

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-512120

(P2021-512120A)

(43) 公表日 令和3年5月13日 (2021.5.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 5 0
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 7 6
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 4
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16 B	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-541922 (P2020-541922)	(71) 出願人	520122600 バイオテクネ コーポレーション アメリカ合衆国 55413 ミネソタ州 、ミネアポリス、マッキンリー プレイス エヌイー 614
(86) (22) 出願日	平成31年2月1日 (2019.2.1)	(74) 代理人	110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	令和2年7月31日 (2020.7.31)	(72) 発明者	ゲッツ, クリスティーン アメリカ合衆国 55413 ミネソタ州 、ミネアポリス、マッキンリー プレイス エヌイー 614
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/016301	(72) 発明者	ハマーベック, クリストファー アメリカ合衆国 55413 ミネソタ州 、ミネアポリス、マッキンリー プレイス エヌイー 614
(87) 国際公開番号	W02019/152810	最終頁に続く	
(87) 国際公開日	令和1年8月8日 (2019.8.8)		
(31) 優先権主張番号	62/625, 594		
(32) 優先日	平成30年2月2日 (2018.2.2)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/627, 478		
(32) 優先日	平成30年2月7日 (2018.2.7)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

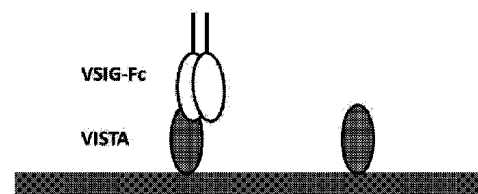
(54) 【発明の名称】 V I S T A と V S I G 3 との相互作用を調節する化合物ならびにその製造および使用方法

(57) 【要約】

V S I G 3 に結合するポリクローナルおよびモノクローナル抗体、V I S T A と V S I G 3 との相互作用を調節する化合物、ならびにポリクローナルおよびモノクローナル抗体および化合物を製造および使用方法が本明細書に記載される。V I S T A と V S I G 3 との相互作用を調節する化合物を導入することによって、V I S T A と V S I G 3 との相互作用を調節することを含む方法もまた、本明細書に記載される。

【選択図】 図 9 A

FIG. 9A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

VISTAとVSI G 3との相互作用を調節することを含む方法であって、VISTAとVSI G 3との前記相互作用を調節する化合物を導入することを含む、方法。

【請求項 2】

VISTAとVSI G 3との前記相互作用の前記調節が、VISTAとVSI G 3との前記相互作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

VISTAとVSI G 3との前記相互作用を調節することが、VISTAもしくはVSI G 3またはその両方の多量体化を調節することを含む、請求項 1 または 2 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 4】

VISTAが細胞の表面上で発現され、
VSI G 3が細胞の表面上で発現され、または
VISTAおよびVSI G 3の両方が細胞の表面上で発現される、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記化合物が抗VSI G 3抗体を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗VSI G 3抗体が、
表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体と同じVSI G 3エピトープに結合する抗体、または

20

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体、を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗VSI G 3抗体が、
前記表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体の重鎖可変領域、または

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体の軽鎖可変領域、のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 5 または 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

前記抗VSI G 3抗体が、
前記表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の重鎖可変領域のうちの 1 つ以上の相補性決定領域 (CDR) を含む重鎖可変領域、または

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の軽鎖可変領域のうちの 1 つ以上のCDRを含む軽鎖可変領域、のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗VSI G 3抗体が、前記表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体を含む、請求項 5 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記化合物が抗VISTA抗体をさらに含む、請求項 5 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記化合物が抗原結合フラグメントを含む、請求項 5 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 12】

前記化合物がVSI G 3ポリペプチドを含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 13】

前記化合物が、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 と少なくとも 80% の配列同一性を有するタンパク質を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記化合物が V S I G 3 の可溶性フラグメントを含む、請求項 12 または 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

前記化合物が V S I G 3 の細胞外領域を含む、請求項 12 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記化合物が配列番号 2 を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記化合物が融合タンパク質を含む、請求項 15 または 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

前記化合物が F c ドメインを含む、請求項 15 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記化合物が配列番号 3 を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記化合物が V I S T A ポリペプチドを含む、請求項 1 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記化合物が、配列番号 4、配列番号 5、または配列番号 6 と少なくとも 80% の配列同一性を有するタンパク質を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記化合物が V I S T A の可溶性フラグメントを含む、請求項 20 または 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

前記化合物が V I S T A の細胞外領域を含む、請求項 20 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記化合物が配列番号 5 を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記化合物が融合タンパク質を含む、請求項 20 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記化合物が F c ドメインを含む、請求項 20 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記化合物が配列番号 6 を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記化合物が、軟骨オリゴマー基質タンパク質 (COMP) のコイルドコイルドメインを含む、請求項 1 ～ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記 COMP がラット COMP またはヒト COMP である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記コイルドコイルドメインが、五量体コイルドコイルドメインである、請求項 28 または 29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

前記コイルドコイルドメインが、V S I G 3 ポリペプチドもしくは V I S T A ポリペプチドまたはその両方に共有結合している、請求項 28 ～ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記化合物がリンカードメインを含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記リンカードメインが、N S G G G S G G G T G (配列番号 1 3) もしくは L D R N L P P L A P L G P (配列番号 1 4) またはその両方を含む、請求項 3 2 の方法。

【請求項 3 4】

前記化合物がアルカリホスファターゼを含む、請求項 2 8 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記化合物が T E V 切断部位を含む、請求項 2 8 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記化合物が V I S T A と V S I G 3 との結合を阻害する、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記化合物が V I S T A シグナル伝達を阻害する、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記化合物が V S I G 3 シグナル伝達を阻害する、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記化合物が、C D 3 誘導性 I L - 2 産生、C D 3 誘導性インターフェロナー γ 産生、C D 3 誘導性 R A N T E S 産生、C D 3 誘導性 M I P - 1 アルファ産生、C D 3 誘導性 I L - 1 7 産生、もしくは C D 3 誘導性 C X C L 1 1 産生、またはそれらの組み合わせに影響を及ぼす、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記化合物が T 細胞増殖に影響を及ぼす、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記方法が、治療有効量の前記化合物で対象を処置することをさらに含む、請求項 1 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

V S I G 3 が、前記対象から得られた生物学的試料内に過剰発現される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

V S I G 3 に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 4 4】

前記抗体が、V S I G 3 - V I S T A 相互作用、V S I G 3 - V S I G 8 相互作用、V S I G 3 の多量体化、もしくは V I S T A の多量体化、またはそれらの組み合わせをブロックする、請求項 4 3 に記載の抗 V S I G 3 抗体。

【請求項 4 5】

前記抗体が、

表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体と同じ V S I G 3 エピトープに結合する抗体、または

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体、を含む、請求項 4 3 または 4 4 のいずれかに記載の抗 V S I G 3 抗体。

【請求項 4 6】

抗 V S I G 3 抗体が、

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体の重鎖可変領域、または

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体の軽鎖可変領域、のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の抗 V S I G 3 抗

10

20

30

40

50

体。

【請求項 47】

抗 V S I G 3 抗体が、

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の重鎖可変領域のうちの 1 つ以上の相補性決定領域 (C D R) を含む重鎖可変領域、または

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の軽鎖可変領域のうちの 1 つ以上の C D R を含む軽鎖可変領域、のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 43 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の抗 V S I G 3 抗体。

【請求項 48】

抗 V S I G 3 抗体が、前記表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体を含む、請求項 43 ~ 47 のいずれか 1 項に記載の抗 V S I G 3 抗体。

10

【請求項 49】

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項 50】

表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体の重鎖可変領域、または

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体の軽鎖可変領域、のうちの少なくとも 1 つを含む、モノクローナル抗体。

【請求項 51】

表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の重鎖可変領域の 1 つ以上の相補性決定領域 (C D R) を含む重鎖可変領域、または

20

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の軽鎖可変領域の 1 つ以上の C D R を含む軽鎖可変領域、のうちの少なくとも 1 つを含む、モノクローナル抗体。

【請求項 52】

表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の重鎖可変領域の相補性決定領域 (C D R) の各々、または

表前記 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の C D R の各々、または

前記表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の重鎖可変領域の C D R の各々、および前記表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の C D R の各々、を含む、モノクローナル抗体。

30

【請求項 53】

表 2 A のクローンによって産生されるモノクローナル抗体の重鎖可変領域の 1 つ以上の相補性決定領域 (C D R) と少なくとも 80 % 同一である、または

表 2 A のクローンによって産生されるモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の 1 つ以上の C D R と少なくとも 80 % 同一である、または

表 2 A のクローンによって産生されるモノクローナル抗体の重鎖可変領域の 1 つ以上の C D R と少なくとも 80 % 同一であり、かつ表 2 A のクローンによって産生されるモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の 1 つ以上の C D R と少なくとも 80 % 同一である、アミノ酸配列、を含む、モノクローナル抗体。

【請求項 54】

前記抗体が V S I G 3 に結合する、請求項 49 ~ 53 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

40

【請求項 55】

前記モノクローナル抗体が I g G 抗体を含む、請求項 49 ~ 54 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 56】

前記モノクローナル抗体が、V S I G 3 の V S I G 3 リガンドへの結合を阻害する、請求項 49 ~ 55 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 57】

前記モノクローナル抗体が、V S I G 3 の V I S T A への結合を阻害する、請求項 49

50

～56のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項58】

前記モノクローナル抗体が、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)₂フラグメント、もしくはFvフラグメント、またはそれらの組み合わせを含む抗原結合フラグメントを含む、請求項49～57のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項59】

請求項43～58のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または抗VSI G3抗体を含む組成物。

【請求項60】

請求項43～58のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または抗VSI G3抗体を含むキット。

10

【請求項61】

VISTAとVSI G3との相互作用を調節する化合物。

【請求項62】

抗VSI G3抗体を含む、請求項61に記載の化合物。

【請求項63】

前記抗VSI G3抗体が、

表2Aのクローンのうちの1つによって産生される抗体と同じVSI G3エピトープに結合する抗体、または

前記表2Aのクローンのうちの1つによって産生される抗体、を含む、請求項62に記載の化合物。

20

【請求項64】

抗VSI G3抗体が、

表2Aのクローンのうちの1つ以上によって産生される抗体の重鎖可変領域、または前記表2Aのクローンのうちの1つ以上によって産生される抗体の軽鎖可変領域、のうちの少なくとも1つを含む、請求項61～63のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項65】

抗VSI G3抗体が、

前記表2Aのクローンのうちの1つによって産生される抗体の重鎖可変領域の1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む重鎖可変領域、または

30

前記表2Aのクローンのうちの1つによって産生される抗体の軽鎖可変領域の1つ以上のCDRを含む軽鎖可変領域、のうちの少なくとも1つを含む、請求項61～64のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項66】

抗VSI G3抗体が、表2Aのクローンのうちの1つ以上によって産生される抗体を含む、請求項61～65のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項67】

前記化合物が抗原結合フラグメントを含む、請求項62～66のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項68】

前記化合物が、VISTAとVSI G3との結合を阻害する、請求項61～67のいずれか1項に記載の化合物。

40

【請求項69】

前記化合物が、VSI G3の多量体化を調節する、請求項61～68のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項70】

前記化合物がVISTAシグナル伝達を阻害する、請求項61～69のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項71】

前記化合物がVSI G3シグナル伝達を阻害する、請求項61～70のいずれか1項に

50

記載の化合物。

【請求項 7 2】

前記化合物が、C D 3 誘導性 I L - 2 産生、C D 3 誘導性インターフェロナー γ 産生、C D 3 誘導性 R A N T E S 産生、C D 3 誘導性 M I P - 1 アルファ産生、C D 3 誘導性 I L - 1 7 産生、または C D 3 誘導性 C X C L 1 1 産生、またはそれらの組み合わせに影響を及ぼす、請求項 6 1 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7 3】

前記化合物が T 細胞増殖に影響を及ぼす、請求項 6 1 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 7 4】

前記化合物が V S I G 3 ポリペプチドを含む、請求項 6 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 7 5】

前記化合物が、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するタンパク質を含む、請求項 7 4 に記載の化合物。

【請求項 7 6】

前記化合物が、V S I G 3 の可溶性フラグメントを含む、請求項 7 4 または 7 5 に記載の化合物。

【請求項 7 7】

前記化合物が、V S I G 3 の細胞外領域を含む、請求項 7 4 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 7 8】

前記化合物が配列番号 2 を含む、請求項 7 7 に記載の化合物。

【請求項 7 9】

前記化合物が融合タンパク質を含む、請求項 7 7 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8 0】

前記化合物が F c ドメインを含む、請求項 7 4 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8 1】

前記化合物が配列番号 3 を含む、請求項 8 0 に記載の化合物。

【請求項 8 2】

前記化合物が V I S T A ポリペプチドを含む、請求項 6 1 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8 3】

前記化合物が、配列番号 4、配列番号 5、または配列番号 6 と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するタンパク質を含む、請求項 8 2 に記載の化合物。

【請求項 8 4】

前記化合物が、V I S T A の可溶性フラグメントを含む、請求項 8 2 または 8 3 に記載の化合物。

【請求項 8 5】

前記化合物が、V I S T A の細胞外領域を含む、請求項 8 2 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8 6】

前記化合物が配列番号 5 を含む、請求項 8 5 に記載の化合物。

【請求項 8 7】

前記化合物が融合タンパク質を含む、請求項 6 1 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8 8】

前記化合物が F c ドメインを含む、請求項 6 1 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8 9】

10

20

30

40

50

前記化合物が配列番号 6 を含む、請求項 88 に記載の化合物。

【請求項 90】

前記化合物が、軟骨オリゴマー基質タンパク質 (COMP) のコイルドコイルドメインを含む、請求項 61～89 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 91】

前記 COMP がラット COMP またはヒト COMP である、請求項 90 に記載の化合物。

【請求項 92】

前記コイルドコイルドメインが五量体コイルドコイルドメインである、請求項 90 または 91 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 93】

前記コイルドコイルドメインが、V S I G 3 ポリペプチドもしくは V I S T A ポリペプチドまたはその両方に共有結合している、請求項 90～92 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 94】

前記化合物がリンカードメインを含む、請求項 93 に記載の化合物。

【請求項 95】

前記リンカードメインが、N S G G G S G G G T G (配列番号 13) もしくは L D R N L P P L A P L G P (配列番号 14) またはその両方を含む、請求項 94 に記載の化合物。

【請求項 96】

前記化合物がアルカリホスファターゼを含む、請求項 90～95 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 97】

前記化合物が T E V 切断部位を含む、請求項 90～96 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 98】

前記化合物が、V I S T A と V S I G 3 との結合を阻害する、請求項 61～97 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 99】

請求項 61～98 のいずれかに記載の化合物を含む組成物。

【請求項 100】

請求項 61～98 のいずれか 1 項に記載の化合物を含むキット。

【請求項 101】

請求項 61～98 のいずれか 1 項に記載の治療有効量の化合物で対象を処置することを含む、方法。

【請求項 102】

V S I G 3 が、前記対象から得られた生物学的試料内に過剰発現される、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

少なくとも 1 つの抗 V S I G 3 抗体が表 2 A のクローンによって産生される抗体を含む、2 つ以上の抗 V S I G 3 抗体を含む組成物。

【請求項 104】

それぞれの抗 V S I G 3 抗体が、V S I G 3-V I S T A 相互作用、V S I G 3-V I S T A 8 相互作用、V S I G 3 の多量体化、および V I S T A の多量体化のうちの 1 つ以上をブロックする、請求項 103 に記載の組成物。

【請求項 105】

前記 2 つ以上の抗 V S I G 3 抗体が異なるエピトープに結合する、請求項 103 または 104 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 106】

前記抗V S I G 3抗体のうちの少なくとも1つが、V S I G 3のA B E I g面と相互作用する、請求項103～105のいずれかに記載の組成物。

【請求項107】

前記抗V S I G 3抗体のうちの少なくとも1つが、V S I G 3のG F C I g面と相互作用する、請求項103～106のいずれかに記載の組成物。

【請求項108】

抗V S I G 3抗体および抗V I S T A抗体を含む組成物であって、

V S I G 3－V I S T A相互作用、V S I G 3－V I S T A 8相互作用、V S I G 3の多量体化、もしくはV I S T Aの多量体化、またはそれらの組み合わせをブロックし、

前記抗V S I G 3抗体が表2Aのクローンのうちの1つ以上によって産生される抗体を含む、組成物。

10

【請求項109】

多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、もしくは多量体化V S I G 8、またはそれらの組み合わせを含む、組成物。

【請求項110】

免疫原で免疫することによって生成されるポリクローナル抗体であって、前記免疫原がポリペプチドを含み、前記ポリペプチドが、表3Aに記載されるポリペプチドのうちの1つ以上を含む、ポリクローナル抗体。

【請求項111】

免疫原で免疫することによって生成されるポリクローナル抗体であって、前記免疫原がポリペプチドを含み、前記ポリペプチドが、表3Aに記載されるポリペプチドのうちの1つ以上からなる、ポリクローナル抗体。

20

【請求項112】

免疫原で免疫することによって生成されるポリクローナル抗体であって、前記免疫原がポリペプチドを含み、前記ポリペプチドが表3Aに記載のポリペプチドからなる、ポリクローナル抗体。

【請求項113】

ポリペプチドで免疫することによって生成されたポリクローナル抗体であって、前記ポリペプチドが表3Aに記載のペプチドからなる、ポリクローナル抗体。

【請求項114】

前記ポリクローナル抗体がV S I G 3に結合する、請求項110～113のいずれか一項に記載のポリクローナル抗体。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年2月2日に出願された米国仮出願第62／625, 594号、および2018年2月7日に出願された米国仮出願第62／627, 478号の利益を主張し、その各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

この出願には、45キロバイトのサイズを有し、かつ2019年1月17日に作成された「0541-000007WO02-SeqList__ST25.txt」と題するASCIIテキストファイルとして米国特許商標局に電子的に提出された配列表が含まれる。配列表の電子出願により、電子的に提出された配列表は、37 CFR § 1.821(c)が要求するハードコピーと、§ 1.821(e)が要求するCRFの両方の役割を果たす。配列表に含有された情報は、参照により本願明細書に組み込まれており、提出された国際出願における開示を超えるものではない。

技術分野

本発明は、V I S T AとV S I G 3との相互作用を調節する化合物ならびにその製造お

50

よび使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

T細胞活性化のV領域免疫グロブリン含有サプレッサー（本明細書では「VISTA」と呼ばれ、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサプレッサー、PD-1H、Gi24、Dies1、DD1α、またはB7-H5としても知られる）は、T細胞抑制を媒介するレセプターであることが報告されている。

【発明の概要】

【0004】

1つの態様において、本開示は、VISTAおよび「3を含有するVセットおよび免疫グロブリンドメイン」（本明細書中では、「VSIG3」または「VSIG-3」と呼ばれ、IGSF11としても知られる）の相互作用を調節する化合物、ならびにVISTAとVSIG3との相互作用を調節する化合物を導入することによってVISTAとVSIG3との相互作用を調節することを含む方法を記載する。VSIG3は上皮細胞および内皮細胞に発現する接着タンパク質であり、大腸癌、腸癌、肝細胞癌でアップレギュレートされている（Watanabe et al. (2005) Cancer Sci. 96: 498）。いくつかの実施形態において、VSIG3は、VISTAリガンドである。いくつかの実施形態では、VISTAはVSIG3リガンドである。

10

【0005】

いくつかの実施形態では、方法は、VISTAとVSIG3との相互作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズさせることを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、VISTAまたはVSIG3またはその両方の多量体化を調節することを含む。

20

【0006】

いくつかの実施形態では、VISTAとVSIG3との相互作用を調節する化合物は、VSIG3に対する抗体、VSIG3ポリペプチド、VISTAポリペプチド、または軟骨オリゴマー基質タンパク質（COMP）のコイルドコイルドメイン、またはそれらの組合せを含む。

【0007】

いくつかの実施形態では、化合物は、VISTAシグナル伝達およびVSIG3シグナル伝達のうちの少なくとも1つを阻害する。いくつかの実施形態では、化合物は、T細胞増殖および／またはT細胞シグナル伝達（例えば、CD3誘導効果を含む）に影響を及ぼし得る。

30

【0008】

別の態様では、本発明は、治療有効量の化合物で対象を処置することを記載する。

【0009】

さらなる態様において、本開示は、モノクローナル抗体を含むVSIG3に対する抗体を記載する。

【0010】

さらなる態様において、本開示は、抗VSIG3抗体を含む組成物を記載する。さらなる態様では、本開示は、多量体化VSIG3、多量体化VISTA、および多量体化VSIG8を含む組成物を記載する。

40

【0011】

さらなる態様において、本開示は、表3Aに記載されるVSIG3免疫原に対して産生されたポリクローナル抗体を記載する。

【0012】

本明細書中で使用される用語「抗体」は、目的の特定の抗原標的に免疫特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位を含む分子をいう。したがって、用語「抗体」は、全長抗体および／またはその変異体、そのフラグメント（断片）、ペプチボディおよびその変異体、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒ

50

ト抗体、ヒト化抗体、ならびに抗体またはその特定のフラグメントもしくは一部（単鎖状抗体およびそのフラグメントを含む）の構造および／または機能を模倣する抗体模倣物を含むが、これらに限定されない。標的への抗体の結合は、そのような結合が、少なくとも1つの標的活性もしくは結合を調節、減少、増加、アンタゴナイズ、アゴナイズ、鎮静、緩和、ブロック、阻害、排除、および／または干渉する場合、またはインビトロ、インサイチュ、および／またはインビボで、受容体活性もしくは結合を有する場合など、しかしこれらに限定されない、様々な効果を引き起こすことができる。従って、本発明の抗体は、生物学的分子（例えば、抗原またはレセプター）またはその部分に結合し得る抗体フラグメントを包含し、これには、F a b、F a b' および F (a b')₂、p F c'、F d、単一ドメイン抗体 (s d A b)、可変フラグメント (F v)、単一鎖状可変フラグメント (s c F v) またはジスルフィド結合 F v (s d F v)；ダイアボディまたは二価ダイアボディ；直鎖状抗体；単一鎖状抗体分子；および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。抗体は、任意のタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A および I g Y）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 および I g A 2）、またはサブクラスであり得る。

【0013】

本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体をいい、すなわち、集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能性のある天然に存在する突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一の抗原性部位に対して方向付けられる。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して方向付けられた異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して方向付けられる。モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリン産生細胞によって汚染されていないハイブリドーマ細胞によって合成され得る。あるいは、モノクローナル抗体は、例えば、モノクローナル抗体をコードする重鎖状および軽鎖状遺伝子で安定にまたは一時的にトランスフェクトされた細胞によることを含む、組換え的に産生され得る。

【0014】

修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られるような、上で定義した抗体の特性を示し、任意の特定の方法による抗体の操作を必要とするものと解釈されるべきではない。いくつかの実施形態では、用語「モノクローナル」は、本明細書では、抗体が操作された方法ではなく、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む細胞のクローン集団に由来する抗体を指す。

【0015】

本明細書中で使用される場合、「単離された」とは、その元の環境（例えば、天然に存在する場合、天然の環境）から除去された物質をいい、したがって、その天然の状態から「人間の手によって」改変される。

【0016】

本明細書中で使用される場合、「室温」は、16℃～26℃であり、または18℃～24℃であることがより好ましい。いくつかの実施形態において、「室温」は、20℃～22℃である。

【0017】

本明細書中で使用される場合、2つのポリペプチド間の「配列同一性」は、1つのポリペプチドのアミノ酸配列を第2のポリペプチドの配列と比較することによって決定される。本明細書中で議論される場合、任意の特定のポリペプチドが、別のポリペプチドに対して少なくとも40パーセント（%）、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるか否かは、BESTFITプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics

Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) のような (しかし、これらに限定されない) 当該分野で公知の方法およびコンピュータプログラム/ソフトウェアを使用して決定され得る。BESTFITは、Smith and Waterman (1981) *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 のローカルホモロジーアルゴリズムを使用して、2つのシーケンス間のホモロジーの最良のセグメントを見つける。BESTFITまたは任意の他の配列アラインメントプログラムを使用して、特定の配列が、例えば、本発明による参照配列と95%同一であるかどうかを決定する場合、同一性のパーセンテージが、参照ポリペプチド配列の全長にわたって計算され、そして参照配列中のアミノ酸の総数の5%までの相同性のギャップが許容されるように、パラメータが設定される。

10

【0018】

「結合親和性」または「親和性結合」は、分子 (例えば、抗体) の単一の結合部位とその結合パートナー (例えば、抗原または抗原エпитープ) との間の非共有相互作用の総和の強度を指す。分子Xのその相手Yに対する親和性は、解離定数 (K_D) によって表され、これは、一般に、例えば、BIA CORE (GE Healthcare Worldwide, Chicago, IL) から市販されているBIA COREバイオセンサを使用して、当該分野で公知の方法を使用して決定することができる。いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、VSI G3に対するそれらの結合親和性に関して記載され得る。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、解離定数 (K_D) が 5×10^{-6} M以下、 1×10^{-6} M以下、 5×10^{-7} M以下、 1×10^{-7} M以下、 5×10^{-8} M以下、 1×10^{-8} M以下、 5×10^{-9} M以下、 1×10^{-9} M以下、 5×10^{-10} M以下、 1×10^{-10} M以下、 5×10^{-11} M以下、 1×10^{-11} M以下、 5×10^{-12} M以下、 1×10^{-12} M以下、 5×10^{-13} M以下、 1×10^{-13} M以下、 5×10^{-14} M以下、 1×10^{-14} M以下、 5×10^{-15} M以下、または 1×10^{-15} M以下である抗原と相互作用する抗体を含む。

20

【0019】

本明細書で使用される「対象」という用語は、ヒトおよび非ヒト脊椎動物を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、対象は哺乳動物、特にヒトである。対象は個体であってもよい。対象は、「個体」、「患者」、または「宿主」であってもよい。非ヒト脊椎動物には、家畜動物、コンパニオンアニマル、および実験動物が含まれる。非ヒト対象はまた、ヒト以外の霊長類ならびに、ラットまたはマウスなどの、しかしこれらに限定されないげっ歯類も含む。非ヒト対象には、ニワトリ、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ミンク、およびウサギも含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0020】

本明細書中で使用される場合、「インビトロ」は、細胞内培養であり、「インビボ」は、対象の身体内である。

【0021】

用語「好ましい」および「好ましくは」は、特定の状況下で、特定の利益を与え得る本発明の実施形態を指す。しかし、同じまたは他の状況下で、他の実施形態も好ましい場合がある。さらに、1つ以上の好ましい実施形態の列挙は、他の実施形態が有用ではないことを暗示しておらず、本発明の範囲から他の実施形態を排除することを意図していない。

40

【0022】

用語「含む」およびその変形は、これらの用語が記述および特許請求の範囲に現れる場合、限定的な意味を有しない。

【0023】

特に明記しない限り、「1つ (a)」、「1つ (an)」、「その (the)」、および「少なくとも1つ」は、交換可能に使用され、1つまたは複数を意味する。

【0024】

50

また、本明細書において、端点による数値範囲の列挙は、その範囲内に包含される全ての数を含む（例えば、1～5は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5などを含む）。値の範囲が、特定の値まで、または少なくとも特定の値までである場合、その値は、その範囲内に含まれる。

【0025】

個別の工程を含む、本明細書で開示される任意の方法について、工程は、任意の実現可能な順序で実行されてもよい。また、必要に応じて、2つ以上の工程の任意の組み合わせを同時に行ってもよい。

【0026】

明細書および特許請求の範囲において使用される成分、分子量等の量を表す全ての数字は、別段の記載がない限り、全ての場合において「約」という用語によって修飾されるものとして理解されるものである。従って、これに反するとの別段の記載がない限り、明細書および特許請求の範囲に記載される数値パラメータは、本発明により得られるべき所望の特性に応じて変化し得る近似である。最低限でも、また均等論を特許請求の範囲に限定する試みとしてではなく、それぞれの数値パラメータは、少なくとも、報告された有効数字の数に照らして、通常の数捨五入技法を適用することによって解釈されるべきである。

【0027】

本発明の広い範囲を示す数値範囲およびパラメータは近似値であるにもかかわらず、特定の具体例に示される数値は、可能な限り正確に報告される。しかしながら、全ての数値は、それらのそれぞれの試験測定において見出される標準偏差から必然的に生じる範囲を本質的に含む。

【0028】

全ての見出しは、読者の利便性のためであり、そのように指定されない限り、見出しに続くテキストの意味を限定するために使用されるべきではない。

【0029】

本明細書の全体を通して「一実施形態」、「ある実施形態」、「特定の実施形態」、「いくつかの実施形態」等への言及は、実施形態と関連して記載される特定の特徵、構成、組成物、または特性が、本開示の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書の全体を通じた様々な箇所におけるこのような語句の出現は、必ずしも本開示の同じ実施形態を指すものではない。さらに、特定の特徵、構成、組成物、または特性は、1つ以上の実施形態において任意の適切な方式で組み合わせられてもよい。

【0030】

上記の本発明の要約は、本発明の各々の開示される実施態様、またはあらゆる実装形態を記載することを意図するものではない。以下の記述は、例示的な実施態様をより具体的に例示する。本出願全体を通していくつかの箇所において、実施例のリストを通してガイダンスが提供され、これらの実施例は、様々な組み合わせで 사용할 ことができる。各事例において、列挙されたリストは、代表的なグループとしてのみ役立ち、そして排他的なリストとして解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1Aは、例示的な機能的酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）結合アッセイにおいて組換えヒトVISTAFcキメラ（「rhVISTA」）に特異的に結合する組換えヒトVSI G3Fcキメラ（「rhVSI G3」または「VSI G03IgG1Fc」）を示す。図1Bは、rhVSI G3およびrhVSI G3タンパク質の結合に対する抗VSI G3抗体の効果の代表的な結果を示す。抗体アイソタイプ対照（□—白四角）は、ブロッキングを示さず；抗体クローン993820（○—白丸）は、0.32μg/mLのED50でVSI G3とVISTAとの間の結合の8%ブロッキングを示した。ED50は、最大ブロッキングの50%を回収するのに必要な抗体の濃度を反映している。

【図2】図2は、rhVSI G3のrhVISTAへの結合をブロッキングするポリクロ

ーナルウサギ抗ヒトV S I G 3 ペプチド抗体についての代表的な結果を示す。r h V S I G 3 - r h V I S T A 相互作用は、ストレプトアビジン-H R P とそれに続く色彩反応を用いて検出した。抗体 I 2 0 5 (○-白丸) はブロッキングを示さず; ウサギ抗体 G 1 2 9 (●-黒丸) は、2. 5 9 μ g / m L の E D 5 0 で V S I G - 3 と V I S T A との間の結合を 7 0 % ブロッキングすることを示した。E D 5 0 は、最大ブロッキングの 5 0 % を回収するのに必要な抗体の濃度を反映する。

【図 3】図 3 は、例示的なウサギポリクローナル抗ヒト V S I G 3 抗体が、活性化 T 細胞からの I L - 2 分泌を阻害する V S I G 3 タンパク質の能力を弱めることを示す。マウス抗ヒト C D 3 抗体を 9 6 ウェルプレート上に 1 μ g / m L で、2 ~ 8 $^{\circ}$ C にて一晚コーティングした。組換えヒト V S I G 3 (r h V S I G 3) タンパク質を、アッセイプレート上に連続希釈 (○-白丸) または 2 0 μ g / m L で固定化し、3 7 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした。連続希釈したポリクローナルウサギ抗ヒト V S I G 3 (N 6 6) またはアイソタイプ対照 (ウサギ I g G) を添加し、2 0 μ g / m L の r h V S I G 3 タンパク質と共に室温にて 1 ~ 2 時間共インキュベートした。ヒト T 細胞を、M a g C e l l e c t ヒト C D 3 ⁺ 単離キット (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) を用いてヒト P B M C から単離し、単離したヒト T 細胞を、このプレートに添加し (2 $\times$ 1 0 ⁵ / ウェル) 、5 % C O ₂ の存在下、3 7 $^{\circ}$ C にて 2 4 時間培養した。分泌された I L - 2 を、Q U A N T I K I N E ヒト I L - 2 E L I S A キット (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) を使用して、細胞培養上澄み液において測定した。抗体アイソタイプ対照、ウサギ I g G (□-白四角) は、I L - 2 分泌に対する V S I G 3 の効果のブロッキングを示さなかった; ポリクローナル抗体クローン N 6 6 (△-三角) は、I L - 2 分泌に対する V S I G 3 の効果のブロッキングを示した。

【図 4】図 4 は、r h V S I G 3 タンパク質が、正常なヒト末梢血 T 細胞の抗 C D 3 誘導性細胞増殖を阻害することができることを示す。この抑制は、モノクローナル抗ヒト V S I G 3 抗体クローン 9 7 3 4 0 4 および 9 9 3 6 2 0 によって逆転することができる。モノクローナル抗体クローン 7 7 4 2 0 8 は、T 細胞の増殖に影響を示さず、陰性対照を表す。

【図 5】図 5 は、例示的なモノクローナル抗ヒト V S I G 3 抗体が、活性化 T 細胞からのインターフェロン- γ 分泌を阻害する V S I G 3 タンパク質の能力を弱めることを示す。マウス抗ヒト C D 3 抗体を 9 6 ウェルプレート上に 1 μ g / m L で、2 ~ 8 $^{\circ}$ C にて一晚コーティングした。組換えヒト V S I G 3 (r h V S I G 3) タンパク質を、アッセイプレート上に連続希釈 (□-白四角) または 2 0 μ g / m L で固定化し、3 7 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした。連続希釈モノクローナル抗ヒト V S I G 3 (9 7 3 4 0 4 または 9 7 3 4 2 2 クローン) を添加し、2 0 μ g / m L の r h V S I G 3 タンパク質と共に室温にて 1 ~ 2 時間共インキュベートした。ヒト T 細胞を、M a g C e l l e c t ヒト C D 3 ⁺ T 細胞単離キット (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) を用いてヒト P B M C から単離した。単離したヒト T 細胞 (2 $\times$ 1 0 ⁵ / ウェル) をプレートに添加し、5 % C O ₂ の存在下、3 7 $^{\circ}$ C にて 2 4 時間培養した。分泌されたインターフェロン- γ を、Q U A N T I K I N E ヒトインターフェロン- γ E L I S A キット (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) を使用して、細胞培養上澄み液において測定した。モノクローナル抗体クローン 9 7 3 4 0 4 (○-白丸) は、V S I G 3 のインターフェロン- γ 分泌に対する効果のブロッキングが示された。しかし、モノクローナル抗体クローン # 9 7 3 4 2 2 (△-三角) は、インターフェロン- γ 分泌に対する V S I G 3 の効果の更なる向上を示した。

【図 6】図 6 は、ラット軟骨オリゴマー基質タンパク質 (C O M P 、残基 2 6 - 7 2 、中央) の五量体コイルドコイルドメインに融合した V I S T A (左側) 、V S I G 3 、または V S I G 8 (右側) 、続いて 6 $\times$ H i s タグからの細胞外ドメインの概略図を示す。

【図 7】図 7 は、ラット軟骨オリゴマー基質タンパク質 (C O M P 、残基 2 6 - 7 2 、中央) の五量体コイルドコイルドメインに融合した V I S T A (左側) 、V S I G 3 、または V S I G 8 (右側) 、続いてアルカリホスファターゼ、フラグおよび 6 $\times$ H i s タグの

概略図を示す。リンカー残基を緑色で示す。アルカリホスファターゼは、A V E X I S アッセイにおける酵素検出に使用することができ、総タンパク質は、抗ポリH i s 抗体を使用して正規化することができる。

【図8A】図8Aは、V I S T A - C O M P 構築物：V I S T A (1 - 1 9 5) - C O M P - A l k P h o s - F l a g / H i s (配列番号7) およびV I S T A (1 - 1 9 5) - C O M P - H i s (配列番号8) の配列を示し；図8Bは、V S I G 3 - C O M P 構築物：V S I G 3 (1 - 2 4 5) - C O M P - A l k P h o s - F l a g / H i s (配列番号9) およびV S I G 3 (1 - 2 4 5) - C O M P - H i s (配列番号10) の配列を示し；図8Cは、V S I G 8 - C O M P 構築物：V S I G 8 (1 - 2 6 3) - C O M P - A l k P h o s - F l a g / H i s (配列番号11) およびV S I G 8 (1 - 2 6 3) - C O M P - H i s (配列番号12) の配列を示す。

【図8B】図8Aのつづきである。

【図8C】図8Bのつづきである。

【図9A】図9A～図9Dは、単量体V I S T A および多量体V I S T A - C O M P を用いた表面プラズモン共鳴 (B i a c o r e) によるV I S T A - V S I G 3 相互作用の動態および親和性の概略図および定量を示す。図9Aおよび図9Cは、抗ポリH i s 抗体を用いてC M 5 チップ (G E H e a l t h c a r e) の表面上でV I S T A (図9A) またはV I S T A - C O M P (図9C) が捕捉される、B i a c o r e 実験の概略図を示す。被分析物、V S I G 3 - F c が、0 . 2 n M ~ 2 0 μ M の範囲の濃度で、捕捉されたV I S T A 上に流される。図9Bおよび図9Dは、単量体V I S T A - V S I G 3 - F c 相互作用 (図9B) および多量体V I S T A - C O M P - V S I G 3 - F c 相互作用 (図9D) の1 : 1 モデルを用いて得られたセンサグラムおよび動態適合を示す。捕捉された単量体V I S T A について、V S I G 3 - F c 被分析物を0 . 2 4 7 μ M ~ 2 0 μ M の範囲で試験した。捕獲された多量体V I S T A - C O M P について、V S I G 3 - F c 被分析物を0 . 2 n M から5 0 0 n M の範囲で試験した。多量体V I S T A - C O M P は、V S I G 3 - F c の親和性が約1 5 0 倍高く、これは主にオフレートの上昇によるものである。

【図9B】図9Aのつづきである。

【図9C】図9Bのつづきである。

【図9D】図9Cのつづきである。

【図10】図10は、V S I G 3 に対するブロッキング抗体について試験するために改変された、例示的な親和性に基づく細胞外相互作用スクリーニング (A V E X I S) の概略図を示す。V S I G 3 - F c をプロテインAプレート上にコーティングし、ブロックし、V S I G 3 に対するモノクローナル抗体のパネルからの個々のm A b と共にインキュベートした。五量体化ラット軟骨オリゴマー基質タンパク質 (C O M P) ヘリックスとアルカリホスファターゼに結合したV I S T A 外部ドメイン (E C D) を添加し、V S I G 3 とV I S T A との間の相互作用をアルカリホスファターゼ活性に基づいて測定した。

【図11】図11は、B l u e P h o s 試薬を用いて測定されたV S I G 3 とV I S T A との間の相互作用をブロックするV S I G 3 に対する抗体についてのA V E X I S アッセイスクリーニングからの例示的な結果を示す。バックグラウンドを差し引いて、結果を6 5 0 n m での吸光度を用いて定量した。試験した抗体は、r h V S I G 3 (1 ~ 2 4 5) に対して産生されたマウスモノクローナルである。示されているのは、少なくとも3回の反復の6 5 0 n m ± 標準偏差での平均吸光度である。バックグラウンドレベルに近いレベルまでブロックする抗体クローン7 7 4 2 0 6 および7 7 4 2 0 8 が、図12～図14において陽性対照として使用された。

【図12】図12は、B l u e P h o s 試薬を用いて測定されたV S I G 3 とV I S T A との間の相互作用をブロックするV S I G 3 に対する抗体についてのA V E X I S アッセイスクリーニングからの例示的な結果を示す。バックグラウンドを差し引いて、結果を6 5 0 n m での吸光度を用いて定量した。試験した抗体は、r h V S I G 3 (1 ~ 2 4 5) に対して産生されたマウスモノクローナルである。示されているのは、少なくとも3回の反

復の650nm±標準偏差での平均吸光度である。抗体クローン774206および774208が陽性対照として使用され、バックグラウンドを赤い破線で示す。

【図13】図13は、BluePhos試薬を用いて測定されたVSI G3とVISTAとの間の相互作用をブロックするVSI G3に対する抗体についてのA V E X I Sアッセイスクリーニングからの例示的な結果を示す。バックグラウンドを差し引いて、結果を650nmでの吸光度を用いて定量した。試験した抗体は、rhVSI G3(1~245)に対して産生されたマウスモノクローナルである。示されているのは、少なくとも3回の反復の650nm±標準偏差での平均吸光度である。抗体クローン774206および774208が陽性対照として使用され、バックグラウンドを赤い破線で示す。

【図14】図14は、BluePhos試薬を用いて測定されたVSI G3とVISTAとの間の相互作用をブロックするVSI G3に対する抗体についてのA V E X I Sアッセイスクリーニングからの例示的な結果を示す。バックグラウンドを差し引いて、結果を650nmでの吸光度を用いて定量した。試験した抗体は、rhVSI G3(1~245)に対して産生されたマウスモノクローナルである。示されているのは、少なくとも3回の反復の650nm±標準偏差での平均吸光度である。抗体クローン774206および774208が陽性対照として使用され、バックグラウンドを赤い破線で示す。PD-1およびPD-L2に対する抗体が陰性対照として使用され、相互作用の崩壊は示されなかった。

【図15】図15は、VSI G3 COMPがT細胞の増殖および活性化をブロックすることを示す。rhVSI G3は、正常ヒト末梢血T細胞の抗CD3誘導性CD25アップレギュレーションおよび増殖を部分的に阻害することができ、一方、VSI G3-COMPは、抗CD3誘導性CD25発現および増殖を完全に阻害することができる。

【図16A】図16Aは、rhVISTAが、正常なヒト末梢血T細胞の抗CD3誘導性増殖を阻害することができ、かつこの阻害を、抗ヒトVSI G3抗体(993620)によって逆転することができることを示す。組換えヒトVSI G8(rhVSI G8)タンパク質も抗CD3誘導性増殖を抑制できるが、VSI G3特異的抗体はこの抑制に影響しない。図16Bは、rhVISTAが、正常ヒト末梢血T細胞上で抗CD3誘導性CD25発現を阻害することができ、かつこの阻害を、抗ヒトVSI G3抗体(993620)によって逆転することができることを示す。rhVSI G8タンパク質は抗CD3誘導性CD25発現も抑制できるが、VSI G3特異的抗体はこの抑制に影響しない。図16Cは、rhVISTAが、正常ヒト末梢血T細胞の抗CD3誘導性CD25アップレギュレーションおよび増殖を阻害することができることを示す。この抑制は、アイソタイプ対照抗体(左上)の添加によって影響されなかったが、増殖(左の上下)は、VSI G3モノクローナル抗体973404の添加によって部分的に回復した。T細胞活性化の別の指標であるCD25発現(右の上下)は、rhVISTAの存在下で同様に阻害され、この阻害は、VSI G3抗体の添加により部分的に逆転した。

【図16B】図16Aのつづきである。

【図16C】図16Bのつづきである。

【図17A】図17A~図17Dは、VSI G3-VISTA相互作用および関連化合物の複合体の例示的な概略モデルを示す。図17Aは、4:2の分子化学量論を有するVISTA-VSI G3複合体を示す。図17Bは、VSI G3-VSI G8ヘテロダイマーを含むVISTA-VSI G3複合体を示す。図17Cは、PVR-TIGIT複合体の化学量論を示す。図17Dは、PDL1-PD1またはPDL2-PD1複合体の化学量論を示す。

【図17B】図17Aのつづきである。

【図17C】図17Bのつづきである。

【図17D】図17Cのつづきである。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本開示は、「V-Setおよび3を含有する免疫グロブリンドメイン」(本明細書では

10

20

30

40

50

、「V S I G 3」または「V S I G - 3」と呼ばれ、I G S F 1 1としても知られる)に特異的に結合することができる抗体および多量体化タンパク質を含む化合物;例えば、V S I G 3とT細胞活性化のV領域免疫グロブリン含有サプレッサー(本明細書では、「V I S T A」とも呼ばれ、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサプレッサー、P D - 1 H、G i 2 4、D i e s 1、D D 1 α、またはB 7 - H 5としても知られる)との間の相互作用を含む、V S I G 3とその結合パートナーとの間の相互作用をブロックすることができる化合物;本明細書に記載の化合物を含む組成物;ならびにこれらの化合物および組成物を作製および使用する方法を記載する。

【0033】

V I S T AはT細胞抑制を仲介するレセプターである。V S I G 3はV I S T Aのための結合パートナーとして、T細胞寛容の維持に役割を果たしている可能性が高い。さらに、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用は、T細胞活性化、T細胞増殖、および/またはT細胞サイトカインまたはケモカイン産生に対して抑制作用を有する。したがって、V S I G 3 - V I S T Aの相互作用を阻害する化合物は、例えば、免疫反応の増加を含む免疫調節の変化を可能にし得る。

【0034】

米国仮出願第62/370,395号(2016年8月3日出願)およびPCT出願第PCT/US2017/045314号(そのそれぞれが本明細書中に参照により組み込まれる)に以前に記載されているように、そして本明細書中にさらに記載されるように、V S I G 3は、V I S T Aのための結合パートナーとして特定され、そして特徴付けられている。いくつかの実施形態では、V S I G 3はV I S T Aリガンドである。いくつかの実施形態では、V I S T AはV S I G 3リガンドである。

【0035】

本明細書および2016年8月3日出願された米国仮出願第62/370,395号、およびPCT出願PCT/US2017/045314号にさらに記載されるように、中和抗体または他の化合物によるV S I G 3/V I S T A相互作用の遮断は、腫瘍および感染症の処置に効果的である場合があり、V S I G 3/V I S T A相互作用を促進または増強するV S I G 3/V I S T Aアゴニストは、自己免疫性、アレルギー性、および炎症性兆候、GVHD、移植、またはT細胞活性化、T細胞増殖、もしくはサイトカイン産生の抑制が所望される他の兆候の処置に有用である場合がある。

【0036】

V S I G 3 - V I S T Aの相互作用を調節する化合物およびその使用方法

いくつかの態様において、本発明は、V I S T AとV S I G 3との相互作用を調節する化合物を記載する。いくつかの実施形態において、化合物は、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用を調節するために使用されてもよい。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることを含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V S I G 3の多量体化の調節を含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V I S T Aの多量体化の調節を含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V I S T Aシグナル伝達またはV S I G 3シグナル伝達、またはその両方の阻害を含むことができる。例えば、相互作用の調節は、細胞増殖、サイトカイン産生、およびケモカイン産生のうちの少なくとも1つに対するV S I G 3またはV I S T Aの下流効果を増強または破壊することを含んでもよい。

【0037】

いくつかの実施形態では、化合物は、本明細書にさらに記載されるように、例えば、モノクローナル抗V S I G 3抗体を含む抗V S I G 3抗体を含んでもよい。

【0038】

いくつかの実施形態では、化合物は、抗V I S T A抗体を含んでもよい。

【0039】

いくつかの実施形態では、化合物は、V S I G 3 ポリペプチド、V I S T A ポリペプチド、融合タンパク質、またはコイルドコイルドメイン、またはそれらの組合せを含んでもよい。いくつかの実施形態では、化合物はF c ドメインを含んでもよい。

【0040】

いくつかの実施形態において、化合物は、V S I G 3 の可溶性フラグメントおよび／またはV S I G 3 の細胞外領域を含んでもよい。いくつかの実施形態では、化合物は、V I S T A の可溶性フラグメントおよび／またはV I S T A の細胞外領域を含んでもよい。いくつかの実施形態では、化合物は、表1の配列のうちの少なくとも1つによってコードされるタンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、化合物は、表1の配列の少なくとも1つに対して、少なくとも80%の配列同一性、少なくとも85%の配列同一性、
10 少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、または少なくとも99%の配列同一性を有するようにコードされるタンパク質を含んでもよい。

【0041】

いくつかの実施形態では、本化合物は、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、または多量体化V S I G 8、またはその組み合わせを含んでもよい。

【0042】

いくつかの実施形態において、化合物は、例えば、C D 3 誘導性I L - 2 産生、C D 3 誘導性インターフェロン- γ 産生、C D 3 誘導性R A N T E S 産生、C D 3 誘導性M I P - 1 アルファ産生、C D 3 誘導性I L - 1 7 産生、および／またはC D 3 誘導性C X C L 1 1 産生を含むT細胞シグナル伝達に影響する場合がある。いくつかの実施形態では、化合物は、T細胞増殖に影響を及ぼす場合がある。理論に拘束されることを望むものではないが、V I S T A および／またはV S I G 3 は、これらのC D 3 誘導効果を阻害することができると考えられる。したがって、いくつかの実施形態では、化合物は、その阻害を逆転させることができる。
20

【0043】

本発明はさらに、V I S T A とV S I G 3 との相互作用を調節する化合物を導入することによって、V I S T A とV S I G 3 との相互作用を調節することを記載する。例えば、対象は、治療有効量の化合物で処置されてもよい。いくつかの実施形態において、V S I G 3 は、対象から得られた生物学的試料内に過剰発現される場合がある。
30

【0044】

抗体

いくつかの実施形態では、本開示は、V S I G 3 に結合する抗体（すなわち、抗V S I G 3 抗体）を記載する。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトV S I G 3（h V S I G 3）に結合する。

【0045】

いくつかの実施形態において、V S I G 3 に結合する抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、V S I G 3 に結合する抗体は、表2 A に列挙されるハイブリドーマ細胞株（本明細書ではクローンとも呼ばれる）によって、および／または組換え方法によって産生されるモノクローナル抗体を含む。
40

【0046】

いくつかの実施形態において、V S I G 3 に結合する抗体は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、V S I G 3 に結合する抗体は、表3 A に列挙されるポリクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、V S I G 3 に結合する抗体は、表3 A に列挙されるペプチド免疫原を使用して産生されたポリクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド免疫原は、システイン修飾を伴う表3 A に列挙される配列を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド免疫原は、システイン修飾を伴わない表3 A に列挙される配列を含む。

【0047】

いくつかの実施形態では、抗体は単離された抗体である。いくつかの実施形態では、抗
50

体は、タンパク質 Aーもしくは Gーセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析法、または親和性クロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって単離または精製されてもよい。

【0048】

いくつかの実施形態において、V S I G 3 に結合する抗体は、V S I G 3 ポリペプチドを認識する。いくつかの実施形態では、V S I G 3 ポリペプチドは、ヒト V S I G 3（配列番号 1；Un i p r o t 番号 Q 5 D X 2 1；遺伝子 I D：1 5 2 4 0 4）またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、V S I G 3 ポリペプチドは、マウス V S I G 3（Un i p r o t 番号：P 0 C 6 7 3；遺伝子 I D：2 0 7 6 8 3）またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態において、V S I G 3 に結合する抗体は、非還元 V S I G 3 ポリペプチドを認識する。

【表 1】

ヒト(ホモサピ エンス) VSIG 3 の全長配列 (配列番号 1)。	mtsqrslap lllslhgva aslevsespg siqvargqpa vlpctfttsa alinlnviwm vtplsnanqp eqvilyqggq mfdgaprfhg rvgtgtgmpa tnvsifinnt qlsdtgtyqc lvnnlpdig rignvtglv lvppsapheq iqgsqdigsd villesseeg iprptylwek ldntklpapt atqdqvqgtv tirnialss glyqcvasna igtstclldl qvispprni gliagaigtg aviiifcial ilgaffywrs knkeeeeee pneireddlp pkcssakafh teissdnt ltssnaynsr ywsnnpkvhr ntesvshfsd lgqsfshsg nanipsiyan gthlvpgqhk tlvvtanrgs spqvmrsng svsrkprpph thsyttishat lerigavpvm vpaqsragsl v 431	60 120 180 240 300 360 420
ヒト(ホモサピ エンス) VSIG3 の細胞外ドメ イン配列表 (配列番号 2)。	mtsqrslap lllslhgva aslevsespg siqvargqta vlpctfttsa alinlnviwm vtplsnanqp eqvilyqggq mfdgaprfhg rvgtgtgmpa tnvsifinnt qlsdtgtyqc lvnnlpdig rignvtglv lvppsapheq iqgsqdigsd villesseeg iprptylwek ldntklpapt atqdqvqgtv tirnialss glyqcvasna igtstclldl qvispprni gliag 245	60 120 180 240
ヒト(ホモサピ エンス) VISG3 ／Fc 融合タン パク質の細胞 外ドメイン配 列 (配列番号 3)。	levsespgsi qvargqtavl pctfttsaal inlnviwmvt plsnanqpeq vilyqggqmf dgaprfhgrv gftgtmpatn vsifinntql sdtgtyqclv nnlpdiggrn igvtglvltv ppsapheqiq gsqdigsdvi llesseegip rptylwekld ntlklpaptat qdqvqgtvti rnialssgl yqcvasnaig tstclldlqv ispqrnigl iagiegrmdp kscdkthtcp pcpapeaega psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs hedpevkfnw yvdgvevhna ktpreeqyn styrvsvlt vlhqdwlngk eyckvsnka lpapiektis kagqpprepq vytlppsrdel ltknqvsltc lvkgfypsdi avewesngqp ennykatppv ldsdgsffly skltvdksrw qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk 460	60 120 180 240 300 360 420
ヒト(ホモサピ エンス) VISTA の完全長配列 (配列番号 4)。	mgvptaleag swrwsllfa lfllaaslgpv aafkvatpys lyvcepgqnv tlterllgpv dkghdvtfyk twyrssrgev qtcserpir nltfqdlhlh hgghqaants hdlaqrhggle sasdhghnfs itmrnltlld sglycclvve irhhhsehrv hgameqvqt gkdapsncvv ypsssqdsen itaaalatga civgilclpl illlvkqrq aasnrraqel vrmdsniqgi enpgfeaspp aqgipeakvr hplsyvaqrq psesgrhlls epstplsppg pgdvffpsld pvpdspnfew i 311	60 120 180 240 300
ヒト(ホモサピ エンス) VISTA の細胞外ドメ イン配列 (配列番号 5)。	mgvptaleag swrwsllfa lfllaaslgpv aafkvatpys lyvcepgqnv tlterllgpv dkghdvtfyk twyrssrgev qtcserpir nltfqdlhlh hgghqaants hdlaqrhggle sasdhghnfs itmrnltlld sglycclvve irhhhsehrv hgameqvqt gkdapsncvv ypsssqesen itaaiegr 198	60 120 180
ヒト(ホモサピ エンス) VISTA/IgG Fc 融合タンパク 質の細胞外ド メイン配列 (配列番号 6)。	fkvatpysly vcepgqnvlt tcrllgpvdk ghdvtfyktw yrssrgevqt cserrpirnl tfqdlhlhgh ghqaantshd laqrhglesa sdhghnfsit mrnltlldsg lycclvveir hhhsehrvhg amelqvqtgk dapsncvvp sssqesenit aaiegrmdpk scdkthtcp cpapeaegap svflfppkp kdtlmisrtp vtcvvvdvsh edpevkfnwy vdgvevhna tkpreeqyns tyrvsvltv lhqdwlngke yckvsnkal papiektisk kagqpprepq ytlppsrdel ltknqvsltc lvkgfypsdi vewesngqp nnykatppvl dsdgsffly kltvdksrw qgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk 399	60 120 180 240 300 360

10

20

30

40

【0049】

いくつかの実施形態では、VSIG3に結合する抗体は、任意のタイプの分子の抗体への共有結合によって修飾またはコンジュゲートされる抗体の誘導体を含んでもよい。このような抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解性切断、毒素、または細胞リガンドもしくは他のタンパク質への結合によって修飾された抗体が含まれる。多数の化学修飾のいずれも、ツニカマイシンの特異的切断、アセチル化、ホルミル化、および代謝合成を含むが、これらに限定されない公知の技法によって実行することができる。さらに、誘導体は1つ以上の非古典的なアミノ酸を含有していてもよい。

【0050】

50

V S I G 3 に結合する抗体は、当該分野で周知の技法によって、検出可能なマーカーに直接的または間接的に結合されてもよい。検出可能なマーカーは、例えば、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的な手段によって検出可能な薬剤である。有用な検出可能なマーカーには、蛍光染料、化学発光化合物、放射性同位元素、高電子密度試薬、酵素、補酵素、着色粒子、ビオチン、またはジオキシゲニンが含まれるが、これらに限定されない。検出可能なマーカーは、しばしば、放射能、蛍光、色彩、または酵素活性などの測定可能なシグナルを生成する。検出可能な薬剤にコンジュゲートされた抗体は、診断または治療目的のために使用されてもよい。検出可能な物質の例には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、様々な陽電子放出断層撮影法を用いた陽電子放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。検出可能な物質は、当該分野で公知の技法を使用して、例えば、当該分野で公知のリンカーのような中間体を介して、抗体に直接的または間接的のいずれかで結合またはコンジュゲートされ得る。例えば、診断用途のための抗体への金属イオンのコンジュゲーションを記載している米国特許第 4, 741, 900 号を参照のこと。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウムベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、およびフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ、生物発光物質の例としては、ルシフェリン、エクオリンなどが挙げられ、適切な放射性物質の例としては、ヨウ素 (^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、トリチウム (^3H)、インジウム (^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{113}mIn 、 ^{115}mIn)、テクネチウム (^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、タリウム (^{201}Ti)、ガリウム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム (^{103}Pd)、モリブデン (^{99}Mo)、キセノン (^{133}Xe)、フッ素 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、および ^{97}Ru が挙げられる。このような治療部分を抗体にコンジュゲートさせるための技法は周知である。

【0051】

これらのハイブリドーマ細胞株の子孫または誘導体によって産生されるモノクローナル抗体、当量または類似のハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体、および／またはそれらから作製される組換え誘導体もまた、本発明に含まれる。いくつかの実施形態では、V S I G 3 に結合する抗体は、例えば、ウサギ B 細胞由来モノクローナル抗体を含む組換え誘導モノクローナル抗体を含む。

【0052】

無傷の抗体分子は、2つの重 (H) 鎖状可変領域 (本明細書中では V_H と略される) および 2つの軽 (L) 鎖状可変領域 (本明細書中では V_L と略される) を有する。 V_H および V_L 領域は、「相補性決定領域」(「CDR」) と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化することができ、「フレームワーク領域」(「FR」) と呼ばれる、より保存された領域に散在する。FR および CDR の程度は、正確に定義されている (Kabata et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、および Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 を参照のこと)。各 V_H および V_L は、3つの CDR および 4つの FR から構成され、アミノ末端からカルボキシ末端まで、以下の順序で配列される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【0053】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンの中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体と同じ重鎖を有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンの中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体と同じ軽鎖を有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンの中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体と同じ重鎖および同じ軽鎖を有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、上記で特定された重鎖および／または軽鎖において、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、またはそれ以上のアミノ酸置換を含むことができ、ここで、アミノ酸置換は、V S I G 3 への抗体の結合に実質的に影響を及ぼさない。

10

【0054】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローン化の中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体と同じ V_H ドメインを有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローン化の中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体と同じ V_L ドメインを有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンの中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体と同じ V_H ドメインおよび同じ V_L ドメインを有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、抗体の V S I G 3 への結合に実質的に影響を及ぼさない、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、またはそれ以上のアミノ酸置換を、上記で特定された V_H ドメインおよび／または V_L ドメイン中に含有することができる。

20

【0055】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローン化の中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の V_H ドメインの少なくとも 1 つの C D R を有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンの中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の V_H ドメインの少なくとも 2 つの C D R を有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローン化の中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の V_H ドメインの少なくとも 3 つの C D R

30

【0056】

さらに、またはあるいは、いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンの中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の V_L ドメインの少なくとも 1 つの C D R を有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローン化の中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の V_L ドメインの少なくとも 2 つの C D R を有するモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローン化の中の少なくとも 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の V_L ドメインの少なくとも 3 つの C D R を有するモノクローナル抗体を含む。

40

【0057】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、V S I G 3 への抗体の結合に実質的に影響を及ぼさない、上記で特定された 1 つ以上の C D R における 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、またはそれ以上のアミノ酸置換を含むことができる。

【0058】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、1 つ以上のフレームワーク領域 (F R) に 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、またはそれ以上のアミノ酸置換を含むことができる。いくつかの実施形態では、置換またはフレームワーク領域 (F R) における置換は、V S I G 3 への抗体の結合に実質的に影響を及ぼさない。

【0059】

50

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の V_H ドメインの少なくとも 1 つの C D R のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の V_H ドメインの少なくとも 2 つの C D R のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を含む。

10

【0061】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の V_H ドメインの少なくとも 3 つの C D R のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の V_L ドメインの少なくとも 1 つの C D R のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を含む。

20

【0063】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の V_L ドメインの少なくとも 2 つの C D R のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を含む。

【0064】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体の V_L ドメインの少なくとも 3 つの C D R のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体を含む。

30

【0065】

いくつかの実施形態では、抗 V S I G 3 抗体は、表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体と同じ V S I G 3 エピトープに結合する抗体を含む。

【0066】

いくつかの実施形態において、抗体は、表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体と比較して、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、またはそれ以上のアミノ酸置換を含むことができ、置換は、V S I G 3 への抗体の結合および／または抗体の機能に実質的に影響を及ぼさない。

40

【0067】

いくつかの実施形態において、抗 V S I G 3 抗体は、V S I G 3 の A B E I g 面と相互作用する抗体を含む（図 17 ~ 18）。いくつかの実施形態において、抗 V S I G 3 抗体は、V S I G 3 の G F C I g 面と相互作用する抗体を含む（図 17 ~ 18）。

【0068】

抗体は、任意の適切な種由来の抗体であってもよい。いくつかの実施形態では、抗体はマウス抗体であってもよい。いくつかの実施形態では、抗体はラット抗体であってもよい

50

。いくつかの実施形態では、抗体はウサギ抗体であってもよい。

【0069】

いくつかの実施形態では、抗体はIgG抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体またはIgGサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を含む）であってもよい。いくつかの実施形態では、抗体は、以下のサブクラス：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG2CおよびIgG3のうちの1つのマウスIgGであってもよい。いくつかの実施形態では、抗体は、以下のサブクラス：IgG1、IgG2A、IgG2B、またはIgG2Cのうちの1つのラットIgGであってもよい。

【0070】

いくつかの実施形態では、抗体はカッパ軽鎖を含んでもよい。いくつかの実施形態では、該抗体は、ラムダ軽鎖を含んでもよい。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)₂フラグメント、および／またはFvフラグメントを含む抗原結合フラグメントを含む。

【0072】

モノクローナル抗体は、任意の適切な技法によって得られる場合がある。いくつかの実施形態において、VSI G3に結合する抗体は、組換えDNA方法によって作製されてもよく、ファージディスプレイによって産生されてもよく、かつ／またはコンビナトリアル方法によって産生されてもよい。VSI G3に結合する抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて容易に単離および配列決定され得る。いくつかの実施形態において、本明細書中に記載されるハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの供給源として役立つ場合がある。いったん単離されるとDNAは、宿主細胞（例えば、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胚性腎細胞（HEK）、または免疫グロブリンタンパク質をそうでなければ産生しない骨髓腫細胞を含む）にトランスフェクトするか、またはゲノム編集（例えば、CRISPR-Casシステムを用いる）によって宿主細胞の中へと導入されて、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る場合がある。VSI G3に結合する抗体をコードするDNAは、例えば、抗体をヒト化するように修飾される場合がある。

20

【0073】

いくつかの実施形態では、抗体はヒト化抗体であってもよい。VSI G3に結合する抗体は、任意の適切な方法によってヒト化され得る。ヒト化モノクローナル抗体を産生するための技法は、例えば、Jones et al. (1986) Nature 321: 522 and Singer et al. (1993) J. Immunol. 150: 2844に見出される場合がある。例えば、抗体のヒト化は、ヒトにおいて使用される場合、抗体の免疫原性を減少させるための抗体に対する変化を含む場合がある。いくつかの実施形態において、VSI G3に結合するヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部を含む場合がある。VSI G3に結合するヒト化抗体は、いくつかの実施形態において、ヒト免疫グロブリン（受容体抗体）を含む場合があり、ここで、受容体抗体の1つ以上の相補性決定領域（CDR）由来の残基は、VSI G3に結合する非ヒト種抗体（ドナー抗体）（マウス抗体、ラット抗体、またはウサギ抗体など）の1つ以上のCDR由来の残基によって置換される。いくつかの実施形態において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、VSI G3に結合する抗体由来の対応する非ヒト残基によって置換され得る。

30

40

【0074】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、キメラ抗体、すなわち、異なる部分が異なる動物種に由来する抗体を含む。キメラ抗体は、例えば、適切な抗原特異性を有するマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的特異性のヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒にスプライシングすることによって得られ得る。例えば、Takeda et al. (1985) Nature 314: 544を参照のこと。

50

【0075】

いくつかの実施形態では、抗体は、二重特異性または二機能性抗体を含む。二重特異性または二機能性抗体は、2つの異なる重／軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはF(ab')₂フラグメントの連結を含む種々の方法によって産生されてもよい。例えば、Song sivilai and Lachmann (1990) Clin. Exp. Immunol. 79:315、Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148:1547を参照のこと。さらに、二重特異性抗体は、「ダイアボディ」(Holliger et al. (1993) PNAS USA 90:6444)または「Janusin」(Traunecker et al. (1991) EMBO J. 10:3655、Trauneck et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7:51)として形成されてもよい。

10

【0076】

いくつかの実施形態において、抗体は、動物(ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ヤギ、ウマ、ニワトリ、または七面鳥を含むが、これらに限定されない)によって産生され、動物からの細胞によって産生され、化学的に合成され、または組換え的に発現される。抗体は、免疫グロブリン分子の精製のための当該分野で公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、親和性、およびサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差溶解性によって、またはタンパク質の精製のための任意の他の通常の技法によって精製され得る。さらに、抗体は、本明細書に記載されるように、または、例えば、精製を容易にするためを含めて、別の方法で当該技術分野で公知であるように、異種ポリペプチド配列に融合され得る。

20

【0077】

モノクローナル抗体は、本明細書に記載の方法によって、および当該技術分野で公知の任意の適切な方法によって、免疫特異的結合についてアッセイされてもよい。使用され得るイムノアッセイには、BIACORE分析、蛍光活性化セルソーター(FACS)分析、免疫蛍光、免疫細胞化学、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、イムノ拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、およびタンパク質Aイムノアッセイなどの技法を使用する競合および／または非競合アッセイシステムが含まれるが、これらに限定されない。このようなアッセイは、ルーティンであり、当該技術分野で周知である(例えば、Ausubel et al., eds, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., N. Y. (1994) 参照)。

30

【0078】

いくつかの実施形態では、VSI G3に結合する抗体は、VSI G3のVSI G3リガンドまたはVSI G3レセプターへの結合を阻害する抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、VSI G3のVISTAへの結合を阻害する抗体を含む。いくつかの実施形態において、VISTAは、ヒトVISTA(配列番号4;UniProt番号Q9H7M9;遺伝子ID64115)である。いくつかの実施形態では、抗体は、VSI G3のVSI G3リガンド(例えば、VISTAを含む)への結合を、少なくとも10パーセント(%)、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%低下させる場合がある。

40

【0079】

いくつかの実施形態において、VSI G3に結合する抗体は、表2のハイブリドーマ細胞株(クローンまたは抗体クローンとも呼ばれる)のうちの少なくとも1つによって産生されるモノクローナル抗体を含む。

50

【0080】

いくつかの実施形態において、V S I G 3に結合する抗体は、V S I G 3の細胞外ドメインで動物を免疫することによって作製されてもよい。いくつかの実施形態において、V S I G 3に結合する抗体は、ヒトV S I G 3のアミノ酸1～245（UniProt数：Q5DX21；遺伝子ID：152404）で動物を免疫することによって作製されてもよい。いくつかの実施形態では、動物は哺乳動物であってもよい。例えば、動物は、ウサギ、マウス、ヤギ、ヒツジ（sheep）、ラマまたはラットであってもよい。いくつかの実施形態では、動物はニワトリであってもよい。

【0081】

別の態様において、本開示は、単離されたポリヌクレオチド分子を記載する。いくつかの実施形態において、単離されたポリヌクレオチド分子は、抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、単離されたポリヌクレオチド分子は、本明細書に記載される抗体をコードするヌクレオチド配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリヌクレオチド分子は、抗体またはその相補体をコードするヌクレオチド配列に高ストリンジェンシー下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。本明細書中で使用される場合、「ストリンジェントな条件」とは、第1のポリヌクレオチド分子が、0.5MのNaHPO₄、7%のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、および1mMのEDTA中の第2のフィルタ結合ポリヌクレオチド分子と65℃にてハイブリダイズし、そして結合したままであり、続いて、0.2×SSC/0.1%のSDS中で、42℃にて洗浄する（Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., N. Y. (1989), p. 2.10.3を参照のこと）能力を指す。いくつかの実施形態において、単離されたポリヌクレオチド分子は、CDRのうちの1つ以上または本発明のモノクローナル抗体の重鎖および／または軽鎖鎖状をコードするポリヌクレオチドを含む。免疫グロブリン可変ドメインおよび定常領域をクローニングおよび配列決定するための一般的な技法は周知である。例えば、Orlandi et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833を参照のこと。

【0082】

別の態様において、本開示は、本発明の単離されたポリヌクレオチドを含む組換えベクターを記載する。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、またはファージの形態であってもよい。適切なDNA配列は、種々の手順によってベクターに挿入されてもよい。一般に、DNA配列は、当該分野で公知の手順によって、ベクター中の適切な制限エンドヌクレアーゼ部位の中へと挿入される。このような手順は、当業者の範囲内であると考えられる。多数の適切なベクターおよびプロモーターが、当業者に公知であり、かつ市販されている。以下のベクターは、例として提供される。細菌ベクターには、例えば、pQE70、pQE60、pQE-9、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、およびpRIT5が含まれる。真核生物ベクターには、例えば、pWLN EO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVLが含まれる。しかしながら、任意の他のプラスミドまたはベクターが使用されてもよい。

【0083】

さらなる態様において、本開示はまた、上述のベクターのうちの少なくとも1つを含む宿主細胞を含む。宿主細胞は、哺乳動物または昆虫細胞のような高等真核細胞、または酵母細胞のような低等真核細胞であってもよい。または、宿主細胞は、原核細胞、例えば細菌

菌細胞、または植物細胞であってもよい。宿主細胞へのベクター構築物の導入は、任意の適切な技術（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、またはエレクトロポレーション）によって達成されてもよい。（Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)）。

【0084】

本発明の抗体は、適切なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞、酵母、細菌、または他の細胞において発現されてもよい。無細胞翻訳系はまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用して、このようなタンパク質を産生するためにも使用されてもよい。原核および真核宿主と共に使用するための適切なクローニングおよび発現ベクターは、Sambrookら、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)に記載されている。

【0085】

また、本発明には、本発明の抗体から1つ以上の超可変領域を発現するファージディスプレイライブラリー、およびこのようなファージディスプレイライブラリーから得られるクローンも含まれる。ファージディスプレイライブラリーを用いて、抗体由来分子を産生する。抗体の抗原結合可変ドメインをコードする遺伝子セグメントは、バクテリオファージのコートタンパク質をコードする遺伝子に融合される。このような遺伝子融合体を含有するバクテリオファージは、バクテリアを感染させるために使用され、得られるファージ粒子は、バクテリオファージの外側に提示される抗原結合ドメインを有する、抗体融合タンパク質を発現するコートを有する。ファージディスプレイライブラリーは、例えば、New England Biolabs Inc., Ipswich, MAから入手可能な、Ph. D. -7ファージディスプレイペプチドライブラリーキット（カタログ番号E8100S）またはPh. D. -12ファージディスプレイペプチドライブラリーキット（カタログ番号E8110S）を使用して調製され得る。例えば、Smith and Petrenko (1997) Chem Rev. 97:391-410を参照のこと。

【0086】

ハイブリドーマ細胞株

本開示はさらに、例えば、表2Aのハイブリドーマ細胞株を含むモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞株（本明細書では「クローン」または「抗体クローン」とも呼ばれる）に記載する。いくつかの実施形態において、ハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体は、VSG3に結合する。いくつかの実施形態において、ハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体は、VISTAへのVSG3の結合を阻害する。

【0087】

ハイブリドーマ細胞株は、当業者によく知られた様々な技術によって得られ得る。例えば、所望の抗原で免疫された動物由来の細胞は、一般に骨髓腫細胞との融合によって不死化される（例えば、Kohler and Milstein (1976) Eur. J. Immunol. 6:511; J. Goding in "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," Academic Press, pp 59-103 (1986); および Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, page 726 (Cold Spring Harbor Pub. 1988を参照のこと)。いくつかの実施形態では、免疫された動物は、好ましくは哺乳動物である。いくつかの実施形態において、免疫動物は、例えば、Wistarラットを含むラット、または例えば、BALB/Cマウスを含むマウスである。いくつかの実施形態では、動物由来の細胞は脾臓細胞である。いくつかの実施形態において、動物由来の細胞は、好ましくはリンパ球である。いくつかの実施形態では、骨髓腫細胞は、P3X63Ag8.653細胞を含む。

。

10

20

30

40

50

【0088】

モノクローナル抗体を産生する形質転換B細胞株を産生する他の公知の方法もまた、使用され得る。

【0089】

組換え抗体

本開示は、組換え誘導モノクローナル抗体をさらに記載する。組換え由来のモノクローナル抗体は、例えば、ウサギB細胞由来のモノクローナル抗体を含み得る。本発明のモノクローナル抗体は、例えば、ファージディスプレイまたはコンビナトリアル法を含む任意の好適な組換え技法によって産生され得る。例えば、米国特許第5, 223, 409号；国際特許公開第92/18619号；同第91/17271号；同第92/20791号；同第92/15679号；同第93/01288号；同第92/01047号；同第92/09690号；または同第90/02809号を参照のこと。このような方法は、ヒトモノクローナル抗体を生成するために使用され得る。

10

【0090】

抗V S I G 3抗体に対する使用

本明細書中に記載されるように、V S I G 3に結合する抗体は、任意の適切な適用のために使用され得る。例えば、モノクローナル抗体は、インビトロ診断およびインビボ診断の両方および治療方法において使用されてもよい。

【0091】

いくつかの実施形態において、抗体は、インビトロまたはインビボでのV S I G 3タンパク質の発現レベルを決定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、抗体は、インビボまたはインビトロで細胞を標識するために使用され得る。いくつかの実施形態において、抗体は、患者試料におけるV S I G 3タンパク質のレベル発現を決定するために使用され得る。いくつかの実施形態では、患者試料は、哺乳動物癌細胞を含む場合がある。

20

【0092】

いくつかの実施形態では、抗体は標識されてもよい。例えば、抗体は、細胞を標識するために使用されてもよく、また標識された細胞は、二次的な方法を介して直接的または間接的に画像化されてもよい。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物細胞である。

【0093】

いくつかの実施形態では、対象由来の試料中のV S I G 3タンパク質の有無を特定するために、抗体を使用してもよい。いくつかの実施形態では、V S I G 3の存在を特定することは、対象由来の試料中のV S I G 3の量を特定することを含む場合がある。

30

【0094】

いくつかの実施形態では、抗体は、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用を調節するために使用され得る。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることを含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V S I G 3の多量体化の調節を含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V I S T Aの多量体化の調節を含むことができる。いくつかの実施形態においては、抗体は、V S I G 3のV I S T Aとの相互作用をアゴナイズおよび／またはアンタゴナイズすることができる。このようなアゴニズムおよび／またはアンタゴニズムは、免疫療法効果を生成することができる。

40

【0095】

いくつかの実施形態において、V S I G 3またはV I S T A、あるいはその両方は、細胞の表面上で発現され得る。

【0096】

本開示は、抗体を含むキットをさらに記載した。例えば、キットは、抗V S I G 3モノクローナル抗体を含む組成物を含んでもよい。キット中の抗体は、本明細書中に記載されるように、1つ以上の検出可能なマーカーで標識されていてもよい。

50

【0097】

キットは、本発明の1つ以上のモノクローナル抗体で満たされた1つ以上の容器を含んでもよい。さらに、キットは、緩衝剤および本発明を実施するために必要とされる溶液などの他の試薬も含んでもよく、これらも含まれる。任意選択で、そのような容器（複数可）には、通知または印刷されたインストラクションが関連付けられてもよい。本明細書で使用される「包装材料」という語句は、キットの中身を収容するために使用される1つ以上の物理的な構造を指し、包装材料は、好ましくは滅菌された汚染物質のない環境を提供するために、周知の方法によって構築される。本明細書で使用される「包装」という語は、ポリペプチドを固定限度内に保持することができる、ガラス、プラスチック、紙、箔などの固形マトリックスまたは材料を指す。

10

【0098】

V S I G 3 - V I S T A の相互作用を調節する抗体および／または化合物を含む組成物

いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書に記載の抗体のうちの少なくとも1つ、および／または本明細書に記載のV S I G 3 - V I S T A 相互作用を調節する化合物のうちの少なくとも1つを含む組成物を記載する。

【0099】

いくつかの実施形態において、組成物はまた、例えば、pHを許容可能な範囲に維持するのを助けるための緩衝剤、または微生物の増殖を遅延させるための保存剤も含んでもよい。組成物はまた、例えば、担体、賦形剤、安定剤、キレート剤、塩類、または抗菌剤も含んでもよい。許容される担体、賦形剤、安定剤、キレート剤、塩、保存剤、緩衝剤、または抗菌剤は、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；アジ化ナトリウム、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウムなどの防腐剤；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール；ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または非特異的免疫グロブリンなどのタンパク質；オリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、デキストリンを含む単糖類、二糖類、およびその他の炭水化物；E D T A などのキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、ソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩を形成する対イオン；金属複合体（例えば、亜鉛（Zn）-タンパク質複合体）；および／またはT W E E N、P L U R O N I C S、ポリエチレングリコール（P E G）などの非イオン性界面活性剤を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0100】

いくつかの実施形態では、組成物は医薬組成物であり、モノクローナル抗体および薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む。本明細書の教示に記載される抗体を含む医薬組成物の調製において、当業者に明らかであるように、種々のビヒクルおよび賦形剤が使用されてもよい。

【0101】

医薬組成物は、一般に、薬学的に許容可能な担体および薬理学的に有効量の抗体、または抗体の混合物を含む。

40

【0102】

医薬組成物は、粉末、顆粒、溶液、懸濁液、エアロゾル、固体、丸薬、タブレット、カプセル、ゲル、局所クリーム、坐剤、経皮パッチ、および／または当技術分野で公知の別の剤型として製剤化されてもよい。

【0103】

本明細書中に記載される目的のために、抗体の薬学的に許容可能な塩は、有機および無機酸および／または塩基を含む、任意の当該分野で認識される薬学的に許容可能な塩を含むことが意図される。塩の例としては、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム

50

、カルシウム、ならびに第一級、第二級および第三級アミン、メチル、エチルおよびプロピルなどの低級炭化水素のエステルが挙げられるが、これらに限定されない。他の塩としては、酢酸、プロピオン酸、ピルビン酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、サリチル酸などの有機酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0104】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容可能な担体」は、薬学的組成物を製剤化する際に当業者に公知の任意の標準的な薬学的に許容された担体を含む。例えば、抗体は、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、水性エタノール水、またはグルコース、マンニトール、デキストラン、プロピレングリコール、油（例えば、植物油、動物油、合成油など）、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシルプロピルメチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、リン酸カルシウム、ゼラチン、ポリソルベート80の溶液、または適切な賦形剤中の固形剤型を含む、薬学的に許容可能な希釈剤中の剤型として調製されてもよい。

10

【0105】

医薬組成物は、しばしば、1つ以上の緩衝液（例えば、中性緩衝化生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水）、炭水化物（例えば、グルコース、ショ糖またはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはアミノ酸（グリシン、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、メタ亜硫酸ナトリウム、ブチル化ヒドロキシトルエン、ブチル化ヒドロキシアニソールなど）など）、静菌剤、キレート剤（EDTAまたはグルタチオンなど）、アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、剤型を受容者の血と等張、低張または弱高張にする溶質、懸濁化剤、増粘剤および／または防腐剤をさらに含む。あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として製剤化されてもよい。

20

【0106】

当業者に公知の任意の適切な担体を、本明細書に記載の抗体の少なくとも1つを含む組成物において使用してもよい。抗体組成物は、例えば、経口、鼻、粘膜、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、および筋肉内投与を含む、任意の適切な投与様式のために製剤化されてもよい。

【0107】

投与と処置

本開示の組成物は、選択された投与経路に適合した種々の形態の医薬品に製剤化することができる。当業者は、組成物が、投与の様式および投薬単位に依存して変化することを理解するであろう。例えば、非経口投与のために、等張生理食塩水が使用されてもよい。局所投与のために、ジメチルスルホキシド（DMSO）などの担体を含むクリーム、またはペプチドの活性をブロックまたは阻害しない局所クリーム中に典型的に見出される他の薬剤が使用されてもよい。他の好適な担体としては、アルコール、リン酸緩衝生理食塩水、および他の平衡塩類溶液が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の化合物は、静脈内、局所、経口、皮下、腹腔内、および筋肉内送達を含むが、これらに限定されない、様々な方法で投与されてもよい。いくつかの態様において、本発明の化合物は、制御放出または持続放出のために製剤化されてもよい。いくつかの態様では、制御放出または持続放出のための剤型は、皮下移植に適している。いくつかの態様では、制御放出または持続放出のための剤型は、貼付剤を含む。化合物は、経腸投与のために製剤化されてもよく、例えば、カプセルまたはタブレットとして製剤化されてもよい。

30

40

【0108】

投与は単回投与としてであっても、複数回投与であってもよい。いくつかの実施形態では、用量は、本明細書に記載されるものを含むが、これに限定されない標準的な方法によって決定されるような有効量である。臨床試験の当業者は、標準的な研究を通して、特定の化合物の用量を最適化することができるであろう。さらに、組成物の適切な用量は、標準的な用量応答プロトコルを使用して、過度の実験なしに決定され得る。投与には、本添付の実施例に記載されている用量および投与スケジュール、投与間隔、および／または投与パターンのいずれかを含むが、これらに限定されない。

50

【0109】

本開示による抗体を含む組成物は、例えば、経口、直腸、経鼻、局所（経皮、エアロゾル、頬側および／または舌下を含む）、腔、非経口（皮下、筋肉内、および／または静脈内を含む）、皮内、膀胱内、関節内、細動脈内、脳室内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内、吸入による、または病変内（例えば、腫瘍の中または周囲への注射による）を含むが、これらに限定されない任意の適切な手段によって投与されてもよい。

【0110】

水溶液での非経口投与に関しては、例えば、溶液は、必要な場合は適切に緩衝化し、希釈液を十分な生理食塩水またはグルコースでまず等張させる。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に特に適している。これに関して、使用され得る滅菌水系媒体は、当業者には公知であろう。用量のいくらかの変動は、処置される対象の状態に依存して必然的に生じることになる。いずれにしても、投与責任者が、個々の対象に適切な投与量を決定することになる。さらに、ヒトへの投与のために、調製物は、米国食品医薬品局によって要求されるような、無菌性、発熱性、ならびに一般的な安全性および純度の基準を満たすべきである。このような調製物は、発熱物質を含まない場合がある。

10

【0111】

放出される薬剤をカプセル化するポリマーまたはタンパク質微粒子、薬剤を投与するために局所に（*topically*）または局所的（*locally*）に使用され得る軟膏、ゲル、または溶液、および長期間にわたって制御放出を提供するパッチさえも含む、多くの好適な剤型が知られている。これらはまた、インプラントの形態をとってもよい。このようなインプラントは、腫瘍内に移植される場合がある。

20

【0112】

本発明の化合物はまた、凍結乾燥形態で提供され得る。このような組成物は、投与前に再構成するための緩衝液、例えば、重炭酸塩を含んでもよく、または緩衝液は、例えば、水で再構成するために凍結乾燥組成物中に含まれてもよい。凍結乾燥組成物は、適切な血管収縮剤、例えば、エピネフリンをさらに含んでもよい。凍結乾燥された組成物は、シリンジ内で提供されてもよく、場合により、再構成のための緩衝液と組み合わせて包装されてもよく、その結果、再構成された組成物は、直ちに患者に投与され得る。

【0113】

本明細書中で使用される場合、「処置する」または「処置」は、治療的および／または予防的処置を含んでもよい。本明細書中で使用される場合、「障害を処置する」は、絶対的な用語であることを意図されない。処置は、予後の改善または症状の頻度もしくは重症度の減少をもたらす場合がある。本明細書中で使用される場合、「治療的に有効である」濃度または量は、対象に対する何らかの向上または利益を提供する量である。処置の所望の効果は、疾患の発生または再発の予防、症状の軽減、疾患のいずれかの直接的または間接的な病理学的結果の減少、疾患の進行の速度の減少、疾患状態の向上または緩和、ならびに寛解または予後の向上を含む。同様に、本明細書中で使用される場合、「予防する」という用語は、絶対的な用語として意図されない。その代わり、予防とは、発症の遅延、症状の頻度の低下、または障害に関連する症状の重症度の低下を指す。したがって、予防は、当業者によって理解される広範囲の予防手段を指す。状況によっては、症状の頻度および重症度を非病理学的量まで低下させる。いくつかの状況において、本発明の組成物を受容する個体の症状は、この障害を有する未処置の個体によって経験される症状として90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、または1%のみの頻度または重症度である。

30

40

【0114】

治療有効濃度および量は、本明細書に記載されるような既知のインビトロおよびインビボ系において化合物を試験することによって、本明細書中の各適用について経験的に決定されてもよく、次いで、ヒトまたは他の動物についての用量は、それから推定されてもよい。

50

【0115】

正確な用量および処置期間は、処置される疾患の関数であり、そして公知の試験プロトコルを使用して経験的に決定されてもよく、またはインビボもしくはインビトロ試験データからの推定によって決定されてもよいことが理解される。濃度および用量値はまた、緩和されるべき症状の重症度によって変化し得ることに留意されたい。任意の特定の対象について、個々の必要性および組成物の投与を管理または監督する人物の専門的判断に従って、具体的な投薬レジメンを経時的に調整すべきであり、また本明細書に記載の濃度範囲は単に例示的なものにすぎず、特許請求される組成物および方法の範囲または実施を限定することを意図しないことをさらに理解されたい。

【0116】

組成物の毒性および治療有効性は、例えば、LD₅₀（母集団の50％に対する致死的な用量）およびED₅₀（母集団の50％に対して治療的に効果的な用量）を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定され得る。毒性と治療効果の用量比は治療指数であり、LB₅₀とED₅₀との間の比率で表すことができる。高い治療指数を示す組成物が好ましい場合がある。細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための用量の範囲を処方する際に使用される場合がある。このような組成物の用量は、好ましくは、毒性がほとんどまたは全くないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にある場合がある。投薬量は、使用される剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変化し得る。厳密な処方、投与経路および用量は、患者の状態の視点から個々の医師によって選ばれてもよい。

【0117】

本明細書中に記載される組成物は、一度に投与されてもよく、または時間間隔で投与されるある数のより少ない用量に分割されてもよい。例えば、組成物は、繰り返し、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8回、またはそれ以上の回数投与されてもよく、または連続注入によって投与されてもよい。正確な用量および処置期間は、処置される疾患の関数であり、そして公知の試験プロトコルを使用して経験的に決定されてもよく、またはインビボもしくはインビトロ試験データからの推定によって決定されてもよいことが理解される。濃度および用量値はまた、緩和されるべき状態の重症度によって変化する場合があることに留意されたい。任意の特定の対象について、個々の必要性および組成物を投与する、もしくは投与を監督する人物の専門的判断に従って、具体的な投薬レジメンを経時的に調整すべきであり、また本明細書に記載の濃度範囲は単に例示的なものにすぎず、特許請求される組成物および方法の範囲または実施を限定することを意図しないことをさらに理解されたい。

【0118】

いくつかの治療用実施形態では、薬剤の「有効量」は、少なくとも1つの病理学的パラメータの減少をもたらす量である。したがって、例えば、本開示のいくつかの態様において、有効量は、薬剤で処置されていない個体におけるパラメータの予想される減少と比較して、少なくとも10％、少なくとも15％、少なくとも20％、少なくとも25％、少なくとも30％、少なくとも35％、少なくとも40％、少なくとも45％、少なくとも50％、少なくとも55％、少なくとも60％、少なくとも65％、少なくとも70％、少なくとも75％、少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、または少なくとも95％の減少を達成するのに有効な量である。

【0119】

本開示の方法のいくつかの態様において、方法は、1つ以上のさらなる治療薬剤の投与をさらに含む。本明細書に記載のモノクローナル抗体の投与の前、後、および／または投与と同時に、1つ以上のさらなる治療薬を投与してもよい。追加の治療薬は、例えば、化学療法、放射線療法などを含んでもよい。追加の治療薬は、別々に、または混合物もしくはカクテルの一部として投与されてもよい。本開示のいくつかの態様において、抗体の投与は、他の治療法単独の投与と比較した場合、他の治療法のより低い用量の有効性を可能にする場合があり、他の方法のより高い用量の投与で観察される毒性からの軽減を提供す

る。

【0120】

本開示の方法のいくつかの態様において、本明細書に記載されるような組成物および少なくとも1つのさらなる治療剤の投与は、治療的相乗効果を実証する。本開示の方法のいくつかの態様では、本明細書に記載の抗体および追加の治療薬剤の両方を投与した後に観察される処置に対する応答の測定は、抗体または追加の治療薬剤のいずれかを単独で投与した後に観察される処置に対する応答の同じ測定よりも改善される。

【0121】

V S I G 3 / V I S T A アゴニストおよび／または V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストの特定および使用方法

V S I G 3 と V I S T A との間の相互作用は、V I S T A と V I S I G との結合をアゴナイズおよび／またはアンタゴナイズするアゴニストまたはアンタゴニストを特定するため、および／または V S I G 3 / V I S T A 相互作用の作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズするために使用することができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3 / V I S T A 相互作用は、T細胞免疫に対する V S I G 3 / V I S T A 相互作用である。いくつかの実施形態では、V S I G 3 / V I S T A 相互作用は、V I S T A シグナル伝達を含む。ある場合には、V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、細胞増殖に対する V I S T A の抑制効果を実質的に阻害または予防するであろう。特定の場において、V S I G 3 および／または V I S T A アンタゴニストは、V S I G 3 と V I S T A との相互作用を実質的に阻害または予防する。ある場合には、V S I G 3 および／または V I S T A アンタゴニストは、C D 3 誘導性 M I P - 1 アルファ、C D 3 誘導性 R a n t e s (C C L 5)、C D 3 誘導性 C X C L 1 1、C D 3 誘導性インターフェロン (I F N) - γ 、I L - 2 および／または I L - 1 7 (I L - 1 7 A としても知られる) 産生の抑制をもたらすことになる。このような産生は、末梢血単核細胞 (P B M C) および／または T 細胞において減少される場合がある。この抑制は、V I S T A および／または V S I G 3 を発現する細胞を用いたインビトロ細胞ベースのアッセイを使用して検出され得る。逆に、ある場合には、V S I G 3 / V I S T A アゴニストは、免疫に対する V I S T A の抑制効果を実質的に強化または増強するであろう。この強化はまた、V I S T A および／または V S I G 3 を発現する細胞を用いた細胞ベースのアッセイを使用して、インビトロを使用しても検出することができる。

【0122】

いくつかの実施形態において、V S I G 3 / V I S T A アゴニストまたは V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、V S I G 3 と V I S T A との相互作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズする。いくつかの実施形態において、V S I G 3 / V I S T A アゴニストまたは V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、V S I G 3 と V I S T A とのうちの少なくとも一方が細胞表面上で発現される場合、V S I G 3 と V I S T A との相互作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズする。いくつかの実施形態では、V S I G 3 / V I S T A アゴニストまたは V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、V S I G 3 の多量体化をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることができる。V S I G 3 の多量体化は、例えば、V S I G 8 を含む、V S I G 3 のホモ二量体化および／または V S I G 3 のヘテロ二量体化を含む場合がある。

【0123】

いくつかの実施形態では、V S I G 3 / V I S T A アゴニストまたは V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、抗体を含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3 / V I S T A アゴニストまたは V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、抗 V I S T A 抗体を含む。いくつかの実施形態では、V S I G 3 / V I S T A アゴニストまたは V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、抗 V S I G 3 抗体を含む。

【0124】

V S I G 3 / V I S T A アゴニストおよび V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストを、ヒトの治療に使用するために製剤化することができる。例えば、いくつかの場合において

、V S I G 3 / V I S T A アゴニストまたはV S I G 3 / V I S T A アンタゴニストを、1つ以上の好適な担体、賦形剤、安定剤、キレート剤、塩類、または抗菌剤と組合せて含む組成物を提供することができる。さらに、組成物中のV S I G 3 / V I S T A アゴニストまたはV S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、インビボ安定性を増強するように改変することができる。例えば、いくつかの場合において、V S I G 3 / V I S T A アゴニストまたはV S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、1つ以上の所望の部分（ポリエチレングリコールポリマーなどの1つ以上の水溶性重合体など）に結合することができる。また、場合によっては、組成物は、2つ以上のV S I G 3 / V I S T A アゴニストまたはV S I G 3 / V I S T A アンタゴニストを含むこともできる。

【0125】

いくつかの場合において、自己免疫、アレルギーまたは炎症状態などの治療的に望ましい状態においてT細胞免疫を阻害するためのV S I G 3 / V I S T A アゴニストを含有する組成物が提供される。このような組成物は、それを必要とする対象においてT細胞の活性化または増殖を抑制するのに効果的な量のV S I G 3 / V I S T A アゴニストを含むことができる。例示的な自己免疫、炎症、およびアレルギー状態には、RAなどの関節炎状態、乾癬性関節炎、強皮症、多発性硬化症、ループス、I B D、I T P、糖尿病、サルコイドーシス、アレルギー性喘息が含まれるが、これらに限定されない。

【0126】

他の場合において、T細胞免疫を促進し、そしてこれが治療的に望ましい状態（例えば、癌および感染性疾患の状態）を処置するために、V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストを含む組成物が提供される。このような組成物は、それを必要とする対象（例えば、癌を有する対象）においてT細胞の活性化または増殖を促進するのに効果的な量の拮抗薬を含むことができる。

【0127】

V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、癌を処置するために使用される組成物内に提供することができる。癌には、黒色腫、リンパ腫、白血病、肺癌、卵巣癌、子宮頸癌、精巣癌、消化器癌、食道癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌および皮膚癌を含むことができるが、これらに限定されない。また、出願人は、V S I G 3 が健常組織と比較して結腸癌組織および肝臓癌組織で高発現していることも発見した。従って、いくつかの場合において、V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストは、結腸癌を処置するために使用される組成物内に提供することができる。また、いくつかの場合において、V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストを、肝臓癌を処置するために使用される組成物内に提供することができる。ある場合には、V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストを、P B M C におけるM I P - 1 アルファ、ランテス（C C L 5）、C X C L 1 1、およびI L - 1 7 分泌の抑制を防止するために、V S I G 3 とV I S T A との相互作用をブロックすることによって、癌を処置するために使用される組成物内に提供することができ、それは次に、T細胞、単球、樹状細胞およびマクロファージの癌組織への浸潤を可能にする。

【0128】

癌は、V S I G 3 および／またはV I S T A を発現する癌または発現しない癌を含み、さらに、免疫、間質または疾患細胞によるV S I G 3 および／またはV I S T A 発現が抗腫瘍応答および抗侵襲性免疫応答を阻害する、非転移性または非浸潤性ならびに浸潤性または転移性癌、ならびに血管新生腫瘍を特徴とする癌を含む。

【0129】

V S I G 3 / V I S T A アンタゴニストはまた、H I V、H P V、E B V、脳炎、疱疹、他の痘ウイルス、および他の既知のヒトウイルス、寄生性疾患、細菌性疾患、真菌または酵母関連疾患などのウイルス性疾患を含むがこれらに限定されない感染性疾患を処置するために使用される組成物内にも提供することができる。

【0130】

当然のことながら、本明細書中で特定される疾患の状態は、例示的であることが意図され、そして網羅的ではない。さらに、V S I G 3 / V I S T A アゴニストまたはV S I G

10

20

30

40

50

3/VISTAアンタゴニストは、同じまたは異なる組成物内で、同時にまたは異なる時に投与することができる他の治療薬と組み合わせることができる。例えば、VSIG3/VISTAアゴニストもしくはVSI G 3/VISTAアンタゴニストは、PD-1またはPD-L1アゴニストもしくはアンタゴニスト、CTLA4-Ig、サイトカイン、サイトカインアゴニストもしくはアンタゴニスト、または別の受容体アゴニストもしくはアンタゴニストの投与を含む治療レジメン内で投与することができる。

【0131】

多量体化

理論に拘束されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のVSI G 3/VISTA相互作用は、多量体化複合体を含んでもよいと考えられる。例えば、図17は、図9に示されるBiacoreによって測定されるような高親和性相互作用（約17nM）と一致し、かつ図7および図10に示される親和性に基づく細胞外相互作用スクリーニング(AVEXIS)相互作用アッセイに類似し、図11～図14の結果を有する、予測される最小のVISTA-VSI G 3結合集合体を示す。この多量体相互作用はさらに、このような複合体の集合体が、抗VSI G 3抗体の結合によってどのように破壊され得るかを例示する。AVEXISスクリーニングは、多量体化されたVISTA外部ドメイン(ECD)がVSI G 3 ECDのダイマーを結合できることを示したが、逆の状況では、VISTAダイマーに対してペンターVSI G 3をピッチングしても、結合事象のあるイベントは検出されなかった。

【0132】

理論に拘束されることを望むものではないが、これらの結果は、4つのVISTA ECDが2つのVSI G 3 ECDと係合する、VISTA分子とVSI G 3分子との間の4:2の化学量論を示唆する。この相互作用は、PVR-TIGIT構成のX線構造解析によって捉えられた結合複合体を連想させ(Stengle et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:5399-5404)、これは、図17Cに示されるように、安定に結合したPVRとTIGIT ECDの2:2化学量論を示す。PVR-TIGIT複合体は、TIGITの免疫グロブリン(Ig)ドメインが、Igドメインβサンドイッチの「ABE」または背面(これは、典型的には、7～9個のβストランド、標識A-Gから構成される)を使用して、最初に、背中合わせの様式でホモ二量体として会合する必要があることを示す(Bork et al. (1994) J. Molec. Biol. 242:309-320)。次いで、TIGIT ECDホモ二量体は、それぞれの向かい合わせの、または「GFC」面相互作用を介して、一对のPVR ECDを結合することができる。これらのGFC表面介在性Igドメイン相互作用は、Igドメインが結合するための最も一般的な方法であり、細胞表面免疫調節性レセプター間のほぼ全ての最小結合複合体において、X線構造解析(Stengle et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:5399-5404)、さらには抗体およびT細胞レセプター(TCR)複合体(Lin et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:3011-3016)によって捕捉されている。

【0133】

同様に、図17Dは、PD-1と、そのリガンド、PD-L1およびPD-L2の両方との間の1:1結合複合体を示し、これらは、それぞれ、相互作用するIg ECDの同じ向かい合わせの面(またはGFC)を利用する(Lin et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:3011-3016; Lazar-Molnar et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:10483-10488)。

【0134】

類推により、VSI G 3は、最初に、図17Aに示されるような背中合わせ(ABE面)のホモ二量体、またはおそらく、図17Bに示されるようなVSI G 3-VSI G 8ヘテロダイマーを形成し得る(両方が同じ細胞表面上に存在する場合)。VSI G 3および

V S I G 8は、非常に類似したアーキテクチャを有する I g スーパーファミリータンパク質であり（それぞれの E C D の両方は、一对の I g ドメインを明らかにし、その N-末端ドメインのみが V I S T A E C D への細胞間結合に関与することが予測される）、両クラスターは同一の I g サブファミリーに互いに近接しており、I g 免疫調節タンパク質の高感度配列に基づく分類から引き出している（R u b i n s t e i n e t a l . (2013) S t r u c t u r e 21 (5) : 766-776）。V S I G 3 と V S I G 8 との間のこの密接な配列および構造的関係は、それらのヘテロ二量体形成およびジョイント V I S T A 結合を可能にすることができる。P V R-T I G I T で見られるように、中央の V S I G 3 ホモ二量体は、図 17 A および図 17 B に示されるように、向かい合わせの（または G F C 面）相互作用を通して V I S T A E C D を係合する。しかしながら、P V R-T I G I T とは異なり、V I S T A はモノマーとして V S I G 3 と係合しているようには見えないが、おそらくその I g 領域の中間における 20 近い異例のアミノ酸挿入（V I S T A I g β -サンドイッチの折りたたみを不安定化させる（d e s t a b l i z e）可能性がある）（N o w a k e t a l . (2017) I m m u n o l . R e v . 276 : 66-79）は、それ自体が背中合わせの V I S T A ホモ二量体を介して安定化される必要があり、したがって、図 17 A および図 17 B に示されるように、4 つの V I S T A E C D （二対の背中合わせのホモ二量体における）が、それぞれの向かい合わせの相互作用で V S I G 3 ホモ二量体（または V S I G 3-V S I G 8 ヘテロダイマー）を把持するために最低限でも使用される。対照的に、図 17 C に示されるように、P V R は、従来の I g 構造を有するモノマー E C D として安定であり、したがって、T I G I T ホモ二量体と係合するために 2 つの P V R のみが必要とされる。

【0135】

従って、本明細書中にさらに記載されるように、V S I G 3 に対するブロッキング抗体は、いくつかの実施形態において、4 : 2 の V I S T A-V S I G 3 複合体（または図 17 A に示されるように、V I S T A₄-V S I G 3₂）の集合体を破壊し得る。

【0136】

多量体化 V S I G 3 または多量体化 V I S T A およびその製造方法および使用方法

いくつかの実施形態では、本開示は、多量体化 V S I G 3、多量体化 V I S T A、および多量体化 V S I G 8；多量体化 V S I G 3、多量体化 V I S T A、および多量体化 V S I G 8 を作製する方法；ならびに多量体化 V S I G 3、多量体化 V I S T A、および多量体化 V S I G 8 を使用する方法を記載する。

【0137】

いくつかの実施形態では、多量体化 V S I G 3、多量体化 V I S T A、および／または多量体化 V S I G 8 は、コイルドコイルドメインを含んでもよい。いくつかの実施形態では、コイルドコイルドメインは、五量体コイルドコイルドメインであってもよい。いくつかの実施形態では、コイルドコイルドメインは、V S I G 3、V I S T A、または V S I G 8 に共有結合してもよい。いくつかの実施形態では、コイルドコイルドメインは、軟骨オリゴマー基質タンパク質（C O M P）のコイルドコイルドメインであってもよい。いくつかの実施形態では、C O M P タンパク質は、ヒトタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、C O M P タンパク質はラットタンパク質であってもよい。

【0138】

いくつかの実施形態において、多量体化 V S I G 3、多量体化 V I S T A、および／または多量体化 V S I G 8 は、リンカードメインを含んでもよい。いくつかの実施形態において、リンカードメインは、少なくとも 10 アミノ酸、少なくとも 11 アミノ酸、少なくとも 12 アミノ酸、または少なくとも 13 アミノ酸であってもよい。いくつかの実施形態では、リンカードメインは、最高で 12 個のアミノ酸、最高で 13 個のアミノ酸、最高で 14 個のアミノ酸、最高で 15 個のアミノ酸、または最高で 20 個のアミノ酸であってもよい。いくつかの実施形態において、リンカードメインは、N S G G G S G G G T G（配列番号 13）または L D R N L P P L A P L G P（配列番号 14）またはその両方を含んでもよい。

【0139】

いくつかの実施形態において、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8は、アルカリホスファターゼを含んでもよい。アルカリホスファターゼは、親和性に基づく細胞外相互作用スクリーニング（A V E X I S）アッセイにおける酵素的検出のために使用されてもよい。

【0140】

いくつかの実施形態において、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T Aおよび／または多量体化V S I G 8は、例えば、H i s タグを含む、タンパク質タグを含んでもよい。

【0141】

いくつかの実施形態において、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8は、T E V切断部位を含んでもよい。いくつかの実施形態において、T E V切断部位は、G S E N L Y F Q Gを含んでもよい。

【0142】

いくつかの実施形態において、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8は、図8に開示される配列の各々の全部または一部を含み得る。

【0143】

理論に拘束されることを望むものではないが、V S I G 3とV I S T Aと、およびV S I G 8とV I S T Aとの相互作用は、受容リガンド相互作用に典型的に見られる1：1の相互作用（例えば、P D - 1とP D - L 1との間の相互作用）より大きい複合体ストイキオメトリーを示すと考えられる。例えば、V S I G 3とV I S T Aとの間の相互作用は、4：2の化学量論を有する場合がある。したがって、V I S T A、V S I G 3、およびV S I G 8の多量体化は、V S I G 3とV I S T Aとの間、またはV S I G 8とV I S T Aとの間の相互作用を複製し、破壊し、または検出を改善するのに役立つ可能性がある。

【0144】

いくつかの実施形態では、多量体化タンパク質（例えば、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8）を用いて、V S I G 3とV I S T AとまたはV S I G 8とV I S T Aとの相互作用を調節することができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることを含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 8とV I S T Aとの相互作用の調節は、V S I G 8とV I S T Aとの相互作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることを含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V S I G 3の多量体化の調節を含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用の調節は、V I S T Aの多量体化の調節を含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 8およびV I S T Aの相互作用の調節は、V I S T Aの多量体化の調節を含むことができる。いくつかの実施形態では、V S I G 8およびV I S T Aの相互作用の調節は、V S I G 8の多量体化の調節を含むことができる。

【0145】

いくつかの実施形態において、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T Aおよび／または多量体化V S I G 8は、インビトロまたはインビボのスクリーニングアッセイで使用されてもよい。例えば、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8を用いて、V S I G 3、V I S T A、および／またはV S I G 8の結合パートナーをスクリーニングしてもよい。さらに、または代替として、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8を使用して、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用を調節する化合物をスクリーニングし；V S I G 8およびV I S T Aの相互作用を調節する化合物をスクリーニングし；V S I G 3のリガンドとのV S I G 3の相互作用を調節する化合物をスクリーニングし；またはV I S T AのリガンドとのV I S T Aの相互作用を調節する化合物をスクリーニングしてもよい。いくつかの実施形態では、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8を使用して、V I S T A／V S I G相互作用の結合親和性および動態を測定してもよい。いく

つかの実施形態において、多量体は、V S I G 3 アゴニストおよび／またはV S I G 3 アンタゴニストの開発および／または特徴付けにおいて使用することができる。いくつかの実施形態において、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T Aおよび／または多量体化V S I G 8を使用して、非多量体化タンパク質を使用するスクリーニングアッセイと比較してスクリーニングアッセイにおける検出感度を増大させることができる。

【0146】

いくつかの実施形態では、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8を使用して、V S I G 3、V S I G 8、および／またはV I S T A シグナル伝達を調節してもよい。例えば、V S I G 3 多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8を用いて、例えばT細胞シグナル伝達またはT細胞増殖を含むT細胞に対するV S I G 3、V S I G 8、またはV I S T Aの抑制効果を阻害または予防してもよい。さらに、または代替として、多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、および／または多量体化V S I G 8を使用して、V S I G 3とV I S T Aとの相互作用を阻害または予防してもよい。

10

【0147】

ある場合には、V S I G 3 - C O M P および／またはV I S T A - C O M P アンタゴニストは、例えば、C D 3 誘導性M I P - 1 アルファ、C D 3 誘導性R a n t e s (C C L 5)、C D 3 誘導性C X C L 1 1、C D 3 誘導性インターフェロン (I F N) - γ 、I L - 2 および／またはI L - 1 7 (I L - 1 7 A としても知られる) 産生を含む、C D 3 誘導性シグナル伝達の抑制をもたらすことになる。このようなC D 3 誘導性シグナル伝達は、末梢血単核細胞 (P B M C) および／またはT細胞において減少する場合がある。この抑制は、V I S T A、V S I G 3 および／またはV S I G 8を発現する細胞を用いたインビトロ細胞ベースのアッセイを使用して検出される場合がある。例えば、図15に示されるように、V S I G 3 - C O M P は、T細胞の増殖および活性化をブロックする。

20

【0148】

方法の実施形態

1. V I S T A と V S I G 3 との相互作用を調節することを含む方法であって、V I S T A と V S I G 3 との相互作用を調節する化合物を導入することを含む方法。

【0149】

2. V I S T A と V S I G 3 との相互作用の調節が、V I S T A と V S I G 3 との相互作用をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることを含む、実施形態1の方法。

30

【0150】

3. V I S T A と V S I G 3 との相互作用を調節することが、V I S T A もしくはV S I G 3 またはその両方の多量体化を調節することを含む、実施形態1または2のいずれかの方法。

【0151】

4. V I S T A が細胞の表面上で発現される、

V S I G 3 が細胞の表面上で発現される、または

V I S T A およびV I S G 3 の両方が細胞の表面上で発現される、

実施形態1～3のいずれか1つの方法。

40

【0152】

5. 化合物が抗V S I G 3 抗体を含む、実施形態1～4のいずれか1つの方法。

【0153】

6. 抗V S I G 3 抗体が、

表2Aのクローンのうちの1つにより産生される抗体と同じV S I G 3 エピトープに結合する抗体、または

表2Aのクローンのうちの1つにより産生される抗体、を含む、実施形態5の方法。

【0154】

7. 抗V S I G 3 抗体が、

表2Aのクローンのうちの1つ以上により産生される抗体の重鎖可変領域、または、

50

表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上により産生される抗体の軽鎖可変領域、のうちの少なくとも 1 つを含む、実施形態 5 または 6 のいずれかの方法。

【0155】

8. 抗 V S I G 3 抗体が、

表 2 A のクローンのうちの 1 つにより産生される抗体の重鎖可変領域の 1 つ以上の相補性決定領域 (C D R) を含む重鎖可変領域、または、

表 2 A のクローンのうちの 1 つにより産生される抗体の軽鎖可変領域の 1 つ以上の C D R を含む軽鎖可変領域、のうちの少なくとも 1 つを含む、実施形態 5 ～ 7 のいずれか 1 つの方法。

【0156】

9. 抗 V S I G 3 抗体が、表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上により産生される抗体を含む、実施形態 5 ～ 8 のいずれか 1 つの方法。

【0157】

10. 化合物がさらに抗 V I S T A 抗体を含む、実施形態 5 ～ 9 のいずれか 1 つの方法。

【0158】

11. 化合物が抗原結合フラグメントを含む、実施形態 5 ～ 10 のいずれか 1 つの方法。

【0159】

12. 化合物が V S I G 3 ポリペプチドを含む、実施形態 1 ～ 11 のいずれか 1 つの方法。

【0160】

13. 化合物が、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するタンパク質を含む、実施形態 1 ～ 12 のいずれか 1 つの方法。

【0161】

14. 化合物が V S I G 3 の可溶性フラグメントを含む、実施形態 12 または 13 のいずれかの方法。

【0162】

15. 化合物が V S I G 3 の細胞外領域を含む、実施形態 12 ～ 14 のいずれか 1 つの方法。

【0163】

16. 化合物が配列番号 2 を含む、実施形態 15 の方法。

【0164】

17. 化合物が融合タンパク質を含む、実施体 15 または 16 のいずれかの方法。

【0165】

18. 化合物が F c ドメインを含む、実施形態 15 ～ 17 のいずれか 1 つの方法。

【0166】

19. 化合物が配列番号 3 を含む、実施形態 18 の方法。

【0167】

20. 化合物が V I S T A ポリペプチドを含む、実施形態 1 ～ 19 のいずれか 1 つの方法。

【0168】

21. 化合物が配列番号 4、配列番号 5、または配列番号 6 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するタンパク質を含む、実施形態 20 の方法。

【0169】

22. 化合物が V I S T A の可溶性フラグメントを含む、上記実施形態 20 または 21 のいずれかの方法。

【0170】

23. 化合物が V I S T A の細胞外領域を含む、実施形態 20 ～ 23 のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

- 【0171】
24. 化合物が配列番号5を含む、実施形態23の方法。
- 【0172】
25. 化合物が融合タンパク質を含む、実施形態20～24のいずれか1つの方法。
- 【0173】
26. 化合物がFcドメインを含む、実施形態20～25のいずれか1つの方法。
- 【0174】
27. 化合物が配列番号6を含む、実施形態26の方法。
- 【0175】
28. 化合物が軟骨オリゴマー基質タンパク質 (COMP) のコイルドコイルドメインを含む、実施形態1～27のいずれかの方法。 10
- 【0176】
29. COMPがラットCOMPまたはヒトCOMPを含む、実施形態28の方法。
- 【0177】
30. コイルドコイルドメインが、五量体コイルドコイルドメインを含む、実施形態28または29のいずれかの方法。
- 【0178】
31. コイルドコイルドメインがVSI G3ポリペプチドまたはVISTAポリペプチドまたはその両方に共有結合される、実施形態28～30のいずれか1つの方法。
- 【0179】 20
32. 化合物がリンカードメインを含む、実施形態31の方法。
- 【0180】
33. リンカードメインが、NSGGGSGGGTG (配列番号13) またはLDRNLPLAPLP (配列番号14) またはその両方を含む、実施形態32の方法。
- 【0181】
34. 化合物がアルカリホスファターゼを含む、実施形態28～33のいずれか1つの方法。
- 【0182】
35. 化合物がTEV切断部位を含む、実施形態28～34のいずれか1つの方法。
- 【0183】 30
36. 化合物がVISTAとVSI G3との結合を阻害する、実施形態1～35のいずれか1つの方法。
- 【0184】
37. 化合物がVISTAシグナル伝達を阻害する、実施形態1～36のいずれか1つの方法。
- 【0185】
38. 化合物がVSI G3シグナル伝達を阻害する、実施形態1～37のいずれか1つの方法。
- 【0186】
39. 化合物が、CD3誘導性IL-2産生、CD3誘導性インターフェロン- γ 産生、CD3誘導性RANTES産生、CD3誘導性MIP-1アルファ産生、CD3誘導性IL-17産生、もしくはCD3誘導性CXCL11産生、またはそれらの組み合わせに影響を与える、実施形態1～38のいずれかの方法。 40
- 【0187】
40. 化合物がT細胞増殖に影響を与える、実施形態1～39のいずれかの方法。
- 【0188】
41. 方法が、対象を治療有効量の化合物で処置することをさらに含む、実施形態1～40のいずれか1つの方法。
- 【0189】
42. VSI G3が対象から得られた生物学的試料内に過剰発現される、実施形態41 50

の方法。

【0190】

抗体の実施形態

1. V S I G 3 に結合するモノクローナル抗体。

【0191】

2. 抗体が、V S I G 3-V I S T A 相互作用、V S I G 3-V S I G 8 相互作用、V S I G 3 の多量体化、もしくはV I S T A の多量体化、またはその組合せをブロックする、実施形態1の抗V S I G 3 抗体。

【0192】

3. 抗体が、

表2Aのクローンのうちの1つにより産生される抗体と同じV S I G 3 エピトープに結合する抗体、または

表2Aのクローンのうちの1つにより産生される抗体を含む、実施形態1または2のいずれかの抗V S I G 3 抗体。

【0193】

4. 抗V S I G 3 抗体が、

表2Aのクローンのうちの1つ以上により産生される抗体の重鎖可変領域、または

表2Aのクローンのうちの1つ以上により産生される抗体の軽鎖可変領域、

のうちの少なくとも1つを含む、実施形態1～3のいずれか1つの抗V S I G 3 抗体

。

【0194】

5. 抗V S I G 3 抗体が、

表2Aのクローンのうちの1つにより産生される抗体の重鎖可変領域の1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む重鎖可変領域、または

表2Aのクローンのうちの1つにより産生される抗体の軽鎖可変領域の1つ以上のCDRを含む軽鎖可変領域、

のうちの少なくとも1つを含む、実施形態1～4のいずれか1つの抗V S I G 3 抗体

。

【0195】

6. 抗V S I G 3 抗体が、表2Aのクローンのうちの1つ以上により産生される抗体を含む、実施形態1～5のいずれか1つの抗V S I G 3 抗体。

【0196】

7. 表2Aのクローンのうちの1つ以上によって産生されるモノクローナル抗体。

【0197】

8. 表2Aのクローンのうちの1つ以上によって産生される抗体の重鎖可変領域、または

表2Aのクローンのうちの1つ以上によって産生される抗体の軽鎖可変領域、

のうちの少なくとも1つを含む、モノクローナル抗体。

【0198】

9. 表2Aのクローンのうちの1つによって産生される抗体の重鎖可変領域の1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む重鎖可変領域、または

表2Aのクローンのうちの1つによって産生される抗体の軽鎖可変領域の1つ以上のCDRを含む軽鎖可変領域、

のうちの少なくとも1つを含む、モノクローナル抗体。

【0199】

10. 表2Aのクローンのうちの1つによって産生されるモノクローナル抗体の重鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)の各々、または

表2Aのクローンのうちの1つによって産生されるモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のCDRの各々、または

表2Aのクローンのうちの1つによって産生されるモノクローナル抗体の重鎖可変領域

10

20

30

40

50

の C D R の各々、および表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生されるモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の C D R の各々、を含むモノクローナル抗体。

【0200】

13. 表 2 A のクローンによって産生されるモノクローナル抗体の重鎖可変領域の 1 つ以上の相補性決定領域 (C D R) と少なくとも 80 % 同一であるか、または

表 2 A のクローンによって産生されるモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の 1 つ以上の C D R と少なくとも 80 % 同一であるか、または

表 2 A のクローンによって産生されるモノクローナル抗体の重鎖可変領域の 1 つ以上の C D R と少なくとも 80 % 同一であり、かつ表 2 A のクローンによって産生されるモノクローナル抗体の軽鎖可変領域の 1 つ以上の C D R と少なくとも 80 % 同一である、アミノ酸配列、を含むモノクローナル抗体。

10

【0201】

14. モノクローナル抗体が V S I G 3 に結合する、実施形態 7 ~ 13 のいずれか 1 つのモノクローナル抗体。

【0202】

15. モノクローナル抗体が I g G 抗体を含む、実施形態 7 ~ 14 のいずれか 1 つのモノクローナル抗体。

【0203】

16. モノクローナル抗体が、V S I G 3 リガンドへの V S I G 3 の結合を阻害する、実施形態 7 ~ 15 のいずれか 1 つのモノクローナル抗体。

20

【0204】

17. モノクローナル抗体が、V I S T A への V S I G 3 の結合を阻害する、実施形態 7 ~ 16 のいずれか 1 つのモノクローナル抗体。

【0205】

18. モノクローナル抗体が、F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F (a b)₂ フラグメント、もしくは F v フラグメント、またはその組み合わせを含む抗原結合フラグメントを含む、実施例 7 ~ 17 のいずれか 1 つの実施形態のモノクローナル抗体。

【0206】

19. 実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つのモノクローナル抗体または抗 V S I G 3 抗体を含む、組成物。

30

【0207】

20. 実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つのモノクローナル抗体または抗 V S I G 3 抗体を含むキット。

【0208】

化合物の実施形態

1. V I S T A と V S I G 3 との相互作用を調節する化合物。

【0209】

2. 抗 V S I G 3 抗体を含む実施形態 1 の化合物。

【0210】

3. 抗 V S I G 3 抗体が、

40

表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体と同じ V S I G 3 エピトープに結合する抗体、または

表 2 A のクローンのうちの 1 つによって産生される抗体、を含む、実施形態 2 の化合物。

【0211】

4. 抗 V S I G 3 抗体が、

表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体の重鎖可変領域、または

表 2 A のクローンのうちの 1 つ以上によって産生される抗体の軽鎖可変領域、のうちの少なくとも 1 つを含む、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つの化合物。

【0212】

50

5. 抗V S I G 3抗体が、

表2 Aのクローンのうちの1つによって産生される抗体の重鎖可変領域のうちの1つ以上の相補性決定領域(C D R)を含む重鎖可変領域、または

表2 Aのクローンのうちの1つによって産生される抗体の軽鎖可変領域のうちの1つ以上のC D Rを含む軽鎖可変領域、のうちの少なくとも1つを含む、実施形態1～4のいずれか1つの化合物。

【0 2 1 3】

6. 抗V S I G 3抗体が、表2 Aのクローンのうちの1つ以上によって産生される抗体を含む、実施形態1～5のいずれか1つの化合物。

【0 2 1 4】

7. 化合物が抗原結合フラグメントを含む、実施形態2～6のいずれか1つの化合物。

【0 2 1 5】

8. 化合物が、V I S T AとV S I G 3との結合を阻害する、実施形態1～7のいずれか1つの化合物。

【0 2 1 6】

9. 化合物が、V S I G 3の多量体化を調節する、実施形態1～8のいずれか1つの化合物。

【0 2 1 7】

10. 化合物が、V I S T Aのシグナル伝達を阻害する、実施形態1～9のいずれか1つの化合物。

【0 2 1 8】

11. 化合物が、V S I G 3のシグナル伝達を阻害する、実施形態1～10のいずれか1つの化合物。

【0 2 1 9】

12. 化合物が、C D 3誘導性I L-2産生、C D 3誘導性インターフェロナーγ産生、C D 3誘導性R A N T E S産生、C D 3誘導性M I P-1アルファ産生、C D 3誘導性I L-17産生、もしくはC D 3誘導性C X C L 11産生、またはそれらの組み合わせに影響を与える、実施形態1～11のいずれか1つの化合物。

【0 2 2 0】

13. 化合物がT細胞増殖に影響を与える、実施形態1～12のいずれか1つの化合物。

【0 2 2 1】

14. 化合物がV S I G 3ポリペプチドを含む、実施形態1～13のいずれか1つの化合物。

【0 2 2 2】

15. 化合物が、配列番号1、配列番号2、または配列番号3に対して少なくとも80%の配列同一性を有するタンパク質を含む、実施形態14の化合物。

【0 2 2 3】

16. 化合物が、V S I G 3の可溶性フラグメントを含む、実施形態14または15の化合物。

【0 2 2 4】

17. 化合物が、V S I G 3の細胞外領域を含む、実施形態14～16のいずれか1つの化合物。

【0 2 2 5】

18. 化合物が配列番号2を含む、実施形態17の化合物。

【0 2 2 6】

19. 化合物が融合タンパク質を含む、実施形態17～18のいずれか1つの化合物。

【0 2 2 7】

20. 化合物がF cドメインを含む、実施形態14～19のいずれか1つの化合物。

【0 2 2 8】

10

20

30

40

50

21. 化合物が配列番号3を含む、実施形態20の化合物。
【0229】
22. 化合物がVISTAポリペプチドを含む、実施形態1～21のいずれか1つの化合物。
【0230】
23. 化合物が、配列番号4、配列番号5、または配列番号6に対して少なくとも80%の配列同一性を有するタンパク質を含む、上記実施形態22の化合物。
【0231】
24. 化合物が、VISTAの可溶性フラグメントを含む、実施形態22または23の化合物。
【0232】
25. 化合物が、VISTAの細胞外領域を含む、実施形態22～24のいずれか1つの化合物。
【0233】
26. 化合物が配列番号5を含む、実施形態25の化合物。
【0234】
27. 化合物が融合タンパク質を含む、実施形態1～26のいずれか1つの化合物。
【0235】
28. 化合物がFcドメインを含む、実施形態1～27のいずれか1つの化合物。
【0236】
29. 化合物が配列番号6を含む、実施形態28の化合物。
【0237】
30. 化合物が、軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP)のコイルドコイルドメインを含む、実施形態1～29のいずれかの化合物。
【0238】
31. COMPがラットCOMPまたはヒトCOMPを含む、実施形態30の化合物。
【0239】
32. コイルドコイルドメインが、五量体コイルドコイルドメインを含む、実施形態30または31のいずれかの化合物。
【0240】
33. コイルドコイルドメインがVSI G3ポリペプチドもしくはVISTAポリペプチドまたはその両方に共有結合される、実施形態30～32のいずれか1つの化合物。
【0241】
34. 化合物がリンカードメインを含む、実施形態33の化合物。
【0242】
35. リンカードメインが、NSGGSGGGTG(配列番号13)もしくはLDRNLPLPLGP(配列番号14)またはその両方を含む、実施形態34の化合物。
【0243】
36. 化合物がアルカリホスファターゼを含む、実施形態30～35のいずれか1つの化合物。
【0244】
37. 化合物がTEV切断部位を含む、実施形態30～36のいずれか1つの化合物。
【0245】
38. 化合物が、VISTAとVSI G3との結合を阻害する、実施形態1～37のいずれか1つの化合物。
【0246】
39. 実施形態1～38のいずれかの化合物を含む、組成物。
【0247】
40. 実施形態1～38のいずれか1つの化合物を含む、キット。
【0248】

41. 治療有効量の実施形態1～38のいずれか1つの化合物で対象を処置することを
含む、方法。

【0249】

42. V S I G 3が対象から得られる生物学的試料内に過剰発現される、実施形態41
の方法。

【0250】

組成物の実施形態

1. 少なくとも1つの抗V S I G 3抗体が表2Aのクローンによって産生される抗体を
含む、2つ以上の抗V S I G 3抗体を含む組成物。

【0251】

2. 各抗V S I G 3抗体が、V S I G 3－V I S T A相互作用、V S I G 3－V I S T
A 8相互作用、V S I G 3の多量体化、V I S T Aの多量体化の1つ以上をブロックする
実施形態1の組成物。

【0252】

3. 2つ以上の抗V S I G 3抗体が異なるエピトープに結合する、実施形態1または2
のいずれかの組成物。

【0253】

4. 抗V S I G 3抗体のうちの少なくとも1つがV S I GのA B E I g面と相互作用
する実施体1～3のいずれかの組成物。

【0254】

5. 抗V S I G 3抗体のうちの少なくとも1つがV S I GのG F C I g面と相互作用
する実施体1～4のいずれかの組成物。

【0255】

6. 抗V S I G 3抗体および抗V I S T A抗体を含み、V S I G 3－V I S T A相互作
用、V S I G 3－V I S T A 8相互作用、V S I G 3の多量体化、もしくはV I S T Aの
多量体化、またはそれらの組み合わせをブロックし、かつ抗V S I G 3抗体が表2Aのク
ローンのうちの1つ以上によって産生される抗体を含む、組成物。

【0256】

7. 多量体化V S I G 3、多量体化V I S T A、もしくは多量体化V S I G 8、または
それらの組み合わせを含む、組成物。

【0257】

ポリクローナル抗体の実施形態

1. 免疫原で免疫することによって生成されるポリクローナル抗体であって、免疫原が
ポリペプチドを含み、ポリペプチドが、表3Aに記載されるポリペプチドのうちの1つ以
上を含む、ポリクローナル抗体。

【0258】

2. 免疫原で免疫することによって生成されるポリクローナル抗体であって、免疫原が
ポリペプチドを含み、ポリペプチドが、表3Aに記載されるポリペプチドのうちの1つ以
上からなる、ポリクローナル抗体。

【0259】

3. 免疫原で免疫することによって生成されるポリクローナル抗体であって、免疫原が
ポリペプチドを含み、ポリペプチドが表3Aに記載のポリペプチドからなる、ポリクロー
ナル抗体。

【0260】

4. ポリペプチドで免疫することによって生成されるポリクローナル抗体であって、ポ
リペプチドが表3Aに記載のペプチドからなる、ポリクローナル抗体。

【0261】

5. ポリクローナル抗体がV S I G 3に結合する、実施形態1～4のいずれか1つのポ
リクローナル抗体。

【0262】

10

20

30

40

50

本発明を以下の実施例により例示する。特定の実施例、材料、量、および手順は、本明細書に記載される本発明の範囲および趣旨に従って広く解釈されるべきであることが理解されるべきである。

実施例

【0263】

別段の記載がない限り、以下の実施例における全てのインキュベーションは室温におけるものであり、全ての試薬、出発物質、および使用した溶媒は、商業的供給業者（Sigma-Aldrich, St. Louis, MOなど）から購入し、さらに精製することなく使用した。

【0264】

実施例1：モノクローナル抗体

組換えヒトV S I G 3 F cキメラ（「r h V S I G 3」一配列番号3によってコードされる；表1を参照のこと）は、機能的E L I S A結合アッセイにおいて、組換えヒトV I S T A F cキメラ（「r h V I S T A」一配列番号6によってコードされる；表1を参照のこと）に特異的に結合する。r h V I S T Aを、E L I S Aマイクロタイタープレートのウェル上に、100 μ Lの体積中2 μ g / m lでコーティングした。ウェルを1 %のB S Aでブロッキングした後、ビオチンで標識した様々な量のr h V S I G 3を添加した。r h V S I G 3-r h V I S T A相互作用に起因するプレートと結合したビオチン標識をストレプトアビジン-H R Pで検出した。図1 Aに示されるように、r h V I S T Aが、ウェルあたり100 μ Lの体積中2 μ g / m lでマイクロタイタープレートのウェル上に固定化される場合、最適な結合応答の50 %を生じるr h V S I G 3の濃度は、約0.25 μ g / m lである。非特異的結合を差し引き、全ての場合において、全シグナルの5 %未満であった。

【0265】

モノクローナル抗V S I G 3抗体を開発し、特異性を、250 n g / m lのH i s タグ化r h V S I G 3タンパク質を有するコーティングを用いた直接E L I S A試験で試験した。表2のクローンによって産生された抗体の結果を、表2 Aの右端の列に示す。

【0266】

r h V S I G 3-r h V I S T A相互作用に対するモノクローナル抗V S I G 3抗体（表2 Aのクローンのうちの1つによって産生される抗体を含む）の効果を試験するために、E L I S Aプレートを、2 ~ 8 $^{\circ}$ Cにて一晩、100 μ Lの体積中2 μ g / m lのr h V S I G 3でコーティングした。1 %のB S Aでブロッキングした後、様々な量のm s xヒトV S I G 3を添加し、室温で2時間前処置した。ビオチン化r h V I S T Aタンパク質を、100 μ Lの体積中7.5 μ g / m lで各ウェルに添加した。r h V S I G 3-r h V I S T A相互作用は、ストレプトアビジン-H R Pを用いて検出され、続いて色彩反応を行った。代表的な結果を図1 Bに示す。

【0267】

V I S T Aに特異的な抗体の存在下でE L I S Aアッセイを用いて試験したr h V S I G 3とr h V I S T Aとの間の相互作用の特異性を示すさらなる結果を、表2 Bにまとめる。30のモノクローナル抗ヒトV S I G 3抗体を、機能的E L I S A結合アッセイを用いて試験した。表2 Bに示すように、試験したV S I G 3に対する30個のモノクローナル抗体のうち26個は、r h V S I G 3とr h V I S T Aとの間の相互作用をブロックした。

表2 A

10

20

30

40

【表 2】

抗体 クロー ン	代替名	免疫原	タイプ	rhVSIG-3/ his-1
774206	774206.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
774208	774208.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
774211	774211.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
774213	774213.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
774220	774220.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
774221	774221.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
774225	774225.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
774226	774226.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
774232	774232.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
774234	774234.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
973401	973401.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
973404	973404.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
973408	973408.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
973422	973422.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
973423	973423.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
973428	973428.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
973433	973433.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
973435	973435.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
973436	973436.111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993501	993501 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	弱い
993502	993502 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993503	993503 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	検出されな い
993505	993505 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993508	993508 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993512	993512 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993515	993515 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993517	993517 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	検出されな い
993518	993518 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993521	993521 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	検出されな い
993523	993523 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	検出されな い
993527	993527 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	検出されな い
993611	993611 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993619	993619 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993620	993620 . 1	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい

10

20

30

40

	または 111			
993621	993621 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993622	993622 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	検出されない
993623	993623 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	検出されない
993625	993625 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993626	993626 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993627	993627 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993628	993628 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993629	993629 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	はい
993630	993630 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	マウス モノ	検出されない
993804	993804 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	検出されない
993810	993810 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	はい
993817	993817 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	弱い
993820	993820 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	はい
993821	993821 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	はい
993822	993822 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	検出されない
993824	993824 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	検出されない
993825	993825 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	はい
993826	993826 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	はい
993832	993832 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	弱い
993835	993835 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	はい
993836	993836 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	はい
993839	993839 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	はい
993843	993843 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	はい
993848	993848 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	検出されない
993851	993851 . 1 または 111	rhVSIG-3 aal-245/His	ラット モノ	弱い

10

20

30

40

表 2 B

【表 3】

抗体 クローン #	免疫原	抗体タイプ	VSIG-3 および VISTA 結合 のブロッキング
973404	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0. 526 μ g/mL。
973422	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	90 %ブロッキング、ND50 : 0. 519 μ g/mL。
973423	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	75 %ブロッキング、ND50 : 0. 309 μ g/mL
973436	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0. 439 μ g/mL。
973435	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	ブロッキングなし
993501	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	60 %ブロッキング、ND50 : 0. 433 μ g/mL
993502	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	60 %ブロッキング、ND50 : 0. 455 μ g/mL。
993508	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	60 %ブロッキング、ND50 : 0. 448 μ g/mL。
993512	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	60 %ブロッキング、ND50 : 0. 471 μ g/mL。
993515	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	60 %ブロッキング、ND50 : 0. 388 μ g/mL。
993518	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	60 %ブロッキング、ND50 : 0. 665 μ g/mL。
993521	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	60 %ブロッキング、ND50 : 0. 255 μ g/mL。
993527	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	ブロッキングなし
993611	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 2. 87 μ g/mL。
993619	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 2. 46 μ g/mL。
993620	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 2. 66 μ g/mL。
993622	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	60 %ブロッキング、ND50 : 2. 15 μ g/mL。
993625	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 5. 12 μ g/mL。
993626	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	60 %ブロッキング、ND50 : 2. 03 μ g/mL。
993628	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 3. 18 μ g/mL。
993630	rhVSIG-3 (1-245)	マウス モノ	ブロッキングなし
993820	rhVSIG-3 (1-245)	ラット モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0. 32 μ g/mL。
993821	rhVSIG-3 (1-245)	ラット モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0. 381 μ g/mL。
993822	rhVSIG-3 (1-245)	ラット モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0.

10

20

30

40

			153 μ g/mL。
993826	rhVSIg-3 (1-245)	ラット モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0.396 μ g/mL。
993836	rhVSIg-3 (1-245)	ラット モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0.315 μ g/mL。
993839	rhVSIg-3 (1-245)	ラット モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0.406 μ g/mL。
993843	rhVSIg-3 (1-245)	ラット モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0.416 μ g/mL。
993848	rhVSIg-3 (1-245)	ラット モノ	80 %ブロッキング、ND50 : 0.279 μ g/mL。
993851	rhVSIg-3 (1-245)	ラット モノ	ブロッキングなし

10

【0268】

実施例2：ポリクローナル抗体

ウサギポリクローナル抗ヒトVSIg-3抗体を、表3Aに列挙されるポリペプチドを使用して生成し、そして実施例1に記載されるように試験した。簡潔には、rhVSIg-3を、ELISAマイクロタイタープレートのウェル上に、100 μ Lの体積中2 μ g/mLで、2～8℃にて一晩、コーティングした。ウェルを1%のBSAでブロッキングした後、様々な量のポリクローナルウサギ抗hVSIg-3ペプチド抗体を添加し、室温にて2時間前処置した。次いで、7.5 μ g/mLのビオチン化rhVISTAを、100 μ Lの体積中で各ウェルの中へと添加した。

20

【0269】

例示的な結果を図2および表3に示す。表3Bに示されるように、試験した16個のウサギポリクローナル抗体のうちの6個は、rhVSIg3とrhVISTAとの間の相互作用をブロックした。ED50は、最大ブロッキングの50%を回収するのに必要な抗体の濃度を反映する。

表3A

【表 4】

抗体	ペプチド免疫原	抗体タイプ
Q111	Q111 ～ C120	ウサギ ポリ
H89	H89～M98+C	ウサギ ポリ
L138	L138～C149	ウサギ ポリ
I205	I205 ～ C215	ウサギ ポリ
V216	V216 ～ C226	ウサギ ポリ
Y176	C+Y176 ～ K186	ウサギ ポリ
G129	G129～L138+C	ウサギ ポリ
C44	C44～L55	ウサギ ポリ
S154	S154～C165	ウサギ ポリ
D194	D194～N204+C	ウサギ ポリ
G78	G78～F88+C	ウサギ ポリ
C120	C120 ～ N132	ウサギ ポリ
Q33	Q33～C44	ウサギ ポリ
N66	N66 ～ Q77 + C	ウサギ ポリ
C165	C165～T175	ウサギ ポリ
K186	C+K186～Q195	ウサギ ポリ

10

20

表 3 B

【表 5】

抗体	ペプチド免疫原	抗体タイプ	ブロッキングアクティビティ
Q111	Q111 ～ C120	ウサギ ポリ	ブロッキングなし
H89	H89～M98+C	ウサギ ポリ	ブロッキングなし
L138	L138～C149	ウサギ ポリ	ブロッキングなし
I205	I205 ～ C215	ウサギ ポリ	ブロッキングなし
V216	V216 ～ C226	ウサギ ポリ	ブロッキングなし
Y176	C+Y176 ～ K186	ウサギ ポリ	ブロッキングなし
G129	G129～L138+C	ウサギ ポリ	70%ブロッキング、ED50=2. 59 ug/mL
C44	C44～L55	ウサギ ポリ	ブロッキングなし
S154	S154～C165	ウサギ ポリ	50%ブロッキング、ED50=6. 59 ug/mL
D194	D194～N204+C	ウサギ ポリ	40%ブロッキング、ED50=3. 78 ug/mL
G78	G78～F88+C	ウサギ ポリ	ブロッキングなし
C120	C120 ～ N132	ウサギ ポリ	40%ブロッキング、ED50=10. 0 ug/mL
Q33	Q33～C44	ウサギ ポリ	40%ブロッキング、ED50=10. 1 ug/mL
N66	N66 ～ Q77 + C	ウサギ ポリ	40%ブロッキング、ED50=6. 06 ug/mL
C165	C165～T175	ウサギ ポリ	ブロッキングなし
K186	C+K186～Q195	ウサギ ポリ	ブロッキングなし

30

40

【0270】

実施例 3：T 細胞機能に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の効果

I L - 2 分泌物

図 3 に示すように、r h V S I G 3 は、T 細胞による抗 C D 3 誘導性 I L - 2 産生を用

50

量依存的に有意に阻害した。ウサギポリクローナル抗ヒトV S I G 3抗体（N 6 6）は、活性化T細胞からのI L - 2分泌を阻害するV S I G 3の能力をブロックした。

【0271】

マウス抗ヒトC D 3抗体を96ウェルプレート上に1 μ g / m Lで、2 ~ 8 $^{\circ}$ Cにて一晚コーティングした。次いで、r h V S I G - 3タンパク質を、連続希釈（白丸）または20 μ g / m Lでアッセイプレート上に固定化し、37 $^{\circ}$ Cにて3時間インキュベートした。連続希釈したポリクローナルウサギ抗ヒトV S I G - 3（N 6 6）またはアイソタイプ対照（ウサギI g G）を添加し、20 μ g / m Lのr h V S I G - 3タンパク質と共に室温にて1 ~ 2時間共インキュベートした。ヒトT細胞を、M a g C e l l e c t H u m a n C D 3 ⁺ I s o l a t i o n K i t（R & D S y s t e m s, M i n n e a p o l i s, MN）を用いてヒトPBMCから単離し、単離したヒトT細胞を、このプレートに添加し（2 $\times$ 10⁵ / ウェル）、5% C O ₂ の存在下、37 $^{\circ}$ Cにて24時間培養した。分泌されたI L - 2を、Q U A N T I K I N EヒトI L - 2 E L I S Aキット（R & D S y s t e m s, M i n n e a p o l i s, MN）を使用して、細胞培養上澄み液内で測定した。結果を図3に示す。

10

【0272】

N 6 6について観察されたN D 5 0は、約2. 67 μ g / m Lであり、固定化r h V S I G - 3の濃度に依存すると予想される。

【0273】

T細胞の増殖と活性化

20

図4および表4に示すように、r h V S I G 3タンパク質は、抗C D 3誘導性細胞増殖および正常ヒト末梢血T細胞の活性化を阻害し、抗V S I G 3抗体はこの阻害をブロックすることができる。

【0274】

抗ヒトC D 3（1 ~ 5 μ g / m L ; R & D S y s t e m s、クローンU C H T 1、M A B 1 0 0）およびヒトI g G（対照タンパク質；1 ~ 5 μ g / m L ; R & D S y s t e m s 1 0 0 - H G）またはr h V S I G 3タンパク質（10 ~ 50 μ g / m l）を、示された抗ヒトV S I G 3抗体（1 ~ 10 μ g / m l）と一緒に、4 $^{\circ}$ Cにて一晚インキュベートすることによって96ウェルプレート上にコーティングした。プレートをPBSで洗浄し、PBS中の2. 5%ヒトAB血清（I n n o v a t i v e R e s e a r c h, N o v i, M I）で30分間ブロックした。C D 3 ⁺ T細胞を、C e l l T r a c e V i o l e t増殖染料（L i f e T e c h n o l o g i e s、製造業者の仕様に従って）で標識したC D 3 ⁺ T細胞単離キット（R & D S y s t e m s、M A G H 1 0 1）を用いてヒトPBMCからネガティブに選択し、200 μ LのR P M I + 10%ヒトAB血清中でウェル（ウェル当たり5 $\times$ 10⁴ - 2 $\times$ 10⁵細胞）に添加した。プレートを37 $^{\circ}$ Cにて72 ~ 96時間インキュベートし、次いで細胞を回収し、増殖／細胞活性化をフローサイトメトリーによって分析した。

30

【0275】

図4および表4に示されるように、ヒトT細胞の抗C D 3誘導性増殖（図4、最初の灰色の棒）は、r h V S I G 3タンパク質（斜線の棒）によって阻害された。モノクローナル抗ヒトV S I G 3 A b 7 7 4 2 0 8との共培養は、この阻害に影響を及ぼさなかった。しかしながら、モノクローナル抗ヒトV S I G 3抗体クローン9 7 3 4 0 4および9 9 3 6 2 0を用いた培養は、r h V S I G 3媒介抑制を逆転することができ、これらの抗体がV S I G 3誘導性T細胞増殖抑制をブロックすることを示した。さらに、ポリクローナル抗体G 1 2 9およびC 1 2 0もr h V S I G 3媒介抑制を逆転させることができ、これらの抗体がV S I G 3誘導性のT細胞増殖抑制をブロックすることを示した。

40

表4

【表 6】

抗体	免疫原	T細胞増殖の抑制をブロック
774208	rhVSI G3 (1-245)	いいえ
973404	rhVSI G3 (1-245)	はい
993620	rhVSI G3 (1-245)	はい

【0276】

インターフェロン γ 分泌

図5に示すように、rhVSI G3は、T細胞による抗CD3誘導性インターフェロン γ 産生を用量依存的な様式で有意に阻害した。例示的なモノクローナル抗ヒトVSI G-3抗体(973404)は、活性化T細胞からのインターフェロン γ 分泌を阻害するVSI G3の性能をブロックした。

10

【0277】

マウス抗ヒトCD3抗体を96ウェルプレート上に1 μ g/mLで、2~8℃にて一晩コーティングした。次いで、rhVSI G-3タンパク質を、連続希釈(□-白四角)または20 μ g/mLでアッセイプレート上に固定化し、37℃にて3時間インキュベートした。連続希釈モノクローナル抗ヒトVSI G-3(973404または973422)を添加し、20 μ g/mLのrhVSI G-3タンパク質とともに室温にて1~2時間共インキュベートした。固定化の間、MagCelllect Human CD3+ T Cell Isolation Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)を用いて、キットからの挿入説明書に従ってヒトT細胞を単離した。単離したヒトT細胞(2 $\times$ 10⁵/ウェル)をプレートに添加し、5% CO₂の存在下、37℃にて24時間培養した。分泌されたインターフェロン γ を、QUANTIKINEヒトインターフェロン γ ELISAキット(R&D Systems, Minneapolis, MN)を使用して、細胞培養上澄み液内で測定した。結果を図5に示す。

20

【0278】

973404について観察されたND50(○-白丸)は約6.7 μ g/mLであり、固定化rhVSI G3の濃度に依存すると予想される。

【0279】

実施例4：融合タンパク質

30

図6に概略的に示すように、VISTA、VSI G3、またはVSI G8を、ラット軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP、残基26~72)の五量体コイルドコイルドメインに融合させた。配列を表5および図8A~図8Cに示す。

【0280】

図7に概略的に示すように、VISTA、VSI G3、またはVSI G8を、ラット軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP、残基26~72)の五量体コイルドコイルドメインに融合させ、続いてアルカリホスファターゼ、フラグ、および6xHisタグを融合させた。リンカー残基を緑色で示す。アルカリホスファターゼは、親和性に基づく細胞外相互作用スクリーニング(AVEXIS)アッセイにおける酵素的検出のために使用することができ、総タンパク質は、抗ポリHis抗体を使用して正規化することができる。配列を表5および図8A~8Cに示す。

40

【0281】

これらの融合タンパク質は、高度の多量体化を有し、そして比較的多数のサブユニット(類似の構築物は、ほとんど全て、5個の代わりに2~3個のサブユニットを含む)およびジスルフィド結合を介したテザリングから生じる高度に安定である。

表5

【表 7】

VISTA (1-195) - COMP - AlkPhos - フラグ/His (配列番号 7)	MGVPTALEAGSWRWGSLFLAASLGVAFAFKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLGPV DKGHDVTFYKTYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLE SASDHHGNFSITMRNLTLDDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPSNCVV YPSSSQESENITAAGSENLYFQGNSSGGSGGGTGGGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELL RHRVKEITFLKNTVMECDACGLDRNLPLAPLGPPIIPVEEENPDFWNREAAEALGAACKL QPAQTAAKNLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVD KHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVV TTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKY MFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTLMQASLDPSVTHLM GLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHHSRAYR ALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLVTDHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRK AYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPLDEETHAGEDVAVFARGPQA HLVHGVQEQT FIAHVMAFAACLEPYTACDLAPPAGTTDDYKDDDDKHHHHHH
VISTA (1-195) - COMP - His (配列番号 8)	MGVPTALEAGSWRWGSLFLAASLGVAFAFKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLGPV DKGHDVTFYKTYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLE SASDHHGNFSITMRNLTLDDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPSNCVV YPSSSQESENITAAGSENLYFQGNSSGGSGGGTGGGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELL RHRVKEITFLKNTVMECDACGLDRNLPLAPLGPPIIPVEEENPDFWNREAAEALGAACKL QPAQTAAKNLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVD KHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVV TTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKY MFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTLMQASLDPSVTHLM GLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHHSRAYR ALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLVTDHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRK AYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPLDEETHAGEDVAVFARGPQA HLVHGVQEQT FIAHVMAFAACLEPYTACDLAPPAGTTDDYKDDDDKHHHHHH
VSIG3 (1-245) - COMP - AlkPhos - フラグ/His (配列番号 9)	MTSQRSPALPLLLSLHGVAASLEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWM VTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDDGAPRFHGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQC LVNNLPDIGNIGVTGLTVLVPPSAPHQCIIQGSQDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEK LDNTLKLPTATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPPRNI GLIAGSENLYFQGNSSGGSGGGTGGGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHRVKEITFL KNTVMECDACGLDRNLPLAPLGPPIIPVEEENPDFWNREAAEALGAACKLQPAQTAAKNL IIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATA TAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVGVVTTTRVQHASP AGTYAHTVNRNWYSADVPASARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPE YPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTLMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKY EIHRSSTLDPSLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHHSRAYRALTETIMFDD AIERAGQLTSEEDTSLVTDHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNG PGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQT FIAHVMAFAACLEPYTACDLAPPAGTTDDYKDDDDKHHHHHH
VSIG3 (1-245) -	MTSQRSPALPLLLSLHGVAASLEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWM VTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDDGAPRFHGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQC

10

20

30

COMP-His (配列番号 10)	LVNNLPDIGGRNIGVTGLTVLVPPSAPHCQIQGSQDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEK LDNTLKLPTATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPPRNI GLIAGSENLYFQNSGGGSGGGTGGGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHRVKEITFL KNTVMECDACGLDRNLPLAPLPGPHHHHHH
VSIG8 (1-263) - COMP- AlkPhos-フ ラグ/His (配列番号 11)	MRVGGAFHLLLVLCLSPALLSAVRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEDYGPNGLDI EWMQVNSDPAHHRENVFLSYQDKRINHGSPLHLQQRVRFASDPSQYDASINLMNLQVSD TATYECRVKKTMTATRKVIVTVQARPAVPMCWTEGHMTYGNVVLKCYASGGSQPLSYKW AKISGHHYPYRAGSYTSQHSYHSELSYQESFHSSINQGLNNGDLVLKDISRADDGLYQCT VANNVGYSVCVVEVKVSDSRRIGGSENLYFQNSGGGSGGGTGGGDLAPQMLRELQETNA ALQDVRELLRHRVKEITFLKNTVMECDACGLDRNLPLAPLPGPIIPVEEENPDFWNREAA EALGAACKLQPAQTAAKNLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQKDKLGPFIPLAMDRFPYV ALSKTYNVDKHPD SGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAK KAGKSVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPASARQEGCQDIATQLISNMDID VILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQAS LDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLSRNPRGFFLFVEGGRIDH GHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLVLTADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGL APGKARDRKAYTVLLYGNPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPLDEETHAGEDV AVFARGPQAHLVHGVQEQTFAIHVMAFAACLEPYTACDLAPPAGTTDDYKDDDDKHHHHH H
VSIG8 (1- 263) - COMP- His (配列番号 12)。	MRVGGAFHLLLVLCLSPALLSAVRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEDYGPNGLDI EWMQVNSDPAHHRENVFLSYQDKRINHGSPLHLQQRVRFASDPSQYDASINLMNLQVSD TATYECRVKKTMTATRKVIVTVQARPAVPMCWTEGHMTYGNVVLKCYASGGSQPLSYKW AKISGHHYPYRAGSYTSQHSYHSELSYQESFHSSINQGLNNGDLVLKDISRADDGLYQCT VANNVGYSVCVVEVKVSDSRRIGGSENLYFQNSGGGSGGGTGGGDLAPQMLRELQETNA ALQDVRELLRHRVKEITFLKNTVMECDACGLDRNLPLAPLPGPHHHHHH

10

20

【0282】

実施例 5 - 表面プラズモン共鳴による VISTA-VSIG3 相互作用の動態および親和性の定量

VISTA または VISTA-COMP (それぞれ実施例 4 に記載のように調製) を、抗ポリ His 抗体を用いて CM5 チップ (GE Healthcare, US) の表面に共有結合的に固定化した。次いで、VSIG3-Fc 融合物の希釈物を、0.2 nM ~ 20 μM の範囲の濃度で表面上に流し、Biacore T200 Evaluation Software version 3.1 により 1:1 Langmuir 結合モデルへの二重参照減算データフィットを行った。

30

【0283】

図 9 に示すように、多量体 VISTA-COMP は、単量体 VISTA (約 2.5 μM) よりも VSIG3-Fc (約 17 nM) について約 150 倍高い親和性を有する。この増加は、主にオフレートの増加によるものである。

【0284】

実施例 6 - 親和性に基づく細胞外相互作用スクリーニング

40

親和性に基づく細胞外相互作用スクリーニング (AVEXIS) を改変して、組換えヒト VSIG3 (rhVSIG3) と VISTA の相互作用をブロックする VSIG3 に対する抗体をスクリーニングした。アッセイの概略図を図 10 に示す。簡潔には、精製された組換え Fc 融合タンパク質 (すなわち、例えば、VSIG3-Fc を含むベイトタンパク質) を、プロテイン A 被覆プレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 上で個々に捕捉し、次いで、1% の BSA ブロッキング緩衝液でブロックした。タンパク質 A 被覆プレート上で VSIG3-Fc ベイトを捕獲した後、ウェルを VSIG3 に対するモノクローナル抗体と共に個々にインキュベートした。次いで、COMP ヘリカルオリゴマーおよびアルカリホスファターゼに融合したオリゴマープレイトタンパク質を含む調整培地を添加し、インキュベートし、洗浄し、そして BLU

50

EPHOS試薬 (KPL/Sera Care, Milford, MA) を使用してアルカリホスファターゼ活性を検出することによって相互作用を定量的に測定した。

【0285】

ヒトV S I G 3を認識するラットおよびマウスモノクローナル抗体を作製し、V S I G 3-V I S T Aの相互作用をブロックする機能について試験した。V S I G 3-V I S T A相互作用の抗体ブロックについてのA V E X I Sアッセイスクリーニングを、上記のように行った。簡単に述べると、ベイトタンパク質V S I G 3-F cをタンパク質Aでコーティングしたプレート上に捕捉し、抗体無しで、または10 μ g/mLの抗体でブロックした。クローン774206および74208由来の抗体は、図11に示されるように、V I S T A-V S I G 3相互作用をほぼバックグランドレベルまでブロックすることが見 10
出され、そして図12、図13、および図14において陽性対照として使用された。プレイタンパク質、アルカリホスファターゼを有する多量体V I S T Aを、抗V S I G 3抗体の存在下でインキュベートした。洗浄後、V S I G 3とV I S T Aとの間の相互作用を、アルカリホスファターゼ基質を用いて測定し、650nmでの吸光度を測定することによって定量した。結果を図12、図13および図14に示し、表6に要約する。

【0286】

実施例7-V S I G 3-C O M Pは、T細胞の増殖および活性化をブロックする

抗ヒトC D 3 (1~5 μ g/mL) およびr h V S I G 3 (10~25 μ g/mL) またはV S I G 3-C O M P (10~25 μ g/mL) の組み合わせを、4℃にて一晩、96ウェルプレート上にコーティングした。プレートをPBSで洗浄した。C D 3 + T細胞 20
を、C D 3 + T細胞単離キット (R&D Systems, MAGH101) を用いてヒトPBMCからネガティブに選択し、Cell Trace Violet増殖染料 (Life Technologies、製造業者の仕様に従って) で標識し、200 μ lのRPMI+10%ヒトAB血清中のウェル (5 $\times$ 10⁴~2 $\times$ 10⁵細胞/ウェル) に添加した。プレートを37℃にて4~6日間インキュベートし、次いで細胞を回収し、C D 25発現および細胞増殖をフローサイトメトリーによって分析した。結果を図15に示す。

【0287】

図15に示されるように、抗C D 3誘導性C D 4 +ヒトT細胞の増殖 (左上) は、細胞をr h V S I G 3の存在下で培養した場合に部分的に阻害され、V S I G 3-C O M Pの 30
存在下で完全に阻害された (左列点プロット)。T細胞活性化の別の指標としてのC D 25発現は、r h V S I G 3またはV S I G 3-C O M Pの存在下で同様に阻害された (右側の列の点プロット)。これらの結果は、多量体化V S I G 3がr h V S I G 3よりもT細胞の活性化と増殖に強く影響することができることを示している。

【0288】

実施例8 - V S I G 3ブロッキング抗体は、V I S T Aが誘導するT細胞増殖および活性化の抑制を回復する

抗ヒトC D 3 (1~5 μ g/mL) およびr h V S I G 8 (10~25 μ g/mL) またはr h V I S T A (10~25 μ g/mL) の組み合わせを、4℃にて一晩インキュベートすることによって、96ウェルプレート上にコーティングした。プレートをPBSで 40
洗浄し、PBS中の2.5%ヒトAB血清 (Innovative Research) で30分間ブロックした。次いで、可溶性抗ヒトV S I G 3抗体、993620または973404 (1~10 μ g/mL) を、適切なウェルに添加した。C D 3 + T細胞を、Cell Trace Violet増殖染料 (Life Technologies、製造業者の仕様に従って) で標識したC D 3 + T細胞単離キット (R&D Systems、MAGH101) を用いてヒトPBMCからネガティブに選択し、200 μ LのRPMI+10%ヒトAB血清中のウェル (ウェル当たり5 $\times$ 10⁴~2 $\times$ 10⁵細胞) に添加した。プレートを37℃にて3~6日間インキュベートし、次いで細胞を回収し、増殖/細胞活性化をフローサイトメトリーによって分析した。抗体993620の結果を図16Aおよび図16Bに示す。抗体973404の結果を図16Cに示す。 50

【0289】

図16Aに示すように、抗CD3はCD4⁺ヒトT細胞の増殖を誘導し（左上のプロット）、これは細胞分裂毎の細胞トレーサーバイオレット染料の希釈、蛍光強度の低下、および右上の象限から左上の象限への細胞集団の動きによって証明される。rhVSI G8またはrhVISTAのいずれかを用いた培養は、右上の象限（上段、中央および右側のプロット）の細胞の維持によって示されるように、CD3誘導性増殖を阻害した。抗ヒトVSI G3抗体クローン993620の添加は、rhVSI G8による増殖の阻害に影響を及ぼさなかったが、rhVISTAタンパク質による増殖の阻害は、部分的に逆転した（右下）。これらの結果は、抗VSI G3モノクローナル抗体993620が、rhVISTA誘導性のT細胞増殖阻害をブロックすることができることを示す。さらに、抗ヒトVSI G3抗体クローン993620の添加は、rhVISTAで培養されたT細胞上でのCD25発現によって測定されるように、CD3誘導性T細胞活性化を部分的に回復させたが、rhVSI G8では回復させなかった（図16B、下段）。

10

【0290】

図16Cに示されるように、抗CD3誘導性のCD4⁺ヒトT細胞の増殖は、細胞をrhVISTAの存在下で培養した場合に阻害された。この阻害は、アイソタイプ対照抗体（左上）の添加によって影響されなかったが、増殖は、VSI G3モノクローナル抗体973404（左の点プロット）の添加によって部分的に回復した。T細胞活性化の別の指標であるCD25発現は、rhVISTAの存在下で同様に阻害され、これは、VSI G3抗体の添加によって部分的に逆転した（右の点プロット）。これらのデータは、抗VSI G3

20

表6 A V E X I S アッセイを用いた抗VSI G3抗体のスクリーニング。

【表8】

抗体クローン #	免疫原	抗体タイプ	VSIG3 - VISTA 相互作用 ブロッキング
993501	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993502	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993503	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	約 80%ブロッキング
993505	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	ブロッキングなし
993508	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993512	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993515	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993517	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	約 30%ブロッキング
993518	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	約 50%ブロッキング
993521	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993523	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	ブロッキングなし
993527	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	ブロッキングなし
993611	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	約 80%ブロッキング
993619	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 90%ブロッキング
993620	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993621	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	ブロッキングなし
993622	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993623	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	ブロッキングなし
993625	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993626	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993627	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	約 20%ブロッキング
993628	rhVSIG3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング

30

40

993629	rhVSI G3 (1-245)	マウスモノクローナル	> 95%ブロッキング
993630	rhVSI G3 (1-245)	マウスモノクローナル	約 60%ブロッキング
993804	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	ブロッキングなし
993810	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993817	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	ブロッキングなし
993820	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993821	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993822	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993824	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	約 80%ブロッキング
993825	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993826	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993832	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 90%ブロッキング
993835	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993836	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993839	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993843	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング
993848	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 90%ブロッキング
993851	rhVSI G3 (1-245)	ラットモノクローナル	> 95%ブロッキング

10

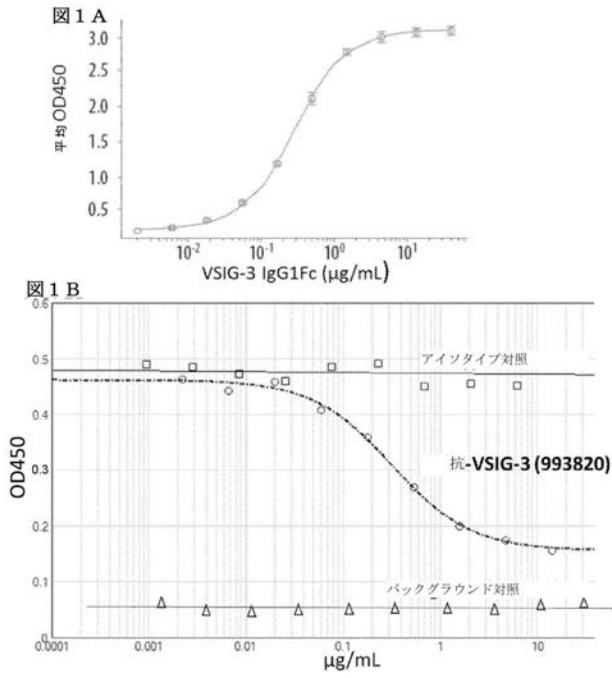
【0291】

20

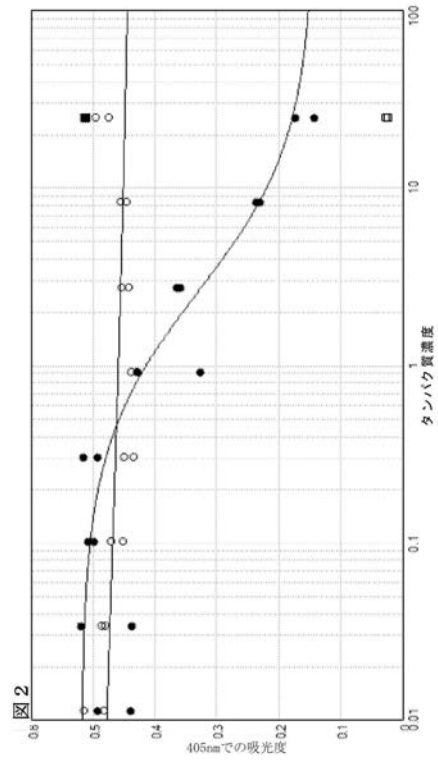
本明細書で引用した全ての特許、特許出願、および刊行物、ならびに電子的に入手可能な材料（例えば、GenBankおよびRefSeqにおけるヌクレオチド配列提出物、ならびに例えば、SwissProt、PIR、PRF、PDBにおけるアミノ酸配列提出物、ならびにGenBankおよびRefSeqにおける注釈付きコード領域からの翻訳物を含む）の完全な開示は、参照により組み込まれる。本出願の開示と、参照により本明細書に組み込まれるいずれかの文書の開示との間に何らかの矛盾が存在する場合、本出願の開示が適用されるものとする。前述の詳細な説明および実施例は、理解を明確にするためにのみ与えられたものである。不必要な限定は、それらからであるとは理解されない。本発明は、示され、かつ説明された厳密な詳細に限定されず、当業者に明らかな変形は、実施形態によって定義される本発明の中に含まれることになる。

30

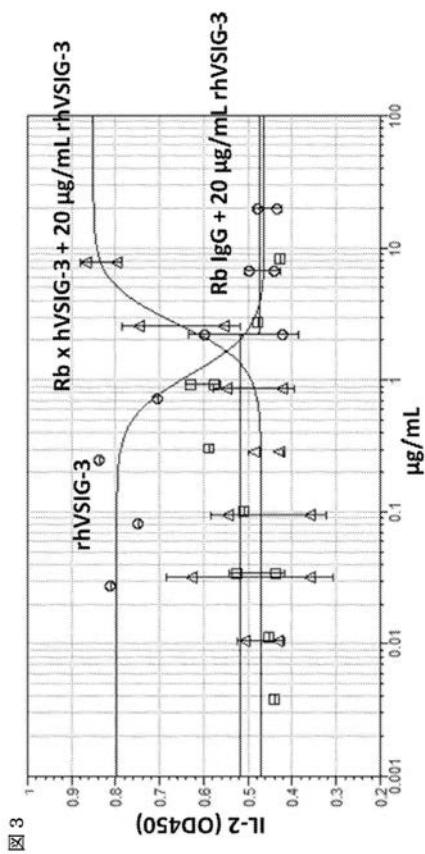
【図 1】



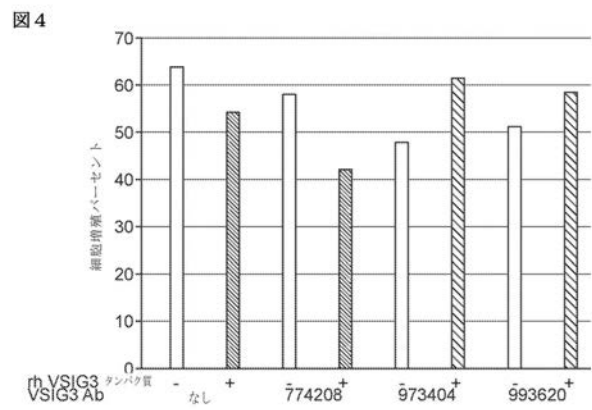
【図 2】



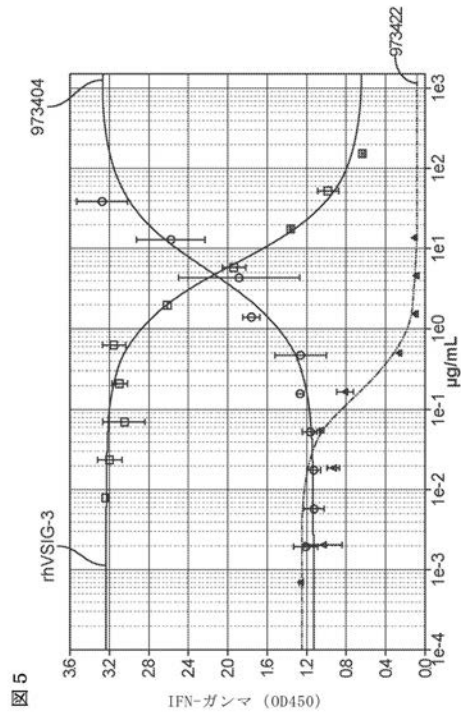
【図 3】



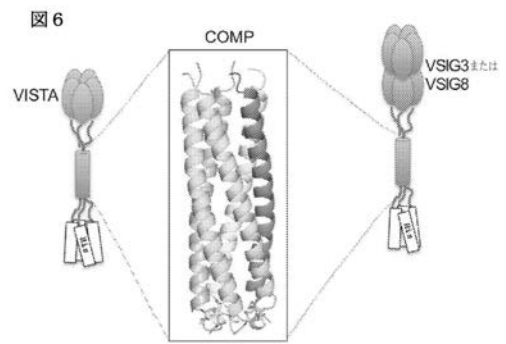
【図 4】



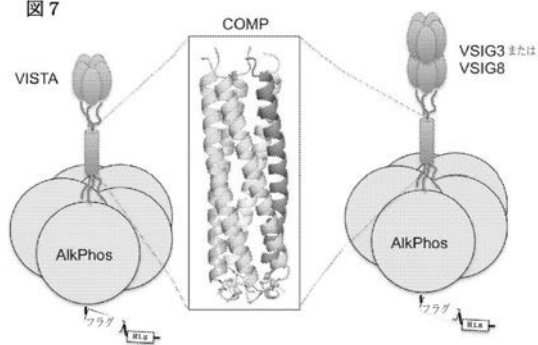
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8 A】

図 8 A

VISTA (1-195) -COMP-AlkPhos-フラグ/His	
シグナルペプチド	MGVPTALEAGSWRWGSLFLAFLAASLGPVAA
プロテイン外部ドメイン	FKVATPYSLYVCEPGQNVTLTCLLLGPVDRGHVDVTFYKTYRSSRGE VQTCSERRPRLNLTQDLHLHGGHQAANTSHDLAQRHGLASDHH GNFSITMRNLTLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTKGD APSNVCVYPSSSQESENITAA
TEV 切断部位	GSENLVFGQ
リンカー 1	NSGGSGGGTG
ラット軟骨外基質タンパク質 (COMP) ヘリックス	GGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHRVKEITFLKNTVMECDACG
リンカー 2	LDRLNPPLAPLGP
アルカリフォスファターゼ	IIPVEEENPDFWNREAAEALGAACKLQPAQTAAKNLIIFLDGGMGVS TVTAARILKGQKKDKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYNVDRKHPVDSGA TATAYLCGVKGNFQITGLSAAARFNQCNTRGNEVISVMNRKAKGK SVGVVTTTRVQHASPAQTYAHTVNRNWSADVPASARQEGQDIAT QLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYDDYVSGQGTLDGKNLVQ EWLAKRQAGARYVMNRTELMQASLDPSVTHLMGLFPGDMKYEIHRDS TLDPSLMENTEAAALRLSRNPRGFLFVEGGRI DHGHESRAYRALT ETIMFDIAERAGQLTSEEDTSLVTADHSHVFSFGYPLRGSSI FG LAPGKARDIRKAYTVLLYGNPGYVLKDGARPDVTESESGSPYRQQS AVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHVGQEQTFIAHVMAFAACLEP YTACDLAPPAGTTD
フラグ	DYKDDDDK
6xHis	HHHHHH

VISTA (1-195) -COMP-His	
シグナルペプチド	MGVPTALEAGSWRWGSLFLAFLAASLGPVAA
プロテイン外部ドメイン	FKVATPYSLYVCEPGQNVTLTCLLLGPVDRGHVDVTFYKTYRSSRGE VQTCSERRPRLNLTQDLHLHGGHQAANTSHDLAQRHGLASDHH GNFSITMRNLTLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTKGD APSNVCVYPSSSQESENITAA
TEV 切断部位	GSENLVFGQ
リンカー 1	NSGGSGGGTG
ラット軟骨外基質タンパク質 (COMP) ヘリックス	GGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHRVKEITFLKNTVMECDACG
リンカー 2	LDRLNPPLAPLGP
6xHis	HHHHHH

【図 8 B】

図 8 B

VISTA (1-245) -COMP-AlkPhos-フラグ/His	
シグナルペプチド	MTSQRSLAPLPLLLSLHGVAA
プロテイン外部ドメイン	SLEVESSEPGSIQVARGQPAVLCTFTTSAALINLNVIMVMTPLSNAN QPEQVILYQGGQMFDPGAPRFHGRVGTGTMPATNVSI FINNTQLSDT GTQCLVNNLPDIIGRNIGVTGLTVLVPPSAPHQIQGSQDIGSDVI LLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPATQDQVQGTVTIRNISALS SGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIGLIA
TEV 切断部位	GSENLVFGQ
リンカー 1	NSGGSGGGTG
ラット軟骨外基質タンパク質 (COMP) ヘリックス	GGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHRVKEITFLKNTVMECDACG
リンカー 2	LDRLNPPLAPLGP
アルカリフォスファターゼ	IIPVEEENPDFWNREAAEALGAACKLQPAQTAAKNLIIFLDGGMGVS TVTAARILKGQKKDKLGPETPLAMDRFPYVALSKTYNVDRKHPVDSGA TATAYLCGVKGNFQITGLSAAARFNQCNTRGNEVISVMNRKAKGK SVGVVTTTRVQHASPAQTYAHTVNRNWSADVPASARQEGQDIAT QLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYDDYVSGQGTLDGKNLVQ EWLAKRQAGARYVMNRTELMQASLDPSVTHLMGLFPGDMKYEIHRDS TLDPSLMENTEAAALRLSRNPRGFLFVEGGRI DHGHESRAYRALT ETIMFDIAERAGQLTSEEDTSLVTADHSHVFSFGYPLRGSSI FG LAPGKARDIRKAYTVLLYGNPGYVLKDGARPDVTESESGSPYRQQS AVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHVGQEQTFIAHVMAFAACLEP YTACDLAPPAGTTD
Flag	DYKDDDDK
6xHis	HHHHHH

VISTA (1-245) -COMP-His	
シグナルペプチド	MTSQRSLAPLPLLLSLHGVAA
プロテイン外部ドメイン	SLEVESSEPGSIQVARGQPAVLCTFTTSAALINLNVIMVMTPLSNAN QPEQVILYQGGQMFDPGAPRFHGRVGTGTMPATNVSI FINNTQLSDT GTQCLVNNLPDIIGRNIGVTGLTVLVPPSAPHQIQGSQDIGSDVI LLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPATQDQVQGTVTIRNISALS SGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIGLIA
TEV 切断部位	GSENLVFGQ
リンカー 1	NSGGSGGGTG
ラット軟骨外基質タンパク質 (COMP) ヘリックス	GGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHRVKEITFLKNTVMECDACG
リンカー 2	LDRLNPPLAPLGP
6xHis	HHHHHH

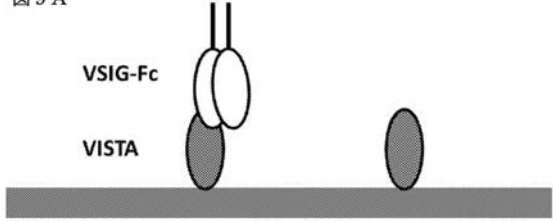
【図 8 C】

図 8 C

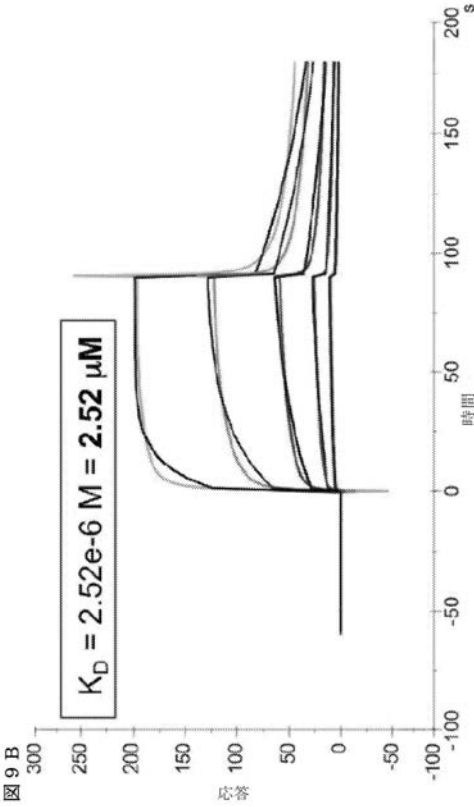
VSIG8 (1-263)-COMP-AlkPhos-フラグ/His	
シグナルペプチド	MRVGGAFHLLLVCLSPALLSA
プロテイン外部ドメイン	VRINGDQGEVLVLAEGDNVRLGCPYVLDPEDYGPNGLDIEWMQVNSD PAHHRENVFLSYQDKRINHGSLPHLQQRVRFASDPQYDASINLMN LQVSDTATYECRVKKTMTATRKIVTVQARPAVPMCWTEGHMTYGND VVLKCYASGGSPLSYKWKISGHHPYRAGSYTSQHSYHSELVYQE SFHSSINQGLNNGDLVLKDISRADDGLYQCTVANNVGYSVCVVEVKV SDSRRIG
TEV 切断部位	GSENLVYFQG
リンカー 1	NSGGSGGGTG
ラット軟骨外基質タンパク質 (COMP) ヘリックス	GGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHRVKEITFLKNTVMECDAGC
リンカー 2	LDRNLPPLAPLGP
アルカリフォスファターゼ	IIPVEEENPDFWNREAAEALGAACKLQPAQTAARNLIIIFLGDGMVVS TVTAARILKGQKKDKLGPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGA TATAYLCGVKGNFQITGLSAAARFNQCNTRGNEVISVMNRACKAGK SVGVVTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWSADVPASARQEGCQDIAT QLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYDDYSQGGTRLGKNLVQ EWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDS TLDPSLMENTEAAALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYKALT ETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLVTDADSHVFSFGGYPLAGSSI LAPGKARDRAKAYTVLLYNGPGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQOS AVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHVHGVEQTFIAHVMAFAACLEP YTACDLAPFAGTTD
フラグ	DYKDDDDK
6xHis	HHHHHH
VSIG8 (1-263)-COMP-His	
シグナルペプチド	MRVGGAFHLLLVCLSPALLSA
プロテイン外部ドメイン	VRINGDQGEVLVLAEGDNVRLGCPYVLDPEDYGPNGLDIEWMQVNSD PAHHRENVFLSYQDKRINHGSLPHLQQRVRFASDPQYDASINLMN LQVSDTATYECRVKKTMTATRKIVTVQARPAVPMCWTEGHMTYGND VVLKCYASGGSPLSYKWKISGHHPYRAGSYTSQHSYHSELVYQE SFHSSINQGLNNGDLVLKDISRADDGLYQCTVANNVGYSVCVVEVKV SDSRRIG
TEV 切断部位	GSENLVYFQG
リンカー 1	NSGGSGGGTG
ラット軟骨外基質タンパク質 (COMP) ヘリックス	GGDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHRVKEITFLKNTVMECDAGC
リンカー 2	LDRNLPPLAPLGP
6xHis	HHHHHH

【図 9 A】

図 9 A

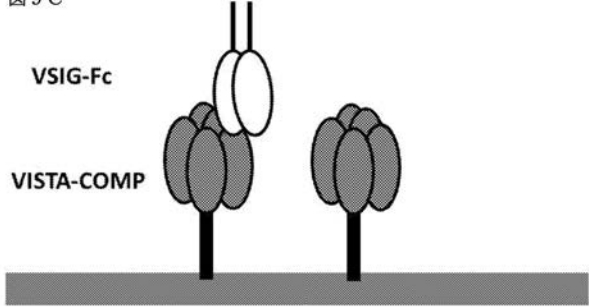


【図 9 B】



【図 9 C】

図 9 C



【図 1 3】

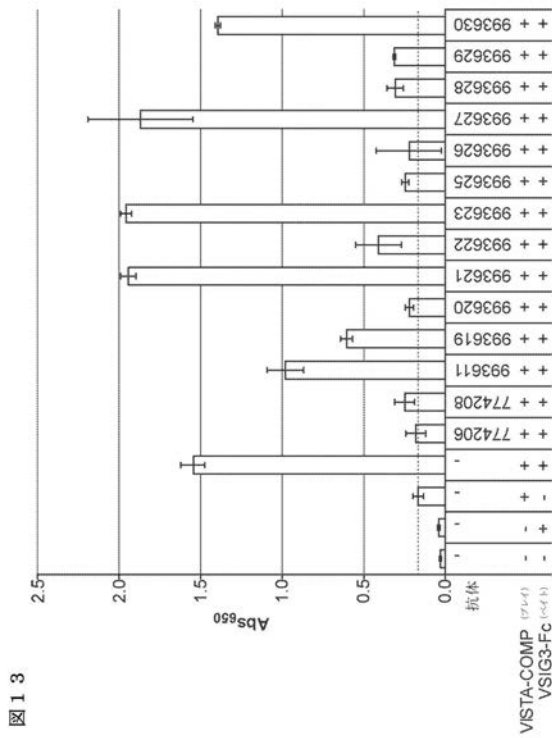


図 1 3

【図 1 4】

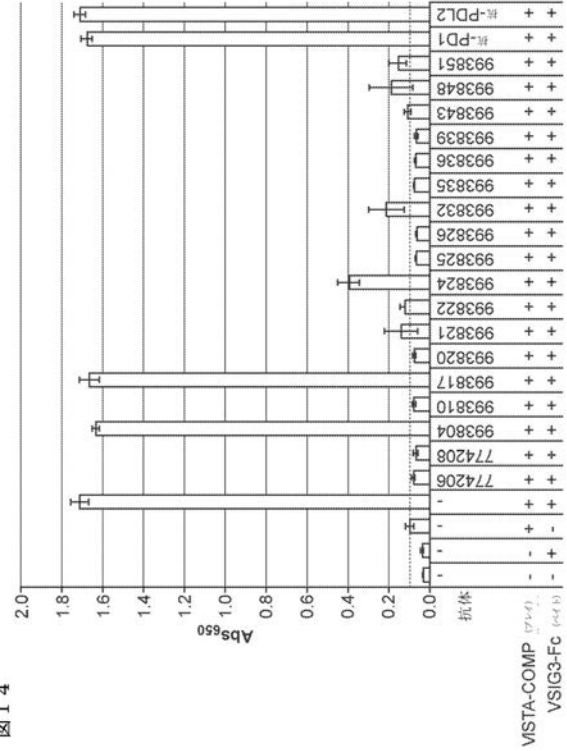


図 1 4

【図 1 5】

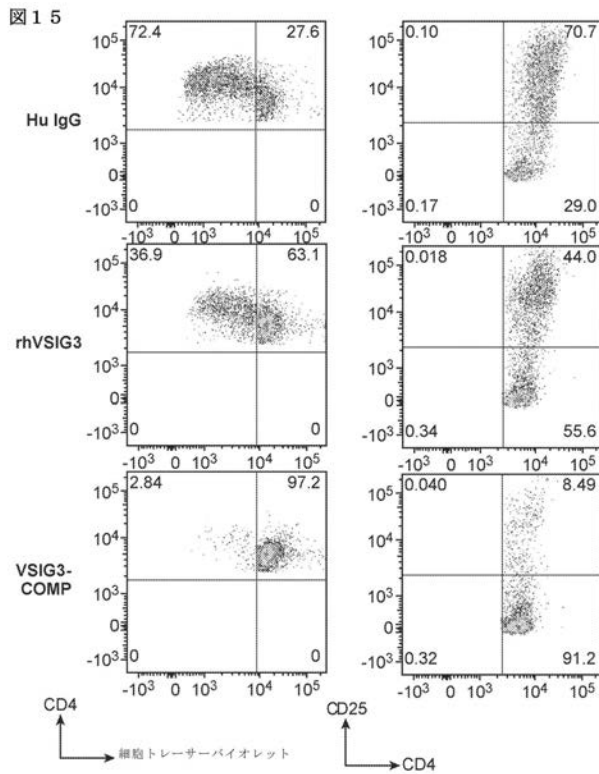


図 1 5

【図 1 6 A】

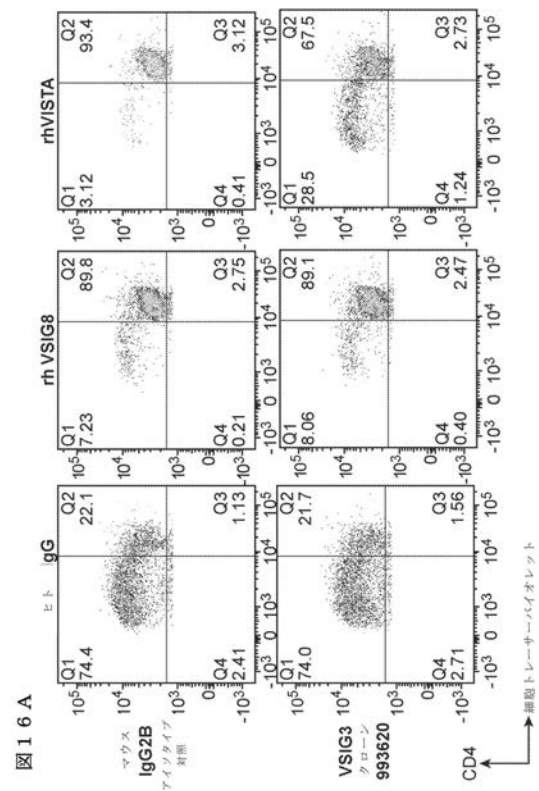
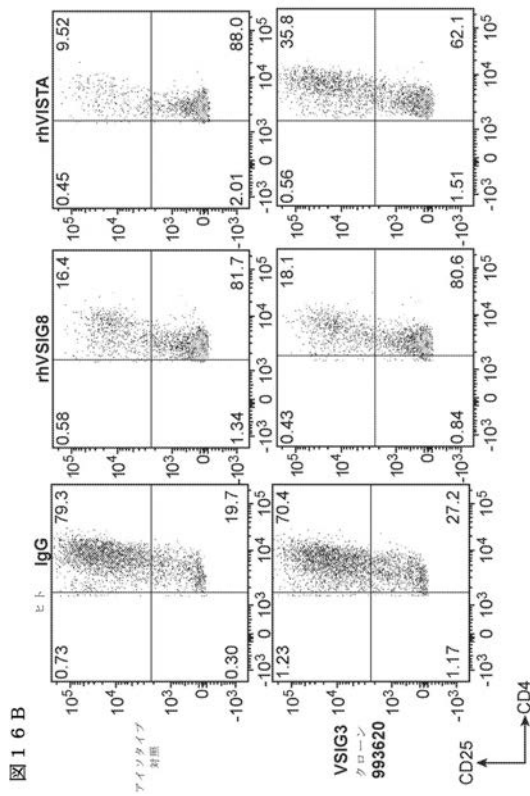
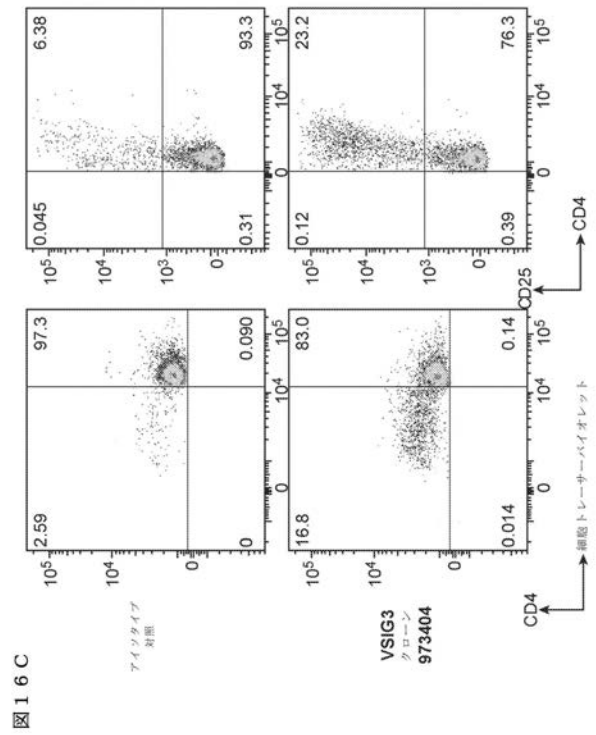


図 1 6 A

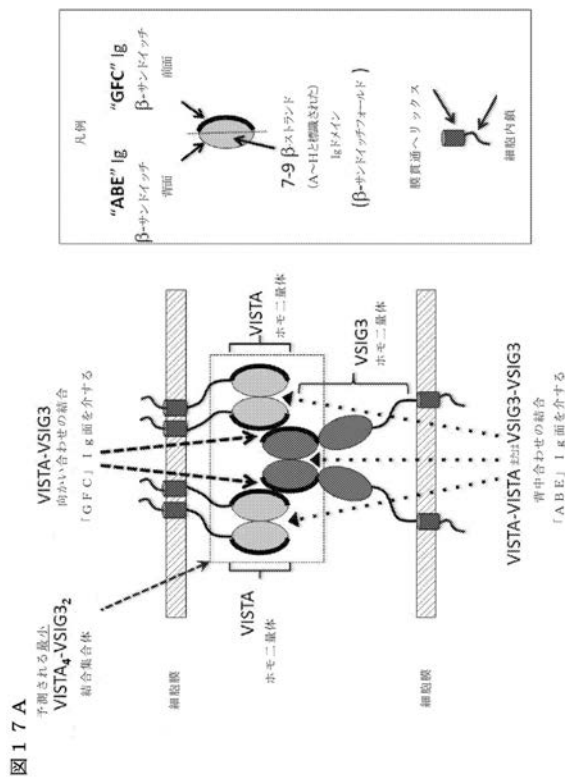
【図 16 B】



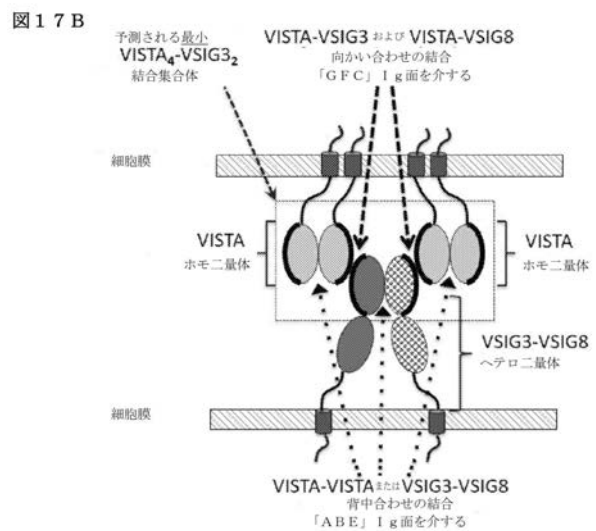
【図 16 C】



【図 17 A】

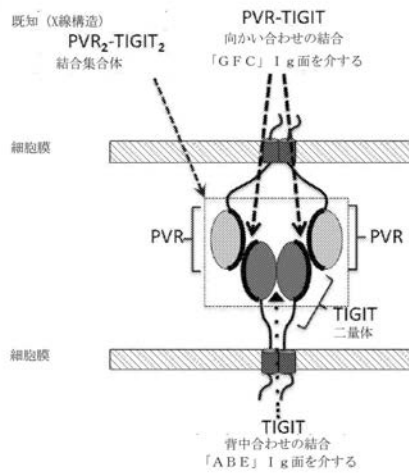


【図 17 B】



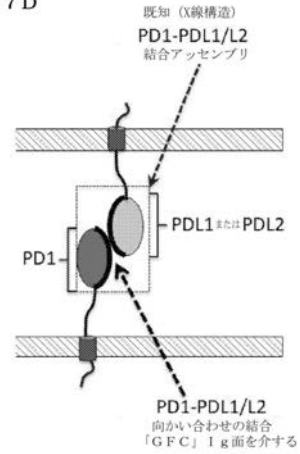
【図 17 C】

図 17 C



【図 17 D】

図 17 D



【配列表】

2021512120000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/016301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/18 G01N33/566
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K G01N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEIL JANG ET AL: "Synaptic adhesion molecule IgSF11 regulates synaptic transmission and plasticity", NATURE NEUROSCIENCE, vol. 19, no. 1, 23 November 2015 (2015-11-23), pages 84-93, XP55460981, US ISSN: 1097-6256, DOI: 10.1038/nn.4176 figures 1, 2 ----- -/--	43-60, 110-114

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 April 2019

Date of mailing of the international search report

18/04/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fleitmann, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/016301

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG JINGHUA ET AL: "VSIG-3/IGSF11 is a ligand of VISTA/PD-1H and inhibits human T cell function", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, [Online] vol. 198, no. 1, Suppl. S, 1 May 2017 (2017-05-01), pages 1-3, XP009504449, ISSN: 0022-1767 abstract -----	1-58, 61-108
X	WO 2013/184912 A2 (ONCOMED PHARM INC [US]) 12 December 2013 (2013-12-12) claims 33-45; sequences 11, 43 -----	41,42, 61,68, 74-81, 94,95, 98-102
X	YANG WEI ET AL: "Construction of a versatile expression library for all human single-pass transmembrane proteins for receptor pairings by high throughput screening", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 260, 1 May 2017 (2017-05-01), pages 18-30, XP085204937, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2017.08.023 abstract; figure 10 page 26, right-hand column, paragraph 3 - page 28, left-hand column, paragraph 2 page 19, right-hand column, paragraph 3 - page 21, right-hand column, paragraph 4 -----	1,2, 4-27, 29-114
X	EP 2 275 544 A2 (ONCOTHERAPY SCIENCE INC [JP]) 19 January 2011 (2011-01-19) paragraph [0211] paragraph [0207] -----	43-68, 70-79, 99,100, 103-107, 110-114
X	US 2014/220012 A1 (NOELLE RANDOLPH J [US] ET AL) 7 August 2014 (2014-08-07) paragraph [0029] paragraph [0292] - paragraph [0293]; examples 24, 25, 34, 35, 37 -----	42,61, 71-73, 82-91, 93-95, 99-102, 109
X,P	WO 2018/027042 A1 (BIO TECHNE CORP [US]) 8 February 2018 (2018-02-08) claims 1-102 -----	1-114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/016301

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013184912 A2	12-12-2013	AU 2013271515 A1	15-01-2015
		CA 2875980 A1	12-12-2013
		CN 104602707 A	06-05-2015
		EP 2858673 A2	15-04-2015
		EP 3202419 A1	09-08-2017
		HK 1204950 A1	11-12-2015
		JP 2015520192 A	16-07-2015
		KR 20150018604 A	23-02-2015
		US 2014056890 A1	27-02-2014
		US 2018118825 A1	03-05-2018
		WO 2013184912 A2	12-12-2013
EP 2275544 A2	19-01-2011	AT 500326 T	15-03-2011
		AU 2003241179 A1	22-12-2003
		AU 2009243506 A1	24-12-2009
		BR 0311822 A	29-03-2005
		CA 2488404 A1	18-12-2003
		CN 1675361 A	28-09-2005
		CY 1112052 T1	04-11-2015
		DK 1513934 T3	02-05-2011
		EP 1513934 A2	16-03-2005
		EP 2233572 A2	29-09-2010
		EP 2275544 A2	19-01-2011
		HK 1083521 A1	14-01-2011
		JP 4594085 B2	08-12-2010
		JP 5069268 B2	07-11-2012
		JP 2006507802 A	09-03-2006
		JP 2009183293 A	20-08-2009
		JP 2012019791 A	02-02-2012
		KR 20050053530 A	08-06-2005
		KR 20100123761 A	24-11-2010
		MX PA04012225 A	25-07-2005
		PT 1513934 E	11-05-2011
		SG 145559 A1	29-09-2008
		US 2005069930 A1	31-03-2005
		US 2009012032 A1	08-01-2009
		US 2010016220 A1	21-01-2010
		US 2012190628 A1	26-07-2012
		WO 03104275 A2	18-12-2003
US 2014220012 A1	07-08-2014	AU 2013277051 A1	12-02-2015
		BR 112014032276 A2	28-11-2017
		CA 2877533 A1	27-12-2013
		CN 104619722 A	13-05-2015
		EP 2864352 A1	29-04-2015
		EP 3421486 A1	02-01-2019
		HK 1214272 A1	22-07-2016
		JP 6285923 B2	28-02-2018
		JP 2015526064 A	10-09-2015
		JP 2018021049 A	08-02-2018
		TW 201412775 A	01-04-2014
		US 2014220012 A1	07-08-2014
		US 2018051070 A1	22-02-2018
		WO 2013192504 A1	27-12-2013
WO 2018027042 A1	08-02-2018	CA 3032146 A1	08-02-2018
		WO 2018027042 A1	08-02-2018

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 38/46	
A 6 1 K 47/62 (2017.01)	A 6 1 K 47/65	
A 6 1 K 47/55 (2017.01)	A 6 1 K 47/62	
	A 6 1 K 47/55	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. PLURONICS

2. TWEEN

- (72)発明者 バレー, クリストファー
アメリカ合衆国 5 5 4 1 3 ミネソタ州, ミネアポリス, マッキンリー プレイス エヌイー
6 1 4
- (72)発明者 ボンヌヴィエ, ジョディ
アメリカ合衆国 5 5 4 1 3 ミネソタ州, ミネアポリス, マッキンリー プレイス エヌイー
6 1 4
- (72)発明者 アゲラー, バート
アメリカ合衆国 5 5 4 1 3 ミネソタ州, ミネアポリス, マッキンリー プレイス エヌイー
6 1 4
- (72)発明者 ワン, ジュンファ
アメリカ合衆国 5 5 4 1 3 ミネソタ州, ミネアポリス, マッキンリー プレイス エヌイー
6 1 4
- (72)発明者 ウー, グオピン
アメリカ合衆国 5 5 4 1 3 ミネソタ州, ミネアポリス, マッキンリー プレイス エヌイー
6 1 4
- (72)発明者 カラボキス, ヴァッシリオス
アメリカ合衆国 5 5 4 1 3 ミネソタ州, ミネアポリス, マッキンリー プレイス エヌイー
6 1 4
- (72)発明者 バザン, ホセ フェルナンド
アメリカ合衆国 5 5 4 1 3 ミネソタ州, ミネアポリス, マッキンリー プレイス エヌイー
6 1 4

Fターム(参考) 4B050 CC05 KK18 LL01

4B064 AG20 AG26 AG27 CC24 DA01

4C076 AA95 CC27 EE59

4C084 AA17 BA02 BA22 BA41 BA44 DC01 MA02 NA14 ZB26 ZC01

ZC41
4C085 AA13 AA14 BB31 BB36 BB41 BB43 CC22 CC23 EE01 EE03
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA76 DA89 EA20
FA74