラス皿、P E T R I 皿）、繊維、フィルム、フィルター、マイクロタイタープレート（例えば96ウェルマイクロタイタープレート）、多翼型の棒、ネット、ペレット、プレート、環、ロッド、ロール、シート、スライド、スティック、トレイ、チューブ又はバイアルの形態であり得る。基板は、単数の個別の本体（例えば単一チューブ、単一ビーズ）、あらゆる数の複数の基板本体（例えば一組10本のチューブ、数個のビーズ）又はその組み合わせ（例えば複数のマイクロタイタープレートを具備するトレイ、ビーズが充填されたカラム、ビーズが充填されたマイクロタイタープレート）であり得る。

【0483】

〔0511〕 非ランダム化学又は物理学的相互作用を通じてV I S T A及びV I S T A複合物が固体基板と会合させられる場合、基板にV I S T A及びV I S T A複合物を「連結」し得る。この連結は共有結合を通じ得る。しかし、連結は共有又は永久的である必要はない。「スペーサー分子」又は「リンカー基」を通じて基板に材料を連結させ得る。このようなスペーサー分子は、生体物質に連結される第一の部分と基板に連結される第二の部分とを有する分子である。従って、基板に連結される場合、スペーサー分子は、基板及び生体物質を分離するが、両方に連結される。生体物質（例えば標識）を基板に連結する方法は当技術分野で周知であり、化学カップリングが挙げられるが限定されない。

30

【0484】

〔0512〕 固相合成反応のために固相を支持し、含有するマイクロタイタープレートなどのプレートを使用し得る。マイクロタイタープレートは、固相として使用されるビーズを収容し得る。本明細書中で「粒子」又は「微粒子」又は「ナノ粒子」又は「ビーズ」又は「マイクロビーズ」又は「ミクロスフェア」は、何らかの様々な形状又はサイズを有する微粒子材料であるものとする。この形状は、一般に球状であり得るが、球状である必要はなく、例えば円筒状又は多面体であり得る。当業者にとって当然であるように、この粒子は、それらの使用に依存して、架橋デンプン、デキストラン、セルロース、タンパク質、ポリスチレン及びメチルスチレンならびに他のスチレンコポリマーなどのスチレンポリマーを含む有機ポリマー、プラスチック、ガラス、セラミック、アクリルポリマー、磁気反応性材料、コロイド、トリアゾール、炭素グラファイト、二酸化チタン、ナイロン、ラテックス及びT E F L O N（登録商標）を含むが限定されない多岐にわたる材料を具備し得る。例えばB a n g s L a b o r a t o r i e s, F i s h e r s, I Nからの“M

40

50

icrosphere Detection Guide ”を参照。

【0485】

〔0513〕 本明細書中に記載の何らかの形態の基板（例えばビーズ、箱、カラム、シリンダー、ディスク、皿（例えばガラス皿、ペトリ皿）、繊維、フィルム、フィルター、マイクロタイタープレート（例えば96ウェルマイクロタイタープレート）、多翼型の棒、ネット、ペレット、プレート、環、ロッド、ロール、シート、スライド、スティック、トレイ、チューブ又はバイアル）上に本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合物を連結させ得る。特に、粒子又はビーズは、ゲル化材料の成分であり得るか又は様々な合成プラスチック（例えばポリスチレン）製のラテックスビーズなどの別個の成分であり得る。標識（例えばストレプトアビジン）を基板（例えばビーズ）に結合させ得る。

10

【0486】

医薬組成物

〔0514〕 「医薬組成物」は、哺乳動物への投与に適切である化学又は生物学的組成物を指す。このような組成物は、口内、表皮性、硬膜外、吸入、動脈内、心臓内、脳室内、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、髄腔内、くも膜下腔内、静脈内、経口、非経口、浣腸又は坐剤を介して直腸に、皮下、真皮下、舌下、経皮及び経粘膜を含むが限定されない多くの経路のうち1以上を介した投与に対して具体的に処方され得る。さらに、注射、粉末、液体、ゲル、ドロップ又は他の投与手段によって投与が行われ得る。

【0487】

〔0515〕 「医薬賦形剤」又は「医薬的に許容可能な賦形剤」は、活性治療剤が処方される担体、通常は液体である。本発明のある実施形態において、活性治療剤は、本明細書中に記載のヒト化抗体又は1以上のその断片である。賦形剤は通常、処方物に薬理学的活性を何らもたらさないが、化学及び／又は生物学的安定性及び放出特性をもたらし得る。代表的な処方物は例えばGrennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.] で見出され得る。

20

【0488】

〔0516〕 医薬組成物は一般的に、製造及び保存条件下で滅菌性及び安定でなければならない。本発明は、医薬組成物が凍結乾燥形態で存在することを企図する。本組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム又は高薬物濃度に適切な他の秩序構造として処方され得る。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又は分散媒であり得る。本発明はさらに、医薬組成物中への安定化剤の組み入れを企図する。

30

【0489】

〔0517〕 様々な剤形の医薬組成物に本明細書中に記載のポリペプチド、複合物及び抗体を処方し得る。本発明の医薬組成物を調製するために、製剤処方の技術分野の熟練者にとって周知の技術に従い、活性成分としての少なくとも1つのVISTA及びVISTA複合物を適切な担体及び添加物と完全に混合し得る。Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.] を参照。例えば、pH 7.2のリン酸緩衝塩水中で本明細書中に記載の抗体を処方し、5.0 mg/mLの無色透明の液体溶液として供給し得る。

40

【0490】

〔0518〕 同様に、液体製剤のための組成物としては、水、アルコール、油、グリコール、保存剤、香味剤、着色剤及び懸濁化剤を含むが限定されない適切な担体及び添加物を伴う、溶液、乳液、分散液、懸濁液、シロップ剤及びエリキシルが挙げられる。非経口投与のための典型的な製剤は、滅菌水又は、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、ラッカセイ油又はゴマ油を含むが限定されない非経口投与的に許容可能な油などの担体とともに活性成分を具備し、溶解度又は保存性を促進するための他の添加剤

50

も含まれ得る。溶液の場合、凍結乾燥させて粉末にし、次いで使用直前に再構成し得る。分散液及び懸濁液の場合、適切な担体及び添加剤としては、水性ゴム、セルロース、ケイ酸塩又は油が挙げられる。

【0491】

〔0519〕 列挙した実施形態のそれぞれに対して、様々な剤形によって I S T A 及び V I S T A 複合物を投与し得る。当業者にとって公知の何らかの生物学的に許容可能な投与形態及びそれらの組み合わせを企図する。このような剤形の例としては、再構成可能な粉末、エリキシル、液体、溶液、懸濁液、乳液、粉末、顆粒剤、粒子、微粒子、分散性顆粒剤、カシェ剤、吸入剤、エアロゾル吸入剤、パッチ剤、粒子吸入剤、インプラント、デポインプラント、注射剤（皮下、筋肉内、静脈内及び皮内を含む。）、点滴及びそれらの組み合わせが挙げられるが限定されない。

10

【0492】

〔0520〕 多くの場合において、等張剤、例えば組成物中の、糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール又は塩化ナトリウム含むことが望ましい。組成物中に吸収を遅延させる物質、例えばモノステアリン酸塩及びゼラチンを含むことによって、注射用組成物の長時間吸収を行い得る。さらに、時間放出処方物において、例えば遅延放出ポリマーを含む組成物において、本明細書中に記載の化合物を処方し得る。インプラント及びマイクロカプセル化送達系を含め、制御放出処方など、急速な放出から化合物を保護する担体とともに、V I S T A 及び V I S T A 複合物を調製し得る。エチレン酢酸ビニル、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酸、ポリグリコールコポリマー（P L G）などの生体分解性の生体適合性ポリマーを使用し得る。このような処方物の調製のための多くの方法が当業者にとって公知である。

20

【0493】

〔0521〕 本組成物に補充性活性化合物も組み込まれ得る。

【0494】

〔0522〕 組成物は、例えば、所望の抗原、例えば腫瘍抗原又は他の免疫調節性化合物、例えば T o l l 様受容体アゴニストなど、1 型インターフェロン、例えば α 及び β インターフェロンなど及び C D 4 0 アゴニスト、例えばアゴニスト性の C D 4 0 抗体及び抗体断片など、好ましくは抗ヒト C D 4 0 アゴニスト性抗体及び抗体断片又は他の免疫エンハンサー又は抑制因子、例えば P D - L 1、P D - L 2、C T L A 4 融合タンパク質及びそれ

30

【0495】

〔0523〕 V I S T A を具備する組成物は、抗原又は他の免疫アゴニストをさらに具備し得る。その組み合わせの他の成分と組み合わせて、抗原に対して免疫反応を生じさせるのに有効な量で抗原を投与し得る。例えば、約 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ の量で抗原を投与し得る。いくつかの実施形態において、約 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $10 \text{mg}/\text{kg}$ の量で抗原を投与し得る。いくつかの実施形態において、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ から約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ の量で抗原を投与し得る。しかし、免疫反応を生じさせるのに有効な量を構成する抗原の特定の量は、例えば投与されている特定の抗原；投与されている特定のアゴニスト及びその量；投与されている特定のアゴニスト及びその量；免疫系の状態；アゴニスト及び抗原の投与の方法及び順序；処方物が投与されている種；及び所望の治療結果など、ある種の因子にある程度依存する。従って、一般に、抗原の有効量を構成する量を示すことは実践的ではない。しかし、当業者は、このような因子を考慮の上、適切な量を容易に決定し得る。

40

【0496】

〔0524〕 抗原は、例えば C D 8 + T 細胞反応、N K T 細胞反応、 γ/δ T 細胞反応又は T h 1 抗体反応の 1 以上を含み得る、T h 1 免疫反応を生じさせることが可能な何らかの物質であり得る。適切な抗原としては、ペプチド；ポリペプチド；脂質；糖脂質；多糖類；炭水化物；ポリヌクレオチド；プリオン；生又は不活性化細菌、ウイルス又は真菌；及び細菌、ウイルス、真菌、原生動物、腫瘍由来又は生物由来抗原、毒素又はトキシイ

50

ドが挙げられるが限定されない。

【0497】

〔0525〕 さらに、本発明のアジュバントの組み合わせと関連して、ある種の最新の実験的抗原、特に強い免疫反応を生じさせない組み換えタンパク質、糖タンパク質及びペプチドなどの物質を使用し得る。代表的な実験的サブユニット抗原としては、ウイルス性疾患、例えばアデノウイルス、AIDS、水疱瘡、サイトメガロウイルス、デング熱、ネコ白血病、家禽ペスト、A型肝炎、B型肝炎、HSV-1、HSV-2、ブタコレラ、インフルエンザA型、インフルエンザB型、日本脳炎、麻疹、パラインフルエンザ、狂犬病、呼吸器合胞体ウイルス、ロタウイルス、イボ及び黄熱病に関連するものが挙げられる。

【0498】

〔0526〕 抗原は、癌抗原又は腫瘍抗原であり得る。癌抗原及び腫瘍抗原という用語は、交換可能に使用され、癌細胞によって差次的に発現される抗原を指す。従って、癌抗原は、差次的に癌細胞に対する免疫反応を標的にするために活用され得る。従って、癌抗原は、腫瘍特異的な免疫反応を潜在的に刺激し得る。ある種の癌抗原は、必ず発現されるわけではないが、正常細胞によりコードされる。これらの抗原の一部は、正常細胞で通常サイレント（即ち発現されない）であること、ある一定の分化段階でのみ発現されるもの及び一次的に発現されるもの（例えば胚性及び胎児性抗原）として特徴付けられ得る。例えば、他の癌抗原は、突然変異体細胞性遺伝子、例えば癌遺伝子（例えば活性化ras癌遺伝子）、抑制因子遺伝子（例えば突然変異体p53）などによってコードされ得るか、又は内部欠失もしくは染色体転座の結果生じる融合タンパク質であり得る。さらに他の癌抗原が、RNA及びDNA腫瘍ウイルスにより担持されるものなどのウイルス性遺伝子によってコードされ得る。

【0499】

〔0527〕 腫瘍抗原の例としては、MAGE、MART-1/Melan-A、gp100、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPPUV）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ADAbp）、シクロフィリンb、結腸直腸関連抗原（CRC）-C017-1A/GA733、癌胎児抗原（CEA）及びその抗原性エピトープCAP-1及びCAP-2、etv6、aml1、前立腺特異的抗原（PSA）及びその抗原性エピトープPSA-1、PSA-2及びPSA-3、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、T細胞受容体/CD3-ζ鎖、腫瘍抗原のMAGEファミリー（例えばMAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2（MAGE-B2）、MAGE-Xp3（MAGE-B3）、MAGE-Xp4（MAGE-B4）、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5）、腫瘍抗原のGAGEファミリー（例えばGAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9）、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、チロシナーゼ、p53、MUCファミリー、HER2/neu、p21ras、RCAS1、α-フェトプロテイン、ε-カドヘリン、α-カテニン、β-カテニン、γ-カテニン、p120ctn、gp100sup、Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺腫様多発結腸ポリープタンパク質（APC）、ホドリン、コネキシン37、Ig-イディオタイプ、p15、gp75、GM2及びGD2ガングリオシド、ウイルス性産物、例えばヒトパピローマウイルスタンパク質など、腫瘍抗原のSmadファミリー、Imp-1、PIA、EBVにコードされる核抗原（EBNA）-1、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、SSX-1、SSX-2（HOM-MEL-40）、SSX-3、SSX-4、SSX-5、SCP-1及びCT-7及びc-erbB-2が挙げられる。

【0500】

〔0528〕 癌又は腫瘍及びこのような腫瘍に関連する特異的な腫瘍抗原としては、急性リンパ芽球性白血病（etv6、aml1、シクロフィリンb）、B細胞リンパ腫（Ig

10

20

30

40

50

ーイディオタイプ)、神経膠腫(Ｅ-カドヘリン、 α -カテニン、 β -カテニン、 γ -カテニン、p120ctn)、膀胱癌(p21ras)、胆道癌(p21ras)、乳癌(MUCファミリー、HER2/neu、c-erbB-2)、子宮頸癌(p53、p21ras)、結腸癌(p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUCファミリー)、結腸直腸癌(結腸直腸関連抗原(CRC)-CO17-1A/GA733、APC)、絨毛癌(CEA)、上皮細胞癌(シクロフィリンb)、胃癌(HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖タンパク質)、肝細胞性癌(α -フェトプロテイン)、ホジキンリンパ腫(Impr-1、EBNA-1)、肺癌(CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、リンパ系細胞由来白血病(シクロフィリンb)、メラノーマ(p53タンパク質、gp75、癌胎児性抗原、GM2及びGD2ガングリオシド、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100. sup. Pmel117)、骨髄腫(MUCファミリー、p21ras)、非小細胞肺癌(HER2/neu、c-erbB-2)、鼻咽頭癌(Impr-1、EBNA-1)、卵巣癌(MUCファミリー、HER2/neu、c-erbB-2)、前立腺癌(前立腺特異的抗原(PSA)及びその抗原性エピトープPSA-1、PSA-2及びPSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖タンパク質)、腎臓癌(HER2/neu、c-erbB-2)、子宮頸部及び食道の扁平上皮細胞癌(ヒトパピローマウイルスタンパク質などのウイルス性産物)、精巣腫瘍(NY-ESO-1)及びT細胞白血病(HTLV-1エピトープ)が挙げられる(しかし排他的ではない。)

10

【0501】

20

[0529] 当業者は、通常の実験を通じて、例えば本明細書中の開示及びGoodman, et al. (2011) Goodman及びGilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [12th Ed.]; Howland, et al. (2005) Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology [2nd Ed.]; 及びGolan, (2008) Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy [2nd Ed.]における教示を指針として、有効な投与量及び投与頻度を決定することができる。Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.]も参照。

30

【0502】

投与経路

[0530] 次の経路何れかにおいて、本明細書中に記載の組成物を投与し得る：口内、表皮、硬膜外、点滴、吸入、動脈内、心臓内、脳室内、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、髄腔内、くも膜下腔内、静脈内、経口、非経口、肺、浣腸又は坐剤を介して直腸に、皮下、真皮下、舌下、経皮及び経粘膜。好ましい投与経路は静脈内注射又は点滴である。投与は、局所であり得、この場合、本組成物が、疾患部位、例えば腫瘍に直接、その近接部に、局所的に、付近に、そこに、その周囲に、又はその近くに投与され、又は全身的、この場合、本組成物が、患者に与えられ、広く全身を通過し、それにより疾患部位に到達する。局所投与(例えば注射)は、疾患を包含し、及び／又は疾患により影響を受ける、及び／又は疾患兆候及び／又は症状が活動性であるか又は起こっていると思われる、細胞、組織、疾患、器官及び／又は器官系(例えば腫瘍部位)への投与により遂行され得る。投与は、その作用が所望される、組成物が直接適用される局所効果がある局所(例えば腫瘍部位)であり得る。

40

【0503】

[0531] 列挙される各実施形態に対して、当技術分野で公知のような様々な剤形により本化合物を投与し得る。当業者にとって公知の何らかの生物学的に許容可能な剤形及びそれらの組み合わせが企図される。このような剤形の例としては、咀嚼錠、速溶性錠剤、発泡錠、再構成可能な粉末、エリキシル、液剤、溶液剤、懸濁液、乳液、錠剤、多層錠、

50

二層錠、カプセル、軟ゼラチンカプセル、硬ゼラチンカプセル、カプレット、薬用キャンディー、チュアブル薬用キャンディー、ビーズ、粉末、ガム、顆粒剤、粒子、微粒子、分散性顆粒剤、カシェ剤、注水器、坐剤、クリーム、局所剤、吸入剤、エアロゾル吸入剤、パッチ剤、粒子吸入剤、インプラント、デポインプラント、経口摂取剤、注射用（皮下、筋肉内、静脈内及び皮内を含む。）、点滴及びそれらの組み合わせが挙げられるが限定されない。

【0504】

〔0532〕 混合により含まれ得る他の化合物は、例えば医学的に不活性の成分（例えば固体及び液体希釈剤）、例えば、錠剤又はカプセル用の、ラクトース、デキストロース、サッカロース、セルロース、デンプン又はリン酸カルシウム、軟カプセル用のオリーブ油又はオレイン酸エチル及び懸濁液又は乳液用の水又は植物油；滑沢剤、例えばシリカ、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム又はカルシウム及び／又はポリエチレングリコールなど；ゲル化剤、例えばコロイド粘土など；増粘剤、例えばトラガカントガム又はアルギン酸ナトリウムなど、結合剤、例えばデンプン、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又はポリビニルピロリドンなど；崩壊剤、例えばデンプン、アルギン酸、アルギン酸塩又はデンプングリコール酸ナトリウムなど；発泡性混合物；色素；甘味料；湿潤剤、例えばレシチン、ポリソルベート又はラウリル硫酸塩など；及び、このような処方物に対する公知の添加物である、他の治療的に許容可能な補助成分、例えば保湿剤、保存剤、緩衝剤及び抗酸化剤などである。

【0505】

〔0533〕 経口投与のための分散液は、シロップ剤、乳液、溶液又は懸濁液であり得る。シロップ剤は、担体として、例えば、サッカロース又はグリセロールとサッカロース及び／又はマンニトール及び／又はソルビトールを含有し得る。懸濁液及び乳液は、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又はポリビニルアルコールを含有し得る。

【0506】

〔0534〕 さらに実施形態において、本発明は、有効量の1以上の本発明の抗体及びその断片を具備する医薬投与単位を具備する1以上の容器を含むキットを提供する。キットは、説明書、指示書、ラベル、販売情報、警告又は情報パンフレットを含み得る。

【0507】

投与量

〔0535〕 本発明の何れかの実施形態による治療組成物中のVISTA又はVISTA複合物の量は、疾患状態、年齢、性別、体重、病歴、リスク因子、疾病素因、投与経路、既存の治療計画（例えば他の投薬との可能性のある相互作用）及び個体重量などの因子に従い変動し得る。投与計画は、最適な治療反応をもたらすために調整され得る。例えば、単ボラスを投与し得るか、ある期間にわたり数回の分割用量を投与し得るか、又は用量は、治療状況の要件により示されるように、比例的に増減させ得る。

【0508】

〔0536〕 投与を容易にし、投与量を均一にするために、単位剤形で非経口組成物を処方することは、特に有利である。単位剤形は、本明細書中で使用される場合、処置しようとする哺乳動物対象に対する単位投与量として適している物理的に個別の単位を指し；各単位は、必要な医薬担体とともに所望の治療効果を生じさせるために計算される、所定量の抗体及びその断片を含有する。本発明の単位剤形に対する規格は、個体における感受性の処置のための、抗体及びその断片の特有の特徴及び達成しようとする特定の治療効果及びこのような抗体及びその断片を作製する技術分野に特有の制限によって決定され、それに直接依存する。本発明の抗体及びその断片又はその適切な医薬組成物が効果的である哺乳動物（例えばヒト）における状態の処置のための治療的用途において、本発明の抗体及びその断片を有効量で投与し得る。本発明に対する必要に応じた投薬は、本明細書中に記載の、組成物、医薬組成物又は何らかの他の組成物であり得る。

〔0537〕 単回投与、2回投与、3回投与、4回投与及び／又は5回投与として投与量

が投与され得る。単回で、同時に及び連続的に投与量が投与され得る。

〔0538〕 剤形は、当業者にとって公知の放出の何らかの形態であり得る。活性成分の即時放出又は活性成分の持続もしくは制御放出を提供するために、本発明の組成物を処方し得る。持続放出又は制御放出調製物において、長時間にわたり（例えば4から24時間）、血液レベルが治療範囲内に維持されるが、毒性レベルを下回るような速度で活性成分の放出が起こり得る。好ましい剤形としては、即時放出、徐放、パルス放出、可変放出、制御放出、持続的放出、持続放出、遅延放出、長時間作用及びそれらの組み合わせが挙げられ、これらは当技術分野で公知である。

〔0539〕 本明細書中で定められるとおり、治療の有効量のタンパク質又はポリペプチド（即ち有効投与量）は、約0.001から30mg/kg体重、好ましくは約0.01から25mg/kg体重、より好ましくは約0.1から20mg/kg体重及びさらにより好ましくは約1から10mg/kg、2から9mg/kg、3から8mg/kg、4から7mg/kg又は5から6mg/kg体重の範囲である。当業者にとって当然のことながら、疾患又は障害の重症度、以前の処置、対象の総体的健康状態及び／又は年齢及び存在する他の疾患を含むが限定されないある種の因子は、対象を効果的に処置するのに必要とされる投与量に影響を与え得る。さらに、治療の有効量のタンパク質、ポリペプチド又は抗体での対象の処置は、単回処置を含み得るか、又は好ましくは、一連の処置を含み得る。

【0509】

〔0540〕 好ましい例において、約1から10週間、好ましくは2から8週間、より好ましくは約3から7週間及びさらにより好ましくは約4、5又は6週間にわたり、週に1回、約0.1から20mg/kg体重の範囲の抗体、タンパク質又はポリペプチドで対象を処置する。これも当然のことながら、処置のために使用される抗体、タンパク質又はポリペプチドの有効な投与量は、一連の特定の処置にわたり増減させ得る。投与量の変化が起こり、本明細書中で記載のように診断アッセイの結果から明らかになり得る。

【0510】

〔0541〕 当然のことながら、当技術分野で公知である標準的な薬理学的モデルを用いて本組成物の薬理学的活性を監視し得る。さらに、当然のことながら、VISTA及びVISTA複合物、抗体又はその抗原結合断片を具備する組成物は、部位特異的な送達に適切なポリマーマトリクス又は膜中に組み込まれるかもしくは封入され得るか、又は部位特異的な送達に影響を与え得る特異的な標的化剤で官能化され得る。これらの技術、ならびに他の薬物送達技術は当技術分野で周知である。特定の状況に対する最適投与量の決定は、当業者の能力内である。例えばGrennaro(2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21st Ed.] を参照。

【0511】

処置の方法

〔0542〕 本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合物は、炎症性障害、自己免疫疾患を処置することを必要とする対象に有効量のVISTA及びVISTA複合物を投与することを具備する、CD4⁺T細胞増殖を抑制する、CD8⁺T細胞増殖を抑制する、CD4⁺T細胞サイトカイン産生を抑制する、及びCD8⁺T細胞サイトカイン産生を抑制する、炎症性障害、自己免疫疾患を処置するための方法において使用され得る。さらに、本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合物は、有効量の本明細書中に記載のVISTA及びVISTA複合物を具備する、CD4⁺T細胞増殖を抑制する、CD8⁺T細胞増殖を抑制する、CD4⁺T細胞サイトカイン産生を抑制する、及びCD8⁺T細胞サイトカイン産生を抑制する、自己免疫疾患を処置することにおける使用のための薬剤を製造するために使用され得る。有効量の本明細書中に記載のVISTA又はVISTA複合物を具備する、CD4⁺T細胞増殖を抑制する、CD8⁺T細胞増殖を抑制する、CD4⁺T細胞サイトカイン産生を抑制する、及びCD8⁺T細胞サイトカイン産生を抑制する、自己免疫疾患を処置するための組成物を製造するために、本明細書中に記載のVISTA及

びV I S T A複合物を医薬的に許容可能な担体と混合し得る。

【0512】

〔0543〕 本明細書中に記載の治療方法は、細胞外ドメインがB7ファミリーリガンドPD-L1に対する相同性を有する、新規及び構造的に区別される、Igスーパーファミリー阻害性リガンドである、PD-L3又はV I S T Aの投与を具備し得る。この分子は、交換可能に本明細書中でPD-L3もしくはV I S T A、又はT細胞活性化のVドメイン免疫グロブリン抑制因子(V I S T A)と呼ばれる。V I S T Aは、主に造血区画内で発現され、骨髄APC及びT細胞において高度に制御される。V I S T A阻害経路の治療的介入は、多岐にわたる癌の処置のためにT細胞介在性免疫性を調整するための新規アプローチに相当する。V I S T Aポリペプチド、複合物、核酸、リガンド及びその調節物質は、自己免疫障害及び炎症性障害の処置のために、免疫性、特にT細胞免疫性を制御することにおいて有用であり得る。

10

【0513】

〔0544〕 膀胱癌、卵巣癌及びメラノーマ、自己免疫障害及び炎症性障害を含むが限定されない癌を処置するためのV I S T A、V I S T A-複合物(例えばV I S T A-Ig)及び抗V I S T A抗体の使用。さらに、本発明は、特に、アレルギー、自己免疫障害及び炎症状態など、免疫抑制が治療的に所望される状態を処置するための、V I S T Aタンパク質、特に多量体V I S T Aタンパク質及び、これらを発現するウイルス性ベクター(例えばアデノウイルス)の使用に関する。

【0514】

20

〔0545〕 患者は、自己免疫疾患の症状を発現し得るか、又は患者は症状がない。インビトロ又はエクスピボで、細胞、例えばヒト細胞において本明細書中に記載の方法を使用し得る。あるいは、インビボ(例えば治療的)プロトコールの一部として、対象に存在する細胞において本方法を行い得る。

【0515】

〔0546〕 本発明は、不十分又は過剰なV I S T A(PD-L3)タンパク質産生又はV I S T A(PD-L3)野生型タンパク質と比較して活性が低下しているか又は異常なV I S T A(PD-L3)タンパク質型の産生を特徴とする障害に対してリスクのある(又は罹患し易い)対象を処置するための予防及び治療の両方法を提供する。さらに、例えばV I S T A(PD-L3)のその逆受容体との相互作用を調整することによって、V I S T A(PD-L3)タンパク質を検出及び単離し、V I S T A(PD-L3)タンパク質のバイオアベイラビリティを制御し、V I S T A(PD-L3)活性を調整するために、本発明の抗V I S T A(PD-L3)抗体を使用し得る。

30

【0516】

本発明の使用及び方法

〔0547〕 次の方法の1以上において、本明細書中に記載の、V I S T A分子、例えばV I S T A核酸分子、ポリペプチド、ポリペプチド相同体及び抗体及び抗体断片を使用し得る：a)スクリーニングアッセイ；b)予測的医薬(例えば診断アッセイ、予後アッセイ及び臨床治験のモニタリング)；及びc)処置方法(例えば免疫反応を上方又は下方調整することによる、例えば治療及び予防)。本明細書中に記載のように、本発明のV I S T A(PD-L3)ポリペプチドは、次の活性の1以上を有する：1)その天然の結合パートナーに結合する、及び/又はその活性を調節する、2)細胞内又は細胞間シグナル伝達を調整する、3)Tリンパ球活性化を調整する、4)生物、例えばマウス又はヒトなどの哺乳動物生物の免疫反応を調整する。下記でさらに述べるように、例えば、V I S T A(PD-L3)ポリペプチドを発現させる(例えば遺伝子治療適用における宿主細胞中の組み換え発現ベクターを介して)、V I S T A(PD-L3)mRNA(例えば生体試料中)又はV I S T A(PD-L3)遺伝子中の遺伝子変異を検出する、及びV I S T A(PD-L3)活性を調整するために、本発明の単離核酸分子を使用し得る。V I S T A(PD-L3)ポリペプチドの不十分もしくは過剰な産生又はV I S T A(PD-L3)阻害剤の産生を特徴とする状態又は障害を処置するために、V I S T A(PD-L3)ポリペ

40

50

プチドを使用し得る。さらに、天然のVISTA (PD-L3) 結合パートナーについてスクリーニングする、VISTA (PD-L3) 活性を調整する薬物又は化合物についてスクリーニングする、ならびに、VISTA (PD-L3) ポリペプチドの不十分もしくは過剰な産生又はVISTA (PD-L3) 野生型ポリペプチドと比較して活性が低下しているか、異常か又は好ましくないVISTA (PD-L3) タンパク質型の産生を特徴とする状態又は障害（例えば免疫系障害、例えば重症複合型免疫不全症、多発性硬化症、全身性紅斑性狼瘡、I型糖尿病、リンパ増殖性症候群、炎症性腸疾患、アレルギー、喘息、移植片対宿主病及び移植拒絶；細菌及びウイルスなどの感染性病原体に対する免疫反応；及びリンパ腫及び白血病などの免疫系癌）を処置するために、VISTA (PD-L3) ポリペプチドを使用し得る。さらに、例えばVISTA (PD-L3) とその天然の結合パートナーとの間の相互作用を調整することによって、VISTA (PD-L3) ポリペプチドを検出及び単離する、VISTA (PD-L3) ポリペプチドのバイオアベイラビリティを制御する、及びVISTA (PD-L3) 活性を調整するために、本発明の抗VISTA (PD-L3) 抗体を使用し得る。

10

【0517】

[0548] 可溶性VISTA (PD-L3) -タンパク質（例えばVISTA (PD-L3) -Ig融合タンパク質）の存在下で、抗VISTA抗体がVISTA (PD-L3) 関連免疫機能におけるVISTA (PD-L3) の抑制効果を促進するという事実に基づき、治療薬としての使用のための抗VISTA (PD-L3) 抗体を選択し得る。これらの抗VISTA抗体はインビボで、免疫性におけるそれらのインビトロでの効果から予想されるものと逆の挙動をとるので（即ちこれらの抗VISTAモノクローナル抗体は免疫抑制性である。）、これは、全く予想外である。

20

【0518】

[0549] 本発明の重要な態様は、VISTA (PD-L3) 発現もしくは活性又はその天然の結合パートナーとの相互作用を調整する方法に関する。治療に関連して、VISTA (PD-L3) は、CD28同時刺激を阻害すること、免疫細胞のTCR活性化を阻害すること、活性化された免疫細胞（CD4+及びCD8+T細胞）の増殖を阻害すること、T細胞によるサイトカイン産生（IL-2、 γ インターフェロン）を阻害すること及び阻害シグナルを免疫細胞に伝達することが明らかになっている。従って、免疫反応を調整するために、VISTA (PD-L3) の活性及び／又は発現、ならびにT細胞におけるVISTA (PD-L3) とその結合パートナーとの間の相互作用を調整し得る。VISTA (PD-L3) は、（T細胞上で）阻害受容体に結合するので、VISTA (PD-L3) 活性の上方制御の結果、免疫反応の下方制御が起こるはずであり、一方で、VISTA (PD-L3) 活性の下方制御の結果、免疫反応の上方制御が起こるはずである。実施形態において、VISTA (PD-L3) は阻害受容体に結合する。既に記されているように、直観に反して、インビトロで（VISTA (PD-L3) -Igの存在下で）抑制性のVISTA (PD-L3) -Ig融合タンパク質の活性を促進する、出願者により作製されるVISTA (PD-L3) 特異的な抗体は（即ちこれらの抗体は、サイトカイン産生、T細胞増殖、分化又は活性化及び既に記した他の機能におけるVISTA (PD-L3) の効果など、VISTA (PD-L3) 関連活性の抑制を促進する。）、インビボで予想されることとは逆の挙動をとり、即ちこれらの抗体はインビボで免疫抑制性であることが分かった。

30

40

【0519】

[0550] 本発明の調整方法は、VISTA (PD-L3) ポリペプチド又は細胞と関連するVISTAの活性（PD-L3）ポリペプチド活性の1以上を調整する薬剤、例えばVISTA (PD-L3) の発現又は活性を調整する、及び／又はVISTA (PD-L3) 及びその天然の結合パートナーの相互作用を調整する薬剤と細胞を接触させることを伴う。VISTA (PD-L3) ポリペプチド活性を調整する薬剤は、本明細書中で記載のような物質、例えば核酸又はポリペプチド、VISTA (PD-L3) ポリペプチドの天然の結合パートナー、VISTA (PD-L3) 抗体、VISTA (PD-L3) ア

50

ゴニスト又はアンタゴニスト、VISTA (PD-L3) アゴニスト又はアンタゴニストのペプチド模倣物、VISTA (PD-L3) ペプチド模倣物又は他の低分子であり得る。VISTA (PD-L3) のその天然の結合パートナー又はリガンドの何れかとの結合を妨害するために、VISTA (PD-L3) の可溶型も使用し得る。

【0520】

[0551] VISTA (PD-L3) の発現を調整する薬剤は、例えばアンチセンス核酸分子、3本鎖オリゴヌクレオチド、リボザイム又はVISTA (PD-L3) ポリペプチドの発現のための組み換えベクターである。例えば、VISTA (PD-L3) ポリペプチド翻訳開始部位の周囲の領域に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し得る。1以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドを一般的には200 µg/mLで細胞培地に添加し得るか、又はVISTA (PD-L3) ポリペプチドの合成を妨げるために患者に投与し得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは細胞により取り込まれ、VISTA (PD-L3) mRNAとハイブリッド形成して翻訳を妨げる。あるいは、2本鎖DNAに結合して、3本鎖コンストラクトを形成してDNAの巻き戻し及び転写を妨げるオリゴヌクレオチドを使用し得る。何れかの結果として、VISTA (PD-L3) ポリペプチドの合成が遮断される。VISTA (PD-L3) 発現が調整される場合、好ましくはこのような調整は、VISTA (PD-L3) 遺伝子をノックアウトすることによる以外の手段により起こる。

【0521】

[0552] 細胞中のVISTA (PD-L3) の量を調節することにより発現を調整する薬剤はまた、細胞中のVISTA (PD-L3) 活性の総量を調整する。ある実施形態において、VISTA (PD-L3) を調整する薬剤は、1以上のVISTA (PD-L3) 活性を刺激する。このような刺激剤の例としては、活性VISTA (PD-L3) ポリペプチド及び細胞に導入されたVISTA (PD-L3) をコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、1以上のVISTA (PD-L3) 活性を阻害する。このような阻害剤の例としては、アンチセンスVISTA (PD-L3) 核酸分子、抗VISTA (PD-L3) 抗体、VISTA (PD-L3) 阻害剤及び対象スクリーニングアッセイにおいて同定される化合物が挙げられる。さらなる実施形態において、阻害剤は、抗VISTA (PD-L3) 抗体及び抗PD-L1又は抗PD-L2抗体の組み合わせである。これらの調整方法は、インビトロで（例えば細胞をこの物質と接触させることにより）又は、あるいはインビボで細胞とこの薬剤を接触させることにより（例えば対象にこの薬剤を投与することにより）行い得る。そのようなものとして、本発明は、VISTA (PD-L3) ポリペプチドの上方又は下方調整から恩恵を受ける状態又は障害、例えばVISTA (PD-L3) ポリペプチド又は核酸分子の好ましくない、不十分な又は異常な発現又は活性を特徴とする障害、に罹患している個体を処置するための方法を提供する。ある実施形態において、本方法は、薬剤（例えば本明細書中に記載のスクリーニングアッセイにより同定された薬剤）又はVISTA (PD-L3) 発現又は活性を調整する（例えば上方制御する又は下方制御する）薬剤の組み合わせを投与することを伴う。別の実施形態において、本方法は、低下した、異常な又は好ましくないVISTA (PD-L3) 発現又は活性を補うための治療としてVISTA (PD-L3) ポリペプチド又は核酸分子を投与することを伴う。

【0522】

[0553] 本発明は、VISTA (PD-L3) ポリペプチド又はVISTA (PD-L3) 発現もしくは少なくとも1つのVISTA (PD-L3) 活性を調整する薬剤を対象に投与することにより、異常な又は好ましくないVISTA (PD-L3) 発現又は活性と関連する疾患又は状態を対象において予防するための方法を提供する。異常な又は好ましくないVISTA (PD-L3) 発現又は活性により引き起こされるか又はそれが関与する疾患又は障害に対するリスクがある対象は、例えば本明細書中で記載のような診断又は予後アッセイの何れか又は組み合わせによって同定し得る。予防用薬剤の投与は、疾患又は障害が予防されるか又は、あるいはその進行が遅くなるように、VISTA (PD

10

20

30

40

50

ーL3) 異常の症状特性の出現前に行い得る。VISTA (PD-L3) 異常のタイプに依存して、対象を処置するために、例えばVISTA (PD-L3) ポリペプチド、VISTA (PD-L3) アゴニスト又はVISTA (PD-L3) アンタゴニスト (例えば抗VISTA (PD-L3) 抗体) 剤を使用し得る。本明細書中に記載のスクリーニングアッセイに基づいて、適切な薬剤を決定し得る。

【0523】

[0554] VISTA及びVISTA複合物をさらなる化学療法剤、細胞毒性剤、抗体 (例えば抗PD-L1、PD-L2又はCTLA-4抗体)、リンホカイン又は造血成長因子と混合し得る。VISTA及びVISTA複合物はまた、別の抗体、リンホカイン、細胞毒性剤 (例えばDNA、RNA又はタンパク質合成を阻害する部分、放射性核種又はリボソーム阻害タンパク質、例えば²¹²Bi、¹³¹I、¹⁸⁸Re、⁹⁰Y、ビンデシン、メトトレキサート、アドリアマイシン、シスプラチン、ヤマゴボウ抗ウイルス性タンパク質、シュードモナス外毒素A、リシン、ジフテリア毒素、リシンA鎖又は細胞毒性ホスホリパーゼ酵素)、免疫抑制剤 (例えばシクロスポリン、レフルノミド、メトトレキサート、アゾチプリン、メルカプトプリン、ダクチノマイシン、タクロリムス又はシロリムス) 又は造血成長因子と組み合わせて投与することもできる。化学発光標識、常磁性標識 (例えばアルミニウム、マンガン、白金、酸素、ランタン、ルテチウム、スカンジウム、イットリウム又はガリウム)、MRI造影剤、蛍光標識、生物発光標識又は放射性標識でVISTA及びVISTA複合物を標識し得る。本明細書中に記載の方法において、抗体と同時に又は連続的に第二の薬剤を投与し得る。例えば、第二の薬剤は、免疫反応を下方制御する薬剤 (例えばPD-L1、PD-L2又はCTLA-4融合タンパク質又はそれに特異的な抗体) であり得る。

【0524】

[0555] ある実施形態において、自己免疫疾患がある対象を処置する方法は、二次療法を受容し得る対象にVISTA及びVISTA複合物を投与することを具備する。二次療法の例としては、化学療法、放射線療法、免疫療法、光療法、寒冷療法、毒素療法、ホルモン療法又は外科手術が挙げられる。従って、本発明は、標準的な抗癌療法と組み合わせた方法及び組成物の使用を企図する。処置しようとする患者はあらゆる年齢であり得る。当業者は、VISTA又はVISTA複合物との複合化において使用され得る他の抗癌療法の存在及び開発を認めるであろう。

【0525】

[0556] 用量の決定は、当業者のレベル内である。急性処置のために、1週間以下、多くの場合は1から3日間、VISTA及びVISTA複合物を投与し得るか、又は数カ月又は数年間にわたり慢性治療において使用し得る。一般に、VISTA及びVISTA複合物の治療的有效量は、自己免疫疾患において臨床的に意義のある変化を生じさせるのに十分な量である。

【0526】

[0557] 阻害受容体により形質導入されるような阻害シグナルは、同時刺激受容体 (例えばCD28又はICOS) が免疫細胞上に存在しない、従って単純に阻害受容体と同時刺激受容体との間の、同時刺激分子の結合に対する競合の機能ではない場合でも生じ得る (Fallarino, et al. (1998) J. Exp. Med. 188:205)。免疫細胞への阻害シグナルの伝達の結果、免疫細胞において無反応、アネルギー又はプログラム化細胞死が起こり得る。好ましくは、阻害シグナルの伝達は、アポトーシスを伴わない機構を通じて操作する。

【0527】

自己免疫疾患

[0558] 自己免疫の処置のための、組成物、使用及び方法において、本明細書中に記載の、VISTAポリペプチド、多量体VISTAポリペプチド、VISTA融合タンパク質 (例えばVISTA-Ig) 及び抗VISTA抗体を使用し得る。

【0528】

〔0559〕 T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリン含有抑制因子(VISTA)は、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに関連するファミリーのメンバーであり、免疫系において顕著な影響を発揮する。Igスーパーファミリーは、多くの重要な免疫制御因子、例えばB7ファミリーリガンド及び受容体からなる。最もよく特徴が分かっている同時刺激リガンドは、Igスーパーファミリーに属する、B7.1及びB7.2であり、専門的なAPC上で発現され、その受容体はCD28及びCTLA-4である。

【0529】

〔0560〕 B7ファミリーリガンドは、同時刺激B7-H2(ICOSリガンド)及びB7-H3、ならびに同時阻害B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1又はB7x)及びB7-H6を含むように拡張した。Brandt, et al. (2009) J Exp Med 206, 1495-1503; Greenwald, et al. (2005) Annu Rev Immunol 23:515-548。従って、さらなるCD28ファミリー受容体が同定されている。ICOSは、活性化T細胞上で発現され、B7-H2に結合する。ICOSは、T細胞活性化、分化及び機能に重要な陽性同時制御因子である。Dong, et al. (2001) Nature 409, 97-101。一方で、プログラム死1(PD-1)はT細胞反応を負に制御する。PD-1^{-/-}マウスは、狼瘡様自己免疫疾患又は自己免疫拡張型心筋症を発現する。Nishimura, et al. (2001) Science 291:319-322。最近、CD80がT細胞に阻害シグナルを伝達するPD-L1に対する第二の受容体として同定された。Butte, et al. (2007) Immunity 27, 111-122。この2つの阻害B7ファミリーリガンド、PD-L1及びPD-L2は異なる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、一方でPD-L1は、造血細胞及び非造血細胞型の両方で広く発現される。PD-1受容体の免疫抑制的な役割と一致して、PD-L1^{-/-}及びPD-L2^{-/-}マウスを用いた研究から、T細胞増殖及びサイトカイン産生の阻害において重複する役割を有することが示されている。このとき、VISTAは、造血細胞において選択的に発現されると思われる、これにより分布においてPD-L1とは区別され、自己免疫疾患の発現を負に制御することにおいて重要な役割を果たすと思われる。

【0530】

〔0561〕 細胞外ドメインがB7ファミリーリガンドPD-L1に対して最大の相同性を有する、新規及び構造的に区別されるIgスーパーファミリー阻害性リガンド。その最も近縁のものが系統的にPD-L1であるものの、これは、類似性レベルが中程度(20%)であるがゆえにPD-Lの名称が与えられなかった。これは、可能性のあるタンパク質キナーゼC結合部位を除き明白なシグナル伝達モチーフはなく、93aa細胞質ドメインを有する。図4参照。VISTAは負の制御リガンドであり、これは次の事実に基づく：

【0531】

〔0562〕 可溶性VISTA-Ig融合タンパク質は、インビトロでCD4⁺及びCD8⁺T細胞増殖及びサイトカイン産生を抑制する。PD-1^{-/-}T細胞を用いて抑制が観察され、これはPD-1がVISTA受容体ではないことを示す。

【0532】

〔0563〕 APCにおけるVISTAの過剰発現は、インビトロでCD4⁺及びCD8⁺T細胞増殖を抑制する。

【0533】

〔0564〕 腫瘍細胞上でのVISTA過剰発現は、腫瘍ワクチン接種宿主において防御的な抗腫瘍免疫性を損なわせる。

【0534】

〔0565〕 VISTA^{-/-}マウスは、炎症性表現型を発現し、これはVISTAが免疫抑制性機能を有することを裏付ける。VISTA^{-/-}DCは、WT DCよりも強くT細胞増殖を刺激する。

【0535】

〔0566〕 抗VISTAモノクローナル抗体（13F3）は、インビトロでVISTA⁺APCによるT細胞反応のVISTA誘導性抑制を遮断し、T細胞活性化を促進する。

【0536】

〔0567〕 抗VISTAモノクローナル抗体は、インビボでEAEを悪化させ、脳炎誘発性Th17の頻度を増加させた。

【0537】

〔0568〕 抗VISTAモノクローナル抗体は、複数の（6種類の）マウス腫瘍モデルにおける腫瘍寛解を誘導し、これらのモデルでの骨髄由来抑制細胞（MDSC）におけるVISTA発現は非常に高く、これは、VISTA⁺MDSCが腫瘍特異的な免疫性を抑制することを示唆する。

【0538】

〔0569〕 自己免疫疾患又は障害の処置のための、組成物、使用及び方法において、本明細書中に記載の、VISTAポリペプチド、多量体VISTAポリペプチド、VISTA融合タンパク質（例えばVISTA-Ig）、核酸配列の配列番号38から67の何れか1つからなるsiRNA分子及び抗VISTA抗体を使用し得る。自己免疫疾患又は障害の例としては、後天性免疫不全症候群（AIDS）、後天性脾臓委縮症、急性前部ブドウ膜炎、急性播種性脳脊髄炎（ADEM）、急性痛風性関節炎、急性壊死性出血性白質脳炎、急性又は慢性副鼻腔炎、急性化膿性髄膜炎（又は他の中枢神経系炎症性障害）、急性の重篤な炎症、アジソン病、副腎炎、成人発症糖尿病（II型糖尿病）、成人発症特発性副甲状腺機能低下症（AOIH）、無ガンマグロブリン血症、無顆粒球症、脈管炎（（リウマチ性多発筋痛及び巨細胞（高安）関節炎を含む）大血管炎を含む。）を含む血管炎、アレルギー性状態、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、アレルギー性超過敏性疾患、アレルギー性神経炎、アレルギー反応、円形脱毛症、全頭脱毛症、アルポート症候群、肺炎（例えばアレルギー性肺炎及び線維性肺炎）、アルツハイマー病、アミロイドーシス、筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルー・ゲーリック病）、好酸球関連障害（例えば好酸球増加症）、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、血管拡張症、抗体介在性腎炎、抗GBM／抗TBM腎炎、抗原－抗体複合体介在性疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、抗リン脂質症候群（APS）、アフタ、アフタ性口内炎、再生不良性貧血、不整脈、動脈硬化症、動脈硬化性障害、関節炎（例えば関節リウマチ、例えば急性関節炎、慢性関節リウマチ）、進行性慢性関節炎、変形性関節炎、回虫症、アスペルギルス腫（又は好酸球を含有する肉芽腫）、アスペルギルス症、アスペルミオジェネシス、喘息（例えば気管支喘息、気管支の喘息及び自己免疫喘息）、毛細血管拡張性運動失調、失調性硬化症、アテローム性動脈硬化症、自閉症、自己免疫血管浮腫、自己免疫再生不良性貧血、自己免疫萎縮性胃炎、自己免疫糖尿病、自己免疫精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫疾患、膠原病に伴う自己免疫障害、自己免疫自律神経障害、自己免疫耳疾患（例えば自己免疫内耳疾患（AGED））、甲状腺炎、例えば自己免疫甲状腺炎を含む自己免疫内分泌疾患、自己免疫消化器症候群、自己免疫性腺機能不全、自己免疫難聴、自己免疫溶血、自己免疫肝炎、自己免疫肝臓病学的障害、自己免疫高脂血症、自己免疫免疫不全症、自己免疫内耳疾患（AIED）、自己免疫心筋炎、自己免疫好中球減少症、自己免疫脾炎、自己免疫多腺性内分泌障害、自己免疫多腺性症候群I型、自己免疫網膜症、自己免疫血小板減少性紫斑病（ATP）、自己免疫甲状腺疾患、自己免疫蕁麻疹、自己免疫介在性胃腸疾患、軸索及びニューロンのニューロパチー、バロー病、ベーチェット病、良性家族性及び虚血－再かん流傷害、良性リンパ球性血管炎、ベルギー病（IgA腎症）、愛鳥家肺、失明、ベック病、細気管支炎閉塞性（非移植）vs NSIP、気管支炎、気管支肺アスペルギルス症、バートン症候群、水疱性類天疱瘡、カプラン症候群、心筋症、心血管系虚血、キャスルマン病、セリアック病、セリアックスプルー（グルテン腸症）、小脳変性症、脳虚血及び血管新生を伴う疾患、シャーガス病、チャンネル病（例えばてんかん）、CNSのチャンネル病、脈絡網膜炎、脈絡膜炎、自己免疫血液障害、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、慢性接触皮膚炎、慢性好酸球

10

20

30

40

50

性肺炎、慢性疲労症候群、慢性肝炎、慢性超過敏性肺臓炎、慢性炎症性関節炎、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー（C I D P）、慢性難治性炎症、慢性粘膜皮膚性カンジダ症、慢性ニューロパチー（例えばI g M多発性ニューロパチー又はI g M介在性ニューロパチー）、慢性閉塞性気道疾患、慢性肺炎症性疾患、慢性再発性多巣性骨髄炎（C R M O）、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）又は亜急性甲状腺炎、チャグ・ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡／良性粘膜類天疱瘡、C N S炎症性障害、C N S脈管炎、セリアック病、コーガン症候群、寒冷凝集素症、ポリープ性大腸炎、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、潰瘍性大腸炎、膠原線維性大腸炎、T細胞浸潤及び慢性炎症反応を含む状態、先天性心臓ブロック、先天性風疹感染、クームス陽性貧血、冠動脈疾患、コクサッキー心筋炎、C R E S T症候群（石灰沈着、レイノー現象）、クローン病、クリオグロブリン血症、クッシング症候群、毛様体炎（例えば慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、虹彩毛様体炎又はフックス毛様体炎）、嚢胞性線維症、サイトカイン誘導性毒性、聴覚消失、変形性関節炎、脱髄性疾患（例えば自己免疫脱髄性疾患）、脱髄性ニューロパチー、デング熱、ヘルペス状皮膚炎及びアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎を含む皮膚炎、皮膚筋炎、急性炎症性要素を伴う皮膚疾患、デビック病（視神経脊髄炎）、糖尿病性大動脈障害、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、びまん性間質性肺線維症、拡張型心筋症、円板状狼瘡、白血球血管外漏出を含む疾患、ドレスラー症候群、デュプュイトラン拘縮、エコーウイルス感染、アレルギー性又はアトピー性湿疹を含む湿疹、脳炎、例えばラスムッセン脳炎及び辺縁系及び／又は脳幹脳炎、脳脊髄炎（例えばアレルギー性脳脊髄炎又はアレルギー性脳脊髄炎及び実験的アレルギー性脳脊髄炎（E A E））、動脈内過形成、心内膜炎、内分泌性眼障害、子宮内膜症、心内膜心筋線維症、水晶体過敏性眼内炎、眼内炎、アレルギー性腸炎、好酸球増加症－筋痛症候群、好酸球性筋膜炎、流行性角結膜炎、後天性表皮水疱症（E B A）、上強膜、上強膜炎、エプスタイン＝バーウイルス感染、持続性隆起性紅斑、多形性紅斑、癩性結節性紅斑、結節性紅斑、胎児赤芽球症、食道運動不全、本態性混合型クリオグロブリン血症、篩骨、エバンス症候群、実験的アレルギー性脳脊髄炎（E A E）、第V I I I因子欠乏症、農夫肺、フェブリスリウマチ、フェルティー症候群、線維筋痛症、線維性肺胞炎、フィラリア症、巣状分節性糸球体硬化症（F S G S）、食中毒、前頭骨、胃萎縮、巨細胞関節炎（側頭関節炎）、巨細胞肝炎、巨細胞多発性筋痛、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群を伴う、及び伴わない糸球体腎炎（G N）、例えば慢性又は急性糸球体腎炎（例えば原発性G N）、グッドパスチャー症候群、痛風性関節炎、顆粒球輸血関連症候群、リンパ腫様肉芽腫症を含む肉芽腫症、多発性血管炎を伴う肉芽腫症（G P A）、肉芽腫性ブドウ膜炎、グレーブズ病、ギラン・バレー症候群、滴状乾癬、血色素尿症発作、ハーマン＝リッチ症候群、橋本病、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、ヘモクロマトーシス、溶血性貧血又は自己免疫性溶血性貧血（A I H A）を含む免疫性溶血性貧血、溶血性貧血、血友病A、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）感染、痛覚過敏、低ガンマグロブリン血症、性腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、特発性尿崩症、特発性顔面麻痺、特発性甲状腺機能低下症、特発性I g A腎症、特発性膜性G N又は特発性膜性腎症、特発性ネフローゼ症候群、特発性肺線維症、特発性スプルー、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、I g A腎症、I g E介在性疾患（例えばアナフィラキシー及びアレルギー性及びアトピー性鼻炎）、I g G 4関連硬化性疾患、回腸炎レジオナリス、免疫複合体腎炎、サイトカイン及びTーリンパ球が介在する急性及び遅発性超過敏性を伴う免疫反応、免疫介在性G N、成人又は急性呼吸窮迫症候群（A R D S）を含む免疫調節性リポタンパク質、封入体筋炎、感染性関節炎、抗精子抗体による不妊症、ブドウ膜全体又は一部の炎症、炎症性腸疾患（I B D）炎症性過剰増殖皮膚疾患、炎症性ミオパチー、インスリン依存性糖尿病（I型）、腓島炎、間質性膀胱炎、間質性肺疾患、間質性肺線維症、虹彩炎、虚血再かん流障害、関節の炎症、若年性関節炎、若年性皮膚筋炎、若年性糖尿病、小児インスリン依存性糖尿病（I D D M）を含む若年性発症（I型）糖尿病、若年発症関節リウマチ、川崎病、乾性角結膜炎、キパノソミアシス、ランバート＝イトン症候群、リーシュマニア症、ハンセン病、白血球減少症、白血球接着欠乏症、白血球破碎性脈管炎、白血球減少症、扁平苔癬、硬化性苔癬、木

10

20

30

40

50

質性結膜炎、直鎖状 I g A 皮膚炎、直鎖状 I g A 疾患（L A D）、レフラー症候群、ルポイド肝炎、狼瘡（腎炎、脳炎、小児、非腎臓、腎臓外、円板状、脱毛症を含む。）、狼瘡（S L E）、播種性紅斑性狼瘡、ライム関節炎、ライム病、リンパ球様間質性肺臓炎、マラリア、男性及び女性自己免疫不妊症、上顎、中間型血管炎（川崎病及び結節性多発動脈炎を含む。）、I 型及び I I 型を含む膜状—又は膜性増殖性 G N（M P G N）及び急速進行性 G N、膜性 G N（膜性腎症）、メニエール病、髄膜炎、顕微鏡的大腸炎、顕微鏡的多発性血管炎、偏頭痛、微小変化型腎症、混合結合組織疾患（M C T D）、伝染性単核球症、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多巣性運動ニューロパチー、多発性内分泌機能不全、多臓器損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血に続発するもの、多臓器損傷症候群、多発性硬化症（M S）、例えば脊椎—眼 M S、多発性硬化症、流行性耳下腺炎、筋障害、重症筋無力症、例えば胸腺腫を伴う重症筋無力症、重症筋無力症、心筋炎、筋炎、ナルコレプシー、壊死性腸炎及び貫壁性大腸炎及び自己免疫炎症性腸疾患、壊死性、皮膚性又は超過敏性脈管炎、新生児狼瘡症候群（N L E）、ネフローゼ、ネフローゼ症候群、神経性疾患、視神経脊髄炎（デビック病）、視神経脊髄炎、神経性筋緊張病、好中球減少症、非癌性リンパ球増加症、非肉芽腫性ブドウ膜炎、非悪性胸腺腫、眼及び眼窩炎症性障害、眼癬痕性類天疱瘡、卵巣炎、交感性眼炎、眼球クローススミオクロースス症候群（O M S）、眼球クロースス又は眼球クローススミオクロースス症候群（O M S）及び感覚ニューロパチー、視神経炎、肉芽腫性精巣炎、変形性関節症、回帰性リウマチ、睪炎、汎血球減少症、P A N D A S（連鎖球菌が関連する小児自己免疫精神神経疾患）、傍腫瘍性小脳変性症、腫瘍随伴症候群、傍腫瘍性神経症候群を含む腫瘍随伴症候群（例えばランバート・イートン筋無力症候群又はイートン・ランバート症候群）、寄生虫症、例えばリーシュマニア、発作性夜間血色素尿症（P N H）、パリー・ロンベルク症候群、毛様体扁平部炎（末梢ブドウ膜炎）、パーソンネージ・ターナー症候群、パルボウイルス感染、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡及び皮膚類天疱瘡、天疱瘡（尋常性天疱瘡を含む。）、紅斑性天疱瘡、落葉状天疱瘡、粘膜類天疱瘡、天疱瘡、消化性潰瘍、周期性四肢麻痺、末梢ニューロパチー、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血（悪性の貧血）、悪性貧血、水晶体抗原性ブドウ膜炎、肺線維症、P O E M S 症候群、結節性多発動脈炎、I、I I 及び I I I 型、多発性関節炎慢性プリマリア、多発性軟骨炎（例えば難治性又は再発性多発性軟骨炎）、多内分泌自己免疫疾患、多内分泌不全、多腺性症候群（例えば自己免疫多腺性症候群（又は多腺性内分泌障害症候群））、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、多発性ニューロパチー、急性多発性神経根炎、開心術後症候群、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、連鎖球菌感染後腎炎、ワクチン接種後症候群、初老期認知症、原発性胆汁性肝硬変、原発性甲状腺機能低下症、原発性特発性粘液水腫、単クローン性 B 細胞リンパ球増加症を含む原発性リンパ球増加症（例えば良性単クローン性高ガンマグロブリン血症及び意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症、M G U S）、原発性粘液水腫、原発性進行性 M S（P P M S）及び再発寛解型 M S（R R M S）、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、進行性全身性硬化症、増殖性関節炎、

乾癬、例えばプラーク性乾癬、乾癬、乾癬性関節炎、肺胞タンパク質症、肺浸潤好酸球増加症、赤芽球癆貧血又は形成不全（P R C A）、赤芽球癆形成不全、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、膿疱性乾癬及び爪の乾癬、腎盂炎、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎、レイノー現象、反応性関節炎、習慣性流産、血圧反応の低下、反射性交感神経性ジストロフィー、難治性スプルー、ロイター病又は症候群、再発性多発性軟骨炎、心筋又は他の組織の再かん流傷害、再かん流傷害、呼吸窮迫症候群、むずむず脚症候群、網膜自己免疫性、後腹膜線維症、レイノー症候群、リウマチ性疾患、リウマチ熱、リウマチ、関節リウマチ、リウマチ性脊椎炎、風疹ウイルス感染、サムプター症候群、サルコイドーシス、住血吸虫症、シュミット症候群、S C I D 及びエプスタインバーウイルス関連疾患、強膜、強膜炎、肢端硬化、強皮症（全身性強皮症を含む。）、硬化性胆管炎、播種性硬化症、硬化症、例えば全身性硬化症、感音性難聴、血清反応陰性脊椎関節炎、シーハン症候群、シャルマン症候群、珪肺症、シェーグレン症候群、精子及び精巣自己免疫性、蝶形骨洞炎、スティ

10

20

30

40

50

ーブンス・ジョンソン症候群、スティッフ・マン（又はスティッフ・パーソン）症候群、亜急性細菌心内膜炎（SBE）、亜急性皮膚性紅斑性狼瘡、突発性難聴、スザック症候群、シドナム舞蹈病、交感性眼炎、全身性紅斑性狼瘡（SLE）又は全身性紅斑性狼瘡（例えば皮膚性SLE）、全身性壊死性脈管炎及びANCA関連血管炎、例えばチャーク・スト劳斯血管炎又は症候群（CSS）、脊髄癆、高安動脈炎、毛細血管拡張症、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、閉塞性血栓性血管炎、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）及び自己免疫又は免疫介在性血小板減少症を含む血小板減少症（例えば心筋梗塞患者により発現される場合）、例えば慢性又は急性血小板減少性紫斑病（ITP）を含む特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血小板減少性紫斑病（TTP）、甲状腺中毒症、組織損傷、トロア・ハント症候群、中毒性表皮剥離症、毒性ショック症候群、輸血反応、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、横断性脊髄炎、横断性の脊髄炎、熱帯性肺好酸球増加症、結核、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織疾患（UCTD）、蕁麻疹（例えば慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性自己免疫蕁麻疹を含む慢性特発性蕁麻疹）、ブドウ膜炎（例えば前部ブドウ膜炎）、網膜ブドウ膜炎、弁膜炎、血管機能不全、脈管炎、椎間体性関節炎、小水疱皮膚炎、白斑、ヴェーゲナー肉芽腫（現在、多発性血管炎を伴う肉芽腫症（GPA）と呼ばれる。）、ウィスコット・アルドリッチ症候群及びX連鎖高IgM症候群が挙げられるが限定されない。

10

【0539】

癌の治療（処置）

〔0570〕 本明細書中に記載の、VISTAポリペプチド、多量体VISTAポリペプチド、VISTA融合タンパク質（例えばVISTA-Ig）、配列番号38から67の核酸配列の何れか1つからなるsiRNA分子及び抗VISTA抗体は、癌（例えば腫瘍）の処置のための、組成物、使用及び方法において使用され得る。

20

【0540】

〔0571〕 癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病が挙げられるが限定されない。このような癌のより特定の例としては、扁平上皮細胞癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌を含む。）、腹膜癌、肝細胞性癌、胃部又は胃癌（胃腸癌を含む。）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎又は腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌腫及び様々なタイプの頭頸部癌、ならびに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；高悪性度免疫芽細胞性NHL；高悪性度リンパ芽球細胞性NHL；高悪性度小型非開裂細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症を含む。）；慢性リンパ球性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；ヘアリー細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；多発性骨髄腫及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）が挙げられる。

30

【0541】

〔0572〕 本発明による処置に受け入れられる癌という用語としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病又はリンパ系悪性腫瘍が挙げられるが限定されない。このような癌のより特定の例としては、膀胱、卵巣、メラノーマ、扁平上皮細胞癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌を含む。）、腹膜癌、肝細胞性癌、胃部又は胃癌（胃腸癌を含む。）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌腫、腎臓又は腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌腫及び様々なタイプの頭頸部癌、ならびに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；高悪性度免疫芽細胞性NHL；高悪性度リンパ芽球細胞性NHL；高悪性度小型非開裂細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症を含む。）；慢性リンパ球性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性

40

50

白血病（ALL）；ヘアリー細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、ならびにファコマトーセスに伴う異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍に付随するものなど）及びメイグス症候群が挙げられる。好ましくは、癌は、乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫（NHL）、腎臓細胞癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、軟組織肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド癌腫、頭頸部癌、メラノーマ、卵巣癌、中皮腫及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。癌は、初期進行（転移性を含む。）膀胱、卵巣又はメラノーマであり得る。癌は結腸直腸癌であり得る。本発明の処置に受け入れられる癌状態としては、骨髄由来抑制細胞によるVISTA発現が抗腫瘍反応及び抗浸潤性免疫反応を抑制する、転移性癌が挙げられる。本発明の方法は、血管新生が起こる腫瘍の処置に特に適切である。

10

【0542】

〔0573〕 本発明はまた、化学療法又は放射線療法又は他の生物製剤と併用して、及びその活性を促進するために、即ち骨髄由来抑制細胞によるVISTA発現が、抗腫瘍反応及び化学療法又は放射線療法又は生物製剤の有効性を抑制する個体において、癌の処置にも適切である。本発明に従い、抗癌活性を示すあらゆる化学療法剤を使用し得る。好ましくは、化学療法剤は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体及び関連阻害剤、ビンカアルカロイド、エポドピロ毒素、抗生物質、L-アスパラギナーゼ、トポイソメラーゼ阻害剤、インターフェロン、白金配位複合体、アントラセンジオン置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、アドレノコルチコステロイド、プロゲスチン、エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン及び性腺刺激ホルモン放出ホルモン類似体からなる群から選択され得る。より好ましくは、化学療法剤は、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコボリン（LV）、イリノテカン、オキサリプラチン、カペシタビン、パクリタキセル及びドキセタキセルからなる群から選択され得る。抗VEGF抗体の投与と組み合わせる投与しようとするカクテル中で2以上の化学療法剤を使用し得る。ある好ましい併用化学療法は、5-FU及び1以上の他の化学療法剤を具備する、フルオロウラシルに基づくものである。併用化学療法の適切な投与計画は当技術分野で公知であり、例えば、Saltz, et al. (1999) Proc ASCO 18:233a及びDouillard, et al. (2000) Lancet 355:1041-7に記載されている。生物製剤は、PD-L1、PD-L2、CTLA-4及びPD-L1、PD-L2、CTLA-4融合タンパク質に対する抗体ならびにサイトカイン、成長因子アンタゴニスト及びアゴニスト、ホルモン及び抗サイトカイン抗体などの別の免疫増強剤であり得る。

20

30

【0543】

アレルギー

〔0574〕 本明細書中に記載の、VISTAポリペプチド、多量体VISTAポリペプチド、VISTA融合タンパク質（例えばVISTA-Ig）及び抗VISTA抗体は、アレルギー（例えばアレルギーに対するアレルギー反応）の処置のための、組成物、使用及び方法において使用され得る。

【0544】

〔0575〕 アレルギーの例としては、ダニ抗原及び花粉抗原が挙げられる。

40

【0545】

〔0576〕 代表的アレルギー性疾患としては、気管支の喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎及び花粉及び昆虫アレルギーが挙げられる。アレルギー性素因は、アレルギーを有する親の子に遺伝し得る遺伝因子である。家族性アレルギー性疾患は、アトピー性疾患とも呼ばれ、原因となる遺伝的に受け継がれる因子は、アトピー性素因である。「アトピー性皮膚炎」は、アトピー性疾患、特に皮膚炎症状を伴う疾患の一般名である。アレルギー性状態を含む好ましい例は、湿疹、アレルギー性鼻炎、枯草熱、蕁麻疹及び食物アレルギーからなる群から選択される。アレルギー性状態としては、湿疹、アレルギー性鼻炎又はコリーザ、枯草熱、気管支の喘息、蕁麻疹（発疹）及び食物アレルギー及び他のアトピー性状態が挙げられる。

50

【0546】

炎症状態及び炎症性疾患

〔0577〕 本明細書中に記載の、VISTAポリペプチド、多量体VISTAポリペプチド、VISTA融合タンパク質（例えばVISTA-Ig）、配列番号38から67の核酸配列の何れか1つからなるsiRNA分子及び抗VISTA抗体は、炎症状態及び炎症性疾患の処置のための、組成物、使用及び方法において使用し得る。

【0547】

〔0578〕 炎症状態及び炎症性疾患としては、リウマチ性疾患（例えば関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎）脊椎関節症（例えば強直性脊椎炎、反応性関節炎、ライター症候群）、結晶性関節症（例えば痛風、偽痛風、ピロリン酸カルシウム結晶沈着症）、多発性硬化症、ライム病、リウマチ性多発筋痛；結合組織疾患（例えば全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、多発性筋炎、皮膚筋炎、シェーグレン症候群）；血管炎（例えば結節性多発動脈炎、ヴェーゲナー肉芽腫、チャグ・ストラウス症候群）；外傷又は虚血の結果を含む炎症状態、サルコイドーシス；アテローム性動脈硬化性の血管疾患を含む血管疾患、アテローム性動脈硬化症及び血管閉塞性疾患（例えばアテローム性動脈硬化症、虚血性心疾患、心筋梗塞、脳卒中、末梢血管疾患）及び血管ステント再狭窄；ブドウ膜炎を含む眼疾患、角膜疾患、虹彩炎、虹彩毛様体炎及び白内障が挙げられるが限定されない。

【0548】

〔0579〕 炎症状態としてはまた、酸逆流／胸焼け、ざ瘡、尋常性ざ瘡、アレルギー及び過敏症、アルツハイマー病、喘息、アテローム性動脈硬化症及び血管閉塞性疾患（例えばアテローム性動脈硬化症、虚血性心疾患、心筋梗塞、脳卒中、末梢血管疾患）及び血管ステント再狭窄、自己免疫疾患、気管支炎、癌、心炎、白内障、セリアック病、慢性痛、慢性前立腺炎、肝硬変、大腸炎、結合組織疾患（例えば全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、多発性筋炎、皮膚筋炎、シェーグレン症候群）、角膜疾患、クローン病、結晶性関節症（例えば痛風、偽痛風、ピロリン酸カルシウム結晶沈着症）、認知症、皮膚炎、糖尿病、ドライアイ、湿疹、浮腫、肺気腫、線維筋痛症、胃腸炎、歯肉炎、糸球体腎炎、心疾患、肝炎、高血圧、超過敏症、炎症性腸疾患、外傷又は虚血の結果を含む炎症状態、インスリン抵抗性、間質性膀胱炎、虹彩毛様体炎、虹彩炎、関節痛／関節炎／関節リウマチ、ライム病、メタボリックシンドローム（シンドロームX）、多発性硬化症、筋炎、腎炎、肥満、ブドウ膜炎を含む眼疾患、骨減少、骨粗しょう症、パーキンソン病、骨盤炎症性疾患、歯周病、多発動脈炎、多発性軟骨炎、リウマチ性多発筋痛、乾癬、再かん流傷害、関節リウマチ、リウマチ性疾患（例えば関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎）、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、副鼻腔炎、シェーグレン症候群、けいれん性結腸、脊椎関節症（例えば強直性脊椎炎、反応性関節炎、ライター症候群）、全身性カンジダ症、腱炎、移植拒絶、UTI's、膣炎、アテローム性動脈硬化性の血管疾患を含む血管疾患、血管炎（例えば結節性多発動脈炎、ヴェーゲナー肉芽腫、チャグ・ストラウス症候群）及び脈管炎も挙げられるが限定されない。

【0549】

移植片対宿主病

〔0580〕 本明細書中に記載の、VISTAポリペプチド、多量体VISTAポリペプチド、VISTA融合タンパク質（例えばVISTA-Ig）、配列番号38から67の核酸配列の何れか1つからなるsiRNA分子及び抗VISTA抗体は、移植片対宿主病（GVHD）の処置のための、組成物、使用及び方法において使用され得る。

【0550】

〔0581〕 本発明はまた、有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig融合タンパク質又は多量体VISTAタンパク質の投与を具備する、移植片対宿主病（GVHD）を処置する方法も提供する。移植片対宿主病（GVHD）、急性移植片対宿主病、慢性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う急性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う慢性移植片対宿主病、骨髄移植に伴う急性移植片対宿主病、同種血液幹細胞移植（HSCT）に伴う急性移植片対宿主病又は骨髄移植に伴う慢性移植片対宿主病を処置するた

めの方法は、有効量のVISTA融合タンパク質、場合によってはVISTA-Ig融合タンパク質又は多量体VISTAタンパク質を投与することを具備し得る。

【0551】

〔0582〕 移植片対宿主病（GVHD）は、移植片対宿主病（GVHD）、急性移植片対宿主病、慢性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う急性移植片対宿主病、幹細胞移植に伴う慢性移植片対宿主病、骨髄移植に伴う急性移植片対宿主病、同種血液幹細胞移植（HSCT）に伴う急性移植片対宿主病又は骨髄移植に伴う慢性移植片対宿主病であり得る。処置しようとする処置される患者は、移植片対宿主病（GVHD）の少なくとも1つの症状を有し得、場合によっては患者は、腹痛、腹部けいれん、下痢、発熱、黄疸、皮膚発疹、嘔吐及び体重減少を含むが限定されない急性GVHDを示す。患者は、ドライアイ、ドライマウス、脱毛、肝炎、肺障害、消化管障害、皮膚発疹及び皮膚肥厚を含むが限定されない慢性移植片対宿主病（GVHD）のうち少なくとも1つの症状を有し得る。患者は、同種幹細胞又は骨髄移植を有し得るか又はこれを受けようとしているものであり得る。患者は、自己幹細胞又は骨髄移植を有するか又はこれを受けようとしているものであり得る。

10

【0552】

診断方法

〔0583〕 VISTA及びVISTA複合物の有無を検出するための診断方法において、VISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する、抗VISTA及び抗VISTA複合物抗体、配列番号38から67の核酸配列の何れか1つからなるsiRNA分子及びその抗原-結合断片を使用し得る。（a）VISTA又はVISTA複合物と結合する抗体又はその断片と試験試料を接触させ、（b）抗体-エピトープ複合体についてアッセイすることを具備する方法において、抗VISTA及び抗VISTA複合物抗体が使用され得る。ウエスタンブロット、放射性免疫アッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈殿反応、ゲル内拡散沈殿反応、免疫拡散アッセイ、凝集反応アッセイ、補体結合反応アッセイ、免疫組織化学アッセイ、蛍光免疫アッセイ及びプロテインA免疫アッセイによって、抗体-エピトープ複合体が検出され得る。この試料は、組織生検、リンパ液、尿、脳脊髄液、羊水、炎症性滲出液、血液、血清、糞便又は結腸直腸管から回収される液体である試料であり得る。

20

【0553】

〔0584〕 VISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する抗体は、組み換え体であり得る。VISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する抗体の断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、CDR、パラトープ又は本抗原に結合可能である抗体の一部であり得る。VISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する抗体は、キメラ、ヒト化、抗イディオタイプの、1本鎖、二機能性又は同時特異的であり得る。VISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する抗体は、又は化学発光標識、常磁性標識（例えばアルミニウム、マンガン、白金、酸素、ランタン、ルテチウム、スカンジウム、イットリウム又はガリウム）、MRI造影剤、蛍光標識、生物発光標識又は放射性標識を含むが限定されない標識に複合化される断片であり得る。

30

【0554】

〔0585〕 さらに、VISTA及びVISTA複合物、VISTA及びVISTA複合物に選択的に結合する抗体及びその抗原結合断片は、固体支持体（例えばビーズ、試験管、シート、培養皿又は試験片）、例えばアレイなどに連結され得る。

40

【0555】

〔0586〕 本方法は、陽電子放出断層撮影（PET）、CCD微光監視システム、X線、CTスキャン、シンチグラフィ、超音波イメージング、単一光子放射断層撮影（SPECT）、核磁気共鳴画像法（MRI）、超音波、常磁性画像法及び内視鏡的光コヒーレンストモグラフィによって、VISTAポリペプチド又はVISTA複合物を画像化することを具備し得る。

【0556】

スクリーニングアッセイ

50

〔0587〕 本発明は、調節物質を同定するための方法（「スクリーニングアッセイ」）を提供し、即ちV I S T Aポリペプチドに結合する候補又は試験化合物又は薬剤（例えばペプチド、ペプチド模倣物、低分子又は他の薬物）は、例えば、V I S T A発現又はV I S T A活性に対して刺激もしくは阻害効果を有するか、又はV I S T Aとその天然の結合パートナーとの相互作用に対して刺激もしくは阻害効果を有する。

【0557】

〔0588〕 V I S T Aポリペプチド又はその生物学的活性部分に結合する、例えばV I S T Aポリペプチドのその天然の結合パートナーとの相互作用能を調整する、候補又は試験化合物をスクリーニングするためのアッセイは、候補化合物をV I S T Aポリペプチドと接触させ、V I S T Aポリペプチドのその天然の結合パートナーとの相互作用能の調整について試験することを具備し得る。V I S T Aタンパク質又はポリペプチド又はその生物学的活性部分と結合するか、又はその活性を調整する候補又は試験化合物をスクリーニングためのアッセイは、V I S T Aポリペプチドを接触させ、V I S T Aポリペプチドと候補薬剤との間の結合について試験することを具備し得る。V I S T Aにより負に制御される免疫機能に対して刺激又は阻害効果を有する候補又は試験化合物をスクリーニングするためのアッセイは、本明細書中で同定されるか、又はV I S T Aとその天然の結合パートナーとの間の相互作用に対するその効果に基づく。これらのV I S T A関連機能は、例として、サイトカイン産生を阻害する（例えばT細胞によるI l-2、 γ インターフェロン、中程度のC D 2 8同時刺激を抑制する、C D 4 +及びC D 8 +T細胞増殖を阻害する、ナイーブ及びメモリーC D 4 +T細胞の増殖を抑制する、及びアポトーシスを誘導せずにT C R活性化を抑制する。）。生物学的ライブラリ；空間的に処理可能な平行固相又は液相ライブラリ；逆重畳積分を必要とする合成ライブラリ法；「1-ビーズ1-化合物」ライブラリ法；及びアフィニティークロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリ法を含む、当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリ法における多くのアプローチの何れかを使用して、本発明の試験化合物を得ることができる。生物学的ライブラリアプローチはペプチドライブラリに限定され、一方で、他の4種類のアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー又は化合物の低分子ライブラリに適用可能である。L a m (1997) A n t i c a n c e r D r u g D e s . 12 : 145。

【0558】

〔0589〕 アッセイは、試験化合物とV I S T Aポリペプチド又はその生物学的活性部分を接触させ、試験化合物のV I S T A活性調節能を決定することを具備する、細胞がV I S T Aポリペプチド又はその生物学的活性部分を発現する細胞に基づくアッセイであり得る。試験化合物のV I S T A活性調整能を決定することは、例えばV I S T Aのその天然の結合パートナーとの結合能及び免疫細胞活性調整能を監視することにより達成され得る。免疫細胞は、T細胞、B細胞又は骨髄細胞であり得る。試験化合物の、その逆受容体へのV I S T A結合調整能を決定することは、例えば、放射性同位体又は酵素性標識とV I S T Aをカップリングし、試験化合物の、V I S T A逆受容体を発現するT細胞へのV I S T A結合調整能を監視することによって遂行され得る。試験化合物のV I S T A結合能を決定することは、例えば、V I S T Aへの化合物の結合が複合体中の標識化V I S T A化合物を検出することにより決定され得るように、化合物を放射性同位体又は酵素性標識とカップリングすることによって、遂行され得る。

【0559】

〔0590〕 相互作用物の何れの標識もなしで化合物のV I S T Aとの相互作用能を決定するために、アッセイを使用し得る。例えば、化合物又はV I S T Aの何れの標識もなくV I S T Aとの化合物の相互作用を検出するために、マイクロフィジオメーターが使用され得る。M c C o n n e l l , H . M . , e t a l . (1992) S c i e n c e 257 : 1906-1912。マイクロフィジオメーター（例えば細胞センサー）は、光アドレス電位差センサー（L A P S）を用いて細胞がその環境を酸性化する速度を測定する分析機器である。この酸性化速度の変化を化合物とV I S T Aとの間の相互作用の指標として使用し得る。

【0560】

[0591] アッセイは、V I S T A結合パートナーを発現するT細胞を試験化合物と接触させ、試験化合物の、V I S T A結合パートナー活性調整能（例えば刺激又は阻害）を決定することを具備する、細胞に基づくアッセイであり得る。試験化合物のV I S T A結合パートナー活性調整能を決定することは、例えば、V I S T AポリペプチドのV I S T A結合パートナーとの結合能又は相互作用能を決定することによって遂行され得る。

【0561】

[0592] V I S T Aポリペプチド又はその生物学的活性断片の、V I S T A結合パートナーとの結合能又は相互作用能を決定することは、直接的結合を決定するための上記の方法のうち1つによって遂行され得る。実施形態において、V I S T Aポリペプチドの、V I S T A結合パートナーとの結合能又は相互作用能を決定することは、結合パートナーの活性を決定することによって遂行され得る。例えば、結合パートナーの活性は、細胞の第二のメッセンジャー（例えばチロシンキナーゼ又はホスファターゼ活性）の誘導を検出するか、適切な基質の触媒性／酵素性活性を検出するか、（検出可能なマーカー、例えばルシフェラーゼをコードする核酸に作動可能に連結される標的反応性の制御エレメントを具備する）レポーター遺伝子の誘導を検出するか、又は標的により制御される細胞性反応を検出することによって決定され得る。例えば、V I S T Aポリペプチドの、天然のV I S T A結合パートナーとの結合能又は相互作用能を決定することは、化合物の、増殖アッセイにおける免疫細胞同時刺激又は阻害の調整能を測定することによって、又はV I S T Aポリペプチドの、V I S T Aポリペプチドの一部分を認識する抗体への結合能を妨害することによって、遂行され得る。ある実施形態において、T細胞活性化を調整する化合物は、化合物の、T細胞増殖又はサイトカイン産生調整能を決定することによって同定され得る。実施形態において、T細胞活性化を調整する化合物は、化合物の、複数の抗原濃度でのT細胞増殖又はサイトカイン産生調整能を決定することによって同定され得る。

【0562】

[0593] アッセイは、V I S T Aポリペプチド又はその生物学的活性部分を試験化合物と接触させ、試験化合物の、V I S T Aポリペプチド又はその生物学的活性部分への結合能を決定する、細胞不含アッセイであり得る。本発明のアッセイにおいて使用しようとするV I S T Aポリペプチドの好ましい生物学的活性部分は、非V I S T A分子との相互作用に参与する断片、例えばV I S T A結合パートナーに結合する細胞外ドメインの少なくとも一部を含む。V I S T Aポリペプチドへの試験化合物の結合は、上記のように直接又は間接的の何れかであり得る。

【0563】

[0594] アッセイは、V I S T Aポリペプチド又はその生物学的活性部分を試験化合物と接触させ、試験化合物の、V I S T Aポリペプチド又はその生物学的活性部分の活性調整能（例えば刺激又は阻害）を決定する、細胞不含アッセイであり得る。試験化合物の、V I S T Aポリペプチド活性調整能を決定することは、例えば、直接的結合を決定するための上記の方法のうち1つによりV I S T Aポリペプチドの、V I S T A結合パートナーへの結合能を決定することによって遂行され得る。本発明の細胞不含アッセイは、可溶性及び／又は膜結合型のポリペプチド（例えばV I S T Aポリペプチド又はその生物学的活性部分又はV I S T Aが結合する結合パートナー）の両方の使用に適している。膜結合型ポリペプチドが使用される細胞不含アッセイの場合（例えば細胞表面V I S T A）、膜結合型のポリペプチドが溶液中で維持されるように、可溶化剤を利用することが所望され得る。このような可溶化剤の例としては、n-オクタシルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、T r i t o n（登録商標）X-100、T r i t o n（登録商標）X-114、テシット、イソトリデシポリ（エチレングリコールエーテル）n、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアミノ] -1-プロパンスルホネート（CHAPS）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアミノ] -2-ヒドロキシー-1-プロパンスルホネート（CHAPSO）又はN-ドデシル、d b d、N、N-ジメチル-3-

アンモニオ－１－プロパンスルホネートなどの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0564】

〔0595〕 アッセイ法において、ポリペプチドの一方又は両方の、非複合化型からの複合化型の分離を促進するために、ならびにアッセイ自動化に適応させるために、VISTA又はその結合パートナーの何れかを固定化することが所望され得る。候補化合物の存在下又は非存在下におけるVISTAポリペプチドへの試験化合物の結合又はVISTAポリペプチドとその結合パートナーとの相互作用は、反応物を含有するのに適切な何らかの容器中で行われ得る。このような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管及び微小遠心管が挙げられる。ある実施形態において、ポリペプチドの一方又は両方をマトリクスに結合できるようにするドメインを付加する融合タンパク質が提供され得る。例えば、グルタチオン－S－トランスフェラーゼ／VISTA融合タンパク質又はグルタチオン－S－トランスフェラーゼ／結合パートナー融合タンパク質をグルタチオンセファロース（登録商標）ビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, Mo.）又はグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いでこれを試験化合物又は試験化合物及び非吸着結合パートナーポリペプチド又はVISTAポリペプチドの何れかと合わせ、複合体形成させる条件下で混合物を温置する（例えば塩及びpHに対して、生理的条件で）。温置後、ビーズ又はマイクロタイタープレートウェルを洗浄して未結合成分を全て除去し、ビーズの場合はマトリクスを固定化し、例えば上記のように、直接的又は間接的の何れかで複合体形成を決定する。あるいは、マトリクスから複合体を解離させ得、標準的な技術を用いてVISTA結合又は活性レベルを決定し得る。本発明のスクリーニングアッセイにおいて、ポリペプチドをマトリクス上に固定化するための他の技術も使用し得る。試験化合物の、VISTAポリペプチド活性の調整能を決定することは、試験化合物の、VISTA下流で機能する分子の活性調整能を決定することによって、例えばVISTA結合パートナーの細胞質ドメインと相互作用させることによって、遂行され得る。例えば、第二のメッセンジャーレベル、適切な標的上での相互作用分子の活性又は適切な標的への相互作用物質の結合を既に記載のように決定し得る。

【0565】

〔0596〕 細胞を候補化合物と接触させ、細胞でのVISTA mRNA又はポリペプチドの発現を決定する方法において、VISTA発現の調節物質を同定し得る。候補化合物存在下でのVISTA mRNA又はポリペプチドの発現レベルを候補化合物非存在下でのVISTA mRNA又はポリペプチドの発現レベルと比較する。次に、変化が統計学的に有意である場合、この比較に基づいて、VISTA発現の調節物質として候補化合物を同定し得る。

【0566】

〔0597〕 VISTAと結合又は相互作用し（「VISTA結合タンパク質」、「VISTA結合パートナー」又は「VISTA-bp」）、VISTA活性に関与する他のポリペプチドを同定するために、2ハイブリッドアッセイ又は3ハイブリッドアッセイにおいて「ベイトタンパク質」としてVISTAポリペプチドを使用し得る（例えば米国特許第5,283,317号；Zervos, et al. (1993) Cell 72:223-232；Madura, et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054；Bartel, et al. (1993) Biotechniques 14:920-924；Iwabuchi, et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696；及びWO94/10300を参照）。このようなVISTA－結合タンパク質も、VISTAポリペプチド又は例えばVISTA介在性シグナル伝達経路の下流エレメントとしてVISTA標的によるシグナル拡大に関与すると思われる。あるいは、このようなVISTA－結合ポリペプチドはVISTA阻害剤であり得る。2ハイブリッド系は、分離可能なDNA－結合及び活性化ドメインからなる、殆どの転写因子のモジュラー的性質に基づく。簡潔に述べると、本アッセイは、2つの異なるDNAコンストラクトを利用する。1つのコンストラクトにおいて、VISTAポリペプチドをコードする遺伝子を既知の転写因子（例えばGAL-4）のDNA結合ドメ

インをコードする遺伝子に融合する。他のコンストラクトにおいて、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に、未確認のポリペプチド「プレイ」又は「試料」をコードする、DNA配列のライブラリからのDNA配列を融合させる。「ベイト」及び「プレイ」ポリペプチドは、インビボで、VISTA依存性複合体を形成する相互作用可能であり、転写因子のDNA結合及び活性化ドメインを近接近させる。この近接近によって、転写因子に応答する転写制御部位に作動可能に連結されるレポーター遺伝子（例えばlacZ）の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現が検出され得、機能的転写因子を含有する細胞コロニーが単離され、VISTAポリペプチドと相互作用するポリペプチドをコードするクローン化遺伝子を得るために使用され得る。

【0567】

〔0598〕 本明細書中に記載のアッセイのうち2以上の組み合わせ。例えば、細胞に基づく又は細胞不含アッセイを用いて調整剤が同定され得、その薬剤のVISTAポリペプチド活性調整能がインビボで、例えば細胞性形質転換及び／又は腫瘍形成に対する動物モデルなどの動物において確認され得る。

【0568】

〔0599〕 本発明はさらに、上記スクリーニングアッセイにより同定される新規薬剤に関する。適切な動物モデルで本明細書中に記載の方法において同定されるような薬剤。例えば、本明細書中で記載のように同定される薬剤（例えばVISTA調整剤、アンチセンスVISTA核酸分子、VISTA特異的な抗体又はVISTA結合パートナー）での処置の有効性、毒性又は副作用を決定するために、動物モデルにおいて、このような薬剤が使用され得る。あるいは、動物モデルにおいて本明細書中で記載のように同定される薬剤の作用機構を調べるために、動物モデルにおいてこのような薬剤が使用され得る。さらに、本発明は、本明細書中で記載のような処置に対する上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規薬剤の使用に関する。

【0569】

検出アッセイ

〔0600〕 ポリヌクレオチド試薬として多くの方法において、本明細書中で同定されるcDNA配列の一部分又は断片（及び対応する完全遺伝子配列）が使用され得る。例えば、これらの配列を使用して、（i）染色体上でそれらの個々の遺伝子をマッピングし；従って遺伝疾患に関連する遺伝子領域を探し；（i i）微小な生体試料から個々を同定し（組織タイピング）；（i i i）生体試料の法鑑定に役立たせ得る。これらの適用は、下記のサブセクションに記載する。

【0570】

染色体マッピング

〔0601〕 遺伝子の配列（又は配列の一部分）が単離されたら、染色体上で遺伝子の位置をマッピングするためにこの配列が使用され得る。この過程を染色体マッピングと呼ぶ。従って、染色体上でVISTA遺伝子の位置をマッピングするために、本明細書中に記載のVISTAヌクレオチド配列の一部分又は断片が使用され得る。染色体に対するVISTA配列のマッピングは、これらの配列を疾患と関連する遺伝子と相関させることにおいて重要な第一段階である。簡潔に述べると、VISTAヌクレオチド配列からPCRプライマー（好ましくは15から25bp長）を調製することによって、染色体に対してVISTA遺伝子をマッピングし得る。ゲノムDNAの1個のエクソンを超えて広がらないプライマーを予想するために、VISTA配列のコンピュータ分析が使用され得、従って増幅過程が複雑になる。次に、個々のヒト染色体を含有する体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングに対して、これらのプライマーを使用し得る。VISTA配列に対応するヒト遺伝子を含有するハイブリッドのみが増幅断片を生じる。異なる哺乳動物からの体細胞（例えばヒト及びマウス細胞）を融合させることによって、体細胞ハイブリッドを調製する。ヒト及びマウス細胞のハイブリッドが増殖し、分裂する際、これらは徐々に無作為な順序でヒト染色体を失うが、マウス染色体を保持する。マウス細胞が特定の酵素を欠くためにマウス細胞が増殖できないがヒト細胞は増殖できる培地を用いることによって、必要

10

20

30

40

50

とされる酵素をコードする遺伝子を含む1つのヒト染色体が保持される。様々な培地を用いることによって、ハイブリッド細胞株のパネルを確立し得る。パネル中の各細胞株は、単一のヒト染色体又は少数のヒト染色体の何れか及びマウス染色体のフルセットを含み、それにより特異的なヒト染色体に対する個々の遺伝子のマッピングが容易になる。D' Eustachio, et al. (1983) Science 220:919-924。ヒト染色体の断片のみを含む体細胞ハイブリッドはまた、転座及び欠失を有するヒト染色体を用いることによっても作製され得る。

【0571】

〔0602〕 体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に対して特定の配列を割り当てるための迅速な手順である。1台のサーマルサークルを用いて1日に3以上の配列を割り当て得る。オリゴヌクレオチドプライマーを設計するためにVISTAヌクレオチド配列を用いて、特異的な染色体からの断片のパネルにより、垂直在化を達成し得る。その染色体にVISTA配列をマッピングするために同様に使用され得る他のマッピングストラテジーとしては、インシトゥハイブリッド形成(Fan, et al. (1990) Proc Natl. Acad. Sci. USA 87:6223-27に記載)、標識されたフロー選別染色体でのプレスクリーニング及び染色体特異的なcDNAライブラリに対するハイブリッド形成によるプレ選択が挙げられる。

【0572】

〔0603〕 ある段階において的確な染色体の位置を提供するために、分裂中期染色体スプレッドに対するDNA配列の蛍光インシトゥハイブリッド形成(FISH)がさらに使用され得る。紡錘体を破壊するコルセミドなどの化学物質により分裂中期で分裂が遮断された細胞を用いて、染色体スプレッドが作製され得る。トリプシンで染色体を短時間処理し、次いでギムザで染色し得る。染色体が個々に同定され得るように、明暗バンドのパターンが各染色体で発色する。500又は600塩基という短いDNA配列を用いてFISH技術を使用し得る。しかし、1,000塩基より大きいクローンは、単純な検出のために十分なシグナル強度で特有の染色体位置に結合する可能性がより高い。好ましくは1,000塩基及びより好ましくは2,000塩基は、理にかなった時間量で良好な結果を得るのに十分であろう。この技術の概説として、Verma, et al. Human Chromosomes: A Manual of basic Techniques (Pergamon Press, New York 1988)を参照。1つの染色体又は染色体上の1つの部位をマークするために染色体マッピング用の試薬を個々に使用し得るか、又は複数部位及び/又は複数染色体をマークするために試薬のパネルを使用し得る。遺伝子の非コード領域に対応する試薬は実際にマッピング目的に好ましい。コード配列は、遺伝子ファミリー内で保存的である可能性がより高く、従って染色体マッピング中に交差ハイブリッド形成の機会が増加する。

【0573】

〔0604〕 的確な染色体位置に配列がマッピングされたら、染色体上のその配列の物理的位置を遺伝マップデータと相関させ得る。最終的に、突然変異の存在を確認するために、及び多型性からの突然変異を区別するために、いくつかの個体からの遺伝子の完全配列決定を行い得る。

【0574】

組織タイピング

〔0605〕 微小な生体試料から個体を同定するためにも、本発明のVISTA配列が使用され得る。さらに、個体のゲノムの選択部分の実際の塩基ごとのDNA配列を決定する代替技術を提供するために、本発明の配列が使用され得る。従って、本明細書中に記載のVISTAヌクレオチド配列は、配列の5'及び3'末端から2つのPCRプライマーを調製するために使用され得る。次に、個体のDNAを増幅するためにこれらのプライマーを使用し、続いてそれを配列決定し得る。

【0575】

〔0606〕 各個体が対立遺伝子の差異ゆえに特有の一連のこのようなDNA配列を有す

10

20

30

40

50

るので、このようにして調製される個体からの対応するDNA配列のパネルは、特有の個々の同定を提供し得る。個体から、及び組織から、このような同定配列を得るために、本発明の配列が使用され得る。本発明のVISTAヌクレオチド配列は独自にヒトゲノムの一部に相当する。これらの配列のコード領域においてある程度まで対立遺伝子変異が起こり、非コード領域においてより大きい度合いで変異が起こる。個々のヒトの間の対立遺伝子変異が各500塩基あたり約1個の頻度で起こると推定される。同定目的のために個体からのDNAを比較し得る標準物質として本明細書中に記載の配列のそれぞれをある程度まで使用し得る。より多数の多型性が非コード領域で起こるので、個体を識別するために必要であるのはより少ない配列である。配列番号1又は4の非コード配列は、それぞれが100塩基の非コード増幅配列を生じるおそらく10から1,000プライマーのパネルを用いて陽性個体の識別を十分に提供し得る。配列番号3又は6の配列など、予想されるコード配列が使用される場合、陽性個体の同定に対してより適切な数のプライマーは500から2000である。

10

【0576】

〔0607〕 個体に対する一意的な同定データベースを作製するために本明細書中に記載のVISTAヌクレオチド配列からの試薬のパネルが使用される場合、その個体からの組織を同定するために、これらの同じ試薬が後に使用され得る。一意的な同定データベースを用いて、非常に小さい組織試料から、生存しているか又は死亡している個体の陽性同定が行われ得る。

20

【0577】

法生物学におけるVISTA配列の使用

〔0608〕 法生物学においてもDNAに基づく同定技術が使用され得る。ヒトゲノムにおける特異的な遺伝子座に標的化される、ポリヌクレオチド試薬、例えばPCRプライマーを提供するために、本発明の配列が使用され得、これは、例えば別の「同定マーカー」（即ち特定の個体に特有である別のDNA配列）を提供することによって、DNAに基づく法鑑定の信頼性を促進し得る。上述のように、制限酵素産生断片により形成されるパターンに対する的確な代替物として、同定のために、実際の塩基配列情報が使用され得る。配列番号1又は3の非コード領域に標的化された配列は、非コード領域でより多数の多型性が起こるので、この使用に特に適切であり、これにより、この技術を用いて個体を識別することがより容易になる。ポリヌクレオチド試薬の例としては、VISTAヌクレオチド配列又はその一部分、例えば少なくとも20塩基、好ましくは少なくとも30塩基の長さを有する配列番号1又は3の非コード領域由来の断片が挙げられる。具体的な組織、例えばリンパ球を同定するために例えばインシトゥハイブリッド形成技術において使用され得る、ポリヌクレオチド試薬、例えば標識される又は標識可能プローブを提供するために、本明細書中に記載のVISTAヌクレオチド配列がさらに使用され得る。これは、法医学病理医に未知の起源の組織が与えられる場合、非常に有用であり得る。このようなVISTAプローブのパネルは、種により及び／又は器官型により組織を同定するために使用され得る。同様の方式で、夾雑について組織培養物をスクリーニング（即ち培養物中の異なる型の細胞の混合物の存在についてのスクリーニング）するために、これらの試薬、例えばVISTAプライマー又はプローブが使用され得る。

30

40

【0578】

診断アッセイ

〔0609〕 生体試料中のVISTAポリペプチド又は核酸の有無を検出するための代表的な方法は、試験対象から生体試料を得て、生体試料中でVISTAポリペプチド又は核酸の存在が検出されるように、生体試料と、VISTAポリペプチドをコードするVISTAポリペプチド又は核酸（例えばmRNA又はゲノムDNA）を検出可能な化合物又は薬剤を接触させることを伴う。VISTA mRNA又はゲノムDNAを検出する好ましい薬剤は、VISTA mRNA又はゲノムDNAにハイブリッド形成可能である、標識化核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、配列番号1又は3で示されるVISTA核酸又はその一部分、例えば少なくとも15、30、50、100、250又は500ヌ

50

クレオチド長の、及びストリンジェントな条件下でVISTA mRNA又はゲノムDNAに特異的にハイブリッド形成するために十分なオリゴヌクレオチドなどであり得る。本発明の診断アッセイでの使用のための他の適切なプローブは、本明細書中に記載されている。VISTAポリペプチドを検出するための好ましい薬剤は、VISTAポリペプチドに結合可能な抗体、好ましくは検出可能な標識がある抗体である。抗体は、ポリクローナル又はより好ましくはモノクローナルであり得る。無傷抗体又はその断片（例えばFab又はF(ab')₂）を使用し得る。プローブ又は抗体に関して「標識される」という用語は、プローブ又は抗体に検出可能な物質をカップリング（即ち物理的に連結）することによるプローブ又は抗体の直接的標識ならびに、直接的に標識される別の試薬との反応性によるプローブ又は抗体の間接的標識を包含するものとする。間接的標識の例としては、それが蛍光標識されるストレプトアビジンで検出され得るように蛍光標識される二次抗体及びビオチンでのDNAプローブの末端標識を用いた、一次抗体の検出が挙げられる。「生体試料」という用語は、対象から単離される、組織、細胞及び体液ならびに対象内に存在する、組織、細胞及び液体を含むものとする。即ち、インビトロならびにインビボで生体試料中でVISTA mRNA、ポリペプチド又はゲノムDNAを検出するために、本発明の検出方法が使用され得る。例えば、PD-L2 mRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリッド形成及びインシトゥハイブリッド形成が挙げられる。VISTAポリペプチドの検出のためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウエスタンブロット、免疫沈降及び免疫蛍光が挙げられる。VISTAゲノムDNAの検出のためのインビトロ技術としては、サザンハイブリッド形成が挙げられる。さらに、VISTAポリペプチドの検出のためのインビボ技術としては、標識される抗VISTA抗体を対象に導入することが挙げられる。例えば、標準的なイメージング技術によって対象における存在及び位置を検出することができる放射性マーカーで本抗体が標識され得る。ある実施形態において、生体試料は、試験対象からのポリペプチド分子を含有する。あるいは生体試料は、試験対象からのmRNA分子又は試験対象からのゲノムDNA分子を含有し得る。好ましい生体試料は、対象から従来の手段により単離された血清試料である。別の実施形態において、本方法は、対照対象から対照生体試料を得て、生体試料中でVISTAポリペプチド、mRNA又はゲノムDNAの存在が検出されるように、VISTAポリペプチド、mRNA又はゲノムDNAを検出可能な化合物又は薬剤に対照試料を接触させ、対照試料中のVISTAポリペプチド、mRNA又はゲノムDNAの存在を試験試料中でのVISTAポリペプチド、mRNA又はゲノムDNAの存在と比較することをさらに伴う。

【0579】

〔0610〕 本発明はまた、生体試料中でのVISTAの存在を検出するためのキットも包含する。例えば、本キットは、生体試料中のVISTAポリペプチド又はmRNAを検出可能な、標識される化合物又は薬剤；生体試料中で検出可能な薬剤；試料中のVISTAの量を決定するための手段；及び試料中のVISTAの量を標準物質と比較するための手段を具備し得る。適切な容器中で本化合物又は薬剤をパッケージ化し得る。本キットは、VISTAポリペプチド又は核酸を検出するためのキットを使用するための説明書をさらに具備し得る。

【0580】

予後アッセイ

〔0611〕 異常な又は好ましくないVISTA発現又は活性と関連する疾患又は障害を有するか又は発現するリスクがある対象を同定するために、本明細書中に記載の診断方法がさらに利用され得る。本明細書中で使用される場合、「異常な」という用語は、野生型VISTA発現又は活性から逸脱するVISTA発現又は活性を含む。異常な発現又は活性は、発現又は活性の増減ならびに、発現の野生型発生パターン又は発現のサブ細胞性パターンに従わない発現又は活性を含む。例えば、異常なVISTA発現又は活性は、VISTA遺伝子における突然変異により、VISTA遺伝子が下方発現又は過剰発現されるケース及び非機能VISTAポリペプチド又はこのような突然変異の結果、野生型のように

機能しないポリペプチド、例えばV I S T A結合パートナーと相互作用しないポリペプチド又は非V I S T A結合パートナーと相互作用するものが生じる状況を含むものとする。本明細書中で使用される場合、「好ましくない」という用語は、免疫細胞活性化などの生物学的反応に関与する好ましくない現象を含む。例えば、好ましくないという用語は、対象において好ましくないV I S T A発現又は活性を含む。

【0581】

〔0612〕 自己免疫障害、免疫不全症障害、自己免疫性などの免疫系障害、アレルギー性又は炎症性障害又は癌など、V I S T Aポリペプチド活性又は核酸発現の誤制御と関連する障害を有するか又はその発現リスクがある対象を同定するために、先行する診断アッセイ又は次のアッセイなど、本明細書中に記載のアッセイが利用され得る。従って、本発明は、試験試料が対象から得られ、V I S T Aポリペプチド又は核酸（例えばmRNA又はゲノムDNA）が検出される、異常な又は好ましくないV I S T A発現又は活性が関連する疾患又は障害を同定するための方法を提供し、V I S T Aポリペプチド又は核酸の存在は、異常な又は好ましくないV I S T A発現又は活性と関連する疾患又は障害を有するか又はその発現リスクがある対象に対する診断である。本明細書中で使用される場合、「試験試料」は、関心のある対象から得られる生体試料を指す。例えば、試験試料は体液（例えば脳脊髄液又は血清）、細胞試料又は組織であり得る。

10

【0582】

〔0613〕 さらに、異常な又は好ましくないV I S T A発現又は活性と関連する疾患又は障害を処置するために対象に薬剤（例えばアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、ポリペプチド、ペプチド、核酸、低分子又は他の薬物候補）が投与され得るか否かを決定するために、本明細書中に記載の予後アッセイが使用され得る。例えば、対象が自己免疫障害、免疫不全症障害、免疫系癌又はアレルギー性又は炎症性障害のための薬剤で効果的に処置され得るか否かを決定するためにこのような方法が使用され得る。従って、本発明は、試験試料が得られ、V I S T Aポリペプチド又は核酸発現又は活性が検出される対象が、異常な又は好ましくないV I S T A発現又は活性が関連する障害に対する薬剤で効果的に処置され得るか否かを決定するための方法を提供する（例えばV I S T Aポリペプチド又は核酸発現又は活性の存在量は、異常な又は好ましくないV I S T A発現又は活性が関連する障害を処置するための薬剤を投与され得る対象に対する診断である。）。本発明の方法はまた、V I S T A遺伝子における遺伝子変異を検出し、それによって改変遺伝子がある対象が、自己免疫障害、免疫不全症障害、免疫系癌、アレルギー性障害又は炎症性障害など、V I S T Aポリペプチド活性又は核酸発現での誤制御を特徴とする障害に対するリスクがあるか否かを決定するためにも使用され得る。例えば、例えばV I S T A遺伝子を伴う疾患もしくは疾病の症状又は家族歴を示す患者を診断するための臨床設定において、都合よく使用され得る、少なくとも1つのプローブ核酸又は本明細書中に記載の抗体試薬を具備する予めパッケージ化された診断キットを利用することによって、本明細書中に記載の方法を行い得る。さらに、V I S T Aが発現されるあらゆる細胞型又は組織が本明細書中に記載の予後アッセイにおいて利用され得る。

20

30

【0583】

免疫アッセイ

40

〔0614〕 試料中のマーカーを質的又は定量的に検出し、分析するための免疫アッセイにおいて、V I S T A及びV I S T A複合物、V I S T A及びV I S T A複合物に結合する抗体及び抗原結合断片が使用され得る。この方法は、V I S T A又はV I S T A複合物に特異的に結合する抗体を提供し：試料を抗体と接触させ；試料中でマーカーと結合した抗体の複合体の存在を検出することを具備する。

【0584】

〔0615〕 よく認められている免疫学的結合アッセイの多くのうち何れかを用いてV I S T A及びV I S T A複合物を検出及び／又は定量し得る。有用なアッセイとしては、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）などの酵素免疫アッセイ（E I A）、放射性免疫アッセイ（R I A）、ウエスタンブロットアッセイ又はスロットブロットアッセイ

50

が挙げられる。例えば米国特許第4, 366, 241号；同第4, 376, 110号；同第4, 517, 288号；及び同第4, 837, 168号を参照。一般に、対象から得られる試料をVISTA又はVISTA複合物と特異的に結合する抗体と接触させ得る。

【0585】

〔0616〕 場合によっては、抗体を試料と接触させる前に、洗浄及び続く複合体の単離を促進するために、本抗体を固体支持体に固定し得る。固体支持体の例としては、例えばマイクロタイタープレート、スティック、ビーズ又はマイクロビーズの形態のガラス又はプラスチックが挙げられるが限定されない。抗体を固体支持体に連結させ得る。

【0586】

〔0617〕 試料を抗体と温置した後、混合物を洗浄し、形成された抗体-マーカー複合体を検出し得る。洗浄した混合物を検出試薬と温置することによって、これを遂行し得る。あるいは、例えば、結合マーカー特異的な抗体を検出するために第二の標識された抗体が使用される間接的アッセイを用いて及び／又は、例えばマーカーの異なるエпитープに結合するモノクローナル抗体を混合物と同時に温置する競合又は阻害アッセイにおいて、試料中のマーカーを検出し得る。

10

【0587】

〔0618〕 アッセイを通して、試薬の各組み合わせ後に温置及び／又は洗浄段階を必要とし得る。温置段階は、約5秒間から数時間、好ましくは約5分間から約24時間まで変動し得る。しかし、温置時間は、アッセイ方式、マーカー、溶液の体積、濃度に依存する。通常、アッセイは周囲温度で行われるが、ある範囲の温度（例えば10℃から40℃）

20

【0588】

〔0619〕 対象からの試料中のマーカーの試験料を決定するために、免疫アッセイが使用され得る。最初に、試料中のマーカーの試験量は、上記の免疫アッセイ法を用いて検出され得る。試料中にマーカーが存在する場合、これは、上記の適切な温置条件下でマーカーと特異的に結合する抗体とともに抗体-マーカー複合体を形成する。抗体-マーカー複合体の量は、場合によっては、標準物質と比較することによって決定され得る。測定単位が対照量及び／又はシグナルに対して比較され得る限り、上記のように、絶対単位でマーカーの試験量を測定する必要はない。いくつかの免疫アッセイが当技術分野で公知であり、放射性免疫アッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、磁気免疫アッセイ、免疫ブロット、ウエスタンブロット、免疫沈降アッセイ、免疫組織化学分析及び蛍光活性化細胞選別（FACS）を含むが限定されないこのような免疫アッセイにおいて、本明細書中に記載のVISTAポリペプチド又はVISTA複合物が使用され得る。Wild、(2008) [Ed.] The Immunoassay Handbook [3rd Ed.] Elsevierを参照。

30

【0589】

放射線イメージング法

〔0620〕 膵臓及び結腸直腸癌を含む癌を診断するために又は腫瘍の進行を監視するために、放射線イメージング法においてVISTA及びVISTA複合物が使用され得る。これらの方法としては、陽電子放出断層撮影（PET）単一光子放射断層撮影（SPECT）が挙げられるが限定されない。これらの技術は両方とも非侵襲性であり、多岐にわたる組織事象及び／又は機能を検出及び／又は測定するために、例えば癌性細胞を検出するなどのために、使用され得る。場合によっては同時に2種類の標識を用いてSPECTが使用され得る。米国特許第6, 696, 686号を参照。

40

【0590】

実用化及び方法

〔0621〕 本発明は、市販量に到達させるためのVISTA及びVISTA複合物の産生をさらに提供する。VISTA及びVISTA複合物を大規模で作製し、必要に応じて保存し、病院、臨床医又は他の医療施設に供給し得る。

【0591】

50

〔0622〕 本明細書中で開示される方法によって、V I S T A及びV I S T A複合物の生産、保存及び分布の方法を作製し得る。生産後、V I S T A及びV I S T A複合物を回収し、精製し、場合によっては患者の処置前に保存し得る。例えば患者が例えば癌、自己免疫疾患又は炎症性状態などの適応症を呈したら、V I S T A及びV I S T A複合物が適時に注文され、提供され得る。従って、本発明は、市販規模で抗体を得るためにV I S T A及びV I S T A複合物を生産する方法、V I S T A及びV I S T A複合物に選択的に結合する抗体及びその抗原結合断片を具備する医薬組成物、ならびに病院及び臨床医にV I S T A及びV I S T A複合物を提供する（即ち生産する、場合によっては保存し、販売する）方法に関する。市販の使用のためにV I S T A及びV I S T A複合物の生産規模を拡大し得る。

10

【0592】

〔0623〕 本発明はまた、販売のために調製物を流通させるための流通系を確立することを具備する、医薬ビジネスを行う方法も提供するか、又は医薬調製物を市販するための販売グループを確立することを含み得る。

【0593】

核酸のライブラリ

〔0624〕 核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発によって、V I S T A（PD-L3）変異体の変化に富むライブラリが作製され得、これは、変化に富む遺伝子ライブラリによりコードされ得る。例えば、潜在的なV I S T A（PD-L3）配列の縮重セットが個々のポリペプチドとして又はあるいは、そこに一連のV I S T A（PD-L3）配列を含有する一連の1つのより大きな融合タンパク質（例えばファージディスプレイ用）として発現可能のように、酵素により合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に連結することによって、V I S T A（PD-L3）変異体の変化に富む遺伝子ライブラリが作製され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なV I S T A（PD-L3）変異体のライブラリを作製するために使用し得る様々な方法がある。自動DNA合成装置において縮重遺伝子配列の化学合成を行い得、次に合成遺伝子を適切な発現ベクターに連結する。遺伝子の縮重セットの使用によって、1つの混合物中で潜在的なV I S T A（PD-L3）配列の所望のセットをコードする配列全てを提供できるようになる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は当技術分野で公知である。例えばNarang（1983）Tetrahedron 39：3；Itakura, et al.（1984）Annu. Rev. Biochem. 53：323；Itakura, et al.（1984）Science 198：1056；Ike, et al.（1983）Nucleic Acids Res. 11：477を参照。

20

30

【0594】

〔0625〕 さらに、V I S T A（PD-L3）ポリペプチドの変異体のスクリーニング及び続く選択のためのV I S T A（PD-L3）断片の変化に富む集団を作製するために、V I S T A（PD-L3）ポリペプチドコード配列の断片のライブラリが使用され得る。分子あたり約1回のみニック生成が起こる条件下でヌクレアーゼによりV I S T A（PD-L3）コード配列の2本鎖PCR断片を処理し、2本鎖DNAを変性させ、DNAを還元して様々なニック入り生成物からのセンス／アンチセンス対を含み得る2本鎖DNAを形成させ、S1ヌクレアーゼでの処理によって再形成2本鎖から1本鎖部分を除去し、得られた断片ライブラリを発現ベクターに連結することによって、コード配列断片のライブラリが作製され得る。この方法によって、発現ライブラリは、N末端、C末端及びV I S T A（PD-L3）ポリペプチドの様々なサイズの内部断片をコードするもの由来のものとなり得る。

40

【0595】

〔0626〕 点突然変異又は短縮化により作製されるコンビナトリアルライブラリの遺伝子産物をスクリーニングするために、及び選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリをスクリーニングするために、いくつかの技術が当技術分野で公知である。このような技術は、V I S T A（PD-L3）ポリペプチドのコンビナトリアル突然変

50

異誘発により作製される遺伝子ライブラリの迅速なスクリーニングに適応可能である。大きな遺伝子ライブラリをスクリーニングするためのハイスループット分析に適している、最も広く使用される技術は、一般に、遺伝子ライブラリを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、得られたベクターライブラリで適切な細胞を形質転換すること及び所望の活性の検出が、生成物が検出される遺伝子をコードするベクターの単離を促進する条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現させることを含む。V I S T A (P D - L 3) 変異体を同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて、ライブラリにおける機能突然変異体の頻度を向上させる新しい技術であるリカーシブアンサンブル突然変異誘発 (R E M) を使用し得る。A r k i n 及び Y o u v a n (1 9 9 2) P r o c N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 7 8 1 1 - 7 8 1 5 ; D e l a g r a v e , e t a l . (1 9 9 3) P r o t e i n E n g . 6 (3) : 3 2 7 - 3 3 1 .

10

【0596】

予測医療

[0627] 本発明はまた、それにより個体を予防的に処置するための予後診断（予測）目的のために診断アッセイ、予後アッセイ及びモニタリング臨床治験が使用される予測医療の分野にも関する。従って、本発明のある態様は、生体試料（例えば血液、血清、細胞又は組織）に関して V I S T A ポリペプチド及び／又は核酸発現ならびに V I S T A 活性を決定し、それにより個体が、異常な又は好ましくない V I S T A 発現又は活性が関連する疾患又は障害に罹患しているか否か、又はそのような障害を発現するリスクがあるか否かを決定するための診断アッセイに関する。本発明はまた、個体が、V I S T A ポリペプチド、核酸発現又は活性が関連する障害を発現するリスクがあるか否かを決定するための予後（又は予測）アッセイも提供する。例えば、生体試料中で V I S T A 遺伝子中の突然変異をアッセイし得る。V I S T A ポリペプチド、核酸発現又は活性を特徴とするかそれが関連する障害の発症前にそれにより個体を予防的に処置するための予後又は予測目的のために、このようなアッセイを使用し得る。

20

【0597】

[0628] 本発明の別の実施形態は、臨床治験で V I S T A の発現又は活性における薬剤（例えば薬物、化合物）の影響を監視することに関する。これら及び他の薬剤は、次のセクションでさらに詳細に記載する。

【0598】

臨床治験中の効果の監視

[0629] V I S T A ポリペプチドの発現又は活性における薬剤（例えば薬物）の影響を監視すること（例えば細胞増殖及び／又は遊走の調整）は、基礎的な薬物スクリーニングだけでなく臨床治験にも適用され得る。例えば、V I S T A 遺伝子発現、ポリペプチドレベル低下を示すか又は V I S T A 活性が下方制御されている対照の臨床治験において、V I S T A 遺伝子発現、ポリペプチドレベルを上昇させるか又は V I S T A 活性を上方制御するための本明細書中で記載のようなスクリーニングアッセイにより決定される薬剤の有効性を監視し得る。あるいは、V I S T A 遺伝子発現、ポリペプチドレベル又は V I S T A 活性上昇を示す対照の臨床治験において、V I S T A 遺伝子発現、ポリペプチドレベルを低下させるか又は V I S T A 活性を下方制御するためのスクリーニングアッセイにより決定される薬剤の有効性を監視し得る。述べられるように、V I S T A は、A P C （マクロファージ及び骨髄樹状細胞）及び C D 4 + T 細胞を含む多くの造血細胞型において発現され、より具体的には、C D 1 1 c + D C 、 C D 4 + T 細胞（F o x p 3 - エフェクター T 細胞及び F o x p 3 + n T r e g s の両方を含む。）、C D 8 + T 細胞及び G r 1 + 顆粒球において発現され、B 細胞及び N K 細胞では低レベルで発現される。このような臨床治験において、V I S T A 遺伝子及び好ましくは例えば V I S T A - 関連障害に関わっている他の遺伝子の発現又は活性は、「読み出し情報」又は特定細胞の表現型のマーカーとして使用され得る。

40

【0599】

[0630] 例えば、限定するものではないが、V I S T A 活性を調整する薬剤（例えば

50

化合物、薬物又は低分子）（例えば本明細書中で記載のようなスクリーニングアッセイで同定される。）での処理により細胞中で調整されるVISTAを含む遺伝子が同定され得る。従って、VISTA関連障害における薬剤の効果を試験するために、例えば臨床治験において、細胞を単離し、RNAを調製し、VISTA及びVISTA関連障害に関わる他の遺伝子の発現レベルについてそれぞれ分析し得る。本明細書中で記載のようなノーザンブロット分析又はRT-PCRによって、又はあるいは本明細書中で記載のような方法のうち1つにより、産生されるポリペプチド量を測定することによって、又はVISTA又は他の遺伝子の活性レベルを測定することによって、遺伝子発現レベル（例えば遺伝子発現パターン）を定量し得る。このようにして、遺伝子発現パターンは、薬剤に対する細胞の生理的応答を示す、マーカーとなり得る。従って、この反応状態は、薬剤での個体の処置前、処置中の様々な時点で決定され得る。実施形態において、本発明は、（i）薬剤投与前に対象から投与前試料を入手し；（ii）投与前試料中の、VISTAポリペプチド、mRNA又はゲノムDNAの発現レベルを検出し；（iii）対象から1以上の投与後試料を入手し；（iv）投与後試料中のVISTAポリペプチド、mRNA又はゲノムDNAの発現又は活性レベルを検出し；（v）投与前試料中のVISTAポリペプチド、mRNA又はゲノムDNAの発現又は活性レベルを投与後試料中のVISTAポリペプチド、mRNA又はゲノムDNAと比較し；（vi）それに従い対象への薬剤の投与を変更する段階を含む、薬剤（例えばアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、ポリペプチド、ペプチド、核酸、低分子又は本明細書中に記載のスクリーニングアッセイにより同定される他の薬物候補）での対象の処置の有効性を監視するための方法を提供する。例えば、薬剤投与の増加は、VISTAの発現又は活性を検出レベルよりも高いレベルに向上させるために、即ち、薬剤の有効性を向上させるために所望され得る。あるいは、薬剤投与の減少は、VISTAの発現又は活性を検出レベルよりも低いレベルに低下させるために、即ち薬剤の有効性を低下させるために所望され得る。このような実施形態に従うと、観察可能な表現型反応の非存在下でも薬剤の有効性の指標としてVISTA発現又は活性が使用され得る。

10

20

【0600】

〔0631〕 本願で言及される全ての刊行物（例えば非特許文献）、特許、特許出願公開及び特許出願は、本発明が属する技術分野の当業者の技術レベルを示す。本願で言及される、このような刊行物（例えば非特許文献）、特許、特許出願公開及び特許出願は全て、それぞれ個々の刊行物、特許、特許出願公開又は特許出願が具体的に及び個々に参照により組み込まれることを示すように、参考により同程度に本明細書中に組み込まれる。

30

【実施例】

【0601】

〔0632〕 本発明を広く説明してきたが、単に本発明のある一定の態様及び実施形態の説明のために含まれるものであり、本発明を限定するものではない次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。

【0602】

実施例1

VISTA（PD-L3）のクローニング及び配列分析

40

〔0633〕 休止Treg、αCD3により活性化されたTreg及びαCD3／αGITRにより活性化されたTregの網羅的な転写プロファイリングによって、VISTA（PD-L3）及びTreg-sTNFを同定した。Treg上でのGITRの誘発が、それらの接触依存性抑制の活性を消滅されることが示されているので、この分析のためにαGITRを選択した（Shimizu, et al.（2002）上出）。それらの特有の発現パターンに基づき、AFFIMETRIX（登録商標）DNAアレイにおいて、VISTA（PD-L3）及びTreg-sTNFを同定した（表2）。VISTA（PD-L3）は、αCD3活性化Tregでの発現の上昇を示し、αGITRの存在下で発現が低下し；Treg-sTNFは、αCD3／αGITR依存性の発現上昇を示した。

〔0634〕 一晚培養中に、精製CD4＋CD25＋T細胞を刺激しないか、又はαCD

50

3 もしくは α CD3/ α GITRで刺激し、リアルタイムPCR分析のためにRNAを単離した。列挙される発現はアクチンに対するものである。

【表2】

表2

mRNA	相対的発現		
	なし	α CD3	α CD3/ α GITR
VISTA(PD-L3)	6	10	7
T ^{reg} -sTNF	0.2	0.3	1.5

〔0635〕 活性化と休止CD25+CD4+nTregsとのAFFIMETRIX（登録商標）分析から、機能は未知であるが、Igスーパーファミリーに対して配列相同性がある遺伝子産物（RIKEN cDNA 4632428N05又は4632428N05Rik）の発現が明らかになった。

【0603】

〔0636〕 より具体的に、CD4+T細胞cDNAライブラリから930bp遺伝子産物をクローニングし、これは予想サイズ及び配列と一致した。シリコー配列及び構造分析から、成熟時に309アミノ酸の、159アミノ酸の細胞外ドメイン、22アミノ酸の膜貫通ドメイン及び95アミノ酸の細胞質テールがある膜貫通タンパク質が予測される（図1A）。アミノ酸配列アラインメントから、PD-L1、PD-L2、B7-H3及びB7-H4などのB7ファミリーリガンドならびにB7ファミリー受容体（即ちPD-1、CTLA-4、CD28、BTLA、ICOS）と相同の細胞外免疫グロブリン（Ig）-V様ドメインが明らかとなる（図1B-C）。一般にB7ファミリーリガンドと受容体との間のIg-Vドメインの配列同一性はあまり高くない（<40%）ものの、4632428N05RikのIg-Vドメインは、B7ファミリーリガンドPD-L1及びPD-L2と最大の相同性を有する。配列アラインメントはまた、B7ファミリーリガンドの特徴である、鎖内ジスルフィド結合形成に重要であるいくつかの非常に保存的なシステインも明らかにする（図1B）。図23AからC；Sica, et al. (2003) Immunity 18:849-861も参照。

【0604】

〔0637〕 4632428N05Rikの細胞外ドメインは、Ig-Vドメインのみを含有するが、Ig-Cドメインを欠く（図1BからC）。この特有の特性はB7ファミリー受容体の特徴であり、これによって、Ig-V及びIg-Cドメインの両方を含有する全ての他のB7ファミリーリガンドから4632428N05Rikが区別される。Freeman (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:10275-10276; Lazar-Molnar, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:10483-10488; Lin, et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105:3011-3016; Schwartz, et al. (2001) Nature 410:604-608; Stamper, et al. (2001) Nature 410:608-61。一貫して、PhyMLアルゴリズム（系統発生学的最尤法）を用いた系統学的分析によって、4632428N05Rikは、B7ファミリーリガンドよりも、B7ファミリー受容体、特にPD-1と近い進化距離に置かれた（図2）。Guindon及びGascuel (2003) Syst Biol 52:696-704。しかし、VISTA(PD-L3)の細胞質テールは、B7ファミリー受容体の特徴的なドメインであるシグナル伝達ドメイン（例えばITIM、ITAM又はITSM）を全く含有しない。Sharpe及びFreeman (2002) Nat Rev Immunol. 2:116-126。阻害受容体PD-1とのその近い進化的関係にも関わらず、4632428N05Rikは、B7リガンドファミリーの新規メンバーに相当する。これらの構造及び系統学的特徴に基づき、この分子をリガンドとしてPD-1-expressed (VISTA(PD-L3))と名付けた。マウスとヒトオルソログとの間でVISTA(P

D-L 3) もまた非常に保存性が高く、77%の配列同一性を有する(図1D)。

【0605】

[0638] マウス VISTA (PD-L3) をコードする核酸配列は、本明細書中で配列番号1として示され、マウス VISTA (PD-L3) タンパク質配列は配列番号2として示される。

【0606】

[0639] VISTA (PD-L3) のヒト相同体は染色体10 (72.9 Mb) に位置し、6個のエクソンから構成され、それによって311残基タンパク質をコードする4689塩基長の転写産物が生成される。ヒト相同体 mRNA コード配列は GENBANK 受託番号 NM_022153 で提供され、タンパク質配列は NP_071436 として与える。ヒト VISTA (PD-L3) をコードする核酸配列は本明細書中で配列番号3として示され、ヒト VISTA (PD-L3) タンパク質配列は配列番号4として示される。マウス及びヒト遺伝子は74%相同性を共有し、タンパク質レベルで68%同一である。染色体20上でラットゥス・ノルベジクス (*Rattus norvegicus*) (27.7 Mb; GENBANK 受託番号 BC098723) ならびにフグ・ルブリペス (*Fugu rubripes*) 及びダニオ・レリオ (*Danio rerio*) においも相同体が同定された。ある実施形態において、本発明の VISTA (PD-L3) タンパク質は、配列番号5で示される共通のアミノ酸配列を共有する。VISTA のさらなるオルソログが同定されており、図23Cにおいて例えば(配列番号17)、ヒト(配列番号16)、カンガルー(配列番号18)、イルカ(配列番号19)、ニワトリ(配列番号20)、ツメガエル(配列番号21)、キンカチョウ(配列番号22)、ゼブラフィッシュ及びフグ(配列番号23)で示される。

【0607】

実施例2

RT-PCR 分析及びフローサイトメトリーによる VISTA (PD-L3) の発現実験

[0640] マウス組織において VISTA (PD-L3) の mRNA 発現パターンを決定するために、RT-PCR 分析を使用した(図3A)。VISTA (PD-L3) は、造血組織(脾臓、胸腺、骨髄)又は豊富な白血球浸潤がある組織(即ち肺)で殆ど発現される。非造血組織(即ち心臓、腎臓、脳及び卵巣)でも弱い発現が検出された。いくつかの造血細胞型の分析から、腹膜マクロファージ、脾臓 CD11b+単球、CD11c+D C、CD4+T細胞及びCD8+T細胞上での VISTA (PD-L3) の発現が明らかになるが、B細胞上では発現レベルがより低い(図3B)。この発現パターンはまた、GNF (Genomics Institute of Novartis Research Foundation) 遺伝子アレイデータベース、ならびに NCBI GEO (遺伝子発現オムニバス) データベースとも大部分一致する(図3AからD)。Su, et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:4465-4470 を参照。

【0608】

[0641] タンパク質発現を研究するために、VISTA (PD-L3) 特異的なハムスター 8D8 及び 6E7 モノクローナル抗体を作製した。VISTA (PD-L3) 一過剰発現マウス EL4 T細胞上での染色が陽性であるが PD-L1 一過剰発現 EL4 T細胞上での染色が陰性であることによって特異性が明らかになる(図5)。

【0609】

[0642] VISTA (PD-L3) に対してポリクローナル及びモノクローナル抗体の両方を産生させた。ウサギ抗 VISTA (PD-L3) 抗体を用いたところ、VISTA (PD-L3) タンパク質はリンパ系器官に局在化し、脳組織で顕著に見られた。同定されたモノクローナル抗体のうち、 α VISTA (PD-L3) クローン 8D8 の特異性をさらに評価した。この分析において、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-1、B7-2、VISTA (PD-L3) 及び hlg を含む PD-L 様-Ig 融合タンパク質分子のパネルに対する結合についてクローン 8D8 を試験した。この分析

の結果から、8D8αPD-L-3がVISTA (PD-L3) に対して非常に特異的であることが示された。

【0610】

[0643] 具体的に、抗VISTA (PD-L3) モノクローナル抗体クローン8D8を用いて、フローサイトメトリーにより、造血細胞上でVISTA (PD-L3) 発現を分析した。CD4+nTregsを区別するために、Foxp3GFPノックインレポーターマウスを使用した。末梢リンパ系器官（脾臓及びリンパ節）において、全てのCD4+T細胞サブセット上で顕著な発現が見られ（総CD4+T細胞又はFoxp3-ナイーブT細胞及びFoxp3+nTreg細胞及びメモリーCD4+T細胞を参照）、一方でCD8+T細胞が発現する表面VISTA (PD-L3) 量は非常に低い（図3C）。胸腺において、VISTA (PD-L3) 発現は、CD4+CD8+二重陽性胸腺細胞上で陰性であり、CD4単陽性細胞上では低く、CD8単陽性細胞上で検出可能である。次に、F4/80マクロファージ及び骨髄CD11c+DCの両方を含む、脾臓及び腹膜細胞の両方に対して、高VISTA (PD-L3) 発現とCD11bマーカーとの強い相関が見られ得る（図3DからE）。一方で、B細胞及びNK細胞は、殆どVISTA (PD-L3) 発現に対して陰性である。Gr-1+顆粒球のうちごく一部もVISTA (PD-L3) を発現する（図3F）。

10

【0611】

[0644] 異なるリンパ系器官からの同じ系列の細胞において差次的発現パターンが示される（図3G）。CD4+T細胞及びCD11b中間型単球の場合、発現レベルは、腸間膜リンパ節>末梢LN及び脾臓>腹膜腔及び血液のパターンに従う。このパターンは、CD11bhi細胞に対してはあまり顕著ではない。このデータは、ある種の細胞型でのVISTA (PD-L3) 発現が細胞成熟及び／又は組織微小環境により制御され得ることを示唆する。

20

【0612】

[0645] 新鮮単離細胞に加えて、活性化するか又は活性化せずに、インビトロ培養において脾臓CD4+T細胞、CD11bhi単球及びCD11c+DC上でVISTA (PD-L3) 発現を分析した（図6）。VISTA (PD-L3) 及び他のB7ファミリーリガンド（例えばPD-L1、PD-L2、B7-H3及びB7-H4）の発現に対して分析する前に24時間、培地とともに、又は抗CD3とともに（T細胞活性化のため）、又はIFNγ及びLPSとともに（単球及びDC活性化のため）、脾臓細胞を培養した。この比較から、これらの分子間での特徴的な発現パターンが明らかとなった。活性化状況に関わらず、インビトロ培養時に全細胞型でVISTA (PD-L3) 発現が急速に失われる。その一方、PD-L1発現は、刺激時にCD4+T細胞上で、又は培地単独中での培養時にCD11bhi単球及びCD11c+DC上で、上方制御され、刺激があるとさらに促進された。PD-L2、B7-H3及びB7-H4の発現は、使用した培養条件下で顕著ではない。インビトロでのVISTA (PD-L3) 発現の喪失は、他のB7ファミリーリガンドと比較した場合に特有であるが、組織微小環境を模倣できない非最適培養条件を反映し得る。

30

【0613】

[0646] インビボでVISTA (PD-L3) 発現がどのように制御され得るかということに対処するために、CD4+TCRトランスジェニックマウスDO11.10に完全フロイントアジュバント（CFA）で乳化させた同種抗原ニフトリオボアルブミン（OVA）を用いて免疫付与した。免疫付与から24時間後、流入領域リンパ節からの細胞をVISTA (PD-L3) 発現について分析した（図7A）。アジュバント単独ではない抗原（CFA/OVA）での免疫付与は、F4/80+マクロファージ及びCD11c+DCの混合集団を含有したCD11b+VISTA (PD-L3)+骨髄細胞集団を劇的に増加させた。PD-L1及びPD-L2とのさらなる比較から、PD-L1が最大の構成的発現レベルを有しても、炎症性免疫反応中にVISTA (PD-L3) が最もよく上方制御されることが明らかになる（図7B）。まとめると、これらのデータは、免疫反応

40

50

を調節し、T細胞免疫性を制御することにおけるその役割に關与し得る免疫系により、骨髓APC上でのVISTA (PD-L3)の発現が厳しく制御されることを強く示唆する。

【0614】

[0647] APC上でのその発現上昇とは対照的に、免疫付与時のより後の時点（即ち24時間ではなく48時間後）で、活性化DO11.10 CD4+T細胞上でVISTA (PD-L3)発現が低下する（図8）。この結果は、能動的な免疫反応中のその活性化状況及びサイトカイン微小環境により、インビボでのCD4+T細胞上でのVISTA (PD-L3)発現が制御され得ることを示唆する。

【0615】

実施例3

CD4+及びCD8+T細胞反応におけるVISTA (PD-L3)シグナル伝達の機能的影響

[0648] CD4+T細胞反応におけるVISTA (PD-L3)の制御的役割を調べるために、VISTA (PD-L3)-Ig融合タンパク質を作製した。VISTA (PD-L3)-Ig融合タンパク質は、ヒトIgG1 Fc領域に融合されたVISTA (PD-L3)の細胞外ドメインを含有する。マイクロプレート上に固定化された場合、対照IgでなくVISTA (PD-L3)-Igは、細胞分裂停止により決定すると、プレート結合抗CD3刺激に反応して、バルク精製CD4+及びCD8+T細胞の増殖を抑制した（図9AからB）。VISTA (PD-L3) Ig融合タンパク質は、ELISAによって決定した場合、プラスチックウェルに対する抗CD3抗体の吸収に影響を与えず、従って非特異的な阻害効果の可能性が除外される。PD-1 KO CD4+T細胞もまた抑制され（図9C、D）、このことからPD-1がVISTA (PD-L3)に対する受容体ではないことが示される。PD-L1-Ig及びVISTA (PD-L3)-Igの阻害効果も直接比較した（図10）。CD4+T細胞を刺激するためにIg融合タンパク質の滴定量がαCD3と一緒にマイクロプレートに吸収された場合、VISTA (PD-L3)-Igは、PD-L1-Ig融合タンパク質と同様の阻害有効性を示した。

【0616】

[0649] バルク精製CD4+T細胞は様々なサブセットを含有するので、選別されたナイーブ（CD25-CD44lowCD62Lhi）及びメモリー（CD25-CD44hiCD62Llow）CD4+T細胞サブセットにおけるVISTA (PD-L3)-Igの影響を評価した（図11A及び11B）。VISTA (PD-L3)は、メモリー細胞においては有効性がより非常に低いものの、両サブセットの増殖を抑制し得る。

【0617】

[0650] VISTA (PD-L3)介在性抑制の機構をさらに理解するために、VISTA (PD-L3)-Igの存在下又は非存在下で、細胞活性化後、初期TCR活性化マーカー及びアポトーシスの発現を測定した。細胞増殖における負の影響と一致して、初期活性化マーカーCD69、CD44及びCD62Lの発現において網羅的な抑制がある（追加図12A）。一方で、VISTA (PD-L3)-Ig融合タンパク質はアポトーシスを誘導しなかった。それどころか、TCR活性化の初期（24時間）及びさらに後（48時間）の両段階で、（アネキシンV+7AAD-細胞の%により決定した場合）VISTA (PD-L3)又はVISTA-Igの存在下でアポトーシスが見られたのはIg対照よりも少なかった（図12B）。例えば、24時間の時点で総「非ゲーティング」集団において、VISTA (PD-L3)又はVISTA-Igの存在下で～27%細胞がアポトーシス性であったが～39%の対照細胞がアポトーシス性であった。生細胞R1ゲート内で細胞を調べた場合、約72.6%の対照細胞がアポトーシス性になり、一方でVISTA (PD-L3)又はVISTA-Igで処理した場合は僅か43.5%の細胞がアポトーシス性であったので、VISTA (PD-L3)又はVISTA-Igが活性化-誘導性-細胞死（ACID）を強く阻害したことが明らかである。48時間の時点で同様の結果が見られた。従って、初期TCR活性化を抑制し、細胞分裂を停止させることに

10

20

30

40

50

よって、VISTA (PD-L3) 又はVISTAがCD4+T細胞反応を負に制御することは明らかであるが、アポトーシスに対する直接的影響は最小限である。この抑制機構は、B7-H4の場合と同様である。Sica, et al. (2003) *Immunity* 18:849-861。

【0618】

[0651] VISTA (PD-L3) 又はVISTA-Igが予め活性化されたCD4 T細胞を抑制し得るか否か、及びその抑制効果がどの程度持続性であるかを決定するために、2-段階アッセイを開発した。VISTA (PD-L3) 又はVISTA-Ig融合タンパク質の抑制効果は、活性化後24時間でそれを除去した後、持続することが示される (図9D)。さらに、VISTA (PD-L3) 又はVISTA-Igによって、ナイーブ及び予め活性化したCD4+T細胞の両方が抑制され得た。図9D(i)、9D(iii)及び9D(iv)を参照。

10

【0619】

[0652] 次に、CD4+T細胞サイトカイン産生におけるVISTA (PD-L3) 又はVISTA-Igの影響を分析した。VISTA (PD-L3) 又はVISTA-Igは、バルク精製CD4+T細胞培養物からのTh1サイトカインIL-2及びIFN α の産生を抑制した (図13A-B)。別個のナイーブ (CD25-CD44lowCD62Lhi) 及びメモリー (CD25-CD44hiCD62Llow) CD4+T細胞集団上でVISTA (PD-L3) 又はVISTAの影響をさらに試験した。メモリーCD4+T細胞は、CD4+T細胞区画内でサイトカイン産生に対する主要な源であり、VISTA (PD-L3) 又はVISTAがこの産生を抑制し得ることが示される (図13CからD)。CD8+T細胞からのIFN α 産生に対するVISTA (PD-L3) 又はVISTAの同様の阻害効果も示された (図13E)。CD4+及びCD8+T細胞によるサイトカイン産生におけるVISTA (PD-L3) 又はVISTAのこの阻害効果は、VISTA (PD-L3) 又はVISTAが、免疫反応を下方制御する阻害性リガンドであるという仮説と一致する。

20

【0620】

[0653] 次に、VISTA (PD-L3) 又はVISTAの阻害効果を克服可能である因子を決定するために実験を設計した。VISTA (PD-L3) 又はVISTAがIL-2産生を抑制し、IL-2がT細胞生存及び増殖に重要であると仮定すると、IL-2はVISTA (PD-L3) 又はVISTAの阻害活性を回避し得る。図14Aで示されるように、細胞増殖において、IL-15、IL-7又はIL-23ではなく外来性IL-2は、VISTA (PD-L3) 又はVISTA-Igの抑制効果を部分的に逆転させた。高レベルのIL-2による不完全なレスキューから、VISTA (PD-L3) 又はVISTAシグナル伝達が、単純にIL-2産生よりも幅広いT細胞活性化経路を標的とすることが示される。一方で、抗CD28アゴニスト性抗体によりもたらされる強力な同時刺激シグナルは、VISTA (PD-L3) 又はVISTA-Ig介在性の抑制を完全に逆転させ (図14B)、一方で、VISTA (PD-L3) 又はVISTAシグナル伝達によって中間レベルの同時刺激が依然として抑制される (図14C)。この結果は、炎症状態が少ない状態下ほど、VISTA (PD-L3) 又はVISTA介在性免疫抑制が有効となるが、強い陽性同時刺激シグナルによって必然的に抑え込まれることを示唆する。この点において、VISTA (PD-L3) 又はVISTAは、PD-L1及びB7-H4などの他の抑制性のB7ファミリーリガンドとこの特性を共有する。Sica, et al. (2003) *Immunity* 18:849-861; Carter, et al. (2002) *Eur J Immunol* 32:634-643。

30

40

【0621】

[0654] VISTA (PD-L3) 又はVISTA-Ig融合タンパク質に加えて、APC上で発現されるVISTA (PD-L3) 又はVISTAが、APCとT細胞との間の同種相互作用中に抗原特異的なT細胞活性化を抑制し得ることを確認する必要がある。この目的のために、MHC II及びB7-2分子を安定的に発現する人工的な抗原提示

50

細胞株 (CHO-APC) においてレトロウイルス形質導入を介してVISTA (PD-L3) 又はVISTA-RFP又はRFP対照タンパク質を過剰発現させた。Latichman, et al. (2001) Nat Immunol 2:261-268。CHOにおいてVISTA (PD-L3) 又はVISTAを発現させることにおけるある問題は、おそらくVISTA (PD-L3) 又はVISTA表面局在に対する支持を欠く異質な環境ゆえに、VISTA (PD-L3) 又はVISTAの大部分が細胞表面に局在できないことである。制御方式を示唆する、VISTA (PD-L3) 又はVISTAの細胞質テール上に存在する明確なモチーフがないものの、このテールはその細胞内局在に関与し得る。結果的に、テールのないVISTA (PD-L3) 又はVISTA突然変異体を設計し、CHO細胞表面にうまく局在することが分かった。

10

【0622】

[0655] T細胞反応を刺激するために、抗原性OVAペプチドの存在下でCHO-VISTA (PD-L3) 又はVISTA又はCHO-RFP細胞をDO11.10 CD4+T細胞と一緒に温置した。図15AからDで示されるように、CHO-VISTA (PD-L3) 又はVISTAは、CHO-RFP細胞よりもDO11.10細胞の増殖誘導が少なかった。より強い刺激性シグナルがVISTA (PD-L3) 又はVISTAの抑制効果を克服するという考えと一致して、この抑制効果はより低いペプチド濃度でより顕著である。

【0623】

[0656] さらに、天然のAPC上での全長VISTA (PD-L3) 又はVISTAの阻害効果を確認した。インビトロ培養した骨髓由来樹状細胞 (BMDC) は、高レベルのVISTA (PD-L3) 又はVISTAを発現しない (図16)。10日間の培養期間中に、レトロウイルス形質導入によってBMDCでVISTA (PD-L3) 又はVISTA-RFP又はRFPを発現させた。RFP発現に基づいて形質導入細胞を均一性について選別した。抗VISTA (PD-L3) 又はVISTAモノクローナル抗体で染色することによって、形質導入DC上でのVISTA (PD-L3) 又はVISTAの発現レベルを推定し、新鮮単離腹膜マクロファージ上で、従って生理的発現範囲内のレベルと、同様であることが分かった (図16)。次に、OVAペプチドの存在下で、OVA特異的なトランスジェニックCD4+T細胞 (OT1) を刺激するために、選別したBMDCを使用した (図15D)。BMDC上でのVISTA (PD-L3) 又はVISTAの発現は、同種CD4+T細胞増殖性反応を抑制した。この結果は、VISTA (PD-L3) 又はVISTA-Ig融合タンパク質及びCHO-APC細胞を用いた以前のデータと一致し、これは、VISTA (PD-L3) 又はVISTAがT細胞介在性免疫反応を抑制し得ることを示唆する。

20

30

【0624】

実施例4

多発性硬化症動物モデル (EAE) における抗VISTA (PD-L3) 又はVISTA抗体の評価

[0657] α VISTA (PD-L3) 又はVISTAモノクローナル抗体はインビボでT細胞反応を抑制すると思われたので、 α VISTA (PD-L3) 又はVISTAがT細胞介在性自己免疫疾患を阻害し得るか否かを評価するために、 α VISTA (PD-L3) 又はVISTAを試験した。実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) モデルを用いて、炎症性疾患における α PD-L3モノクローナル抗体の機能的影響を決定した。EAEは、広く使用される、ヒト自己免疫疾患多発性硬化症のマウスモデルである。アジュバント中のミエリン抗原での免疫付与によるか又はミエリン特異的なT細胞の養子免疫伝達よるか何れかでEAEを誘導し得、その結果、様々なエフェクターT細胞及びB細胞及びマクロファージの炎症性浸潤する及び中枢神経系の脱髄が起こる。

40

【0625】

[0658] 外来抗原としての大量のモノクローナル抗体の注射によるアナフィラキシーの誘導を回避するために、受動的EAEモデルにおいて α PD-L3モノクローナル抗

50

体を試験した。この養子免疫伝達EAEモデルにおいて、CFA及びPLPペプチドを用いてドナーSJLマウスに免疫付与した。第10日に、流入領域LNからの全リンパ球を単離し、インビトロでPLPペプチド、IL-23 (20 ng/mL) 及び抗IFN γ (10 μ g/mL) とともに4日間培養した。次に、拡大させたCD4⁺ T細胞を精製し、ナイーブ受容マウスに養子性に移した。この分析から、 α PD-L3モノクローナル抗体が疾患発症を遅延させ、疾患重症度が軽減し、それによって疾患進行曲線が著しく変化したことが示される (A, Bure 17)。さらに、これは、マウスのかなりの割合で重症度を低下させ、生存率を22%前後から75%超まで大きく向上させた。このことから、EAEでの α PD-L3モノクローナル抗体の活性がインビトロデータと一致することが明らかとなり、様々な炎症性疾患における新規免疫制御試薬としてのこの試薬の使用が立証される。

10

【0626】

実施例 5

活動性EAEマウスにおけるVISTA-IgG2Aの治療効果

[0659] 多発性硬化症を処置するためのVISTA融合ポリペプチドの推定有効性を評価するために、前の実施例に記載のように作製した活動性EAEのマウスを評価した。これらの実験において、6匹のEAEマウス群をPBS (対照)、100 μ gの対照IgG2aポリペプチド、300 mgの対照IgG2aポリペプチド、100 μ gのmVISTA-IgG2aポリペプチド、300 μ gのmVISTA-IgG2aポリペプチドで処置した。図42のスコアにより示されるように、mVISTA-IgG2a処置マウスは、試験した両用量で顕著で及び統計学的に有意な治療効果があった (低及び高用量でp=0.0051及び0.0043)。

20

【0627】

[0660] 発明者らはまた、EAEにおけるT細胞の運命及び機能におけるVISTAの効果を実験を行った。発明者らは、VISTAが、病原性の発現、脳炎誘発性のT細胞、クローン性T細胞拡大、T細胞極性、寿命及びTeffからTregへの変換を変化させるか否かを評価することを望んだ。発明者らは、EAEでのT細胞運命におけるVISTA遮断の影響を試験した。より高い疾患スコアと一致して、疾患進行の終点でのCNSの分析から、13F3 (α VISTA) 処置群において、有意に多いIL17A-産生CD4⁺ T細胞浸潤 (0.66から11%) が確認された。

30

【0628】

実施例 6

狼瘡の予防のためのVISTA-Igの評価

[0661] 予防実験のために、8週齢からPBS、150 μ gの対照-IgG2a又はmVISTA-IgG2aで1日おきにNZBWF1雌マウスを処置した。体重減少及び蛋白尿により疾患重症度を毎週監視した。図43A及びBで示されるように、データを平均 $\pm$ SEMとして示した。対照IgG2aとmVISTA-IgG2aとの間の統計学的有意差を決定した。p値を計算したところ、0.0027となり (対応のないマン・ホイットニー検定による)、VISTA融合物が対照と比較してSLEの発症を予防したことが示された。

40

【0629】

実施例 7

VISTA-Igは狼瘡において生存を促進する

[0662] 図44A及びBでさらに示されるように、8週齢のときに、NZBWF1雌マウスにPBS、150 μ gの対照-IgG2a又はmVISTA-IgG2aを1日おきに投与し、蛋白尿減少により証明されるように、VISTA-IgG2a処置マウスの疾患重症度が軽減した。繰り返すが、データは平均レベル $\pm$ SEMとして示し、これは実験の代表例である。対応のないマン・ホイットニー検定によるp値により決定されるような統計学的有意差は0.0009であることが分かった。\$ \$ bの生存曲線及び44Aの蛋白尿データの結果は、VISTA-Igポリペプチドが、狼瘡患者において生存を促進し

50

、その腎臓傷害を緩和するか又は予防し得ることを示す。

【0630】

実施例 8

E A E モデルにおける V I S T A の効果の評価

〔0663〕 α V I S T A (P D - L 3) 又は V I S T A モノクローナル抗体はインビボで T 細胞反応を抑制すると思われたので、 α V I S T A (P D - L 3) 又は V I S T A が T 細胞介在性自己免疫疾患を阻害し得るか否かを評価するために α V I S T A (P D - L 3) 又は V I S T A を試験した。実験的アレルギー性脳脊髄炎 (E A E) モデルを用いて、炎症性疾患における α P D L - L 3 モノクローナル抗体の機能的影響を決定した。E A E は、ヒト自己免疫疾患多発性硬化症の広く使用されるマウスモデルである。アジュバント中のミエリン抗原での免疫付与によるか又はミエリン特異的な T 細胞の養子免疫伝達によるかの何れかで E A E を誘導し得、その結果、様々なエフェクター T 細胞及び B 細胞及びマクロファージの炎症性浸潤及び中枢神経系の脱髄が起こる。

10

【0631】

実施例 9

C N S における V I S T A の発現

〔0664〕 C N S における V I S T A の発現も実施した。これらのアッセイは、V I S T A の喪失が炎症促進可能であり得るという仮説と一致して、疾患マウスにおいて、C D 1 1 b + 細胞上で V I S T A 発現が著しく減少する (7 6 % から 3 3 %) ことを明らかにした (図 2 2) 。これは興味深く、発明者らが本明細書中で、非常に高レベルの V I S T A を発現する腫瘍における M D S C と炎症性骨髄細胞を対比させる場合、機能的に重要であると思われる。E A E マウスが、T 細胞活性化に対して強力に抑制性であり、疾患を和らげ得る脾臓の骨髄由来抑制細胞 (C D 1 1 b + L y - 6 C h i g h M D S C) 数を上昇させたことが報告されている 3 2 。発明者らのデータは、V I S T A が E A E において骨髄介在性抑制に関与し得ることを強く示唆する。

20

【0632】

実施例 10

E A E での T 細胞の運命及び機能における V I S T A の影響

〔0665〕 発明者らはまた、E A E での T 細胞の運命及び機能における V I S T A の効果をアッセイする実験を行った。発明者らは、V I S T A が、病原性の発現、脳炎誘発性の T 細胞、クローン性 T 細胞拡大、T 細胞極性、寿命及び T e f f から T r e g への変換を変化させるか否かを評価することを望んだ。発明者らは、E A E での T 細胞運命における V I S T A 遮断の影響を試験した。より高い疾患スコアと一致して、疾患進行の終点での C N S の分析から、1 3 F 3 (α V I S T A) 処置群において、有意に多い I L 1 7 A - 産生 C D 4 + T 細胞浸潤 (0 . 6 6 から 1 1 %) が確認された。

30

【0633】

実施例 11

V I S T A (P D - L 3) 又は V I S T A トランスジェニック及びノックアウトマウス

〔0666〕 胚のレンチウイルス感染を用いて、V I S T A (P D - L 3) 又は V I S T A をユビキタスに発現する 4 匹のトランスジェニックマウスを作製した。これらのマウスは、ヒト伸長因子 1 プロモーターの調節下で全長 V I S T A (P D - L 3) 又は V I S T A を発現する。レンチウイルス性ベクター p W P T を用いてこれらのマウスを作製した。他の P D - L 1 ファミリーメンバーと同様に (App a y , e t a l . (2 0 0 2) J . I m m u n o l . 1 6 8 : 5 9 5 4 - 8) 、 V I S T A (P D - L 3) 又は V I S T A が、インビトロで α C D 3 T 細胞増殖を同時刺激するように機能しながら、インビボで負の制御因子として機能することが企図される。この点において、これらのマウスは、V I S T A (P D - L 3) 又は V I S T A トランスジェニックマウスにおいて自然発生的に自己免疫性及びインビボ免疫反応 (即ち液性免疫反応、T 細胞刺激) を発現すると予想され、全身性自己免疫疾患発現を評価するために測定される。

40

【0634】

50

〔0667〕 ノックアウトマウスの場合、相同組み換えによりVISTA (PD-L3) 又はVISTAを不活性化する。全長VISTA (PD-L3) 又はVISTA配列を含有するBACクローンをINVITROGEN (登録商標) (Carlsbad, CA) から購入した。ネオマイシン遺伝子の上流のVISTA (PD-L3) 又はVISTA遺伝子の第二のエクソンの5'側にある1.6 kb断片及びネオマイシン遺伝子の下流のVISTA (PD-L3) 又はVISTA遺伝子の第三のエクソンの3'側にある5 kb断片を挿入することによって、VISTA (PD-L3) 又はVISTA標的ベクターを作製した。B6由来の胚幹 (ES) 細胞をVISTA (PD-L3) 又はVISTA標的ベクターとともに電気穿孔処理し、組み換えクローンを選択する。次に、選択したクローンをC57BL/6胚盤胞に注入し、得られたキメラ雄子孫をFLPデリーターマウスと交配させてネオマイシンカセットを除去する。子孫における標的化対立遺伝子の伝達は、ゲノムDNAからのPCRにより決定する。第二及び第三のエクソンは、VISTA (PD-L3) 又はVISTAドメインを含有し、従って得られるマウスはVISTA (PD-L3) 又はVISTA分子の不活性化型のみを有する。

【0635】

〔0668〕 VISTA (PD-L3) 又はVISTA欠損マウスの全体的な免疫能は、抗原に対するT細胞反応、液性免疫反応、顕性の自己免疫性 (例えば全身性紅斑性狼瘡、炎症性腸疾患) 及び誘導性自己免疫疾患 (実験的自己免疫脳脊髄炎) に対する易罹患性向上の評価を含め、他のPD-L-/-マウスのように決定する (Chen (2004) 上出)。

【0636】

〔0669〕 実質的に上述のように作製したVISTA-/-マウスを得て、それらの表現型及び免疫機能を評価した。表現型の面で、これらのマウスを観察したところ、肺、肝臓及び脾臓でリンパ球性浸潤が増加していた。その上、これらのマウスは、肺及び脾臓において濾胞過形成があった。また、これらは胃において好中球浸潤があった。一方で、これらの腎臓、副腎、食道、小腸及び結腸は、正常の動物と感知できる違いは示さなかった。

【0637】

〔0670〕 免疫学的に、これらのマウスはEAEに対する易罹患性が高くなり、雌においてIgG自己抗体産生が増大していた (図45及び図46)。また、これらのマウスは、対照動物と比較して、骨髓造血増加を示した (図47)。これらのマウスはまた炎症性表現型も示し、CD4+及びCD8+T細胞数が増加しており、サイトカイン及びエオタキシン、IP-10、MCP-1、M1G、 γ インターフェロン、IL-17F及びTNF α などの他のポリペプチドの発現レベルが上昇又は変化していた (図48)。

【0638】

実施例12

コラーゲン誘発性関節炎動物モデルにおいて試験したVISTA (PD-L3) 又はVISTA特異的な抗体

〔0671〕 雄DBA/Jマウスの尾基部にCFA (ミコバクテリウム・ツベクロシス (mycobacterium tuberculosis) 3.5 mg/mL) 中の100 μ g ニワトリII型コラーゲン (C-II) を含有する100 μ Lの乳液で免疫付与し、免疫付与後第21日にIPで100 μ g C-II水により追加免疫した。各処置群のマウス (n=6) は、指示どおり、処置を行わないか (NT-黒丸)、300 μ g ハムスターIgG (HamIg-黒四角) を注射したか、又は300 μ gのモノクローナル抗体「7c9」 (赤三角) 又は「13F3」 (緑三角) を注射した。注射は2日ごとに行った。指示された日に各マウスの各肢に対して関節腫脹を0から4でスコア化した。示される関節炎スコアは、各処置群におけるマウスの全肢の総スコアをその群のマウス数で除したものである。

【0639】

実施例13

特異的なV I S T Aモノクローナル抗体によるV I S T A遮断はインビトロでT細胞反応を促進する

〔0672〕 V I S T A介在性抑制を中和する、V I S T A特異的なモノクローナル抗体（13F3）を同定した（図18）。13F3の存在下又は非存在下でO T - I IトランスジェニックC D 4⁺T細胞を刺激するためにC D 11b^{hi}骨髄A P Cをナイーブマウスから精製した。その中和効果と一致して、13F3は、C D 11b^{hi}骨髄細胞により刺激されるT細胞増殖を促進し、高レベルのV I S T Aを発現することが分かった。

【0640】

実施例14

抗V I S T Aは抗腫瘍免疫性を促進する

〔0673〕 抗V I S T AのT細胞活性化促進能ゆえに、抗V I S T Aが免疫原性腫瘍に対する防御的な免疫反応を促進するか否かを評価した。発明者らが豊富な経験を有するモデルは、膀胱癌、MB49である。MB49は雄性抗原を発現し、従ってこれは雌マウスでは中程度に免疫原性であるが、免疫介入がない場合、それが成長し、雌マウスは死亡する。α V I S T A療法の有効性を試験するために、雌マウスの皮下（s q）にMB49腫瘍細胞を投与し、α V I S T Aで処置した。その何日か後、マウスを安楽死させるまで腫瘍サイズを測定した。図19は、抗V I S T A療法が腫瘍成長を大幅に減弱させることを示す。これは、抗V I S T Aの、細胞介在性免疫（C M I）反応強化能によるものである。

【0641】

実施例15

4種類のマウス腫瘍モデルでの腫瘍退縮における抗V I S T Aの効果

〔0674〕 免疫原性膀胱癌腫瘍MB49における実験は、モノクローナル抗体13F3を用いたV I S T Aの中和及び宿主での腫瘍成長を防ぐことを示した。このデータは、腫瘍の微小環境においてV I S T Aが、その非常に高いM D S C発現のために、相当な負の免疫制御因子的役割を有することを示す。免疫原性（MB49）及び高度に非免疫原性である（B16）腫瘍モデルの成長における抗マウスV I S T Aの影響を調べる実験から、α V I S T A療法の有効性がさらに確認され、作用機構が明らかとなり、最適用量及びタイミングを選択するための基準が提供される。各腫瘍モデルに対する論理的根拠は下記で詳述する。

【表3】

表3

腫瘍名	腫瘍タイプ	宿主	群	アッセイ
MB49	膀胱癌	B6雌	α VISTA	腫瘍成長
MB49	膀胱癌	B6雄		生存
B16.F10	メラノーマ	B6雄又は雌		
ID8	卵巣癌	B6雌	対照Ig	免疫/自己免疫アッセイ

〔0675〕 雌マウスにおけるMB49：このマウスモデルにおける有効性が明らかになった。このモデルにおけるM D S Cもまた、V I S T A発現レベルが上昇している。このモデルにおいて、H - Y抗原の存在ゆえに、MB49腫瘍は中程度に免疫原性である。発明者らは抗V I S T A療法が有効であることを知っているのので、抗V I S T A療法の用量（1から100μg/マウス）；及びタイミング（腫瘍接種日又は腫瘍後4、7、10日；治療介入）を決定するために、このモデルは「陽性」対照となろう。

【0642】

〔0676〕 雄マウスにおけるMB49：雌マウスで有効な用量及びタイミングを使用し、雄マウスでの抗V I S T A療法（腫瘍の免疫原性がより低い。）の有効性を決定する。

【0643】

〔0677〕 B 1 6 メラノーマ：抗 C T L A - 4 モノクローナル抗体は、このモデルにおいて非常に有効であることが示され、このマウスモデルは、ヒトでの成功を予想するのに有益な非免疫原性腫瘍となる。投与計画及びタイミングは、M B 4 9 モデルで有効であることが示されるものと同様である。

【 0 6 4 4 】

〔0678〕 I D 8 卵巣癌：このモデルにおいて、V I S T A 発現が M D S C において極めて高いことが示されている。腫瘍接種時に又は接種後第 5、15、25 日に I D 8 腫瘍を担持するマウスを α V I S T A で処置する。

【 0 6 4 5 】

〔0679〕 方法：記される全マウス腫瘍モデルの寛解のための抗 V I S T A 処置の最適用量及びタイミングを決定するために、B 6 W T マウスを使用する。使用しようとするモデルを表 3 で列挙する。

【 0 6 4 6 】

〔0680〕 この用量及びタイミングアッセイに対する読み出し情報は腫瘍成長速度である。M B 4 9 及び B 1 6 実験の場合、皮内 (i. d.) 接種を介して全腫瘍実験を行い、従って腫瘍サイズを容易に測定し得る。キャリパーを用いて腫瘍測定を 2 から 3 日ごとに収集する。これらのモデルのそれぞれにおいて、抗 V I S T A 又は対照抗体の腫瘍成長遅延能又は腫瘍退縮促進能について抗 V I S T A 又は対照抗体の影響を試験する。ルシフェラーゼ形質導入 I D 8 及び I V I S ワークステーションを使用した全身イメージングを用いて、I D 8 の成長を追跡する。さらに、宿主生存も決定する。

【 0 6 4 7 】

〔0681〕 腫瘍成長におけるデータは平均腫瘍体積 $\pm$ S E M として表し、両側 A N O V A によって群間の差を分析する。0.05 未満の確率 (p) 値は統計学的に有意とみなされる。群間の生存の差の有意性を確認するために使用されるウィルコクソンの順位検定およびログランク検定とともにカプランマイヤー法を使用して生存データを分析する。B 1 6 モデルにおいて白斑を発現するマウスの頻度を決定する。

【 0 6 4 8 】

〔0682〕 これらの方法を用いて、非免疫原性腫瘍モデルのうちいくつかにおいて、対照 a b で処置したマウスと比較した場合、抗 V I S T A モノクローナル抗体で処置したマウスにおける腫瘍成長遅延及び／又は腫瘍退縮が得られる。抗 V I S T A 処置が免疫原性腫瘍モデルにおいて腫瘍成長を遅延させることは既に示されている。これらの腫瘍モデルのそれぞれはそれら自身の特定の成長速度を有し、腫瘍成長を付与し、免疫性を抑制するための V I S T A への依存が見込まれるので、腫瘍接種時に又はその後の時点でマウスにモノクローナル抗体を投与する。さらに、治療的有用性に対する最適用量を決定するために、少なくとも 3 つの異なる濃度の抗 V I S T A モノクローナル抗体を試験する。

【 0 6 4 9 】

〔0683〕 図 2 0 A から E で示されるように、V I S T A モノクローナル抗体処置は、(A) M B 4 9、(B) M C A 1 0 5、(C) E G 7 腫瘍細胞をマウスの皮下に (s q)、又は I D 8 - ルシフェラーゼ腫瘍細胞を (D) マウスの腹腔内 (i p) に接種し、第 + 1 日に開始して 1 日おきに (300 μ g) V I S T A モノクローナル抗体 1 3 F 3 で処置した 4 種類のこれらの腫瘍モデル全てで腫瘍成長を低下させた。皮下腫瘍成長を監視した。I D 8 - ルシフェラーゼ腫瘍に対して、X e n o g e n I V I S を用いて第 30 日にマウスの画像を得た。(E) 腫瘍担持マウスにおける骨髓白血球上での V I S T A 発現も調べた。V I S T A 発現について流入領域 L N 及び腫瘍組織 (腹水) を分析した。これらの知見は、M D S C 上で発現された V I S T A が、防御的な抗腫瘍免疫性の発現を妨害する主要な抑制性分子であり、 α V I S T A が免疫介入を可能にし、腫瘍の成長を遅延させるこの抑制性活性を軽減することを示す。これらの知見はまた、炎症の程度を制御することにおいて自己免疫疾患において骨髓細胞上での V I S T A が中枢的機能を果たすという結論も裏付ける。

【 0 6 5 0 】

実施例 16

自己免疫性の処置に有用なオリゴマー性 V I S T A 及び V I S T A 融合タンパク質の合成

〔0684〕 インビトロでの可溶性 V I S T A-I g は抑制性ではなく、細胞へのその結合も容易に検出し得ない。一方、プラスチックに結合させられたこの分子は、顕著に抑制性である。さらに、インビボで V I S T A-I g を用いた実験は顕在的な活性を示さなかった。これらの実験に対して、作製された V I S T A-I g は、C H 2-C H 3 ドメインにおいて F c R 結合を除外する突然変異を有し、従ってインビボでは細胞親和性ではない。最近の研究は、四量体 P D-L 1 が単量体の P D-L 1 よりも P D-1 に対して 100 倍高く結合し ($K_d = 6 \times 10^{-8} M$) 26、細胞への結合が容易に検出可能であったことを示している。四量体 P D-L 1 はインビボで試験しなかったが、インビトロでネイティブ P D-L 1 による機能抑制を遮断することが示された。同様の方法を用いて、インビトロ及びインビボで、V I S T A 経路を標的とし、強力な免疫抑制活性を引き出すオリゴマーを作製する。

10

【0651】

〔0685〕 細胞外ドメイン又はその一部分がオリゴマーに対する構成単位として使用される、単量体の V I S T A の細胞外ドメイン又はその断片、例えば少なくとも 50、75、100、125、150、175 又は 200 アミノ酸長を用いて、このようなオリゴマーを構築する。これらの方法において、発明者らは確立した M H C 四量体技術を利用する。これらの方法において、2 価から 7 価にわたる価数を有する一連の V I S T A 複合体を作製するために、(本明細書中で同定される) 様々なオリゴマー化ドメインの N-末端に V I S T A 細胞外ドメインコンストラクト又は断片を連結させる。

20

【0652】

〔0686〕 それによって、二量体、三量体、四量体、五量体及び七量体集合体の安定的な形成を支配する高親和性コイルドコイルドメインに基づいて、一連の非共有オリゴマーを作製する。宿主細胞 (例えば E. コリ (E. coli)) においてこれらのオリゴマー性コンストラクトが発現される。E. コリ (E. coli) で発現が実施される場合、発現されるオリゴマーが次に再折り畳みされ、標準的な実験プロトコルを用いて封入体から精製される。このアプローチは、通常的に、M H C-ペプチド複合体及び三量体 G I T R L を含む、生物学的及び構造分析に対して高品質の物質を作製している 66。次に、S D S-P A G E、分析的ゲルろ過、分析的超遠心分離法及び質量分析によって、単離オリゴマータンパク質を評価する。これらの品質管理基準は、インビトロ及びインビボ実験に対して、均一でよく特徴付けられた物質の利用を確実にする。これらのコンストラクトの並行構成の結果、それぞれの個々の V I S T A 複合体が細胞表面結合 V I S T A 受容体と増殖性に相互作用するように配置されるので、結合価がオリゴマー性の状態と同等である分子が得られる。上述のコンストラクトは、オリゴマー性状態の高度の安定性及び均一性を保持する (非共有コイルドコイルオリゴマー化ドメインは、一般に、95℃の溶融温度を示す七量体配列を除き、100℃を超える溶融温度を示す。)。

30

【0653】

〔0687〕 さらに二量体の V I S T A-I g を細胞親和性又は非細胞親和性の何れかである四量体にする。I g G 1-F c (野生型 I g G 1 及び既存の非 F c R-結合 I g G 1 の両方) を有するインフレイムの V I S T A の F c 融合コンストラクトを酵素的ビオチン化のために N 末端 B i r A 部位で修飾し、p I R E S 2-E G F P ベクターにクローニングする。酵素的ビオチン化は、アビジン多量体化における特異的な、単一残基修飾及び配向を可能とする。B 7-1、P D-L 1、P D-L 2 及び T I M-3 を含め、多くの I g-融合タンパク質の作製のためにこのアプローチが使用されてきた。次に、発現されたタンパク質をインビトロで酵素的にビオチン化し、サイズ排除 H P L C により精製し、P E-アビジンを用いて四量体化する。細胞親和性又は非細胞親和性であり得る得られた四量体の活性をインビボで評価する。

40

【0654】

〔0688〕 これらの改変多量体 V I S T A タンパク質は、V I S T A 経路及び免疫抑制

50

への介入が治療的に正当である自己免疫性及び他の状態を処置することにおいて有用である。

【0655】

実施例 17

免疫抑制を誘導するための V I S T A アデノウイルスベクター

〔0689〕 組み換えアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いた遺伝子の移入により、遺伝子治療における大きな技術的発展があった。具体的に、PD-L1 遺伝子又はCTLA4-Ig及びCD40-IgのAAV介在性遺伝子送達によって、狼瘡ENREF_69及び心臓移植の自己免疫疾患モデルにおいて治療の有効性が得られた。全長VISTA又はオリゴマー性VISTA細胞外ドメインの何れかを送達するために、これらの方法が使用され、EAEモデルにおいてそれらの治療効果を評価する。製造者の説明書に従い、アデノーXTM発現系（Clontech）を用いて、全長マウスVISTA又はオリゴマー性VISTA細胞外ドメインの何れかを発現する組み換えアデノウイルスベクターを作製する。簡潔に述べると、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターの調節下のE1及びE3-欠失、pAdDESTに基づく発現ベクターにVISTAをクローニングする。次に、VISTA及び対照lacZ発現アデノウイルスを細胞溶解液から精製する。VISTAの全身性過剰発現に対して、免疫付与を介した疾患誘導前又はその直後、又は疾患発症後の何れかに、アデノウイルスをマウス尾静脈に静脈内注射（ 1×10^9 プラーク形成単位 [Pfu]）によって投与する。対照マウスには100 μ L PBSを投与する。異なる疾患進行パターンを示し、ヒトMS患者の臨床症状の2種類の異なる型に相当するSJLマウス及びC57BL/6マウスの両方において疾患発現及び変化を監視する。

【0656】

実施例 18

改変タンパク質及びアデノウイルスベクターを用いた機能研究

〔0690〕 マウスにまた、改変VISTA及び／又はアデノウイルスベクターも投与する（5から100 μ gのタンパク質／マウスx週に3回）。投与後、T細胞拡大、分化ならびにEAE発現を決定する。

【0657】

実施例 19

VISTAにおける構造研究及びVISTA機能の分子決定基の決定

〔0691〕 組織化されたシグナル伝達複合体の親和性、特異性、オリゴマー性状態及び形成及び局在化は、免疫機能に対する重要な寄与因子である。受容体-リガンド細胞外ドメインの組織化が非共有結合細胞質シグナル伝達及び足場分子の、動員、組織化及び機能を直接調節するので、これらの特性全てが、シグナル伝達及び免疫制御に影響を与える。細菌、昆虫及び哺乳動物発現系ならびにハイスループット結晶化及び構造決定アプローチを含む技術を用いてVISTAの高分解能結晶構造を決定する。結晶学的に観察されるジスルフィド結合パターンを検証するために、TIM-3及びヒトDCR359の試験を首尾よく裏付けたアプローチを用いる高分解能質量分析を使用する。これらの構造の結果に基づき、改変オリゴマー特性を有する一連の突然変異体ならびにVISTA-IgVドメインの何らかの不安定領域の近くの突然変異体を設計する。これらの突然変異体タンパク質は、VISTA機能に対してさらなる直接的な機構的洞察を提供し、本明細書中で同定される、自己免疫、アレルギー性及び炎症性疾患などの免疫抑制が所望される治療において有用となるはずである。これらの突然変異体、特にオリゴマーをインビトロ系で試験し、疾患進行、疾患寛解における、又は自己免疫又は炎症性状態を発現しないように動物において予防することにおける、免疫抑制効果を評価するために動物自己免疫及び炎症性疾患モデルで評価する。

【0658】

〔0692〕 これらのオリゴマーVISTAタンパク質は、自己免疫性における免疫介入の標的としてVISTA経路及び機能を活性化する。この介入は、免疫性を抑制し、自己

免疫疾患及び自己免疫抑制が所望される他の状態において治療的有用性を発揮する。これは、EAE及びコラーゲン誘発性関節炎動物モデルなどの様々な自己免疫及び炎症性モデルにおいてオリゴマー化VISTAタンパク質を投与することによって遂行される。さらに、上記で論じられるように、全長VISTA又はVISTAオリゴマーを過剰発現するアデノウイルスベクターを構築し、インビボで試験する。これらの研究から、VISTAオリゴマーの免疫抑制効果が確認される。

【0659】

実施例20

条件的過剰発現VISTAトランスジェニックマウス系統（VISTAトランスジェニックマウス系統：R26STOPFL VISTA（VISTA）を用いた実験

[0693] loxP-隣接STOPカセットが先行するVISTAの全長cDNAを含む標的化コンストラクトは、ユビキタスに発現されるROSA26遺伝子座に標的化されている。複数の正しく標的化されたR26stopFL/VISTA仔が誕生し、CMV-Creデリター系統と交配させて繁殖させた60。VISTA x CMV-Creにおける予備的データから、GFP及びVISTA発現向上が確認される。これらのマウスの免疫状況（抗原に対するT細胞反応、抗体力価）における研究から、抑制性の表現型が確認される。VISTA系統をCD4-Cre、CD11c-Cre及びLys-Creと交配させ、VISTA発現の系統位置が抑制に影響するか否かを決定する。T細胞の表現型及び機能も決定し、VISTAの過剰発現の結果、Tregが生成するか否かも決定する。これらの実験において、OVA-免疫Cre x VISTA系統からのTregをWT宿主に養子的に移入して、過剰発現VISTAの存在下での抗原免疫付与が抗原特異的なTregを誘導するか否かを見る。これにより、VISTAがTreg分化に影響を与えることが検証されるはずである。

【0660】

[0694] さらに、EAEモデルにおいて研究を実施し、これにより疾患発現に関する異なる系列（CD4-Cre、CD11c-Cre、Lys-Creと交配させることによる。）のVISTAタンパク質の影響を評価する。VISTA突然変異体の系列限定的過剰発現により又はCMV x VISTA突然変異体において、疾患が抑制され得ることを想定して、疾患発現の時間的調節もCre-ERT2 x VISTA η を使用している。タモキシフェン投与を通じて、発明者らは、免疫性の誘導及び/又はエフェクター相においてVISTAが影響を与え得るか否かを判断するために、疾患開始前、疾患開始時又はピーク疾患時にVISTAの過剰発現を誘導し得る。BMキメラマウスを用いて、時間的に限定されたVISTA過剰発現を造血区画に限定し得る。時間枠の調節の判断のために、VISTAを過剰発現させ、VISTAを遺伝子の面でスイッチオンにし、次いで抗VISTAモノクローナル抗体の投与によって血清学的にスイッチオフにする。これらの研究から、VISTAがどこでいつ、自己免疫疾患の発現及び進行を調節するように作用しなければならないかが決定される。

【0661】

実施例21

抗VISTA抗体CD40/TLRアゴニストワクチンの効果

[0695] 図21で示されるように、ワクチン有効性に対する抗VISTA抗体の効果をアッセイする実験を行った。これらの結果は、抗VISTAがCD40/TLRワクチンの治療的有効性を促進することを示す。C57BL/6マウスに対して1X10⁵ 転移性B16、F10メラノーマ細胞s.q.を負荷した。4日後に、抗VISTA（200 μ g x 3/週）とともに、又はこれなしで、100 μ gの腫瘍関連抗原 Δ V、100 μ gの α CD40 FGK45（CD40アゴニスト性の抗体）及び100 μ gのS-27609（TLR7アゴニスト）でマウスにワクチン接種した。キャリパー測定により腫瘍の成長を監視した。

【0662】

実施例22

10

20

30

40

50

発現プロファイリング

〔0696〕 T r e g 細胞の確立されている発現プロファイルとの比較を容易にするために、標準的な成長及び活性化条件を使用した (M c H u g h, e t a l. (2002) 上出)。簡潔に述べると、抗 G I T R (D T A-1) とともに又はこれなしで抗 C D 3 で予め被覆した 24 ウェルプレート中の 10% ウシ胎仔血清及び 100 単位 I L-2 が補給されている完全 R P M I 培地に新鮮単離 T r e g 細胞 (~96% 陽性) を 106/mL で接種した (S h i m i z u, e t a l. (2002) 上出)。細胞を 37℃ で 0 及び 12 時間培養し、R N A を精製し、続いて A F F Y M E T R I X (登録商標) マウスゲノム A 430 オリゴヌクレオチドアレイを用いて分析した。

【0663】

〔0697〕 休止又は活性化 C D 4 + C D 25 + T 細胞群からのデータを比較することによって、遺伝子発現パターンが、当技術分野で確立されたものと同様であることが分かった (G a v i n, e t a l. (2002) 上出; M c H u g h, e t a l. (2002) 上出)。G I T R シグナル伝達により制御される遺伝子を同定するために、抗 G I T R 処理あり又はなしで、様々な細胞集団間で遺伝子発現プロファイルを比較した。以前特徴が分かっていたいなかった V I S T A 及び T r e g - s T N F を含め、既知ならびに未知の遺伝子のリストを編集した。

【0664】

実施例 23

V I S T A の分子クローニング、レトロウイルス産生及び細胞のレトロウイルス形質導入

〔0698〕 精製マウス C D 4 + T 細胞から全長 V I S T A をクローニングした。Q i a g e n R N A m i n i キットを用いてトータル R N A を C D 4 + T 細胞から単離した。B i o - R a d i S c r i p t T M c D N A 合成キットを用いて c D N A を作製した。全長 V I S T A を増幅し、I R E S - G F P 断片が R F P により置き換えられたレトロウイルスベクター p M S C V - I R E S - G F P の E C o r I - X h o I 部位にクローニングし (Z h a n g 及び R e n (1998) B l o o d 92:3829-3840)、従ってその結果、R F P の N-末端に V I S T A が融合された融合タンパク質が得られた。エコトロフィックパッケージングベクター p C L - E c o (I M G E N E X C o r p.) を一緒に用いて、V I S T A - R F P レトロウイルスベクターの一過性遺伝子移入により、H E K 293 T 細胞においてヘルパー不含レトロウイルスを作製した。8 µg/mL ポリブレン (S i g m a) 存在下で、R T で 45 分間、2000 rpm でのスピニンフェクションによって、マウス T 細胞株 E L 4 細胞又は骨髓由来 D C のレトロウイルス形質導入を行った。

【0665】

実施例 24

V I S T A - I g 融合タンパク質の作製

〔0699〕 V I S T A の細胞外ドメイン (アミノ酸 32-190) を増幅し、親ベクター C D M 7 B の S p e I - B a m H I 部位にクローニングした。H o l l e n b a u g h, e t a l. (1995) J I m m u n o l M e t h o d s 188:1-7。このベクターは、F c 受容体への結合を大きく低下させている、ヒト I g G 1 の定常及びヒンジ領域の突然変異体型を含有する。得られたベクター C D M 7 B - V I S T A を D H F R 発現ベクター p S V - d h f r (M c I v o r 及び S i m o n s e n (1990) N u c l e i c A c i d s R e s 18:7025-7032) とともに C H O (d h f r-) 細胞株 (A T C C # C R L - 9096) に同時遺伝子移入した。ヌクレオチドなしの培地 M E M - α (I N V I T R O G E N (登録商標)) 中で V I S T A - I g を発現する安定的な C H O 細胞クローンを選択した。0.5 から 1 µM のメトトレキサート (S I G M A (登録商標) M 9929) を用いたさらなる増幅により、高レベルの可溶性 V I S T A - I g 融合タンパク質を発現するクローンが得られた。標準的なプロテイン-G カラム アフィニティークロマトグラフィーを用いて、融合タンパク質を培養上清からさらに精製した。

10

20

30

40

50

【0666】

実施例 25VISTAモノクローナル抗体の作製

〔0700〕 アルメニアンハムスターにVISTA-RFPを過剰発現するEL4細胞で毎週4回免疫付与し、次いでCFA中で乳化させたVISTA-Ig融合タンパク質を用いて追加免疫を行った。追加免疫から4週間後、ハムスターに可溶性VISTA-Ig融合タンパク質を用いて再び追加免疫を行った。最後の追加免疫から4日後、ハムスター脾臓細胞を回収し、標準的なハイブリドーマ融合技術を用いて骨髓腫細胞株SP2/O-Ag14(ATCC#CRL-1581)に融合させた。Shulman, et al. (1978) Nature 276:269-270。限界希釈後にVISTA 特異的な抗体を分泌するハイブリドーマクローンを選択し、ELISA及びフローサイトメトリー法の両方によりスクリーニングした。

10

【0667】

実施例 26VISTAの阻害活性

〔0701〕 CD4+及びCD8+T細胞抗原受容体トランスジェニックT細胞及び抗原刺激とともにインビトロでPD-L1を過剰発現する抗原提示細胞を使用することによって、PD-L1の阻害活性が明らかになった(Carter, et al. (2002) Eur. J. Immunol. 32:634-43)。同様に、クラスII主要組織適合遺伝子複合体(MHC)及びクラスI MHCを発現する細胞株に、全長VISTAを発現する本明細書中で開示されるレンチベクターを形質導入する。空のベクター形質導入又はVISTA形質導入抗原提示細胞により提示される抗原に対するTEa Tg又は2CトランスジェニックT細胞の反応を確立された方法に従い決定する。

20

【0668】

実施例 27モノクローナル抗体産生

〔0702〕 マウスB細胞株A20においてVISTAを過剰発現させ、アルメニアンハムスターに免疫付与するために組み換え細胞株を使用した。5回の細胞免疫付与後、CFA中で乳化させた精製VISTA-Ig融合タンパク質を用いてハムスターに対して追加免疫を行った。4週間後、可溶性VISTA-Igで最終追加免疫を与えた。続いて、第4日にハムスター脾臓細胞とSP2/O細胞との融合を行った。ELISAによってVISTA-Ig融合タンパク質を認識し、VISTAを染色したが、マウスT細胞株EL4上で過剰発現されたPD-L1が染色されなかった16個の異なるクローンを同定した。クローンのうち11種類のサブクローニングに成功し、それらの細胞及び組織上での内在性VISTA染色能及びVISTA機能遮断能の評価のために調製した。

30

【0669】

実施例 28VISTA-Ig複合物はT細胞反応を負に制御する。材料及び方法

〔0703〕 マウス。Jackson Laboratoryから、C57BL/6マウス、OT-I CD4トランスジェニックマウス及びSJL/Jマウスを購入した。FoxP3-GFPレポーターマウスは以前記載のとおりであり(Fontenot, et al. 2005)、A. Rudensky (University of Washington School of Medicine, Seattle, WA) により提供された。PD-1 KOマウスはT. Honjo (Kyoto University, Kyoto, Japan; Nishimura, et al. 1999, 2001) により提供された。Dartmouth Medical Schoolの病原体フリーの施設で全動物を維持した。全ての動物プロトコールは、Institutional Animal Care and Use Committee of Dartmouth Collegeにより承認された。

40

50

【0670】

[0704] 抗体、細胞株及び試薬。抗体 α -CD3 (2C11)、 α -CD28 (PV-1)、 α -CD4 (GK1.5)、 α -CD8 (53-6.7)、 α -CD11b (M1/70)、 α -F4/80 (BM8)、 α -CD11c (N418)、 α -NK1.1 (PK136)、 α -Gr1 (RB6-8C5)、 α -PD-L1 (MIN5)、 α -PD-L2 (TY25)、 α -B7-H3 (M3.2D7) 及び α -B7-H4 (188) は eBioscience から購入した。LPS (Sigma-Aldrich)、組み換えマウス IFN- γ (PeproTech)、ヒト IL-2 (PeproTech) 及び可溶性 PD-L1-Ig 融合タンパク質 (R&D Systems) は指示される濃度で使用した。CFA 及びニワトリ OVA は Sigma-Aldrich から購入した。B細胞リンパ腫細胞株 A20 (BALB/c 起源) は American Type Culture Collection から入手した。

10

【0671】

[0705] VISTA の分子クローニング、レトロウイルス産生及び細胞のレトロウイルス形質導入。

全長 VISTA を精製マウス CD4⁺T 細胞からクローニングした。RNAm mini キット (Qiagen) を用いてトータル RNA を CD4⁺T 細胞から単離した。iScript TM cDNA 合成キット (Bio-Rad Laboratories) を用いて cDNA を作製した。全長 VISTA を増幅し、IRES-GFP 断片が RFP により置き換えられているレトロウイルスベクター pMSCV-IRES-GFP の ECOR I-Xho I 部位にクローニングし (Zhang 及び Ren, 1998)、従ってその結果、RFP の N-末端に VISTA が融合された融合タンパク質が得られた。エコトロフィックパッケージングベクター pCL-Eco (IMGENEX Corp.) を一緒に用いて、VISTA-RFP レトロウイルスベクターの一過性遺伝子移入により、HEK293T 細胞においてヘルパー不含レトロウイルスを作製した。8 μ g/mL ポリブレン (Sigma-Aldrich) 存在下での、室温で 45 分間、2000 rpm でのスピニンフュクションによって、マウス T 細胞株 EL4 細胞又は BMDC のレトロウイルス形質導入を行った。

20

【0672】

[0706] VISTA のバイオインフォマティクス分析。BLAST アルゴリズムによって VISTA Ig-V 配列に進化的に関連付けられるタンパク質を同定した (Altshul, et al. 1990)。mGenTHREADER アルゴリズム (Lobley, et al. 2009) を用いてタンパク質データベース (Berman, et al. 2000) からの最も適切な構造鋳型を同定した。最高スコアを記録したものの 1 つである PD-L1 (タンパク質データベース受託番号 3BIS) を比較タンパク質構造モデリングに対する鋳型として選択した。2つのアラインメント方法、MUSCLE 及び HHalign (Rai 及び Fiser, 2006; Rai, et al. 2006) の最適な組み合わせを用いて、MMM サーバーにより VISTA の構造モデルを構築した。36 種類の VISTA オルソログタンパク質を ENSEMBL データベース (Flicek, et al. 2008) から収集した。それぞれ DALI (Holm 及び Park, 2000) 及び Clustalw (Larkin, et al. 2007) により、構造及び配列アラインメントを計算し、ESPrIPT 2.2 サーバー (Gouet, et al. 1999) を用いて提示した。以前に記載のように (Atkinson, et al. 2009) BLAST ペアワイズ比較ネットワークを構築し、Cytoscape (Shannon, et al. 2003) を用いて分析した。

30

40

【0673】

[0707] VISTA-Ig 融合タンパク質の産生。VISTA の細胞外ドメイン (aa 32-190) を増幅させ、親ベクター CDM7B の SpeI-BamHI 部位にクローニングした (Hollenbaugh, et al. 1995)。このベクターは、Fc 受容体への結合を大きく低下させている、ヒト IgG1 の定常及びヒンジ領域の突然変

50

異体型を含有する。得られたベクターCDM7B-VISTAをジヒドロ葉酸レダクターゼ発現ベクターpSV-dhfr (Mc Iv or及びSimonsen, 1990)とともにチャイニーズハムスター卵巣(dhfr⁻)細胞株(#CRL-9096; American Type Culture Collection)に同時遺伝子移入した。ヌクレオチドなしの培地MEM- α (Invitrogen)中でVISTA-Igを発現する安定的なチャイニーズハムスター卵巣細胞クローンを選択した。0.5から1 μ Mのメトトレキサート(M9929; Sigma-Aldrich)を用いたさらなる増幅により、高レベルの可溶性VISTA-Ig融合タンパク質を発現するクローンが得られた。標準的なプロテイン-Gカラムアフィニティークロマトグラフィーを用いて、融合タンパク質を培養上清からさらに精製した。

10

【0674】

[0708] VISTAモノクローナル抗体(mAb)の作製。アルメニアンハムスターにVISTA-RFPを過剰発現するEL4細胞で免疫付与し、次いでCFA中で乳化させたVISTA-Ig融合タンパク質を用いて追加免疫を行った。追加免疫から4週間後、ハムスターに可溶性VISTA-Ig融合タンパク質を用いて再び追加免疫を行った。最後の追加免疫から4日後、ハムスター脾臓細胞を回収し、標準的なハイブリドーマ融合技術(Shulman, et al. 1978)を用いて骨髓腫細胞株SP2/O-Ag14(#CRL-1581; American Type Culture Collection)に融合させた。限界希釈後にVISTA特異的な抗体を分泌するハイブリドーマクローンを選択し、ELISA及びフローサイトメトリー法の両方によりスクリーニングした。

20

【0675】

[0709] RNA及びRT-PCR。業者の説明書に従い、TRIzol(登録商標)(Invitrogen)を用いて様々なマウス組織試料又は精製造血細胞型からのトータルRNAを回収した。iScript cDNA合成キット(Bio-Rad Laboratories)を用いることによってcDNAを調製した。全長VISTAを増幅するためにRT-PCR反応に対して等量の組織cDNA(10 ng)を使用した。1%アガロースゲルに流した後、PCR産物を観察した。

【0676】

[0710] フローサイトメトリー及び分析。CellQuestソフトウェア(BD)を用いてFACSscan上でフローサイトメトリー分析を行った。FlowJoソフトウェア(Tree Star, Inc.)を用いてデータ分析を行った。細胞増殖を定量するために、CFSE分裂のヒストグラムプロファイルを分析し、Prism 4(GraphPad Software, Inc.)を用いて増殖性CFSE^{low}細胞の%をグラフ化した。

30

【0677】

[0711] 細胞調製。トータルCD4⁺T細胞単離キット(Miltenyi Biotec)を用いて、トータルCD4⁺T細胞をナイーブマウスから単離した。指示がある場合、富化CD4⁺T細胞をナイーブ(CD44^{low}CD25⁻CD62L^{hi})及びメモリー(CD44^{hi}CD25⁻CD62L^{low})集団にフロー選別した。インビトロ増殖アッセイの場合、37℃にて5 μ M CFSE(Invitrogen)で10分間、CD4⁺T細胞を標識し、刺激する前に2回洗浄した。

40

【0678】

[0712] A20アッセイの場合、A20-RFP又はA20-PD-XL細胞(20,000)を100 μ g/mLマイトマイシンC(1h)で予め処理し、次いでOVAペプチドの存在下でCFSE-標識DO11.10 CD4⁺T細胞(100,000)とともに温置した。対照-Ig又は13F3モノクローナル抗体を指示どおり添加した。CFSE希釈により72時間で細胞増殖を分析した。CD11b^{hi}骨髓APC選別の場合、CD11b磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いてナイーブ脾臓細胞からCD11b⁺単球を濃縮した。トータルCD11b^{hi}骨髓APC又はCD11b^{hi}CD

50

11c⁻単球及びCD11b^{hi}CD11c⁺骨髄DCを選別し、照射し(2,500rad)、OVAペプチドの存在下でOT-IITランスジェニックCD4⁺T細胞を刺激するために使用した。指示どおり、対照-Ig又は13F3モノクローナル抗体を添加した。72時間のアッセイのうち最後の8時間中に、トリチウム取り込みにより細胞増殖を測定した。

【0679】

[0713] インビトロでのプレート結合T細胞活性化アッセイ。指示された濃度比の抗CD3(クローン2C11)及びVISTA-Ig又は対照-Igの何れかの存在下で96ウェル平底プレートに中で精製CD4⁺T細胞(ウェルあたり100,000細胞)を培養した。例えば全範囲滴定の場合、96ウェルプレートを4℃にてPBS中で一晩、1.25μg/mL(比率2:1)、2.5μg/mL(比率1:1)、5μg/mL(比率1:2)又は10μg/mL(比率1:4)VISTA-Ig又は対照-Igタンパク質と一緒に混合した2.5μg/mLのα-CD3で被覆した。CD4⁺T細胞添加前に、ウェルを3回、PBSで洗浄した。10%FBS、10mM Hepes、50μM β-ME及びペニシリン/ストレプトマイシン/Ｌ-グルタミンを補給した完全RPMI 1640培地中で複製培養を行った。指示される場合、VISTA-Igの阻害効果をレスキューするために、α-CD3と一緒に100U/mLヒトIL-2(PeproTech)又は適量のα-CD28(クローンPV-1;Bio X Cell)の何れかで被覆した。CFSEプロファイルについて第3日に、又は指示されるとおりの時間コースに従い、培養物を分析した。

【0680】

[0714] BMDCの培養、レトロウイルス形質導入及びトランスジェニックCD4⁺T細胞の刺激。以前に記載のとおり(Lutz, et al. 1999; Son, et al. 2002)、幾分かの変更を行い、BMDCを作製した。簡潔に述べると、第0日に、27-ゲージ針でフラッシュすることによりBM細胞を脛骨及び大腿骨から単離した。赤血球細胞溶解後、20ng/mL GM-CSF(PeproTech)を含有する1mL完全RPMI 1640培地中で1から2x10⁶個のBM細胞を再懸濁した。8μg/mLポリブレン(Sigma-Aldrich)の存在下で細胞にRFP又はVISTA-RFPレトロウイルスを感染させた。プレートを室温にて2,000rpmで45分間回転させることによって感染を行った。次に、新鮮培地を添加する前にさらに2時間、細胞を培養した。第1、3及び5日に同様の感染手順を繰り返した。第10日に緩く付着した細胞(90%がCD11c⁺)を回収し、CD11c⁺RFP⁺二重陽性細胞を選別し、OT-IITランスジェニックCD4⁺T細胞を刺激するために使用した。OT-IIT細胞増殖アッセイの場合、適量の合成OVA₃₂₃₋₃₃₉ペプチド(AnaSpec)と一緒に、30,000個の選別RFP⁺又はVISTA-RFP⁺BMDCとともに100,000個のCFSE-標識化OT-IIT CD4⁺T細胞を96ウェル丸底プレート中で培養した。CFSEプロファイルを調べることによって72時間でOT-IIT細胞の増殖を分析した。

【0681】

[0715] 腫瘍実験。VISTA-RFP又はRFP対照を用いて親MCA105腫瘍細胞に対してレトロウイルスで形質導入を行い、RFP発現に基づき均一性について選別した。腫瘍ワクチン接種の場合、1,000,000個の照射済みMCA105(10,000rad)細胞を用いてナイーブC57BL/6マウスの左側腹部の皮下に接種して免疫付与した。第14日に、ワクチン接種マウスに対して、右側腹部の皮下に接種して生MCA105腫瘍細胞を負荷した。2日ごとに腫瘍成長を監視した。腫瘍サイズが150mm²に到達した際にマウスを安楽死させた。T細胞枯渇の場合、生腫瘍細胞負荷の2日前に、(250μg)CD4⁺T細胞(クローンGK1.5)及びCD8⁺T細胞(クローン53.6.72)に特異的なモノクローナル抗体でワクチン接種マウスの腹腔内に前処置し、実験終了まで3から4日ごとに処置を繰り返した。腫瘍サイズが160mm²に到達した際にマウスを安楽死させた。

【0682】

[0716] EAEの受動的誘導及び中枢神経系浸潤性のCD4⁺T細胞の特徴評価。受動伝達EAEの場合、400 µgのミコバクテリウム・ツベクロシス (*Mycobacterium tuberculosis*) H37Ra及び100 µgのPLPペプチドを含有する200 µLの乳液を用いて雌SJLマウス(6週齢)の皮下に免疫付与した。インビトロ刺激のために第10日に流入領域LN細胞を回収した。赤血球細胞を溶解させた。10% FBS、50 µM 2-ME、1 mMグルタミン、1% ペニシリン/ストレプトアビジン、1 mM非必須アミノ酸、20 ng/mL IL-23、10 ng/mL IL-6、10 ng/mL IL-1β、20 µg/mL抗IFN-γ及び20 µg/mL PLPペプチド入りの完全IMDM培地中で単一の細胞懸濁液(10,000,000個/マイクロタイター)を培養した。第4日に、細胞を回収し、CD4磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いて生CD4 T細胞を精製した。EAEを誘発するために、1,500,000から2,000,000個の精製生CD4 T細胞をナイーブSJLマウスに養子的に移入した。非特異的ハムスター対照-Ig又は400 µg VISTA特異的なモノクローナル抗体の何れかで3日ごとにマウスを処置した。次のように疾患をスコア化した: 0、疾患なし; 1、後肢脱力又は尾部緊張喪失; 2、尾部弛緩及び後肢不全麻痺; 2.5、一方の後肢の麻痺; 3、両後肢麻痺; 4、前肢脱力; 5、瀕死状態。スコア4でマウスを安楽死させた。

10

【0683】

VISTAのクローニング並びに配列及び構造分析

20

[0717] 活性化対休止状態のマウスCD25⁺CD4⁺天然T_{reg}細胞(nT_{reg}細胞)のAffymetrix(登録商標)分析から、機能が未知であるが、Igスーパーファミリーと配列相同性がある遺伝子産物(RIKEN cDNA 4632428N05又は4632428N05Rik)の発現が明らかになった。予想サイズ及び配列と一致する930 bp遺伝子産物をマウスCD4⁺T細胞cDNAライブラリからクローニングした。シリコ配列及び構造分析から、成熟時に309 aaのI型膜貫通タンパク質が予想される。その細胞外ドメインは、136 aaの1個の細胞外Ig-Vドメインを含有し、これは、23 aaストーク領域、21残基膜貫通セグメント及び97 aa細胞質ドメインと連結される(図23A)。4632428N05Rikの細胞質テールは、シグナル伝達ドメインを含有しない。本明細書中で示されるIg-Vドメインの構造特性及びその免疫抑制的な機能に基づき、この分子をVISTAと名付けた。

30

【0684】

[0718] VISTA Ig-VドメインでのBLAST(Altschul, et al. 1990)配列検索から、10⁻⁴の境界性の有意なe値スコア及び24%の配列同一性で、B7ファミリーのPD-L1が最も近縁の進化的に関連したタンパク質として同定された。

【0685】

[0719] B7ファミリーメンバーPD-L1、PD-L2、B7-H3及びB7-H4とのVISTAの構造に基づく配列アラインメントは、全てのIg-Vドメインタンパク質において体系的に保存的であることが知られ、Ig-Vフォールドの安定性に重要であると考えられるいくつかのアミノ酸を強調する(図23C)。例としては、Igスーパーファミリータンパク質の顕著な特性である、2つのβシート間のジスルフィド結合を形成するB及びFβ鎖の2個のシステインが挙げられる(図23C)。この多配列アラインメントはまた、VISTAに特有のさらなる配列特性も明らかにする。

40

【0686】

[0720] RT-PCR分析及びフローサイトメトリーによるVISTAの発現実験。マウス組織におけるVISTAのメッセンジャーRNA発現パターンを決定するために、RT-PCR分析を使用した(図3A)。VISTAは、造血組織(脾臓、胸腺及びBM)又は豊富な白血球浸潤がある組織(即ち肺)で殆ど発現される。非造血組織(即ち心臓、腎臓、脳及び卵巣)でも弱い発現が検出された。いくつかの造血細胞型の分析から、腹

50

膜マクロファージ、脾臓CD11b⁺単球、CD11c⁺DC、CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞上でのVISTAの発現が明らかになったが、B細胞上では発現レベルが低かった(図3B)。この発現パターンはまた、GNF(Genomics Institute of the Novartis Research Foundation)遺伝子アレイデータベース(symbol 4632428N05Rik; Su, et al. 2002)ならびにNational Center for Biotechnology Information GEO(Gene Expression Omnibus)データベース(受託番号GDS868)とも大きく一致する。

【0687】

[0721] タンパク質発現を研究するために、VISTA特異的なハムスターモノクローナル抗体を作製した。VISTA-過剰発現マウスEL4 T細胞で陽性染色であるが、PD-L1-過剰発現EL4細胞では染色が陰性になることによって特異性が明らかになる。

【0688】

[0722] α-VISTAモノクローナル抗体クローン8D8を用いて、フローサイトメトリーにより造血細胞上でVISTA発現を分析した。CD4⁺nT_{reg}細胞を区別するために、Foxp3 GFPノックインレポーターマウスを使用した(Fontenot, et al. 2005)。末梢リンパ系器官(脾臓及びLN)において、全てのCD4⁺T細胞サブセットで顕著な発現が見られ(総CD4⁺T細胞又はFoxp3⁺ナイーブT細胞及びFoxp3⁺nT_{reg}細胞及びメモリーCD4⁺T細胞を参照)、一方でCD8⁺T細胞が発現する表面VISTA量は非常に低かった(図3C)。胸腺において、VISTA発現は、CD4⁺CD8⁺二重陽性胸腺細胞上で陰性であり、CD4単陽性細胞では低く、CD8単陽性細胞で検出可能であった。次に、F4/80マクロファージ及び骨髄CD11c⁺DCの両方を含む、脾臓及び腹膜細胞の両方に対して、高VISTA発現とCD11b⁺マーカーとの強い相関が見られた(図3D及び3E)。一方で、B細胞及びNK細胞は、殆どVISTA発現に対して陰性であった。Gr-1⁺顆粒球のうちごく一部もVISTAを発現した(図3F)。

【0689】

[0723] 異なるリンパ系器官からの同じ系列の細胞上で差次的発現パターンが示された(図3G)。CD4⁺T細胞及びCD11b^{intermediate}単球の場合、発現レベルは、腸間膜LN>末梢LN及び脾臓>腹膜腔及び血液のパターンに従った。このパターンは、CD11b^{hi}細胞に対してはあまり顕著ではなかった。これらのデータから、ある種の細胞型上でのVISTA発現が細胞成熟及び/又は組織微小環境により制御され得ることが示唆される。

【0690】

[0724] 新鮮単離細胞に加えて、活性化あり又はなしで、インビトロ培養において脾臓CD4⁺T細胞、CD11b^{hi}単球及びCD11c⁺DC上でVISTA発現を分析した(図6)。VISTA及び他のB7ファミリーリガンド(例えばPD-L1、PD-L2、B7-H3及びB7-H4)の発現分析前に24時間、培地とともに、α-CD3(T細胞活性化の場合)とともに、又はIFNγ及びLPSとともに(単球及びDC活性化の場合)、脾臓細胞を培養した。この比較から、これらの分子間での特徴的な発現パターンが明らかとなった。活性化状況に関わらず、インビトロ培養時に全細胞型でVISTA発現が急速に失われた。一方、PD-L1発現は、培地単独中での培養後、活性化CD4⁺T細胞上で又はCD11b^{hi}単球及びCD11c⁺DC上で上方制御され、刺激時にさらに促進された。PD-L2、B7-H3及びB7-H4の発現は、使用した培養条件下で顕著ではなかった。インビトロでのVISTA発現の喪失は、他のB7ファミリーリガンドと比較した場合に特有であるが、組織微小環境を模倣できない非最適培養条件を反映し得る。

【0691】

[0725] インビボでVISTA発現がどのように制御され得るかということに対処す

るために、CD4⁺ TCRトランスジェニックマウスDO11.10にCFA中で乳化させた同種抗原ニワトリオボアルブミン (OVA) を用いて免疫付与した。免疫付与から24時間後、流入領域LNからの細胞をVISTA発現について分析した (図7A)。アジュバント単独ではない抗原 (CFA/OVA) での免疫付与によって、F4/80⁺マクロファージ及びCD11c⁺DCの混合集団を含有したCD11b⁺VISTA⁺骨髄細胞集団が劇的に増加した。PD-L1及びPD-L2とのさらなる比較から、PD-L1が最大の構成的発現レベルを有しても、このような炎症性免疫反応中にVISTAが最もよく上方制御されることが明らかになった (図7B)。まとめると、これらのデータは、免疫反応を調節することにおけるその役割に参与し得る免疫系により、骨髄APC上でのVISTAの発現が厳しく制御されることを強く示唆する。APC上でのその発現上昇について、免疫付与時のより後の時点 (即ち24時間ではなく48時間後) で活性化DO11.10 CD4⁺T細胞上でのVISTA発現が低下した。

【0692】

[0726] インビトロでのCD4⁺及びCD8⁺T細胞反応におけるVISTAシグナル伝達の機能的影響。CD4⁺T細胞反応におけるVISTAの制御的役割を調べるために、VISTA-Ig融合タンパク質 (VISTA-Ig) を作製した。VISTA-Igは、ヒトIgG₁Fc領域に融合されたVISTAの細胞外ドメインを含有した。マイクロプレート上に固定化された場合、対照IgでなくVISTA-Igは、 α -CD3刺激に反応してバルク精製CD4⁺及びCD8⁺T細胞の増殖を抑制した (図9A及び9B)。VISTA-Igは、ELISAによって決定した場合、プラスチックウェルに対する抗CD3抗体の吸収に影響を与えず、従って非特異的な阻害効果の可能性が除外された。PD-L1-Ig及びVISTA-Igの阻害効果を直接比較した。Ig融合タンパク質の滴定量がCD4⁺T細胞を刺激するために α -CD3と一緒にマイクロプレートに吸収された場合、VISTA-Igは、PD-L1-Ig融合タンパク質と同様の強力な阻害有効性を示した。PD-1 KO CD4⁺T細胞も抑制され (図9C)、このことから、PD-1がVISTAに対する受容体ではないことが示される。

【0693】

[0727] バルク精製CD4⁺T細胞は様々なサブセットを含有するので、選別されたナイーブ (CD25⁻CD44^{low}CD62L^{hi}) 及びメモリー (CD25⁻CD44^{hi}CD62L^{low}) CD4⁺T細胞サブセット上でのVISTA-Igの影響を評価した。VISTAは、メモリー細胞においては有効性がかなり低いものの、両サブセットの増殖を抑制した。

【0694】

[0728] VISTA介在性抑制の機構をさらに理解するために、細胞活性化後、初期TCR活性化マーカーの発現及びアポトーシスを測定した。細胞増殖における負の影響と一致して、初期活性化マーカーCD69、CD44及びCD62Lの発現において網羅的な抑制があった (図12A)。一方で、VISTA-Igはアポトーシスを誘導しなかった。TCR活性化の初期 (24時間) 及びさらに後 (48時間) の両段階で、(アネキシンV⁺7AAD⁻細胞の%により決定した場合) VISTA-Igの存在下ではアポトーシスが見られたのはIg対照よりも少なかった (図12B)。例えば、24時間の時点で総「非ゲーティング」集団のうち、VISTAの存在下で~27%細胞がアポトーシス性であったが、対照Igでは~39%の対照細胞がアポトーシス性であった。同様に、生細胞R1ゲート内の細胞のうち、対照Igでは~72.6%の細胞がアポトーシス性になり、一方でVISTA-Igの存在下では僅か~43.5%細胞がアポトーシス性であった。48時間の時点で同様の結果が見られた。従って、初期TCR活性化を抑制し、細胞分裂を停止させることによって、VISTAがCD4⁺T細胞反応を負に制御することは明らかであるが、アポトーシスに対する直接的影響は最小限であった。この抑制機構は、B7-H4の場合と同様である (Sica, et al., 2003)。

【0695】

[0729] VISTA-Igが予め活性化されたCD4⁺T細胞を抑制し得るか否か、

及びその抑制効果がどの程度持続性であるかを決定するために、2段階アッセイを開発した。VISTA-Ig融合タンパク質の抑制効果は、活性化後24時間でそれを除去した後、持続した(図9D、ii)。さらに、VISTA-Igによって、ナイーブ及び予め活性化したCD4⁺T細胞の両方が抑制された(図9D、i、iii及びiv)。

【0696】

[0730] 次に、CD4⁺T細胞サイトカイン産生におけるVISTA-Igの影響を分析した。VISTA-Igは、バルク精製CD4⁺T細胞培養物からのTh1サイトカインIL-2及びIFN γ の産生を抑制した(図13A及び13B)。別個のナイーブ(CD25⁻CD44^{low}CD62L^{hi})及びメモリー(CD25⁻CD44^{hi}CD62L^{low})CD4⁺T細胞集団において、VISTAの影響をさらに試験した。メモリーCD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞区画内でサイトカイン産生に対する主要な源であり、VISTAはこの産生を抑制した(図13C及び13D)。CD8⁺T細胞からのIFN γ 産生もVISTA-Igによって阻害された(図13E)。CD4⁺及びCD8⁺T細胞によるサイトカイン産生におけるVISTAのこの阻害効果は、VISTAがT細胞介在性免疫反応を下方制御する阻害性リガンドであるという仮説と一致する。

【0697】

[0731] VISTAの阻害効果を克服可能である因子を決定するために、さらなる実験を設計した。VISTAがIL-2産生を抑制し、IL-2がT細胞生存及び増殖に重要であると仮定して、発明者らは、IL-2はVISTAの阻害活性を回避し得るという仮説を立てた。図14Aで示されるように、IL-15、IL-7又はIL-23ではなく、外来性IL-2は、細胞増殖におけるVISTAの抑制効果を部分的に逆転させた。高レベルのIL-2による不完全なレスキューから、VISTAシグナル伝達が、単純にIL-2産生よりも幅広いT細胞活性化経路を標的とすることが示される。一方で、 α -CD28アゴニスト性抗体によりもたらされる強力な同時刺激シグナルは、VISTA-Ig介在性の抑制を完全に逆転させ(図14B)、一方で、VISTAシグナル伝達によって中間レベルの同時刺激が抑制され続けた(図14C)。この点において、VISTAは、PD-L1及びB7-H4などの他の抑制性のB7ファミリーリガンドとこの特性を共有する(Carter, et al. 2002; Sica, et al. 2003)。

【0698】

[0732] VISTA-Ig融合タンパク質に加えて、APC上で発現されるVISTAが、APCとT細胞との間の同種相互作用中に抗原特異的なT細胞活性化を抑制し得ることを確認する必要がある。発明者らは、この問いに対処するために2種類の独立した細胞系を使用してきた。最初に、B細胞株A20においてレトロウイルス形質導入を介してVISTA-RFP又はRFP対照タンパク質を過剰発現させた。蛍光顕微鏡によってVISTA-RFP融合タンパク質の正しい細胞表面局在化を確認した。T細胞反応を刺激するために、抗原性OVAペプチドの存在下でDO11.10 CD4⁺T細胞と一緒にA20-VISTA又はA20-RFP細胞を温置した。図15A及びC)で示されるように、A20-VISTAは、DO11.10細胞の増殖の誘導がA20-RFP細胞よりも少なかった。より強い刺激性シグナルがVISTAの抑制効果を克服するという考えと一致して、この抑制効果はより低いペプチド濃度でより顕著である。

【0699】

[0733] 第二に、天然のAPCにおける全長VISTAの阻害効果を確認した。インビトロ培養した骨髄由来樹状細胞(BMDC)は、高レベルのVISTAを発現しなかった(図16)。10日の培養期間中に、レトロウイルス形質導入によってBMDCでVISTA-RFP又はRFPが発現された。RFP発現に基づいて形質導入細胞を均一性について選別した。 α -VISTAモノクローナル抗体で染色することによって、形質導入DC上でのVISTAの発現レベルを推定し、新鮮単離腹膜マクロファージ上で、従って生理的発現範囲内でのレベルと同様であることが分かった(図16)。次に、OVAペプチドの存在下で、OVA特異的なトランスジェニックCD4⁺T細胞(OT-I)を刺激するために、選別したBMDCを使用した。BMDC上でのVISTAの発現は、同種

CD4⁺T細胞増殖を抑制した（図15D）。この結果は、VISTA-Ig融合タンパク質又はVISTA-発現A20細胞を用いたデータ（図5）と一致し、これは、APC上で発現されるVISTAがT細胞介在性免疫反応を抑制し得ることを示唆する。

【0700】

〔0734〕 インビボでのVISTA発現の影響を検証するために、腫瘍細胞上でのVISTA過剰発現が抗腫瘍免疫反応を損なわせ得るかを調べた。MCA105（メチルコラントレン105）線維肉腫はVISTAを発現しない。VISTA-RFP又はRFP対照ウイルスの何れかを用いてレトロウイルス形質導入によって2種類のMCA105腫瘍株を確立した。MCA105腫瘍は免疫原性であり、照射済みMCA105細胞を用いて予め免疫付与された宿主において容易に調節され得るので（Mackey, et al. 1997）、発明者らは、このような防御的な免疫性における腫瘍VISTA発現の影響を調べた。図24Aで示されるように、VISTA発現MCA105は、ワクチン接種した宿主において活発に増殖し、一方で対照腫瘍は育たなかった。T細胞介在性抗腫瘍免疫性の非存在下で腫瘍増殖速度において本質的相違がないことを確認するために、モノクローナル抗体を用いてCD4⁺及びCD8⁺T細胞の両方を枯渇させたワクチン接種動物において腫瘍を接種した。図24Bで示されるように、T細胞枯渇時に、MCA105RFP及びMCA105VISTA腫瘍の両方が同等の速度で及び非T-枯渇宿主よりもかなり急速に成長した。まとめると、これらのデータは、腫瘍細胞上でのVISTA発現が宿主において防御的な抗腫瘍免疫性を妨害し得ることを示す。

【0701】

特異的なモノクローナル抗体によるVISTA遮断は、インビトロ及びインビボでT細胞反応を促進した。

〔0735〕 A20-DO11.10アッセイ系においてVISTA介在性抑制を中和するために、VISTA特異的なモノクローナル抗体（13F3）を同定した（図25A）。T細胞反応における13F3の影響をさらに確認するために、ナイーブマウスからCD11b^{hi}骨髄APCを精製して、13F3の存在下又は非存在下でOT-I IトランスジェニックCD4⁺T細胞を刺激した（図25B）。その中和効果と一致して、13F3は、高レベルのVISTAを発現することが示されたCD11b^{hi}骨髄細胞により刺激されたT細胞増殖を促進した（図3）。CD11b^{hi}CD11c⁺骨髄DC及びCD11b^{hi}CD11c⁺単球の両方で13F3の同様の効果を見ることができた（図25C-D）。

【0702】

〔0736〕 次に、ヒト多発性硬化症に対するマウス自己免疫炎症性疾患モデルであるEAEの受動伝達モデルにおいて、モノクローナル抗体によるVISTA遮断の影響を調べた（Stromnes及びGoverman, 2006）。プロテオリピドタンパク質（PLP）ペプチドを用いて能動的免疫付与によって、ドナーマウスにおいて脳炎誘発性のCD4⁺T細胞を刺激し、ナイーブマウスに養子的に移入した。α-VISTAの疾患悪化能を慎重に評価するために、α-VISTA又は対照-Igで処置したナイーブ宿主に滴定数の活性化脳炎誘発性T細胞を受動的に移入し、EAEの発現を監視した。13F3は、疾患発症を顕著に加速化し、最適以下のT細胞移入投与量下で疾患重症度を悪化させることが分かった。13F3処置群は、第14日までに100%疾患発症率に到達し、一方で、対照抗体で処置したマウスは、実験期間中に100%疾患発症率に到達しなかった。平均疾患スコアは、疾患コースを通じて対照群よりも13F3処置群において有意に高かった。より高い疾患スコアと一致して、疾患経過の終了時の中枢神経系の分析から、13F3処置群においてIL-17A-産生CD4⁺T細胞浸潤が有意に高いことが確認された。

【0703】

考察

〔0737〕 VISTAは、インビトロ及びインビボの両方でT細胞上で免疫抑制活性を発揮し、自己免疫性及び癌に対する免疫反応の発現を調節することにおいて重要なメディエーターである、Igスーパーファミリーネットワークの新規メンバーである。与えられる

【 0 7 0 4 】

20

40

50

反応して骨髄APC上でPD-L1及びPD-L2も上方制御されたが、その程度は非常に低かった。発明者らは、VISTA⁺骨髄APCの誘導が、進行中の免疫反応を短縮するために自己制御機構を構成すると推測する。この仮説と一致して、VISTAモノクローナル抗体の中和は、VISTA発現骨髄APCにより刺激された場合、インビトロでのT細胞増殖性反応を促進した(図25A-D)。

【0707】

[0741] 骨髄細胞における発現パターンとは対照的に、インビボ活性化CD4⁺T細胞においてVISTA発現が縮小される。この結果は、能動的な免疫反応中のその活性化状況及びサイトカイン微小環境によって、インビボでのCD4⁺T細胞上でのVISTA発現が制御され得ることを示唆する。このような下方制御は特有なものであり、PD-L1、PD-L2及びB7-H4などの他の阻害性B7ファミリーリガンドに対しては見られていない。CD4⁺T細胞上でのVISTA発現の機能的意味は現在のところ不明であるものの、それらの同種相互作用中のT細胞からAPCへの逆シグナル伝達の可能性を将来の研究で決定する。

【0708】

[0742] VISTA-Ig融合タンパク質、VISTAを発現するAPC及びVISTAを過剰発現する腫瘍ならびにインビトロ及びインビボ両方での中和モノクローナル抗体を用いて、VISTAの阻害性リガンド機能を詳述した。VISTA-過剰発現腫瘍は、ワクチン接種宿主において強力な防御的免疫性を克服し得る。EAEモデルにおけるVISTAモノクローナル抗体の強い促進効果から、VISTAがインビボで阻害性リガンドであるという仮説がさらに実証される。他のB7ファミリーリガンドの機能の特性評価を行うために、同様のアプローチが使用されてきた(Sica, et al. 2003; Keir, et al. 2008)。VISTAが、PD-1と異なる受容体に会合することによりその抑制機能を発揮することに留意することは重要である(図9)。VISTA経路の遮断がEAEを悪化させるという事実から、その機能がPD-L1又はPD-L2と重複しないことが確認される。それどころか、発明者らは、VISTAが、その特有の構造特性、発現パターン及び動態により反映されるように免疫反応を調節すると推測する。その未知の受容体の同定により、VISTA介在性抑制の機構がさらに浮彫りになるう。

【0709】

[0743] まとめると、新規の免疫抑制的なリガンドとしてVISTAが同定された。APC上でのVISTAの発現は、T細胞とAPCとの間の同種相互作用中にまだ同定されていないその逆受容体をT細胞上で会合させることによって、T細胞反応を抑制する。VISTA遮断は、自己免疫疾患モデルにおいてT細胞介在性免疫性を促進し、これは、PD-L1及びPD-L2などの他の阻害B7ファミリーリガンドと比較した場合、自己免疫性を調節することにおけるその特有の及び重複しない役割を示唆する。免疫活性化の初期段階でのその高度に制御された発現パターンはまた、T細胞免疫性を下方制御し、炎症反応を減弱させるためのフィードバック調節経路も示し得る。この点において、VISTA阻害経路の治療介入は、疾患、例えばウイルス性感染及び癌などを処置するためにT細胞介在性免疫性を調節するための新規アプローチに相当する。

【0710】

実施例29

自己免疫性における免疫介入の標的としてのVISTA経路

[0744] これらの研究の目的は、可溶性VISTA-Igタンパク質がインビボで免疫反応を抑制し得るか否かを決定することである。インビボでマウスVISTA-mIgG2aを使用した研究から、第14日という遅い時期の治療処置がEAEでの臨床疾患スコアにおいて有益な効果を有したことが示された。これらの進行中の実験は、非常に興味をかき立てられるようなものであり、即ち発明者らは、自己免疫疾患介入における新しい中心軸を同定した可能性がある(図26)。この成功により、発明者らは、それらの細胞親和性能を引き出すために、マウスIgG1又はIgG2aバックボーン上でマウスVISTA

10

20

30

40

50

S T Aを用いて研究を拡張してきた。I g G 1 F c（野生型 I g G 1 及び既存の非 F c R－結合 I g G 1 の両方）とのインフレイムの V I S T A の F c 融合コンストラクトを作製した。これらの可溶性 V I S T A 分子が E A E を抑制し得るか否かを決定するためにこれらの可溶性 V I S T A 分子それぞれを試験し、V I S T A－I g G 1 及び V I S T A－I g G 2 a の両方が E A E の発現及び進行を抑制することが示される（図 2 7）。これらの結果は、二量体の細胞親和性 V I S T A がインビボで活性を有することを示唆する。これらの結果に基づき、V I S T A の他の多量体型が同様の活性を保持することがさらに予想される。例えば、V I S T A は、部位特異的なデオキシ化及び多量体化に対するアビジンとの複合化を用いて四量体化され得る。インビトロで、特に E A E 及び他の自己免疫炎症性及びアレルギー性障害の関連において、T 細胞機能を調節するために、これらの多量体を使用し得る。最後に、発明者らは、この提案に記載の取り組みが、新規治療計画の開発に対してかなり有望であり、全般的に自己免疫性及び T 細胞機能に関心があるコミュニティ全体に非常に大きな有益性があると考えている。

10

【0711】

実施例 3 0

V I S T A－I g 複合物は E A E 進行を低下させる。

〔0745〕 実験的自己免疫脳脊髄炎（E A E）は、多発性硬化症のモデルである。1 7 5 μ g の M O G / C F A 及び百日咳毒素（P T）3 0 0 n g（第 0、2 日）でマウスに免疫付与することによって E A E を誘発した。第 1 4、1 7 及び 2 0 日に、1 5 0 μ g V I S T A－I g G 2 a（n=8）又は 1 5 0 g 対照 I g G 2 a（n=8）を投与した。データは平均±S E Mとして図 2 6 で示す。別の実験において、第 6 日に、1 5 0 μ g の対照 I g G 1（n=3）、1 5 0 μ g の対照 I g G 2 a（n=6）、1 5 0 μ g の m V I S T A－I g G 1（n=3）又は 1 5 0 μ g の m V I S T A I g G 2 a（n=6）で週に 3 回、マウスを処置した（全 2 週間）。データは平均±S E Mとして図 2 7 で示す。別の実験において、第 1 4 日に、P B S（n=6）、1 0 0 μ g の対照 I g G 2 a（n=6）、3 0 0 μ g の対照 I g G 2 a（n=6）、1 0 0 μ g の V I S T A－I g G 2 a（n=6）又は 3 0 0 μ g の m V I S T A I g G 2 a（n=6）で週に 3 回、マウスを処置した（全 2 週間）。データを平均±S E Mとして図 2 8 で示す。従って、V I S T A－I g 融合タンパク質は、炎症性状態、例えば多発性硬化症において治療効果を有する。

20

【0712】

実施例 3 1

ヒト細胞における V I S T A 発現の分析及び V I S T A－I g による抑制

〔0746〕 ヒト細胞試料において、V I S T A の発現パターン及び V I S T A－I g 融合タンパク質の投与によるその抑制を調べた。

【0713】

材料及び方法

〔0747〕 V I S T A－I g 融合タンパク質の産生－ヒト V I S T A の細胞外 I g V ドメインからのアミノ酸 1 6－1 9 4 及び F c 受容体の低結合のために突然変異させたヒト I g G 1 型からなる融合タンパク質を作製した。ベクター C D M 7 B の S p e I－B a m H I 部位に V I S T A 配列をクローニングした。製造者の説明書（I n v i t r o g e n）に従い、F r e e s t y l e 遺伝子移入試薬及びタンパク質不含 F r e e s t y l e E x p r e s s i o n M e d i a を用いて F r e e s t y l e C H O 細胞の一過性遺伝子移入によってタンパク質を産生させた。増殖 5 日後に上清を回収し、プロテイン G アフィニティーカラムにより精製した。1 0 K M W C O スピンカラム（A m i c o n）を用いてタンパク質を濃縮した。

40

【0714】

〔0748〕 細胞調製－未確認の健康なヒトドナーからヒトアフエレーシス試料を得た。培養実験に対して、血液を L y m p h o p r e p（P A A）に重ね、密度勾配遠心によって単離した。界面細胞を P B S で 2 回洗浄し、次に、製造者の説明書に従い、M i l t e n y i C D 4 N e g a t i v e s e l e c t i o n k i t I I、C D 8 N e g

50

active selection kit又はCD4メモリーT細胞選択キットを用いて磁気ビーズ選択を行う前にMACS緩衝液中で1回洗浄した。エフェクター細胞単離に対しては、続いて、Miltenyi CD27陽性選択ビーズを用いてCD4 T細胞に対してCD27⁺細胞型を枯渇させた。

【0715】

〔0749〕 培養－抗CD3（クローンOKT3、BioXCell）及びVISTA-Ig又は対照-Ig（ZZ、R&D biosystems）の何れかで被覆した96ウェル平底プレートにおいてウェルあたり 2×10^5 細胞でT細胞を播種した。別段の断りがない限り、PBS中で $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ （比率1：4）VISTA-Ig又は対照-Igタンパク質と一緒に混合して $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で4℃にて一晩抗CD3で被覆した。細胞を添加する前に完全培地でウェルを2回洗浄した。指示される場合、被覆混合液中に滴定量の抗CD28（Miltenyi Biotech）を含んだか、又は $50 \text{ ng}/\text{mL}$ のIL-2、IL-4、IL-7又はIL-15（PeproTech）を培地に添加した。第2日に初期活性化マーカーについて、第5日に後期活性化マーカー又はCFSEプロファイルについて培養物を分析した。

10

【0716】

〔0750〕 フローサイトメトリー－培養後の染色については、細胞を回収し、V底96ウェルプレートに移した。細胞を洗浄し、抗体（CD4、CD8、CD25、CD69、CD45RA；BD biosciences）及び近赤外定着性ライブデッド色素（Invitrogen）を含有するHBSS/5%BCS染色緩衝液中で染色した。細胞を洗浄し、分析前にBD固定緩衝液で固定した。

20

【0717】

〔0751〕 VISTA発現に対する染色については、全血を洗浄し、細胞外マーカーに対する抗体を含有するPBA緩衝液（PBS/0.1%BSA/0.1%アジ化ナトリウム）で染色した。CD4、CD8、CD3、CD45RA、CD56、CD11b、CD11c、CD123、HLA-DR、CD14及びCD16に対する抗体はBD biosciencesから購入し、抗VISTAは本明細書中で記載のように作製した。FoxP3を細胞内染色するために、eBiosciencesからのFoxp3固定/透過処理濃縮液及び希釈キット及びBD biosciencesからの抗FoxP3抗体を使用した。図33Dを参照。

30

【0718】

〔0752〕 FACSDivaソフトウェアv6.1.2（Becton及びDickinson）を用いてLSRII Fortessa（Becton及びDickinson, San Jose, CA, USA）上で試料を取得して、FlowJoソフトウェア（Tree Star, Inc.）で分析した。Prism 5（GraphPad Software, Inc.）を用いてグラフドを用いて、グラフを作成した。

【0719】

結果

〔0753〕 ヒトVISTAタンパク質－ヒトゲノムに対するマウスVISTA配列のBLASTによって、8e-165のe値及び77%同一性で、染色体10オープンリーディングフレーム54（C10orf54又は血小板受容体Gi24前駆体、遺伝子ID：64115）が同定される。マウスVISTAと共通して、このタンパク質は、1個の細胞外IgVドメインを有するI型膜貫通タンパク質をコードすると予想される。ヒトVISTAは、311アミノ酸（aa）長であり、32aaシグナルペプチド、130aa細胞外IgVドメイン、33aaストーク領域、20aa膜貫通ドメイン及び長い96aa細胞質テールからなる。配列番号16のアミノ酸配列を参照。

40

【0720】

〔0754〕 VISTA発現分析－cDNA組織パネルのリアルタイムPCR分析によって健康なヒト組織のVISTA発現を調べた（Origene）図29A）。マウス組織と同様に、VISTAは主に造血組織又は大量の造血組織を含有する組織で発現された。

50

これは、免疫関連機能におけるVISTAの重要性と一致する。興味深いことに、VISTAの発現はヒト胎盤において特に高く、このことから、妊娠の同種間の環境に対する寛容性の維持における、VISTAに対する機能的役割が示され得る。この発現パターンは、VISTAの最も近縁の相同体PD-L1の場合と同様の傾向に従うことが分かった（図29B）。

【0721】

〔0755〕 次に、フローサイトメトリーにより造血区画内でVISTAタンパク質発現を調べた。PBMCを末梢血液から単離し、抗VISTAモノクローナル抗体GA1で染色した。単球、樹状細胞の殆どによって、ならびにCD4及びCD8T細胞のおよそ20%によって、VISTAが高度に発現された（図30）。血液単球の「巡回性」（CD14^{dim}CD16⁺）及び「炎症性」（CD14⁺CD16^{+/+}）サブセットの両方内で及び樹状細胞のリンパ系及び骨髄サブセットの両方内でVISTA発現を観察した。

【0722】

〔0756〕 T細胞機能におけるVISTAの機能的影響—VISTAは、マウスT細胞免疫反応において負の影響を有することが以前に明らかになっている（Wang, et al. (2011) J. Exp. Med. 1-16頁）。ヒト細胞介在性免疫反応においてVISTAが同じ役割を有するか否かを調べた。VISTAの細胞外ドメイン及びFc受容体結合を低下させるための突然変異を含有するヒトIgGのFc領域からなるIg融合タンパク質を作製した。2.5 µg/mLの抗CD3（OKT3）とともにプレート上に10 µg/mLのVISTA-Ig又は対照Igを固定化し、次いでCFSE希釈によって増殖を測定した。VISTAは、バルク精製CD4（図31A）及びCD8（図31B）T細胞のCFSE希釈を抑制することが分かった。VISTAによる抑制は、PD-L1-Ig（R&D biosystems）により誘導されるものと同等である。さらに、VISTA-Igは、メモリー（CD45RO⁺、図31C）及びエフェクター（CD27⁻、図31D）サブセットの抑制において有効であった。ヒトCD4T細胞上でのマウスVISTA及びヒトVISTAの比較から、VISTAが種を越えて交差反応性であることが明らかになった。様々な濃度のOKT3にわたるヒトVISTA-Ig及びヒトVISTA-Igの滴定から、OKT3の濃度が高いほど、克服するためのVISTA濃度が高くなり得ることが示された（図32A及び32B）。

【0723】

〔0757〕 抑制の機構に対するある程度の洞察を得るために、VISTA-Igの存在下又は非存在下での活性化後に細胞の状況を調べた。2日の培養中、初期活性化マーカーCD25及びCD69の抗CD3による上方制御がVISTA-Igにより遮断された（図33A及び33B）。同様に、培養5日後、抗原経験を示すCD45RAからCD45ROへの発現シフトが妨げられた（図33C）。VISTAは、細胞生存能に対して影響がなかった。増殖の遮断と一致して、VISTA-Igで処置した細胞は、OKT3単独で見られるプラスティング細胞ではなく未刺激細胞と同様に前方及び側方散乱プロファイルがあった。VISTAにより誘導される抑制が安定であるか否かを決定するために、抗CD3及びVISTA-Ig上で2日間、細胞を培養し、次いで3日間、抗CD3単独上に移した。このさらなる刺激は、図34A及び34Bで示されるように抑制をレスキューすることができなかった。

【0724】

〔0758〕 次に、サイトカイン産生におけるVISTA-Igの影響を調べた。VISTA-Igの漸増量の存在下で細胞をプレート結合OKT3で5日間刺激し、次いで、サイトメトリックビーズアレイによって培養上清中で様々なサイトカインの濃度を測定した。検出されたのは痕跡量レベルのIL-2、IL-4又はIL-6のみであり（<5 pg/mL）、差は観察されなかった。しかし、VISTA-Igは、CD4（図35A）及びCD8（図35B）T細胞によるIL-10、TNFα及びIFNγの産生を顕著に減少させ、IL-17産生が中程度に増加するという傾向があった。

【0725】

〔0759〕 T細胞のVISTA誘導性抑制を克服することができた因子も調べた。抗CD28アゴニスト性抗体は、T細胞に対して強力な同時刺激をもたらすので、VISTA抑制を負荷するために培養物に滴定する（図36A-C）。より低量の抗CD28ではVISTAを克服できなかったものの、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ VISTAの被覆濃度で抗CD28が含まれた場合、増殖を遮断できなかった。同様に、低濃度のVISTAがIL-2、IL-7及びIL-15などのサイトカインの添加により克服され得た一方で、より高濃度のVISTAは、 $50\text{ng}/\text{mL}$ の生理的に高い濃度のサイトカインがあっても依然として抑制性であった。

【0726】

実施例32

VISTA-Ig複合物の効果、CFSE CD4+T細胞増殖アッセイにおける、健常対象及び狼瘡対象のCD4+T細胞の増殖

実験プロトコールで使用した材料

必要な試薬

1. 蓋付きのCorning（登録商標）96ウェルEIA/RIAクリア平底 ポリスチレンHigh Bindマイクロプレート、蓋付き、滅菌（製品番号3361）。
2. BioXCell、抗ヒトCD3、カタログ番号BE0001-2、クローン：OKT3、種：マウスIgG2a
3. R&D、組み換えヒトIgG1 Fc（対照Ig）、CF、ヒトIgG1、カタログ番号：110-HG-100
4. PanT細胞単離キットII、カタログ番号：130-091-156
5. Invitrogen、LIVE/DEAD（登録商標）Fixable Violet Dead Cell Stain Kit、405nm励起用、カタログ番号：L34955
6. Sigma、Histopaque-1077、ろ過滅菌済み、密度： $1.077\text{g}/\text{mL}$ 、カタログ番号10771-500ML
7. Cellgro、RPMI1640、カタログ番号：10-040-CV、10%熱不活性化FBS/ペニシリン/ストレプトマイシン/ $50\mu\text{M}$ 2-ME、
 1. 牛胎仔血清：HyClone、カタログ番号：SH30910.03
 1. BD Cytotfix、固定緩衝液、カタログ番号：554655
8. Cellgro、リン酸緩衝塩水（PBS）、1X、滅菌、カルシウム及びマグネシウム不含、カタログ番号：21-040-CV
9. Polysciences、ホルムアルデヒド、カタログ番号：04018
10. Sigma、ヒトIg、カタログ番号：G4386-1G、 $1.25\text{mg}/\text{mL}$ の最終濃度で使用
11. Invitrogen、CellTrace CFSE細胞増殖キット、フローサイトメトリー用、カタログ番号：C34554
12. ヒトVISTA-Ig（Lot番号100912、Freestyle CHOより）

【0727】

実験プロトコール

〔0760〕 第-1日：ウェルあたり 100mL PBS中の抗CD3（クローンOKT3 $2.5\text{mg}/\text{mL}$ ）+対照Ig又はVISTA-Ig（ $10\text{mg}/\text{mL}$ ）で96ウェルフラットプレートを被覆する。 4°C で一晩、又は 37°C で3時間、プレートを温置する。

〔0761〕 第0日：Miltenyi Biotecの説明書に従い、ヒトCD4+T細胞を単離し、CFSEで細胞を標識する。被覆した96ウェルプレートにおいてウェルあたり細胞200,000個で細胞を播種する。

〔0762〕 第3から4日に、細胞を回収し、CD4+細胞の増殖レベルを決定するためにフローサイトメトリーを用いてCFSE標識により分析する。特に、フローサイトメトリーは、図37に含有されるフローゲーティングストラテジーを用いて行う。

〔0763〕 C F S E 増殖アッセイの結果は図 3 8 に含有される。このことから、V I S T A A I g が、対照 F c 群と比較した場合、ヒト対照対象及び狼瘡対象の両方によって、10 μ g / m L でヒト C D 4 T 細胞において最大の抑制を示すことが分かり得る。

【0728】

実施例 3.3

V I S T A I g タンパク質のインビトロ効力における様々なリンカーの影響

〔0764〕 ヒト I g G 1 F c に融合したヒト V I S T A タンパク質は、インビトロで抗 C D 3 誘導性 T 細胞反応を抑制することにおいて強力な活性を示した。このデータの殆どは、C D M 8 由来のコンストラクトを用いて生成された。このタンパク質に対する部分的アミノ酸配列データを下記の配列で与える。この配列において、V I S T A タンパク質を緑色で強調し、ヒト I g G 1 を黄色で強調する。h u V I S T A 配列に先行する配列のうち色が付いていない部分は、シグナルペプチド配列である。V I S T A 及びヒト I g G 1 配列に介入し、配列のうち星印を付した部分に介入する配列のうち色が付いていない部分は、19 アミノ酸残基を具備するリンカーペプチドである。

【0729】

〔0765〕 2. 5 μ g / m L プレート結合抗 C D 3 及び対照 I g 又は V I S T A - I g の何れかの存在下で 5 日間培養した C F S E 標識ヒト T 細胞を用いて、このポリペプチドのインビトロ抑制活性をアッセイした。下記配列のポリペプチド。(配列番号 6 8)。このアッセイの結果を図 3 9 A で示す。

配列 1: h u V I S T A - I g G 1 - C D M 8 - 由来
MSLLFALFLAASLGPVAA*FKVATPYS LYVCPEGQNV TLTCRLLPV DKGHDVTFYK TWYRXSXGEV QTCSERRP
IR NLTFQDLHLH HGGHQAANTS HDLAQRHGLE SASDHHGNFS ITMRNLTL DSGLYCCLVVE IRHHHSEHRV
HGAMELQVQT GKDAPSNCVV YPSSSQESEN ITAA***DPGGGG GRLVPRGFGT GD***PXPSSDK THT**CPP
CPAP DSRVHRQSSS SPKTKDTLMI SRXPEVTCVV VDVSDQEDPEV KFXWYVDGVE MHRXKTKPRE EXNXXLXM
G XXLTXQQDW LNXKDYKFKV SNKKQXNPFE KTXSKSKRQT REPXVYNLPP SRXELTKIQV SLTXVXKXFX P
SDXAVEWES NGQPENXYKX TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
GSAGGS GGLNDIFEAQ KIEWHESRGS L

(配列番号 6 8)

〔0766〕 I n v i v i t r o g e n からの p F U S E - h I g G 1 e 3 - F c 2 ベクターを用いて第二のヒト V I S T A - ヒト I g G 1 F c コンストラクトを作製した。同様に、この配列において、V I S T A タンパク質を緑色で強調し、ヒト I g G 1 を黄色で強調する。h u V I S T A 配列に先行する配列のうち色が付いていない部分は、シグナルペプチド配列である。V I S T A 及びヒト I g G 1 配列に介入し、配列のうち星印を付した部分にさらに介入する配列のうち色が付いていない部分は、19 アミノ酸残基を具備するリンカーペプチドである。(また、この配列のうち異なる部分をまた星印で分離する。)。

【0730】

〔0767〕 この第二の V I S T A I g 融合ポリペプチドに対するアミノ酸配列は、下記で示される配列 2 である (配列番号 6 9)。2. 5 μ g / m L プレート結合抗 C D 3 及び対照 I g 又は配列 2 の前記 V I S T A - I g ポリペプチドの何れかの存在下で 5 日間培養した C F S E 標識ヒト T 細胞を用いて、このポリペプチドのインビトロでの抑制活性を再びアッセイした。このアッセイの結果を図 3 9 B で示す。図 3 9 B での結果に基づき、このタンパク質のビトロ活性が、配列番号 6 8 の V I S T A I g ポリペプチドよりも大幅に低かったことが分かり得る。

配列 2: h u V I S T A - I g G 1 - p F U S E 由来
シグナル配列

MYRMQLLSICALSLALVTNS**FKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLPVDKGHDVTFYK TWYRSSRGEVQTCSERRP
IR NLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLE SASDHHGNFS ITMRNLTL DSGLYCCLVVE IRHHHSEHRVHGAMELQV**
QTGKDAPSNCVVYPSSSQDSENITAAA***RSISAMVRSVE***CPPCPAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQ

PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK-

(配列番号 69)

〔0768〕 これらの異質な結果に基づき、これらの2種類のVISTA-Ig融合物の免疫抑制活性の相違がVISTA融合タンパク質のFc領域での配列変異によって潜在的に説明され得ることが推測された。従って、配列1及び2のFcドメイン(黄色)の配列決定を行い、比較した。この配列比較は下記のアラインメントで示されるとおりである。検査時、発明者らは配列の相違に気付いたが、これらのポリペプチドの免疫抑制活性における実質的な相違に対する説明を提供する突然変異には気付かなかった。

10

Fcのアラインメント:

スコア=315ビット(808)、期待値=2e-109、方法:Compositional matrix adjust.

同一性=158/203(78%)、ポジティブ=164/203(81%)、ギャップ=0/203(0%)

【化1】

```

Query 252 PKTKDTLMISRPEVTCVVVDVSQEDPEVKFXYVDGVEHHRXKTKPREEXXNXLXMGX
311
      PK KDTLMISR PEVTCVVVDVS EDPEVKF XYVDGVE+H KTKFREE N +
Sbjct 28 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
87

Query 312 KLTXXQQDWLNKDYKFKVSNKKQXNPFERTXSKSKRQTREPXYVNLRFPSRXELTKIQVS
371
      LT QDWLN K+YK KVSNK + EKT SK+K Q REP VY LPFSR E+TK QVS
Sbjct 88 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
147

Query 372 LTXVXKXFXPSDXAVEWESNGQFENXYKXTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
431
      LT VK F PSD AVEWESNGQFEN YK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
Sbjct 148 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
207

Query 432 CSMVMEALHNHYTQKSLSLSPGK 454
      CSMVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Sbjct 208 CSMVMEALHNHYTQKSLSLSPGK 230

```

20

30

(配列番号70)

〔0769〕 次に、活性の相違は、グリコシル化の相違の結果であり得るか又はおそらく融合タンパク質のVISTA及びIgドメインに介入するリンカーのサイズ又は性質の影響によると推測した。特に、配列決定時に、配列1のVISTAタンパク質及びFcドメインに介入するスペーサー又はリンカーは、かなり多数が可動性グリシン残基を具備する19アミノ酸を具備することが観察された。一方、配列2においてVISTAポリペプチド及びIgG1ポリペプチドに介入するリンカー(配列番号73)は11アミノ酸長のみであり、グリシン残基を具備しない。

【0731】

40

〔0770〕 この観察に基づき、より多くの可動性リンカーの組み入れが、VISTA-Igの活性をさらに向上させ得ることが推測された。これに関して、それらの可動性及び既知の免疫原性リスクがないことから、抗体操作分野で様々なドメインを連結するためにグリシン-セリンリンカーが使用される。しかし、本例において、このようなリンカーが顕著に活性に影響を与えるか否かは不明であった。例えば、VISTAは、活性のために二量体化を必要としない一部の他のタンパク質と同様の構造を保持する。

【0732】

〔0771〕 従って、この仮説に基づき、発明者らは、配列1及び配列2においてVISTA-Ig融合ポリペプチドの免疫抑制活性を別の可動性リンカー、即ちセリン-グリシンリンカーを具備する第三のVISTA-Ig配列と比較することにした。特に選択され

50

たリンカーはG T S G S S G S G S G G S G S G G G G (配列番号71)であった。配列3 (配列番号72)に含有されるV I S T A I gタンパク質を作製するために、ヒトV I S T Aとp F U S E - h I g G 1 e 3 - F c 2 F cドメインとの間のリンカーとしてこの配列を使用した。

配列: S e r / G l y リンカーを用いて得られた3 h u V I S T A - I g G 1 - p F U S E

シグナルペプチド V I S T A 配列の開始

MYRMQLLSICIALSLALVTNS***FKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLGPVDKGHDVTFYKWTWYRSSRGEVQTCSERRPI
RNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHGNGFSITMRNLTLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQ
TGKDAPSNCVVYPSSSQDSENITAAA***GTSGSSGSGSGSGSGGGG***RSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS
IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(配列番号72)

【0733】

[0772] 配列3において、V I S T Aタンパク質を再び緑色で強調し、ヒトI g G 1を黄色で強調する。h u V I S T A配列に先行する配列のうち色が付いていない部分は、繰り返すがシグナルペプチド配列である。V I S T A及びヒトI g G 1配列に介入し、配列のうち星印を付した部分にさらに介入する配列の部分は、セリン又はグリシンアミノ酸残基である19アミノ酸残基を具備するリンカーペプチドである。(また、配列の異なる部分を星印によって分離する。)

【0734】

[0773] 図39Cでの結果から見られ得るように、このリンカーを含有するV I S T A I gポリペプチドは、V I S T A - I gタンパク質より大きい免疫抑制活性を有した。具体的に、S e r - G l y リンカーを含有するV I S T A I g融合物は、配列1におけるV I S T A I g融合物よりも約10%大きい免疫抑制活性を示し、配列2 (配列番号69)よりも約9倍大きかった。発明者らにより構築された別のV I S T A - I g配列を下記で示す(配列番号73)。M L R実験及び本願に記載の他のh V I S T A - I g実験においてこの配列を使用した。N末端からC末端の配列の異なる部分を下記で同定し、配列中で星印によりさらに分離する。

赤=シグナルペプチド太字

緑=v i s t a

青=ビオチン化アクセプターペプチド

紫=リンカー

橙=I g G 1 F c

下線付き=F c突然変異

(また、配列の異なる部分を星印によっても分離する。)

細胞外

MPMGSLLQPLATLYLLGMLVASCLGTSMSELLFALFLAASLGPVAA**FKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLGPVDKGHDV
TFYKWTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHGNGFSITMRNLTLDSGLYCC
LVVDIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPSNCVVYPSSSQESENITAA**DPGGGGGRLVPRGFGTGDGP**EPKSSDKTH
TCPPCPAPEFEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPTPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GSAGGSG** GLNDI
FEAQKIEWHE**SRGSL

(配列番号73)

ベクターF cとのヒトI g G 1のアラインメント

【化 2】

```

Query 20  EPKSSDKTHTCPCPAPEFEGAPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
79
Sbjct 1    EPKS DKTHTCPCPAPE G PSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
60
Query 80  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPIEKT
139
Sbjct 61  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPIEKT
120
Query 140  ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKPTP
199
Sbjct 121  ISKAKGQPREPQVYTLPPSR+E+TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKPTP
180
Query 200  PVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 251
Sbjct 181  PVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 232

```

10

(配列番号 7 4)

〔0774〕 これらの結果から、特異的な長さ及び／又は可動性のリンカーの組み込みにより、V I S T A - I g 融合タンパク質、単量体及び多量体 V I S T A - I g 融合物の両方の免疫抑制活性が顕著に強化され得ることが示される。

20

【0 7 3 5】

実施例 3 4

m V I S T A - I g でのマウスの処置は、マウス狼瘡モデルにおいて疾患を抑制する。

〔0775〕 特徴がよく分かっているマウス系統 N Z B W - F 1 (「BW」雌のみ) 及び N Z M 2 4 1 0 (N Z M 雄及び雌) は、S L E のヒトで見られるものと同様の自己免疫疾患狼瘡の複数の症状を発現する。これらには、自己反応性抗体の発現、糸球体における免疫複合体沈着、蛋白尿、プロ炎症性サイトカイン産生の増加及び体重減少が含まれる。究極的には、マウスは 1 年齢未満で腎不全で死亡する。m V I S T A - I g が全身性自己免疫疾患を抑制し得るか否かを決定するために、発明者らは、BW マウスを 8 週で予防的に、及び BW 及び N Z M マウスを治療的に 2 4 週で m V I S T A - I g により処置した。V I S T A - I g での処置は、総白血球数の変化を何ら引き出さず、この薬剤が明白に T 細胞を枯渇させないことを示す(データは示さない。)。V I S T A - I g での予防的処置は、体重減少及び蛋白尿の両方を予防し、治療的処置は、これらのマウスにおいて蛋白尿から回復させた。結果は図 4 0 に含有される。また、2 4 週で処置した N Z M マウスにおいて同様の結果が観察された(データは示さない。))。

30

【0 7 3 6】

〔0776〕 図 4 1 A - D で示されるように、マウスが発病したとき又は 3 0 週齢の時点で、実験的 V I S T A - I g G 2 a 又は対照 I g G 2 a の何れかを投与された 2 匹の N Z B W F 1 (BW) 及び 3 匹の N Z M マウスから採取した腎臓切片においてヘマトキシリン及びエオシン (H & E) 染色を行った。BW は 8 週齢で処置を開始し、N Z M は疾患発症から長時間経過してから 2 4 週齢で開始した。全 5 匹の V I S T A - I g G 2 a 処置マウスからの切片は、最小から軽度の糸球体腎炎を示し、間質性疾患及び糸球体癒痕化はなかった(図 4 0 B)。一方、全 5 匹の対照 I g G 2 a 投与マウスは、重症の増殖性糸球体腎炎の証拠を有し、5 匹のうち 3 匹で顕著な癒痕化が明らかであり、このうち 1 匹は糸球体が全て閉塞した最終段階の腎臓病であった(図 4 1 C、D)。5 匹のうち 2 匹のマウスでも間質性炎症が見られた(データは示さない。)。総 I g G d s D N A 力価の全体的評価から、V I S T A - I g 処置の効果は何も示されなかったが、ここで、このマウスモデルにおける幾分かの自己特異性は寿命が長い形質細胞由来であり、一部は短命の形質細胞由来であることが明らかである。従って、V I S T A - I g が抗 e l f 抗体力価に何の影響を有するかを結論付ける前に、抗 S L E 抗体の全アイソタイプ及びこれらの抗体の

40

50

優れた特異性に対するVISTA-Igの影響のより完全な分析を評価する必要がある。既に記載のように、dsDNA抗体価に影響がない抗CD40LでのBW及びNZMマウスの後期処置もまた、疾患を改善し得る。そのようなものとして、抗CD40L及びVISTA-Igは代わりに、腎臓レベルでの過剰なT細胞介在性炎症及び組織損傷などのさらなる過程を制御し得る。重要なこととして、機構に関わらず、これらの予備的結果から、VISTA-Ig処置がまた治療的にも作用し、24週での投与開始の結果、IgG2a対照処置動物と比較して、蛋白尿レベルの低下及び糸球体障害の減少が起こることが示される。従って、VISTA-Igは、確立された疾患において進行中の免疫介在性損傷を無効にし得、ヒトSLEの処置に対して明らかに有意である効果である。

【0737】

10

〔0777〕 図60の実験で示されるように、1日おきにPBS、150μg対照IgG2a、mVISTA-IgG2aを投与して処置した20週齢のNZBWF1マウスから全血を回収した。(a)炎症性単球mad(b)T細胞の存在及び数を同定するために蛍光複合化抗体で全血を染色し、フローサイトメトリ分析によって細胞集団を調べた。この図における結果は、この処置が炎症性単球及びT細胞の細胞頻度を変化させなかったことを示した。

【0738】

〔0778〕 図61の実験で示されるように、VISTA-IgG2aで処置した20週NZBWF1マウスの血液中でIL-17レベルがさらに検出された。この結果は、処置によって炎症性サイトカインの発現が低下したことを示す。

20

【0739】

〔0779〕 図62及び63の実験で示されるように、対照IgG2a又はVISTA-IgG2aで処置した24週齢NZBWF1マウスのサイトカインプロファイルも比較した。この結果は、VISTA-IgG2aでの処置が、そこでの炎症反応の軽減と一致するように、IL-2、IL-10、CXCL1、IL-5、IL-4、IL-12及びIL-1-βを含む炎症と関連するサイトカインの発現を低下させたか又はそれに影響を与えたことを示す。一方、dsDNA抗体レベルは統計学的には影響を受けなかった(結果は示さない)。

【0740】

〔0780〕 この結果は、VISTA-Igが、抗体レベル又は免疫複合体沈着に影響を与えずにSLEに治療的に介入することを示し、それが非B細胞機構を通じて介入することを示唆する。むしろ、VISTA-IgはTregの痕跡を促進し、腎臓でT細胞サイトカインを減少させ、これは、T細胞活性化に対する直接的影響を示唆する。また、この結果は、腎臓においてVISTA-Ig投与が著しく骨髄浸潤を減少させ、疾患消散となるはずであることを明らかにする。

30

【0741】

〔0781〕 従って、前述のことに基づき、炎症又は自己免疫性又はアレルギーの負の制御因子としてVISTA-Ig融合タンパク質を使用し得る。示されるように、このようなポリペプチドは、CD4+及びCD8+T細胞によるIL-10、TNFα及びIFNγの産生を顕著に減少させ得る。これは、同様に、免疫反応の治療的な下方制御につながり、自己免疫、アレルギー性又は炎症性障害からの回復をもたらすはずである。

40

【0742】

実施例35

〔0155〕 喘息などの呼吸器障害の処置におけるVISTA-Igの使用

〔0154〕 制御T細胞及び寛容性：CD4⁺Foxp3⁺発現Tregは、最もよく特徴が分かっているTregサブセットであり、自己及び外来抗原の両方に対する寛容性を維持するために欠かせない。Foxp3突然変異のある患者はアレルギー性症状7を示し得、喘息性気道からのFoxp3⁺Tregの抑制活性が損なわれる6。T細胞におけるFoxp3⁺誘導性の転写プログラムは、近隣のT細胞及び抗原提示細胞(APC)活性化の抑制能を付与する。TGF-β及びIL-2の存在下でFoxp3⁺発現Tregもま

50

たナイーブ末梢CD4+T細胞から誘導され得、これは、全一トランスレチノイン酸（ATRA）によってさらに促進される8。末梢CD4+T細胞からの消化管におけるFoxp3+Tregの誘導は、TGF- β 及びレチノイン酸の産生に依存する9。Foxp3+又はFoxp3-表現型を有するIL-10産生Tregに対する重要な役割もまた、呼吸器の寛容性において確立されている10、11、12。Treg数を拡大する新規ストラテジーは、アレルゲンに対するそれらの特異性を向上させるか又は肺組織でそれらの抑制活性を回復させ、従って、喘息における潜在的な疾患修飾性の免疫療法として非常に有望である。

【0743】

〔0155〕 発明者らは、アレルギー性の肺の炎症及び寛容性の一連のマウスモデルを開発し、これは、アレルギー性感作後のCD4反応が混合型のTh2+Th17反応からなることを示した13。アレルギー性感作及び寛容性誘導の両方とも、流入領域リンパ節ではなく肺組織における総Foxp3+CD4集団の増加が伴う（図49）。しかし機能的に関連するTreg活性化マーカー14であるGARPの発現が、肺及びリンパ節の両方において上方制御された（図49）。興味深いことに、寛容性マウスにおいて粘膜組織中のTregがアレルゲンに反応して増殖したが、炎症が存在した場合にそのようにならなかった（図50）。炎症性の肺におけるこのTregの「麻痺した」状態には、ヘリオス発現の低下が付随した（図51）。ヘリオスは、Foxp3プロモーターに結合する転写因子であり、Treg活性に関与し得る15。さらに、寛容性であるが未感作の動物においてIL-10及びIFN- γ 産生T細胞の刺激が明らかとなった。

【0744】

〔0156〕 VISTAに対するモノクローナル抗体を用いて、発明者らは、肺胞マクロファージが通常、肺DC及び間質性マクロファージを含む肺における他細胞型と比較して、細胞表面VISTAの高いベースライン発現を有することを示した（図52）。これは、気道内の特有の環境が、抑制的であることが知られている、肺胞マクロファージ上での高VISTA発現を維持することを示唆する。寛容性及び炎症の両方との関連におけるアレルゲンの吸入は、気道マクロファージ上でVISTAの発現をさらに増加させ、これは、免疫誘発が、炎症を防ぎ得る、流入するT細胞に対する負のシグナルの送達を促進する環境を作ること示唆する。気道リンパ球は、肺胞マクロファージよりもかなり低いレベルのVISTAを発現した。寛容性中にはリンパ球VISTA発現が増加し、アレルゲンにより誘発された炎症中はより低かった（図52）。しかし、上皮機能が制御不全になった場合の、慢性アレルゲン誘発後のVISTAの発現パターン及び呼吸器寛容性におけるVISTAの機能的役割は不明である。発明者らは、VISTAがナイーブCD4+T細胞のFoxp3+Tregへの変換を促進し得ることを明らかにし、これは、末梢寛容性機構におけるVISTAに対する重要な役割を示す（図53）。

【0745】

〔0157〕 従って、前述のことに基づき、VISTAは、肺における吸入された抗原性及び微生物物質に対する免疫性の非常に重要なチェックポイント制御因子なので、VISTA中和は、アレルゲン吸入後、アレルゲン感作、T細胞サブセット発生及び肺の炎症を緩和するはずである。

【0746】

〔0158〕 また、VISTA-Igは、呼吸器寛容性誘導中の制御T細胞の発生、分化及び活性を調節するはずであり、肺胞マクロファージ、肺DC、T細胞及び制御T細胞に影響を与え、呼吸器寛容性を緩和するはずである。

【0747】

〔0159〕 喘息性の肺において、これは、大部分、慢性炎症に介在する免疫性のTh2及びTh17構成要素であり、一方でTh1及びTreg反応はアレルギーを阻害し、寛容性を促進する。肺の炎症は、上皮のバリア機能を低下させ、複数のアレルゲンに対するアレルギー性感受性を促進すると考えられる。

【0748】

〔0160〕 喘息動物モデル：寛容性誘導中のVISTA活性の中和

〔0161〕 発明者らのデータは、肺において、特に、吸入された物質に遭遇する最初の細胞である肺胞マクロファージ上でVISTAが強く発現され、呼吸器寛容性及び炎症中に上方制御されることを示す。喘息の処置におけるVISTA-Igの可能性を確認するために、50 μ gのOVAを4回、鼻腔内投与により負荷して、吸入OVAに対してC57BL/6マウスを寛容性にした13。持続性の寛容性の発現は、2週間後のOVA+TNF- α (1 μ g)とそれに続くOVAでの再負荷による動物の粘膜感作及び気道での炎症性細胞の評価及び細胞内サイトカイン分析によるT細胞サブセットの特徴評価によって確認される。

【0749】

10

〔0162〕 寛容性誘導におけるVISTAの役割を決定するために、300 μ gの抗VISTA 13F3中和抗体又は対照IgGでの処置下(i.p. 1日おきに)にある間にマウス(n=6)の群をOVAで同時に寛容化する。抗VISTA処置後、能動的寛容性の発現及びアレルギー反応性のFoxp3+Treg、IL-10分泌T細胞の存在及びTreg上でのヘリオス及びGARP発現を評価する。次に、能動的寛容性の発現を上記のように決定する。VISTA中和が既に確立された寛容性を破壊し得るか否かを決定するために、寛容化後2週間から開始して、OVA i.n. 負荷(週に3回)の繰り返しとともに、寛容化動物を抗VISTA又は対照IgGで処置する。2週間後、気道炎症、肺Th1/2/17 CD4細胞及び制御T細胞反応を決定する。既に記載のように、対照又は抗VISTA処置動物の反復OVA負荷とそれに続く、噴霧メタコリン吸入後の肺耐性及びコンプライアンスの測定によって、気道過敏活性の調節におけるVISTAの役割を決定する。

20

【0750】

〔0163〕 VISTA-/-マウスにおける気道ホメオスタシスの特徴評価

〔0164〕 発明者らの実験室で通常行われるように、BAL細胞のフローサイトメトリーによって、未処置C57BL/6-VISTA-/-マウス及び齢が一致した対照、VISTA+/+子孫において多くの気道及び肺マクロファージ/DC、T細胞、好中球、好酸球及びB細胞を調べる16。マルチカラーフローサイトメトリーによって、様々な気道細胞集団上でのMHCクラスII、CD80/86、CD40、阻害受容体CD200R及びPD-1ならびにVISTAの表面発現を評価する。LuminesサイトカインビーズアレイによってBAL上清中のサイトカインの休止レベルを決定する。次に、LPS (1 μ g/mL) + IFN- γ (50 ng/mL)での刺激から24時間後に、VISTA-/-及び対照BALから精製された肺胞マクロファージからのサイトカインの誘導性分泌を決定する。OVA-Alexa488標識アレルギーの鼻腔内滴下によって、続いて6時間後の肺組織細胞の洗浄、抽出及び組織常在細胞によるアレルギーの取り込みに対するフローサイトメトリーによって、呼吸器上皮のバリア機能を決定する。炎症性事象による肺ホメオスタシスの動揺の結果、上皮を横切るアレルギー取り込みが増加する。

30

【0751】

〔0165〕 アレルギー性気道疾患の2種類のモデルが使用される(i)上記のようなOVA $\pm$ TNF- α i.n.での粘膜感作と、それに続く50 μ gのOVAでの反復負荷及び(ii)ハウスダストダニでの反復処置(HDM、Allergen、25 μ g i.n., 記載のように週に3回)17。HDMは固有のアジュバント活性を有し、英国で喘息において観察される最も顕著な感作であるので、より臨床的に意義のあるモデルとなり得る。しかし、誘導される反応のアレルギー特異性を確認することは困難である。両モデルを用いてVISTA-/-及び対照子孫において急性アレルギー性気道炎症を誘導し、気道への炎症性細胞の浸潤及び肺T細胞サイトカインプロファイルに記載のように決定する。以前のような肺機能試験によって気道機能亢進を評価する。発明者らの実験室で通常使用されるように、アレルギー特異的なIg ELISA又は総IgE ELISAによって、循環IgE、IgG1、IgG2a及びIgA血清反応の発現を測定する。BAL液性IgAレベルも決定する。最後に、発明者らは、疾患の急性期と比較してAHR及

40

50

び炎症が軽減される場合、V I S T Aがマウスの慢性アレルギー負荷後に現れる気道リモデリングを下方制御するか否かを決定する。V I S T A－／－又は対照マウスを上述のように感作するが、i . n . 負荷は5週間継続する。以前のように気道炎症を決定し、組織学により気道壁肥厚、コラーゲン沈着及び平滑筋細胞肥厚化について肺切片を分析する。

【0752】

〔0166〕 肺での限定された白血球サブセットにおけるV I S T Aの制御的役割

〔0167〕 発明者らは、現在、限定された系列の造血細胞においてV I S T Aが条件的に欠失させられる新規のマウス系統を開発している。別の研究の一部として、T細胞増殖性反応、T r e gの抑制性の活性及びT h 1、T h 2、T h 1 7及びC D 8 T細胞の分化における様々な細胞型上でのV I S T Aに対する役割の詳細な特徴評価は進行中である。予備的データは、F o x p 3 + T r e g上で発現されるV I S T Aがそれらの抑制活性に寄与することを示す。それぞれC D 4及びC D 8 T細胞、D C、骨髄細胞及びF o x p 3 + T r e gに対する突然変異を標的とするために、次の系列特異的なプロモーター：L c k、C D 1 1 c、L y z M及びF o x p 3下でC r eリコンビナーゼを発現する動物とV I S T A f l o x / f l o xマウスを交配させる。V I S T A－／－動物で上記で決定されたように、休止気道集団の何らかの異常について、及び以前のように呼吸器寛容性の欠如について、得られたコロニーからP C R－スクリーニングされた子孫を試験する。次に、V I S T A－I g融合物を用いて呼吸器寛容性誘導についてこれらの群を試験する。

【0753】

〔0168〕 アレルギー性気道疾患におけるV I S T A経路の治療的標的化

〔0169〕 可溶性型のV I S T A－I g融合タンパク質は、インビトロで抑制性ではないが、プラスチックと結合させた場合、T細胞反応を阻害する6。可溶性V I S T A－I gはF c Rに対する結合ドメインを欠くので、これはインビボでA P Cに結合しないか又は抑制効果を発揮しない。従って、別個に援助を受けたプロジェクトにおいて、発明者らは、E . コリ（E . c o l i）で発現され、再折り畳みされ、封入体から精製されているコンストラクトを用いてV I S T A細胞外ドメインの非共有オリゴマーを開発している。T細胞増殖及びT r e g分化アッセイにおいて、免疫抑制活性についてV I S T Aの四量体、五量体又は七量体を試験する。これらの試薬が入手可能になったら、発明者らは、V I S T A経路を治療的介入に対して標的化することが喘息であるか否かが実行可能であることを試験する。上記のようにC 5 7 B L / 6マウスにおいて急性アレルギー性気道炎症を誘導し、アレルギー負荷と並んで動物群を5から1 0 0 µ gの選択されたV I S T Aオリゴマー（又は負の対照としてのV I S T A－I g）でi . n . 処置する。気道炎症及びT r e g介在性免疫寛容原性反応を決定する。V I S T Aオリゴマーが炎症を阻害するか又は寛容性を誘導する場合、気道機能亢進及びH D M誘導性炎症のさらなる研究を行う。最終的に、発明者らは、このような治療が確立された炎症を消散させ得るか否かを決定するために疾患の急性期の後までV I S T A－オリゴマー処置を遅らせる。慢性期までアレルギー負荷とともにV I S T Aオリゴマーを与え、対照及びV I S T A標的化マウスにおいて気道炎症及びリモデリングを評価する。

【0754】

実施例 3 6

〔0156〕 シグナル伝達経路上でのV I S T Aの効果

〔0154〕 T C R誘導性E R K及び他のシグナル伝達経路分子におけるV I S T Aの影響を評価するために、実験を行った。これらの実験は、癌及び自己免疫疾患の処置において適応がある、ある一定のシグナル伝達経路の調整として行った。例えば、C M Lの処置のために使用されるイマチニブは、癌に影響を与えるシグナル伝達経路におけるその影響ゆえに臨床的に有効である抗体の実例となるものである。

【0755】

〔0155〕 これらの実験において、2 . 5 µ g / ウェルの抗C D 3抗体（2 C 1 1）＋1 0 µ gの対照I g G又はV I S T A－I gの何れか（1 : 4の比率）で2 4ウェルプレ

ートを被覆し、ウェルを40℃で一晩温置した。次に血清飢餓精製マウスCD4+T細胞を用いて様々な時間にわたり37℃でウェルを刺激した。

【0756】

〔0156〕 この細胞を回収し、Fyn、Lck、ZAP70、LAT、GRB2、Vav、Ras、P38、JNK、ERK1/2を含むTCRシグナル伝達経路におけるリン酸化タンパク質についてウエスタンブロットを介して規定の時間点でTCRシグナル伝達カスケードにおける影響を評価した。これらの実験を図54で図示する。

【0757】

〔0157〕 図55のプロットは、CD3刺激後の様々な時間点でのpErkレベルを示す(VISTA-Ig又は対照IgGなし：活性化時間経過)。ローディング対照は、図56に含有される。

10

【0758】

〔0158〕 図57のデータにより示されるように、VISTAはERK1/2活性化を阻害する。一方、図58のデータにより示されるように、VISTAはpJNK活性化に影響を与えない。特に、これらの実験の結果は、10分後にVISTAが選択的にTCR誘導性p-ERKを抑制したことを示す。従って、p-ERK発現及びシグナル伝達経路を調整するために、VISTAアゴニスト及びアンタゴニストを使用し得る。

【0759】

実施例37：MLRの抑制におけるVISTA-Igの使用
MLR実験で使用される材料及び方法

20

〔0159〕 方法：A) 健康なヒト血液ドナーからのPBMCを用いてヒトMLRを96ウェルU底プレートに用意した。精製ヒト又はマウスVISTA-Igタンパク質でプレートを4℃で一晩被覆した。

【0760】

〔0160〕 刺激装置である細胞に4000radで放射線照射した。VISTA-Igの存在下及び非存在下で各ウェルで10⁵「反応物」細胞を10⁵「刺激装置」細胞と混合した。

【0761】

〔0161〕 ヒト及びマウスVISTA-IgコンストラクトによるMLRの抑制
〔0162〕 ヒト及びマウスMLR実験の結果はそれぞれ59A及び59(B)に含有される。この実験において、上記のように健康なヒトドナーからのPBMCを用いて標識(A)ヒトMLRを96ウェルU底プレートに用意した。精製ヒト又はマウスVISTA-Igタンパク質でプレートを4℃で一晩被覆した。刺激装置である細胞に400radで放射線照射した。ヒト又はマウスVISTA-Igの存在下及び非存在下で各ウェルで10⁵「反応物」細胞を10⁵「刺激装置」細胞と混合した。3H-チミジンを用いて細胞増殖を測定した。図59(B)で示されるマウスMLR実験において、マウス脾臓細胞を用いたことを除き実質的に同様に実験を行った。

30

【0762】

〔0163〕 これらの実験において、図59(A)及び(B)で示される指示された濃度でhV-Ig(ヒトVISTA-Ig)、mV-Ig(マウスVISTA-Ig)をMLRに添加した。これらの実験で使用したヒトVISTA-Igコンストラクトに対する配列は下記でさらに提供される。

40

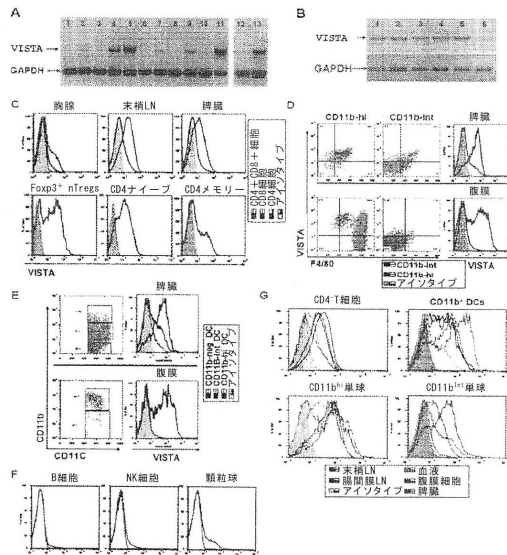
〔0164〕 FKVATPYSLYVCPGQNVTLTCRLLGPVDKGHDVTIFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLEASDDHGNFSITMRNLTLDSGLYCCLVVDIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPSNVCVVPSSSQESENITAADPGGGGRLVPRGFGTGDPEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPTPIEKTKSKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号75)

【0165】 結果

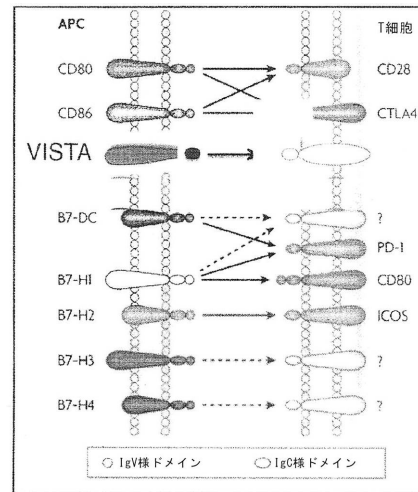
〔0166〕 図59(A)及び(B)で示されるように、試験した組み換えヒトVISTA

50

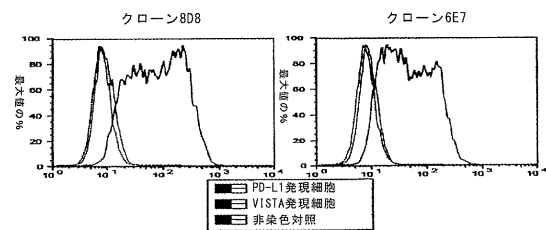
【図 3】



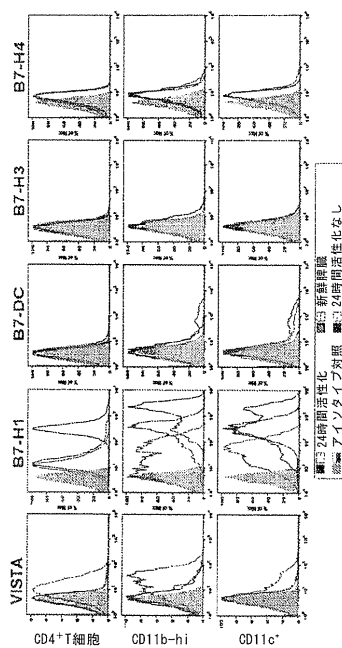
【図 4】



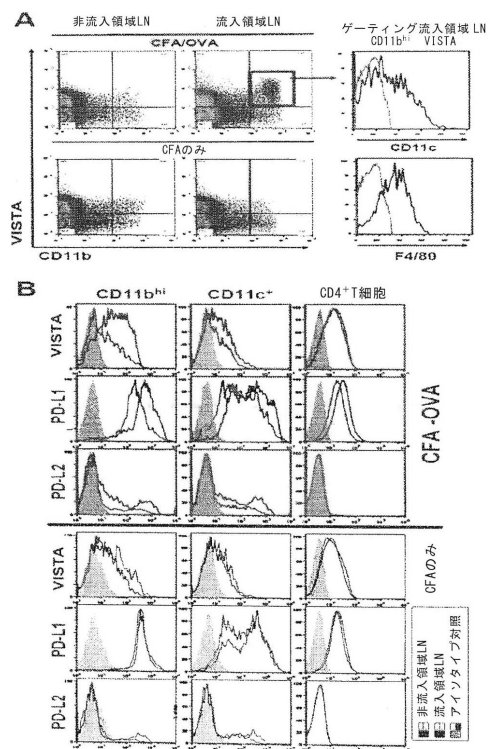
【図 5】



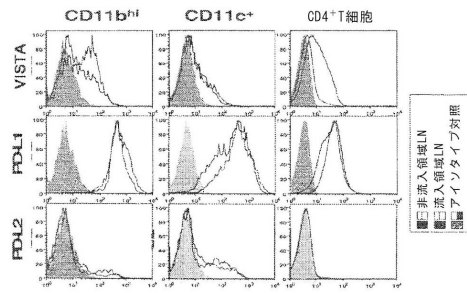
【図 6】



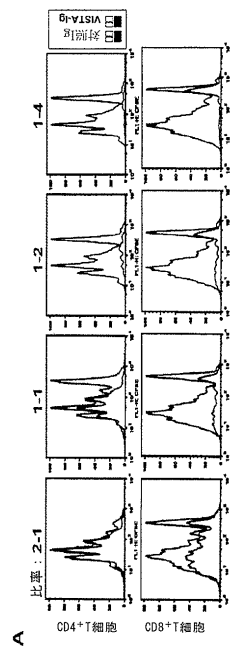
【図 7】



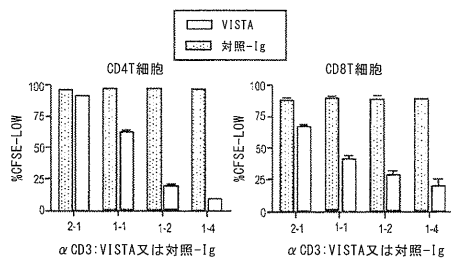
【図 8】



【図 9 A】



【図 9 B】



【図 9 C】

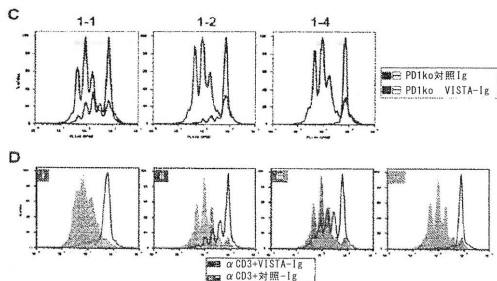
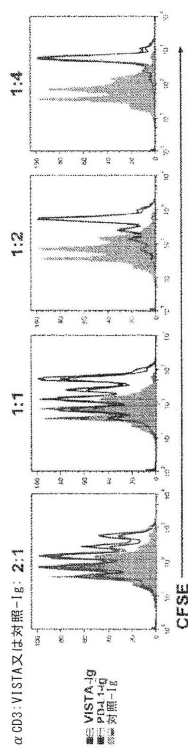
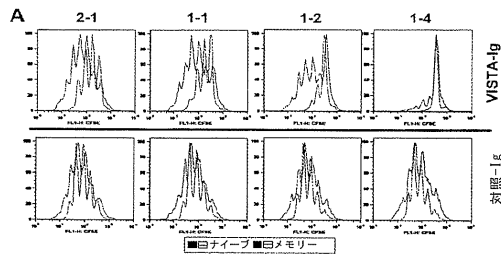


図 9 C、9 D

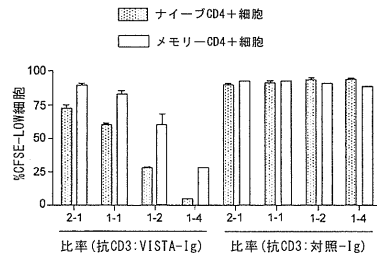
【図 10】



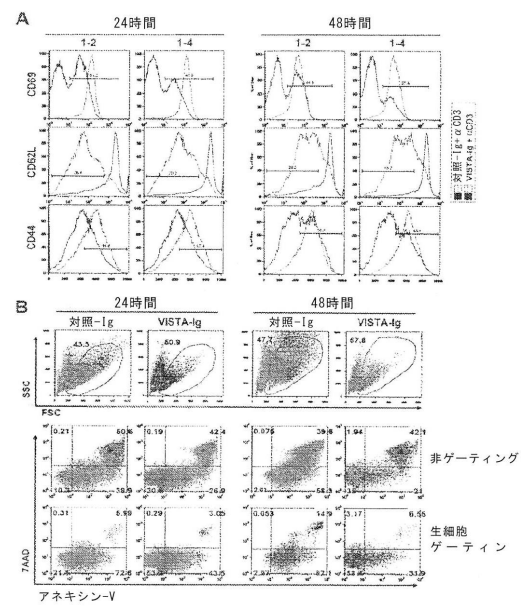
【図 1 1 A】



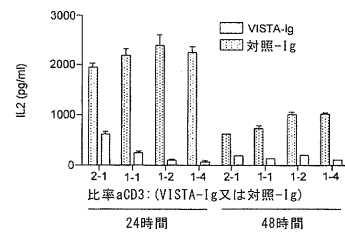
【図 1 1 B】



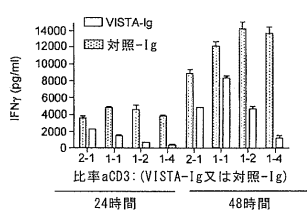
【図 1 2】



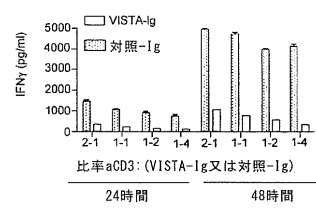
【図 1 3 A】



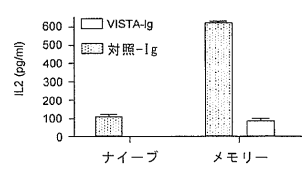
【図 1 3 B】



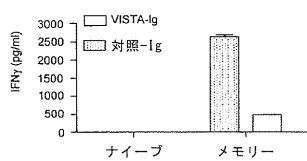
【図 1 3 E】



【図 1 3 C】



【図 1 3 D】



【図 1 4 - 1】

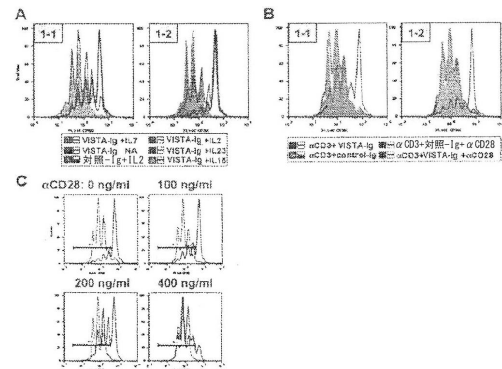


図 1 4 A、B、C

【図 14-2】

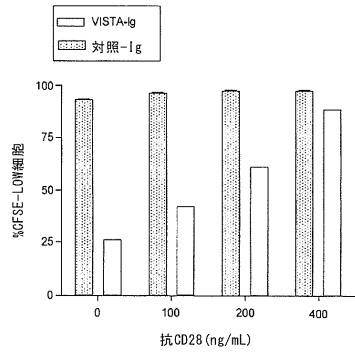
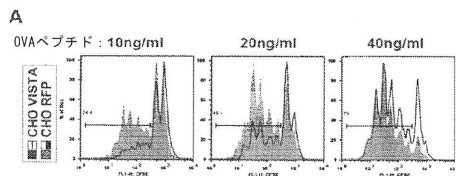
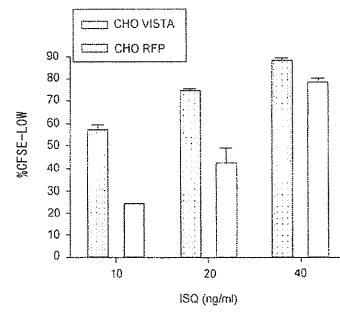


図 14 D

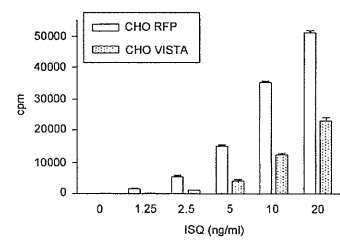
【図 15 A】



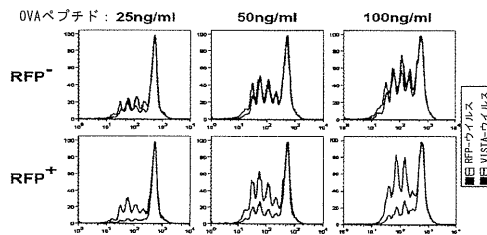
【図 15 B】



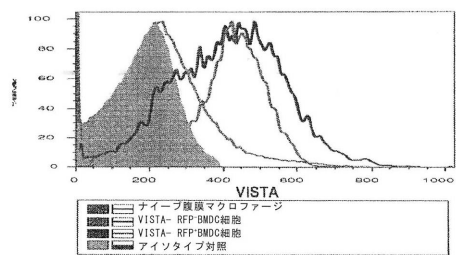
【図 15 C】



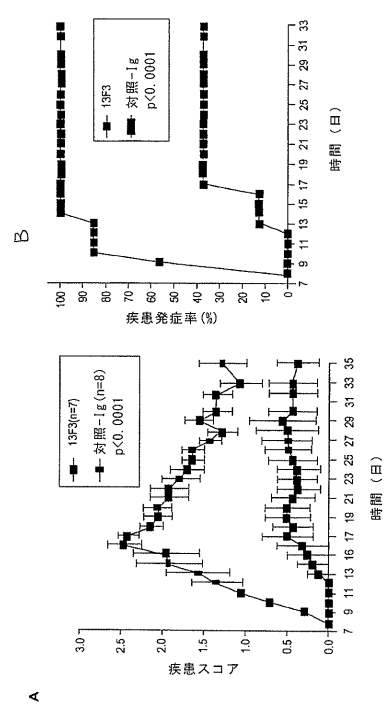
【図 15 D】



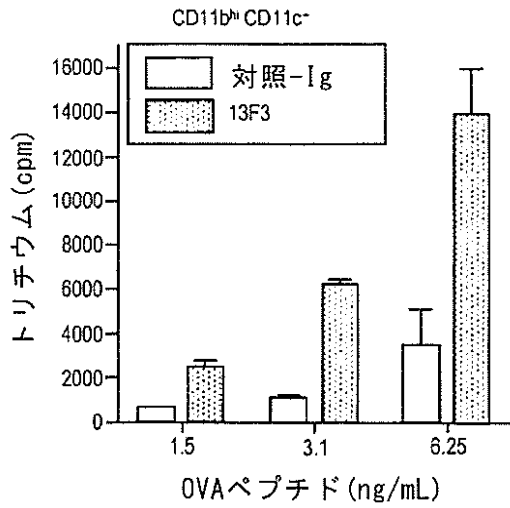
【図 16】



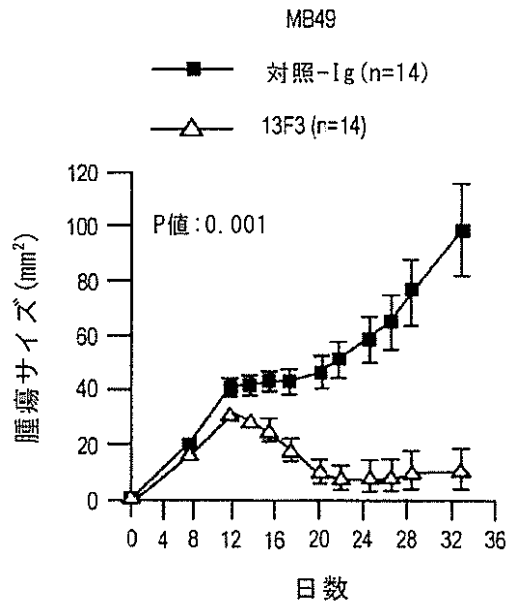
【図 17】



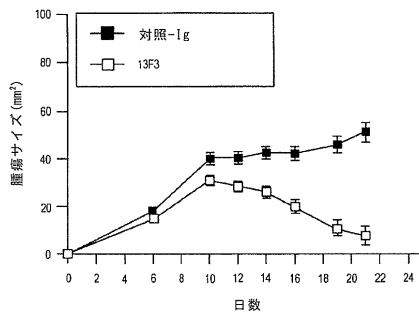
【図 18】



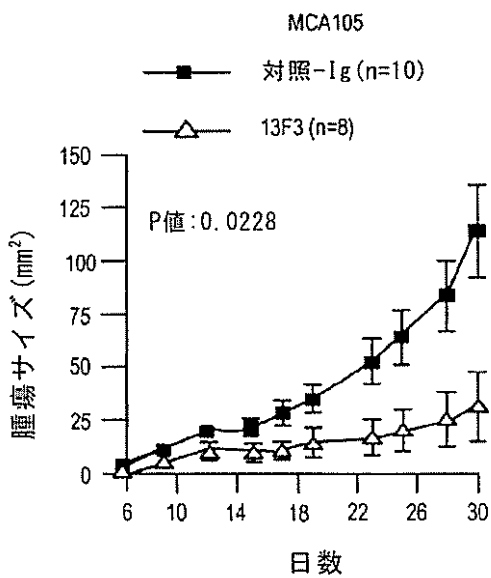
【図 20 A】



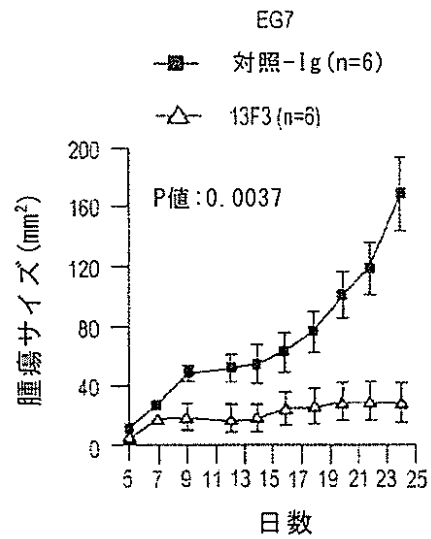
【図 19】



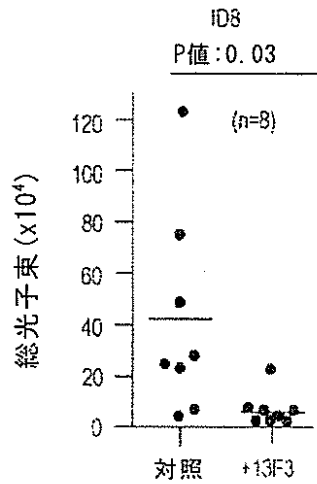
【図 20 B】



【図 20 C】

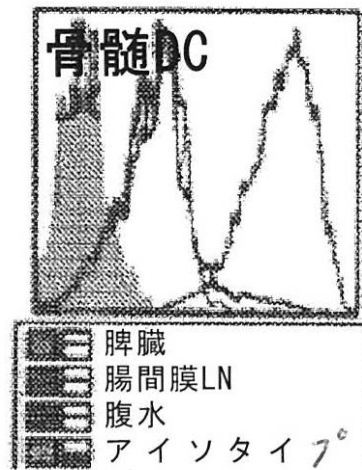


【図 20 D】

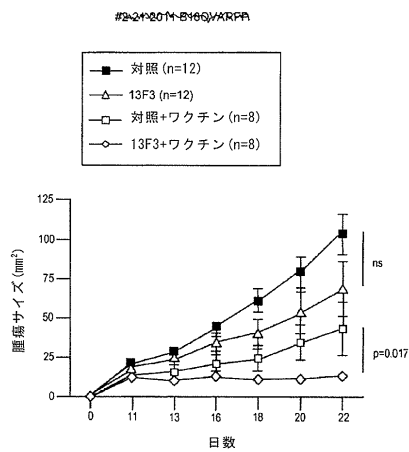


【図 20 E】

E. MDSC



【図 21】



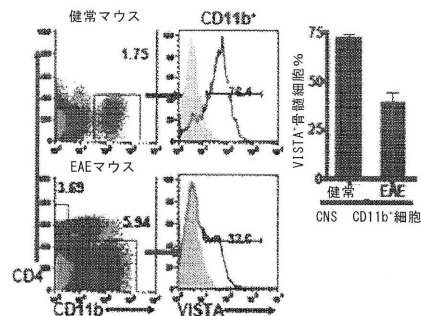
【図 23 A】

MGVPAVPEASSPRWGTLLAIFLAASRGLVAAPKVTTPSYLYVCEPQGNATLTC
RILGPVSKGHVDITYKTWYLSRRGEVQMCCKEHRPNFTLQHLQHGHSHLKAN
ASHDQPKHGLASDHGHNFTLRNVTFRDGLYGLVIELKNHHPEQRFPYG
SMELOVQAGKGSSTQMASNEQDSSTAAALATGACVGLCLPLLLLYKGRQ
VASHRRACELVRMDSSNTQGIENPGFETTPFQGMPEAKTRPPLSYVAQRQPS
ESGRYLLSDPSTPLSPPGGVDFPSPDVPDPSNSEA

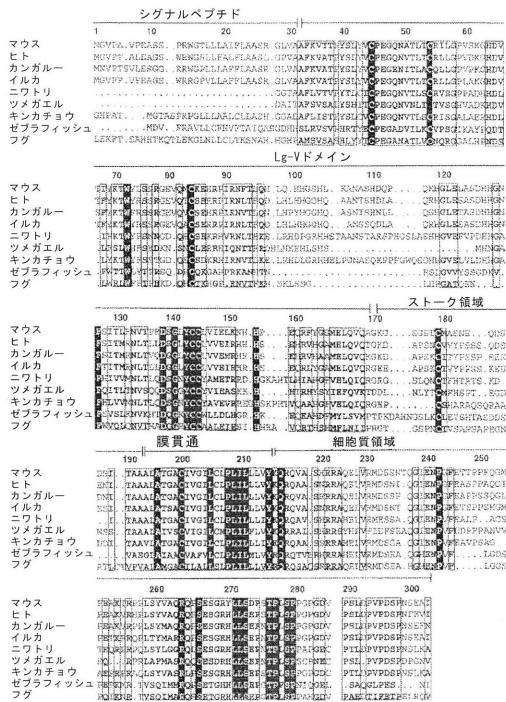
【図 23 B】

VISTA
PD1L1
PD1L2
B7H4
B7H3
VISTA
PD1L1
PD1L2
B7H4
B7H3
VISTA
PD1L1
PD1L2
B7H4
B7H3

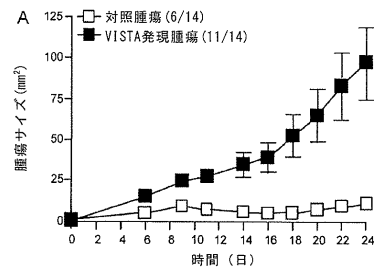
【図 22】



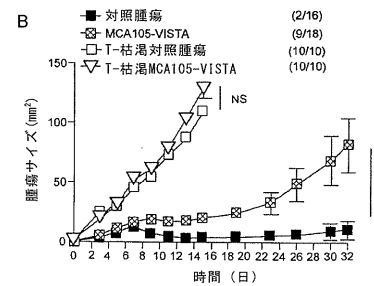
【図 2 3 C】



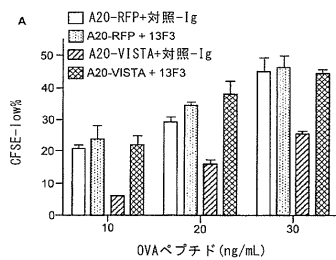
【図 2 4 A】



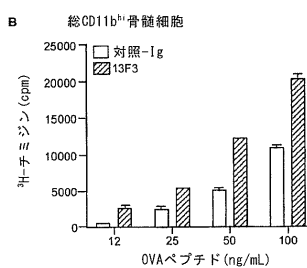
【図 2 4 B】



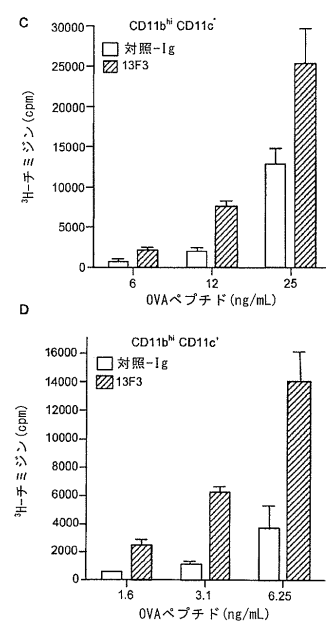
【図 2 5 - 1】



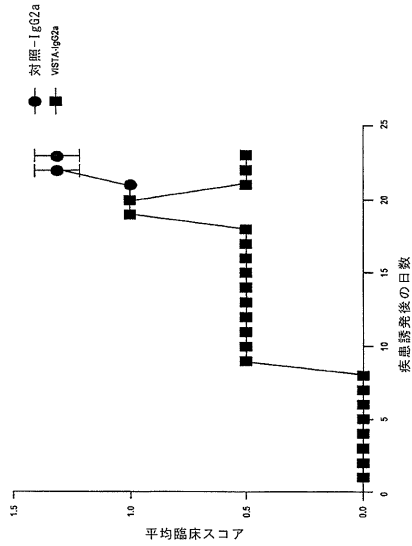
【図 2 5 - 2】



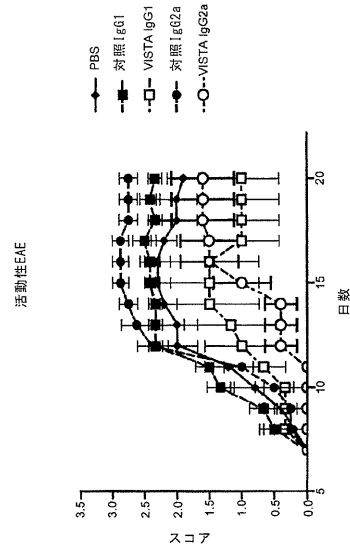
【図 2 5 - 3】



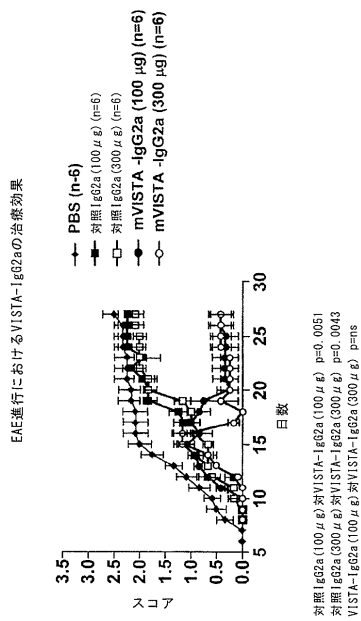
【图 2 6】



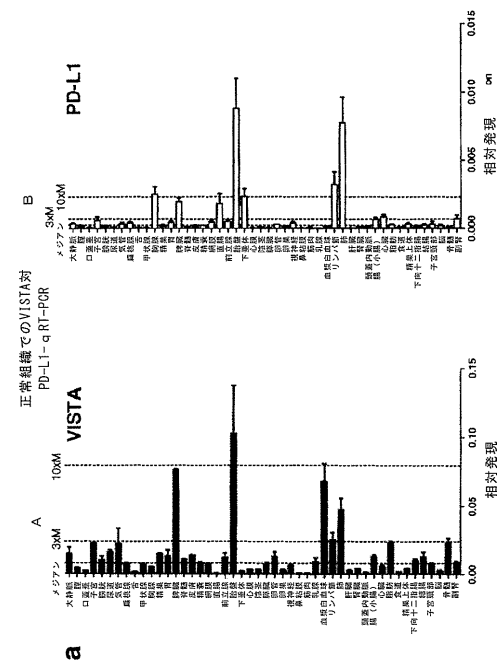
【図 27】



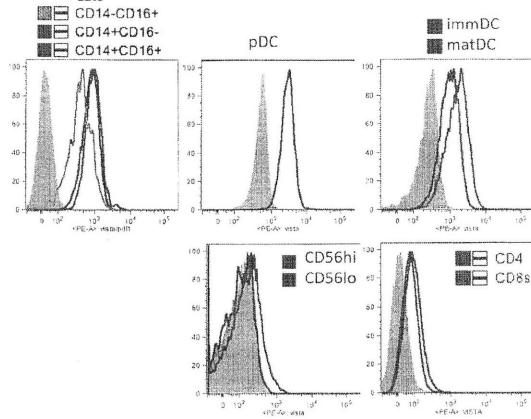
【図 28】



【图 29】

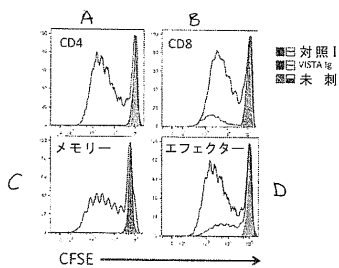


【図 30】



【図 31】

VISTAはT細胞に対して抑制性である。



【図 33-2】

VISTA-Igは、FoxP3変換を増加させる。

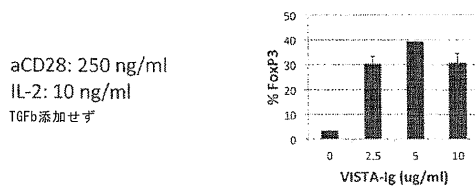
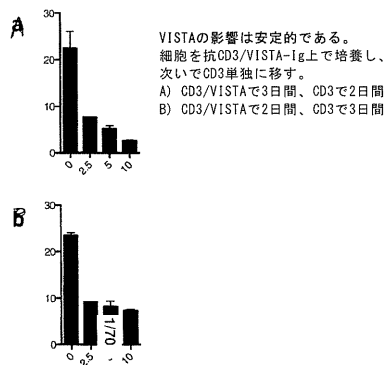


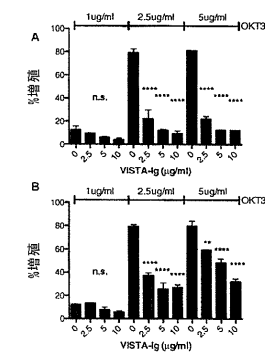
図 33 D

【図 34】



【図 32】

ヒトCD4におけるヒト対マウスvistaの滴定



【図 33-1】

VISTA処理細胞は、活性化のマーカーを発現しない。

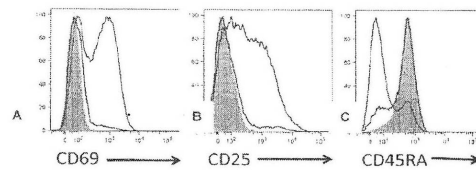
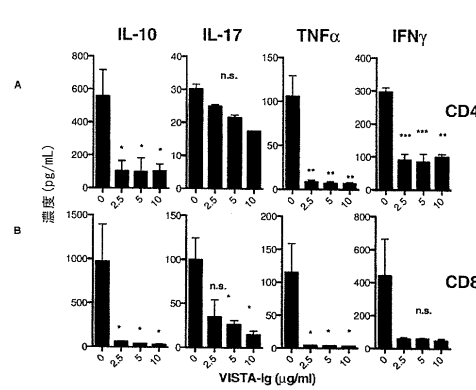


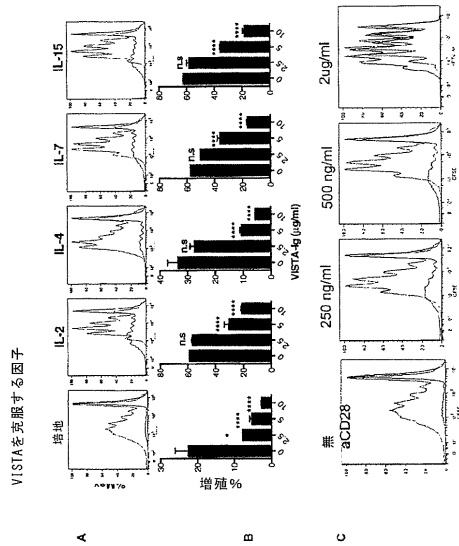
図 33 A-C

【図 35】

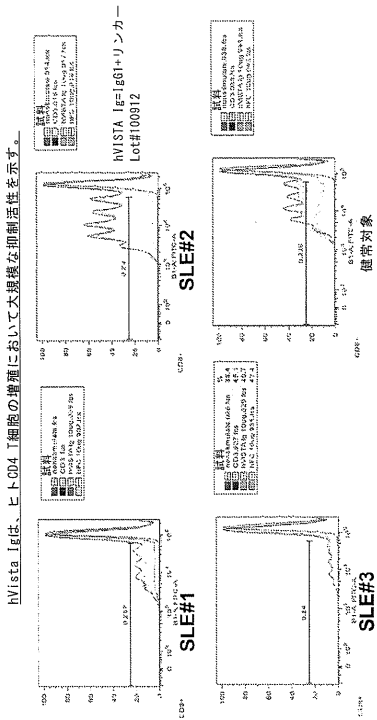
VISTAは、サイトカイン産生を減少させる。



【図 3 6】

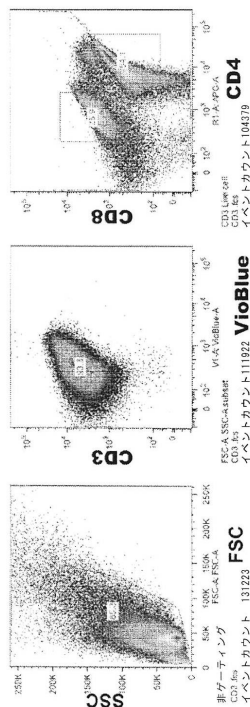


【図 3 7】



ヒト対照対象及び狼瘡患者CD4⁺T細胞におけるCFSE増殖アッセイ
-2.5 μ g/mL CD3とともにhVISTA 1gで同時処理した。
-hVISTA 1gは、対照Fc群と比較した場合、ヒト対照対象および狼瘡対象の両方で10 μ g/mLで最大抑制を示す。

【図 3 8】



【図 3 9】

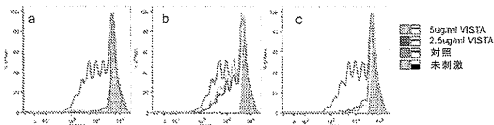


图 39 A-C

VISTA-Ig 活性におけるリンカー可動性の影響。CFSE 標識ヒト T 細胞を 2.5 μ g/mL プレート結合抗 CD3 及び対照 Ig または VISTA-Ig の何れかの存在下で 5 日間培養した。a) 配列 1 からの huVISTA-Ig。b) 可動性リンカーを欠く配列 2 からの huVISTA-Ig。c) セリン/グリシンリンカーがある配列 3 からの huVISTA-Ig

【図 40】

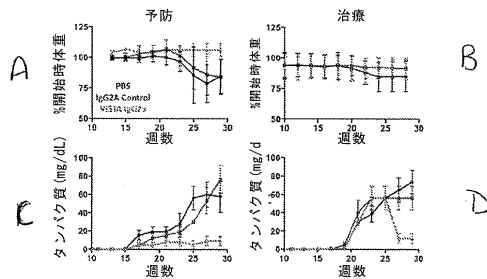


图 40

予防研究に対して、PBS、150 μ g対照-IgG2aとmVISTA-IgG2aで1日おきにNZBWF1雌マウスを8週齢から処置した。治療研究の場合は24週で処置を開始した。体重減少及び蛋白尿により疾患重症度を毎週監視した。データを平均±SEとして示す。対照-IgG2aとmVISTA-IhG2aとの間の統計学的有意差を判定した；対応のないマン・ホイットニー二検定により $p=0.0027$ （予防）及び $p=0.0156$ （治療）。

【図 4 1】

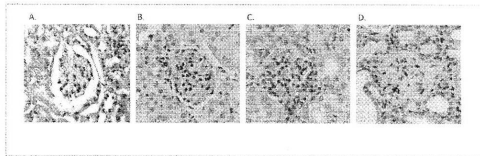
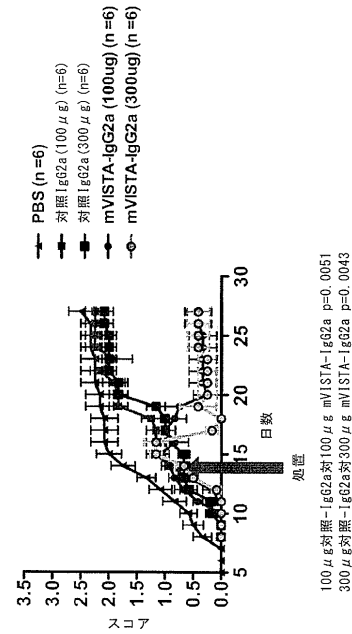


図 4 1

A. 組織学的に正常なBW系球体。B. 中度の糸球体の炎症があるVISTA-IgG2a処置マウス。C. 強い炎症及びうっ滞がある対照IgG2a処置マウス。D. ほぼ完全に糸球体が閉塞している別の対照IgG2a処置マウスからの個々の糸球体の腎臓の、代表的なH&E染色高倍率切片

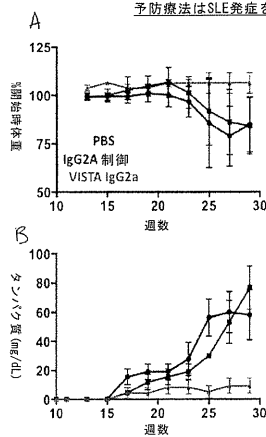
【図 4 2】

活動性EAEにおけるVISTA-IgG2aの治療効果



【図 4 3】

予防療法はSLE発症を防ぐ。

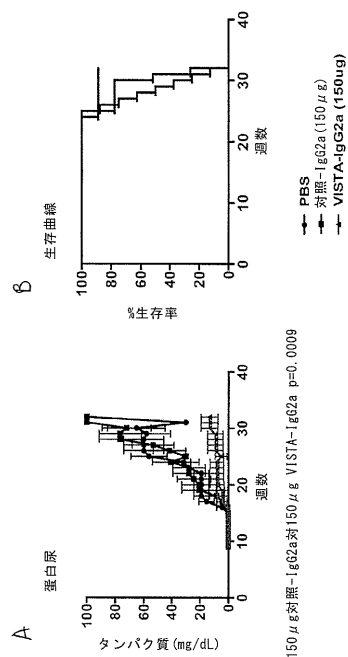


NZB/NZWf1

予防研究に対して、8週齢からNZB/NZWf1雌マウスにPBS、150 μg対照-IgG2a又はmVISTA-IgG2aで1日おきに処置した。体重減少及び蛋白尿により疾患重症度を毎週監視した。データを平均±SEMとして示す。対照IgG2aとmVISTA-IgG2aとの間の統計学的有意差を判定した：対応のないマン・ホイットニー検定によりp=0.0027(予防)。N=7。

【図 4 4】

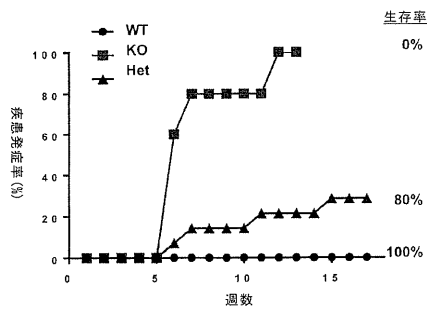
予防療法は生存を促進する。



VISTA-IgG2aでの予防的処置は、NZB/NZWf1マウスにおいて蛋白尿を防ぐ。
8週齢のNZB/NZWf1雌マウスを蛋白尿について毎週監視し、PBS、150 μg対照-IgG2a又は150 μg mVISTA-IgG2aで1日おきに処置した。蛋白尿により疾患重症度を毎週監視した。データは平均±SEMとして示し、これは1回の実験の代表例である。対応のないマン・ホイットニー検定により、対照IgG2aとmVISTA-IgG2aとの間の統計学的有意差を判定した：p=0.0009。

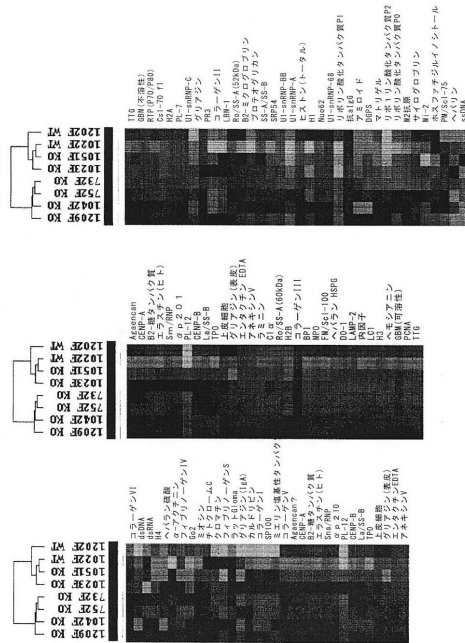
【図 4 5】

TCR Tg/VISTA^{-/-}マウスにおけるEAEに対する易罹患性の上昇



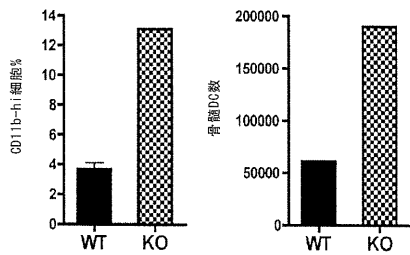
【図 4 6】

雌VISTA K0マウスにおけるIgG自己抗体の上昇



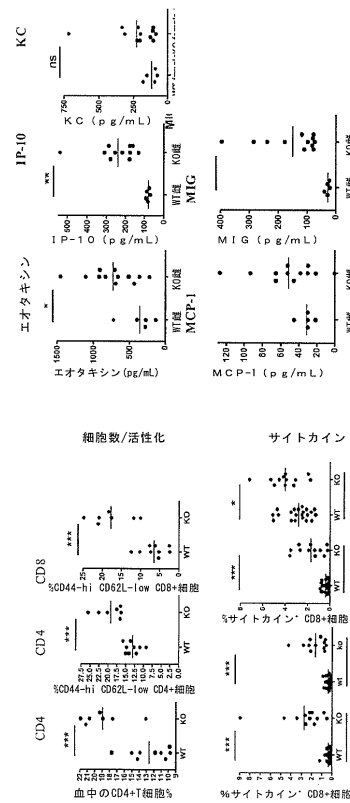
【図 47】

RAG^{-/-}VISTA^{-/-}マウスにおける骨髄造血の上昇



【図 48】

VISTA^{-/-}マウスの炎症表現型



【図 49】

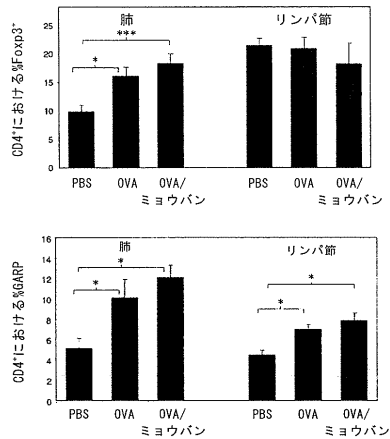


図 49

OVAに対する寛容性および感作の両方が、標的組織でFoxp3⁺Tregを増加させ、流入領域リンパ節でTregを活性化させる。OVA/ミヨウバンアジュバント、あるいは一定のOVA単独(寛容化)又はPBS処置でマウスを感作した。第7、10、11及び12日に50μg OVA又はPBSを用いて鼻腔内投与を行った。第13日に、n=5で肺及び流入領域リンパ節細胞を核内Foxp3又は表面GARPについて染色した。

【図 50】

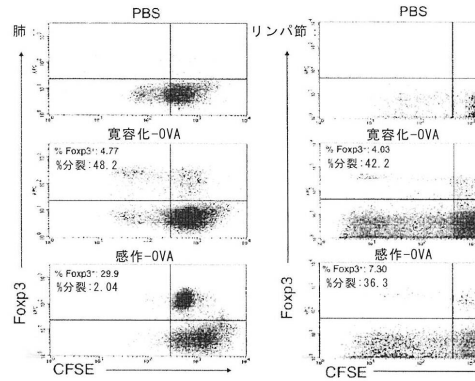


図 50

肺Tregはアレルゲンに無反応である。全体を通して図1のようにOVA/ミヨウバンアジュバント(感作)、OVA単独(寛容化)又はPBS処置によりマウスに免疫付与した。第13日に肺及び流入領域リンパ節細胞をCFSEで標識し、アレルゲンの存在下で4日間培養し、続いて核内Foxp3染色を行った。いくつかの独立した実験で同様のデータが得られた。

【図 51】

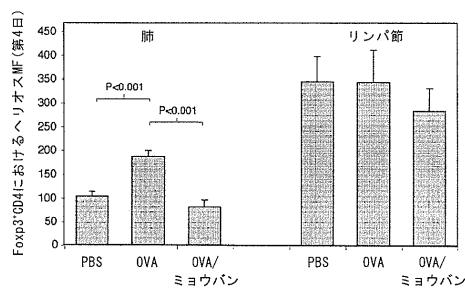


図 51

Foxp3⁺Tregにおけるヘリオス発現は炎症性組織で減少するが、流入領域リンパ節では減少しない。図50におけるように、核内ヘリオス発現について肺及びリンパ節細胞を染色した。

【図 52】

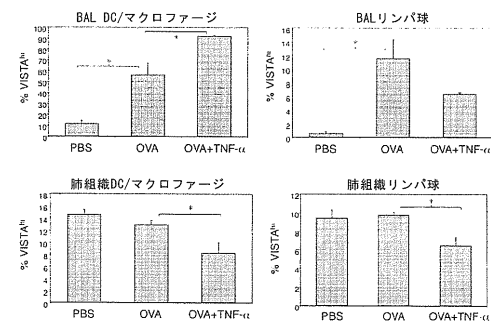


図 52

寛容性誘導中及びアレルゲン感作中の両方で肺マクロファージ上でVISTAが高発現される。肺の炎症を誘発するために、マウスにアレルゲン単独(OVA、寛容化)又はアレルゲン+粘膜アジュバント(OVA+TNF-α)の4回のi.n.投与を行った。最終負荷24時間後に、モノクローナルVISTA Abで、マクロファージ/DC(1-Ab⁺CD11c⁺)又はリンパ球(CD3⁺/B220⁺)のマーカーについて、BAL又は肺組織細胞を染色した。2回の独立した実験で同様のデータが得られた。

【図 5 3】

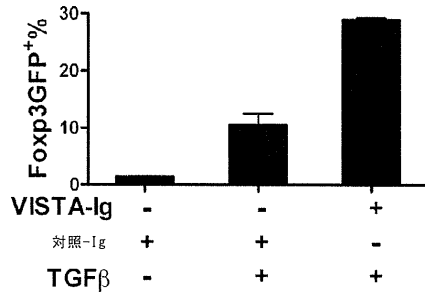
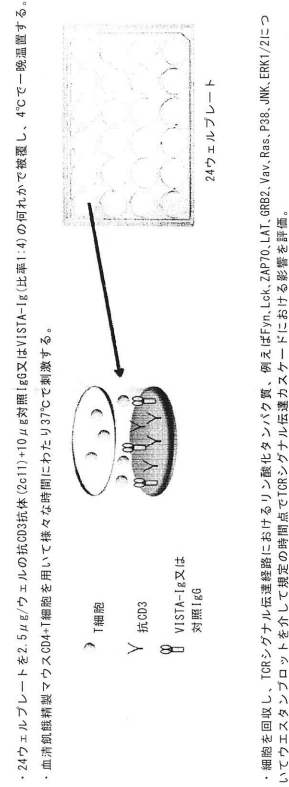


図 5 3

固定化されたVISTA-Ig融合タンパク質はインビトロでのFoxp3-発現TregのTGF-β 介在性誘導を促進する。指定されるように、プレート結合抗CD3 (5 μg/mL) ± TGF-β (1 ng/mL) 及び対照-Ig又はVISTA-Ig (2.5 μg/mL) の何れかとともに、Foxp3-レポーターマウスからの選別Foxp3GFP⁺CD25⁺ナイーブCD4⁺T細胞を培養した。Foxp3発現細胞の誘導について72時間後に細胞を調べた。

【図 5 4】

図 5 4
VISTA活性のホスホブロットアッセイ

【図 5 5】

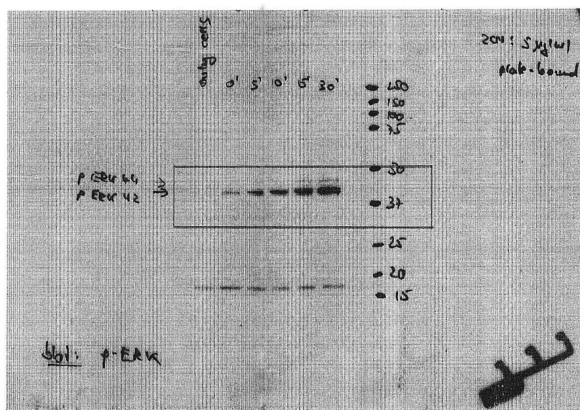


図 5 5

CD3刺激後の様々な時間点でのpErkレベルのプロット
(VISTA-Ig又は対照IgGなし: 活性化の時間経過)

【図 5 6】

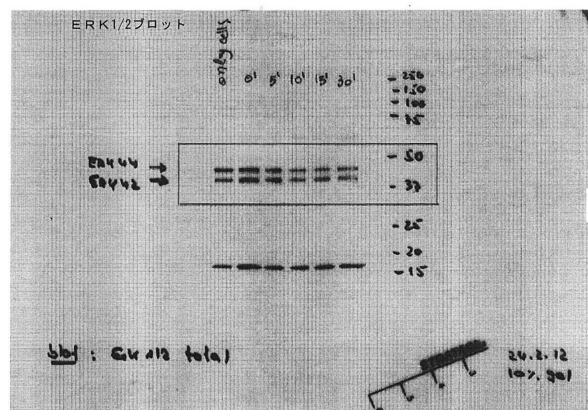


図 5 6

ローディング対照: 同じ時間点、総合

【図 5 7】

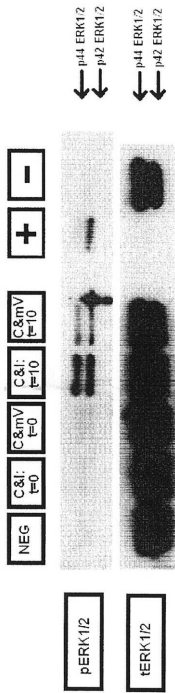


図 5 7

VISTAはERK1/2活性化を阻害する。

【図 5 8】

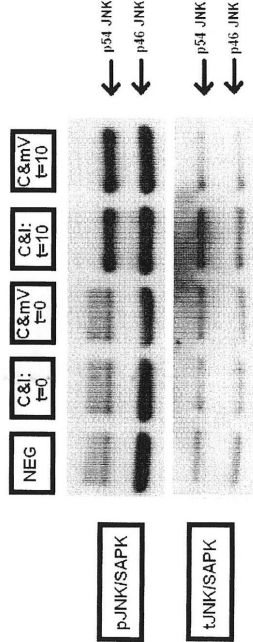
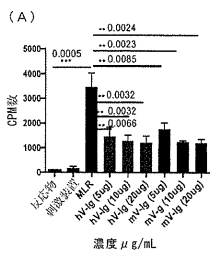


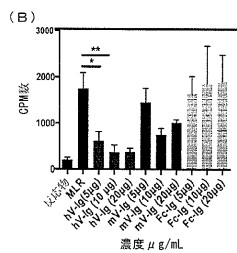
図 5 8

VISTAはJNK活性化を阻害しない。

【図 5 9】



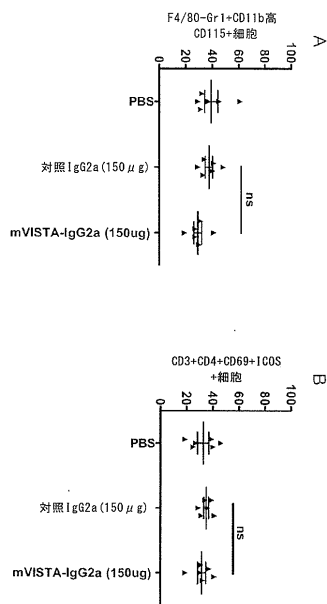
ヒト及びマウスVISTA-Igタンパク質の両方が、インビトロでヒトMLR反応を抑制する。hV-Ig(ヒトVISTA-Ig)、mV-Ig(マウスVISTA-Ig)を指示濃度でMLRに添加した。



ヒト及びマウスVISTA-Igタンパク質の両方が、インビトロでマウスMLR反応を抑制する。hV-Ig(ヒトVISTA-Ig)、mV-Ig(マウスVISTA-Ig)及びFc-Ig(対照)を指示濃度でMLRに添加した。

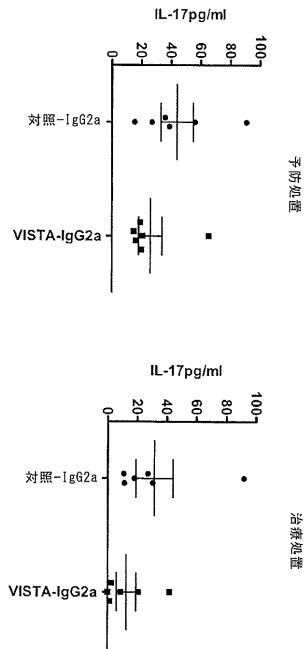
【図 6 0】

MLRにマウスにおける予防的VISTA-IgG2aの効果を1日おきにPBS、150 μ gの対照-IgG2a又はmVISTA-IgG2aで処理した20週齢のマウスから全血を回収し、(A)炎症性単核及び(B)T細胞を同定するために、全血を溶血させ、蛍光標識化抗体で染色した。フローサイトメトリ分析によって細胞集団を決定した。



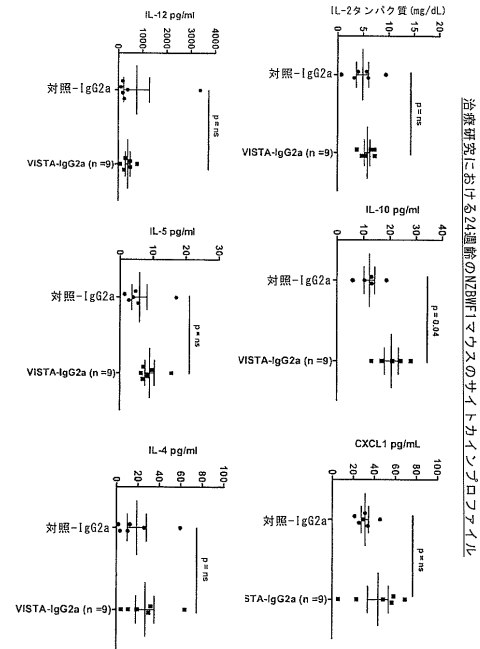
処理は細胞頻度を変化させない。

【図 6 1】



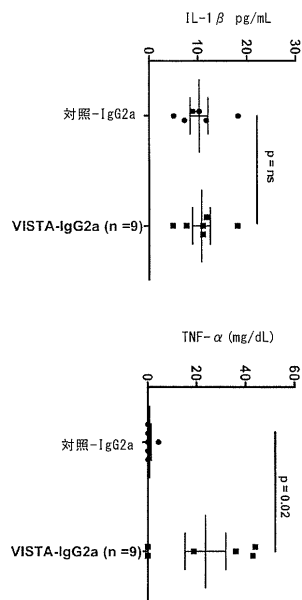
VISTA-IgGで処置した24週齢のNZBWF1マウスの血清中のIL-17レベル

【図 6 2】



治療研究における24週齢のNZBWF1マウスのサイトカインプロファイル

【図 6 3】



治療研究における24週齢のNZBWF1マウスのサイトカインプロファイル

【配列表】

0006285923000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	38/00	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	35/57	(2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	36/06	(2006.01)	A 6 1 K	35/57	
A 6 1 K	35/74	(2015.01)	A 6 1 K	36/06	
A 6 1 K	35/65	(2015.01)	A 6 1 K	35/74	
A 6 1 K	35/64	(2015.01)	A 6 1 K	35/65	
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/64	
A 6 1 K	31/4706	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	A
A 6 1 K	31/573	(2006.01)	A 6 1 K	31/4706	
A 6 1 K	31/675	(2006.01)	A 6 1 K	31/573	
A 6 1 K	31/52	(2006.01)	A 6 1 K	31/675	
A 6 1 K	31/343	(2006.01)	A 6 1 K	31/52	
A 6 1 K	31/42	(2006.01)	A 6 1 K	31/343	
A 6 1 K	31/519	(2006.01)	A 6 1 K	31/42	
A 6 1 K	31/192	(2006.01)	A 6 1 K	31/519	
A 6 1 K	31/137	(2006.01)	A 6 1 K	31/192	
A 6 1 K	31/167	(2006.01)	A 6 1 K	31/137	
A 6 1 K	31/56	(2006.01)	A 6 1 K	31/167	
A 6 1 K	31/47	(2006.01)	A 6 1 K	31/56	
A 6 1 K	31/404	(2006.01)	A 6 1 K	31/47	
A 6 1 K	31/352	(2006.01)	A 6 1 K	31/404	
A 6 1 K	31/46	(2006.01)	A 6 1 K	31/352	
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 K	31/46	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	5/00	
A 6 1 P	5/38	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	5/38	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	9/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/06	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/08	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	

A 6 1 P 11/08	(2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 11/16	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/02	(2006.01)	A 6 1 P 11/08	
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 11/16	
A 6 1 P 15/08	(2006.01)	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 15/10	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 P 15/10	
A 6 1 P 17/04	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/14	(2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 21/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 25/06	(2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 27/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 31/06	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/10	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/06	
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 31/20	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/06	(2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 33/10	(2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 33/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/06	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 33/10	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 33/12	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 39/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 25/04	(2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 19/04	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 5/50	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 13/10	(2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 3/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 19/10	(2006.01)	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 5/50	

A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/10
A 6 1 P 15/02	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 7/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/04
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 P 19/10
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 15/06	(2006.01)	A 6 1 P 15/02
A 6 1 P 17/10	(2006.01)	A 6 1 P 7/10
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 P 27/12	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 27/04	(2006.01)	A 6 1 P 9/12
		A 6 1 P 15/06
		A 6 1 P 17/10
		A 6 1 P 25/14
		A 6 1 P 27/12
		A 6 1 P 27/04

(31)優先権主張番号 61/735,799

(32)優先日 平成24年12月11日(2012.12.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/663,969

(32)優先日 平成24年6月25日(2012.6.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/663,431

(32)優先日 平成24年6月22日(2012.6.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100101373

弁理士 竹内 茂雄

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(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ジェイズビー, 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

審査官 中村 勇介

(56)参考文献 国際公開第2011/120013 (WO, A1)

特表2003-508023 (JP, A)

特表2008-506635 (JP, A)

WANG L ET AL, VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses, THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, 2011年, Vol.208, p.577-592

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

A61K31/715

A61K38/00-38/58

A61K41/00-45/08

A61K48/00

A61K51/00-51/12

PubMed