

(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2018-505911
(P2018-505911A)

(43) 公表日 平成30年3月1日(2018.3.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00 ZNA	2G045
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B063
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4C084
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4C085
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 196 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-548376 (P2017-548376)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月5日 (2015.12.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年8月4日 (2017.8.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/064146
 (87) 国際公開番号 W02016/090347
 (87) 国際公開日 平成28年6月9日 (2016.6.9)
 (31) 優先権主張番号 62/088,058
 (32) 優先日 平成26年12月5日 (2014.12.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 517196867
 イミュネクスト, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03
 766, レバノン, キャヴンディッシュ・
 コート 16
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹
 (74) 代理人 100120112
 弁理士 中西 基晴
 (74) 代理人 100188374
 弁理士 一宮 維幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 推定上のVISTA受容体としてのVSIG8の同定と、VISTA/VSIG8調節剤を産生するためのその使用

(57) 【要約】

VISTAの受容体が同定され(VSIG8)、並びに、アゴニストまたはアンタゴニスト化合物、好ましくはVSIG8及び/またはVISTA及び/またはVSIG8/VISTA結合相互作用の効果を刺激する、またはそれに拮抗する抗体、ポリペプチド及び融合タンパク質の同定または合成における、この受容体の使用についてもまた記載する。これらのアンタゴニストは、T細胞免疫におけるVISTAの抑制効果を抑制するために使用してよく、より詳細には、癌または感染症の治療に使用してよい。これらのアゴニスト化合物を使用して、T細胞免疫におけるVISTAの抑制効果を強化または向上させることによって、自己免疫、アレルギーまたは炎症性状態の治療等におけるT細胞免疫を抑制してよい。これらのアゴニスト及びアンタゴニスト化合物を同定するためのスクリーニングアッセイもまた提供する。

【選択図】 図1

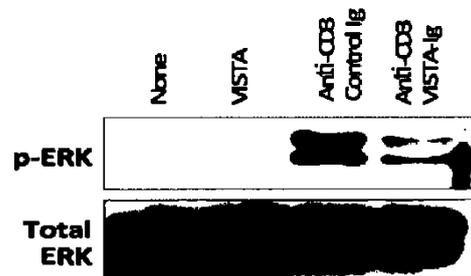


Fig 1. VISTA inhibits early TCR-induced T cell activation. T cells were isolated and cultured for 10 minutes with the α CD3⁺ control Ig or VISTA-Ig. Total ERK and phosphor-Erk was detected.

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

V I S T A と V - R (V S I G 8) の相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する化合物。

【請求項 2】

アゴニスト抗 V S I G 8 抗体または抗体断片である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

アンタゴニスト抗 V S I G 8 抗体または抗体断片である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

T 細胞免疫での抑制効果を誘発する V S I G 8 の細胞外領域、その断片、または、V S I G 8 の細胞外領域、もしくは配列番号 1、2、もしくは 3 に対して少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有する前記 V S I G 8 ポリペプチドの誘導体を含むポリペプチドの少なくとも 1 つのコピーを含む、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 5】

ヒト、非ヒト霊長類またはマウス V S I G 8 の細胞外領域全体を含む少なくとも 1 つのポリペプチドを含む、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

融合タンパク質である、請求項 4 または 5 に記載の化合物。

【請求項 7】

I g 融合タンパク質である、請求項 6 に記載の化合物。

20

【請求項 8】

任意で突然変異誘発し、F c R または補体結合を取り除いたヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、もしくは I g G 4 定常領域、またはそれらの断片を含む、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 9】

V I S T A と V S I G 8 を含む単離した複合体。

【請求項 10】

前記 V I S T A 及び / または V S I G 8 はオリゴマーまたは多量体である、請求項 9 に記載の複合体。

30

【請求項 11】

請求項 10 に記載の V I S T A - V S I G 8 複合体に特異的に結合する、抗体または抗体断片。

【請求項 12】

上の請求項のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの化合物を含む医薬組成物。

【請求項 13】

上の請求項のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの化合物と抗原を含むワクチン組成物。

【請求項 14】

上に記載の請求項のいずれか一項に従った、診断または治療用途の、V S I G 8 または V S I G 8 / V I S T A アゴニストまたはアゴニストを含有する治療及び / もしくは診断方法、または組成物の使用であって、前記方法または使用は、治療または診断を必要とする対象に、治療上または診断上効果的な量の、上の請求項のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの V S I G 8 もしくは V S I G 8 / V I S T A アゴニストもしくはアンタゴニストを含む組成物、または上の請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも 1 つの用量を投与することを含む、前記治療及び / もしくは診断方法、または組成物の使用。

40

【請求項 15】

個体が、V S I G 8 及び / または V I S T A が仲立ちする免疫への効果の増減に係る状態を有するかどうかの検出における、抗体もしくは抗原結合断片または組成物の診断

50

方法または使用であって、前記方法または使用は、前記個体からの組織試料を化合物、例えば、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または組成物と接触させることと、前記組織試料への特異的結合を検出することを含む、前記診断方法または使用。

【請求項 16】

診断もしくは治療用途の、抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原結合断片を含有する治療及び / もしくは診断方法、または組成物の使用であって、治療及び診断を必要とする対象における、T細胞免疫もしくはナチュラルキラー (NK) 免疫の促進、及び / もしくは T r e g もしくは M D S C の抑制を含み、上の請求項のいずれか一項に記載の、治療上または診断上効果的な量の少なくとも 1 つの抗体、抗原結合断片または組成物を投与することを含み、かかる抗体または抗原結合断片は、免疫または免疫細胞において、配列番号 1、2、または 3 のポリペプチドに少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を有する V S I G 8 ポリペプチドの、少なくとも 1 つの効果に拮抗するか遮断する、前記治療及び / もしくは診断方法、または組成物の使用。

10

【請求項 17】

T細胞免疫における V S I G 8 及び / もしくは V I S T A の阻害効果を抑制する V S I G アнтаゴニストを使用する、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 18】

C T L 活性を促進する V S I G アнтаゴニストを使用する、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の方法または使用。

20

【請求項 19】

診断もしくは治療用途の、抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原結合断片を含有する治療及び / もしくは診断及び / もしくは診断方法、または、組成物の使用であって、治療及び / もしくは診断を必要とする対象において NK または T細胞免疫を促進することを含み、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の、治療上または診断上効果的な量の少なくとも 1 つの抗体、抗原結合断片または組成物を投与することを含み、かかる抗体または抗原結合断片は、配列番号 1、2、もしくは 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチド (V S I G 8)、またはこのアミノ酸配列、もしくは免疫もしくは免疫細胞上の非ヒト V S I G 8 オルソログ、もしくはヒト V I S T A と少なくとも 90 % の配列同一性を有するポリペプチドの少なくとも 1 つの効果を阻害する、前記治療及び / もしくは診断方法、または組成物の使用。

30

【請求項 20】

前記治療される個体が感染症を患っている、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 21】

前記治療される個体は癌を患っている、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 22】

上に記載の請求項のいずれか一項に記載の任意の化合物、例えば、以下の免疫阻害性効果の少なくとも 1 ついづれか 1 つ、または組み合わせを仲立ちする、抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原結合断片、または V S I G 8 融合タンパク質の方法または使用であって、前記抗 V S I G 8 抗体または抗原結合断片が (i) ~ (x x v i i i) のうちの 1 つ以上の逆の効果を生じ得ることを条件とし、任意で自己免疫、アレルギー、炎症、移植または敗血症を治療 (t r e a t r) するために使用される、前記方法または使用： (i) 免疫応答の低下、 (i i) T細胞の活性化の低下、 (i i i) 細胞傷害性 T細胞活性の低下、 (i v) ナチュラルキラー (NK) 細胞活性の低下、 (v) T細胞活性の低下、 (v i) 炎症性サイトカイン分泌の低下、 (v i i) I L - 2 分泌の低下、 (v i i i) インターフェロン 産生の減少、 (i x) T h 1 応答の低下、 (x) T h 2 応答の低下、 (x i) 制御性 T細胞の細胞数及び / もしくは活性の増加、 (x i i) 制御性細胞活性、及び / もしくは、骨髄由来免疫抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現

40

50

単球のうちの1つ以上の増加、(x i i i) 制御性細胞活性、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現単球のうちの1つ以上の活性の増加、(x i i i) M 2 マクロファージの増加、(x i v) M 2 マクロファージ活性の増加、(x v) N 2 好中球の増加、(x v i) N 2 好中球活性の増加、(x v i i) T 細胞の活性化阻害の増加、(x v i i i) C T L 活性化阻害の増加、(x i x) N K 細胞活性化阻害の増加、(x x) T 細胞疲弊の増加、(x x i) T 細胞応答の低下、(x x i i) 細胞毒性細胞の活性の低下、(x x i i i) 抗原特異的メモリー応答の低下、(x x i v) 細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(x x v) 細胞への細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の低下、(x x v i) 細胞の直接殺傷の減少、(x x v i i) T h 1 7 活性の低下、並びに/または(x x v i i i) 補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の低下。

10

【請求項 2 3】

診断もしくは治療用途の、抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原結合断片を含有する治療及び/もしくは診断方法、または組成物の使用であって、治療及び/または診断を必要とする対象における、T 細胞免疫もしくはナチュラルキラー(N K) 免疫の抑制、及び/または T r e g もしくは M D S C の促進を含み、上の請求項のいずれか一項に記載の、少なくとも1つの抗体、抗原結合断片または組成物を投与することを含み、かかる抗体または抗原結合断片が、免疫または免疫細胞上の、配列番号 1、2、もしくは3のアミノ酸配列を有するポリペプチド(V S I G 8)、またはオルソログの少なくとも1つの効果を強める、模倣する、または促進する、前記治療及び/もしくは診断方法、または組成物の使用。

20

【請求項 2 4】

アレルギー、自己免疫、移植、遺伝子治療、炎症またはこれらの組み合わせの治療で用いる、請求項 2 3 に記載の方法または使用。

【請求項 2 5】

C T L A 4、P D - 1、P D L - 1、L A G - 3、T I M - 3、B T L A、B 7 - H 4、B 7 - H 3、V I S T A のうちの1つ以上を標的とするアンタゴニスト抗体、及び/または C D 4 0、C D 1 3 7、O X 4 0、G I T R、C D 2 7、C D 2 8、もしくは I C O S の1つ以上を標的とするアゴニスト抗体から選択される別の抗体を更に含む、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原結合断片、もしくは V S I G 8 融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

30

【請求項 2 6】

治療前、治療と同時、及び/または治療後に、個体の細胞により V S I G 8 及び/または V I S T A タンパク質をアッセイすることを含む、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項 2 7】

上に記載の請求項のいずれか一項に記載の抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原断片、または、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の方法もしくは使用において好適な抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原断片を選択するためのアッセイ方法であって、前記方法は、(i) 推定上、配列番号 1、2、もしくは3のいずれかに記載されるアミノ酸配列から選択される配列を有する V S I G 8 ポリペプチドに結合する、もしくは、この配列もしくは非ヒト V S I G 8 オルソログと少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドに結合する、1つ以上の抗体、または、少なくとも1つの V S I G 8 エピトープを含有する、ポリペプチドの断片もしくは変異体であって、前記断片もしくは変異体が、前記ポリペプチド、または非ヒト V S I G 8 オルソログに少なくとも90%の同一性を有する、前記断片もしくは変異体を得ることと、(i i) 前記抗体または抗原結合断片が前記 V S I G 8 ポリペプチドに特異的に結合するかどうかを決定することと、(i i) 前記抗体または抗原結合断片が、免疫における V S I G 8 の少なくとも1つの効果を制御(刺激する、またはそれに拮抗する)かどうかを決定することと、(i v) (i i) と (i i) が満たされる場合、前記抗体を、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の方法または使用で有用な可能性があるものとして選択することと、を含む、前記方法。

40

50

【請求項 28】

前記選択される抗体は、以下の効果のうち少なくとも1つを仲立ちすることを示し、前記抗V S I G 8抗体または抗原結合断片が、(i)~(x x v i i i)のうち1つ以上の逆の効果を誘発することを条件とする、請求項27に記載の方法：(i)免疫応答の増加、(i i)T細胞の活性化の増加、(i i i)細胞傷害性T細胞活性の増加、(i v)NK細胞活性の増加、(v)T細胞抑制の緩和、(v i)炎症性サイトカイン分泌の増加、(v i i)I L - 2分泌の増加、(v i i i)インターフェロン 産生の増加、(i x)T h 1応答の増加、(x)T h 2応答の低下、(x i)制御性T細胞(T r e g)、骨髓由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2発現単球のうち少なくとも1つの細胞数、及び/もしくは活性の減少もしくは除去、(x i i)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髓由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2発現単球のうち1つ以上の活性の低下、(x i i i)M 2マクロファージの減少もしくは除去、(x i v)M 2マクロファージ腫瘍形成活性の低下、(x v)N 2好中球の減少もしくは除去、(x v i)N 2好中球の腫瘍形成活性の低下、(x v i i)T細胞の活性化阻害の低下、(x v i i i)C T L活性化阻害の低下、(x i x)NK細胞活性化阻害の低下、(x x)T細胞疲弊の逆転、(x x i)T細胞応答の増加、(x x i i)細胞毒性細胞の活性の増加、(x x i i i)抗原特異的メモリー応答の刺激、(x x i v)癌細胞のアポトーシスもしくは溶解の誘発、(x x v)癌細胞に対する細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の刺激、(x x v i)癌細胞の直接殺傷の誘発、(x x v i i)T h 17活性の増加、並びに/または(x x v i i i)補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の誘発。

10

20

【請求項 29】

前記選択した抗体は、以下の効果のうち少なくとも1つを仲立ちすることを示し、前記抗V S I G 8抗体または抗原結合断片が、(i)~(x x v i i i)のうち1つ以上の逆の効果を誘発することを条件とする、請求項27に記載の方法：(i)免疫応答の低下、(i i)T細胞の活性化の低下、(i i i)細胞傷害性T細胞活性の低下、(i v)ナチュラルキラー(N K)細胞活性の低下、(v)T細胞活性の低下、(v i)炎症性サイトカイン分泌の低下、(v i i)I L - 2分泌の低下、(v i i i)インターフェロン 産生の減少、(i x)T h 1応答の低下、(x)T h 2応答の低下、(x i)制御性T細胞の細胞数及び/もしくは活性の増加、(x i i)制御性細胞活性、及び/もしくは、骨髓由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2発現単球のうち1つ以上の増加、(x i i i)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髓由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2発現単球のうち1つ以上の活性の増加、(x i i i)M 2マクロファージの増加、(x i v)M 2マクロファージ活性の増加、(x v)N 2好中球の増加、(x v i)N 2好中球活性の増加、(x v i i)T細胞の活性化阻害の増加、(x v i i i)C T L活性化阻害の増加、(x i x)NK細胞活性化阻害の増加、(x x)T細胞疲弊の増加、(x x i)T細胞応答の低下、(x x i i)細胞毒性細胞の活性の低下、(x x i i i)抗原特異的メモリー応答の低下、(x x i v)細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(x x v)細胞に対する細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の低下、(x x v i)細胞の直接殺傷の減少、(x x v i i)T h 17活性の低下、並びに/または(x x v i i i)補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の低下。

30

40

【請求項 30】

前記選択された抗体は、ヒトまたは齧歯類V S I G 8のV I S T Aへの結合と競合することを示す、請求項27~29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

上に記載の請求項のいずれか一項により得た免疫調節抗体もしくは抗原結合断片、またはこれらを含む医薬もしくは診断用組成物。

【請求項 32】

癌、感染症、敗血症、自己免疫、炎症、アレルギーもしくは他の免疫状態を治療もしくは

50

は診断するため、または、細胞もしくは遺伝子治療薬、もしくは移植した細胞、組織もしくは臓器に対する望ましくない免疫反応を抑制するための、上に記載の請求項のいずれか一項に従って得た免疫調節抗体もしくは抗原結合断片、もしくはV S I G 8融合もしくは非融合タンパク質、または、これらを含む医薬もしくは診断用組成物の使用。

【請求項33】

細胞、組織または臓器のレシピエントへの移植を含む移植療法であって、前記細胞、組織または臓器は、前記細胞、組織または臓器を前記レシピエントに注入または移植する前に、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の、抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片または組成物、またはV S I G 8融合もしくは非融合タンパク質を含む組成物を使用して*ex vivo*で治療される、前記移植療法。

10

【請求項34】

診断上または治療的有効量の、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の化合物を含む診断用または治療用組成物。

【請求項35】

P D - 1もしくはP D - L 1アゴニストもしくはアンタゴニスト、または他の免疫調節剤の投与を更に含むか包含する、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項36】

免疫細胞を、上に記載の請求項のいずれか一項に記載のアゴニストまたはアンタゴニスト化合物と接触させる方法。

20

【請求項37】

V S I G 8を単独、またはV I S T Aと共に使用して、V S I G 8 / V I S T Aアゴニストまたはアンタゴニストを識別することを含むスクリーニングアッセイ。

【請求項38】

V S I G 8 E C Dの断片を含む単離したペプチドであって、前記断片は、配列番号1、2もしくは3のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、このアミノ酸と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する変異体から本質的になるかこれからなる、前記単離したポリペプチド。

【請求項39】

2 ~ 10個の、前記V S I G 8 E C Dポリペプチド断片を含む、請求項38に記載の単離したポリペプチド。

30

【請求項40】

前記断片は異種リンカーにより介在され、前記リンカーはV S I G 8ポリペプチドの断片ではない、請求項37 ~ 38に記載の単離したポリペプチド。

【請求項41】

異種ポリペプチド及び/または半減期延長部位に結合した、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の、または、配列番号1、2もしくは3のいずれか一項に記載の前記単離したポリペプチドを含み、前記異種ポリペプチドまたは前記半減期延長部位がV S I G 8ポリペプチドの断片でないことを条件とする、融合タンパク質。

【請求項42】

ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3、及びI g G 4からなる群から選択されるヒト免疫グロブリン重鎖定常領域を含む、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

40

【請求項43】

受容体、ホルモン、サイトカイン、抗原、B細胞標的、NK細胞標的、T細胞標的、TNF受容体スーパーファミリーメンバー、ヘッジホッグファミリーメンバー、受容体型チロシンキナーゼ、プロテオグリカン関連分子、TGF - スーパーファミリーメンバー、W n t関連分子、受容体リガンド、樹状細胞標的、骨髄細胞標的、単核細胞/マクロファージ細胞標的、または血管新生標的である少なくとも1種の異種ポリペプチドを含む、上の請求項のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

50

【請求項 4 4】

前記抗原は腫瘍抗原、自己抗原、アレルゲン、または病原体抗原である、請求項 4 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4 5】

免疫調節ポリペプチドである少なくとも 1 種の異種ポリペプチドを含む、上の請求項のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 4 6】

以下の効果のうちの少なくとも 1 つを仲立ちし、前記単離または組み換え V S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質が、(i) - (x x v i i i) の 1 つ以上の逆の効果を生ずることを条件とする、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質：(i) 免疫応答の低下、(i i) T 細胞の活性化の低下、(i i i) 細胞傷害性 T 細胞活性の低下、(i v) ナチュラルキラー細胞活性の低下、(v) T 細胞活性の低下、(v i) 炎症性サイトカイン分泌の低下、(v i i) I L - 2 分泌の低下、(v i i i) T 細胞によるインターフェロン 産生の減少、(i x) T h 1 応答の低下、(x) T h 2 応答の低下、(x i) 制御性 T 細胞の細胞数及び/もしくは活性の増加、(x i i) 制御性細胞活性、及び/もしくは、骨髄由来免疫抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現単球のうちの 1 つ以上の増加、(x i i i) 制御性細胞活性、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現単球のうちの 1 つ以上の活性の増加、(x i i i) M 2 マクロファージの増加、(x i v) M 2 マクロファージ活性の増加、(x v) N 2 好中球の増加、(x v i) N 2 好中球活性の増加、(x v i i) T 細胞の活性化阻害の増加、(x v i i i) C T L 活性化阻害の増加、(x i x) N K 細胞活性化阻害の増加、(x x) T 細胞疲弊の増加、(x x i) T 細胞応答の低下、(x x i i) 細胞毒性細胞の活性の低下、(x x i i i) 抗原特異的メモリー応答の低下、(x x i v) 細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(x x v) 細胞への細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の低下、(x x v i) 細胞の直接殺傷の減少、(x x v i i) T h 1 7 活性の低下、並びに/または (x x v i i i) 補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の低下。

【請求項 4 7】

T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞上の V S I G 8 及び/もしくは V I S T A の少なくとも 1 つの効果、または 1 種以上の炎症性サイトカインの産生を刺激する、またはそれに拮抗する、上の請求項のいずれか一項に記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質。

【請求項 4 8】

C T L 活性、C D 4 + T 細胞の活性化、及び/もしくは C D 4 + T 細胞増殖及び/もしくは細胞枯渇、または炎症性サイトカインの枯渇もしくは分泌のうちの 1 つ以上を阻害する、または促進する、上の請求項のいずれか一項に記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質。

【請求項 4 9】

上に記載の請求項のいずれか一項に記載の単離したタンパク質もしくは融合タンパク質、または配列番号 1、2、3 のいずれかに記載する V S I G 8 E C D タンパク質、または発現ベクターもしくはウイルスもしくは組み換え細胞をコードするポリヌクレオチドを含む医薬組成物。

【請求項 5 0】

任意で、本出願で特定した任意のものから選択される別の薬剤または免疫調節剤と組み合わせ、上に記載の請求項のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種の化合物、融合タンパク質 V S I G 8 アゴニストまたはアンタゴニストを含む、例えば癌、感染症、アレルギー、自己免疫、炎症、移植または敗血症の免疫療法または治療の方法。

【請求項 5 1】

対象の病気の診断、または診断補助の診断方法であって、前記病気は癌、自己免疫疾患、または感染症からなる群から選択され、前記診断方法は i n v i v o で行われ、上の

10

20

30

40

50

請求項のいずれか一項に記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、及び/または配列番号1、2、3のいずれに記載されるV S I G 8 E C Dタンパク質を対象に投与することと、組織への特異的結合を検出することを含む、前記診断方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2014年12月5日出願された、米国仮出願番号第62/088,058号に対する優先権を主張し、その内容全体が参照により組み込まれる。

【0002】

分野

本出願は概して、以前に同定されている、T細胞の活性化及び増殖を制御するB7ファミリーの免疫調節ポリペプチドである、V I S T A (T細胞活性化のV領域免疫グロブリン含有抑制因子(V-region Immunoglobulin-containing Suppressor of T Cell Activation)¹)に対する受容体の同定に関する。本発明はまた、得られる受容体を使用して、治療薬、特に癌、感染症状、自己免疫、炎症及びアレルギー性疾患の治療において使用され得る、V S I G 8の効果を刺激する、またはそれに拮抗する化合物を作製することに関する。本発明は特に、得られる受容体を使用して、V I S T A / V I S T A - Rの結合相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する化合物を作製することに関する。また、本発明は、かかるアゴニストまたはアンタゴニストを使用して、CD4⁺またはCD8⁺T細胞の増殖、CD4⁺またはCD8⁺T細胞の活性化、及び免疫サイトカインの産生などのV I S T Aにより影響を受ける免疫機能を増強するかまたは阻害することに関する。

【背景技術】

【0003】

免疫陰性チェックポイント制御因子(NCR)経路は、ヒトの免疫に関係する病気の治療において、顕著な臨床標的であることが証明されている。モノクローナル抗体(mAb)を使用して2つのNCR(CTLA-4とPD-1)を遮断し腫瘍免疫を高めることは、癌治療に大きな革命をもたらし、ヒトの病気において臨床的に確認された標的として、これらの経路が確立されている。更に最近では、NCR経路を誘発する可溶性のNCRリガンドが、自己免疫を治療するための免疫抑制剤(例えば、関節リウマチでのAMP-110/B7-H4-Ig)としてクリニックに導入され、近い将来の臨床結果が非常に待ち望まれている。

【0004】

V I S T A (V領域免疫グロブリン含有T細胞活性化抑制因子(1))は最近同定されたNCRリガンドであり、最も近い系統的親戚はPD-L1である。PD-L1同様に、V I S T Aは、免疫を非常に大きく抑制するリガンドであり(1)、また、PD-L1同様に、V I S T Aを遮断することで、症状発現前の腫瘍学モデルにおける、癌に対する治療免疫の発達を可能にする(2)。V I S T Aを遮断することで免疫、特に、CD8⁺とCD4⁺が仲立ちするT細胞免疫が増強されるが、V I S T A細胞外領域の可溶性Ig融合タンパク質(V I S T A - I g)で治療を行うことにより、免疫が抑制され、複数の自己免疫疾患マウスモデルにおける進行を阻止することが示されている。

【0005】

V I S T Aは、非常に大きなT細胞抑制を誘発するリガンドであるという、はっきりとした科学的証拠が示されているものの、この抑制効果を伝達する受容体が何であるかは、現在知られていない。NCR経路の分野において受容体を同定することは、受容体のuM親和性と密度が極めて低いことを考慮すると、特に困難なままとなっている。

【0006】

本明細書において、「V-Set及び免疫グロブリンドメイン含有8(V-Set and Immunoglobulin domain containing 8)」(

10

20

30

40

50

以下「V - R」または「V S I G 8」)をV I S T Aに対する受容体として同定した実験方法を提示する。更に、V S I G 8が *in vitro* 及び *in vivo* において、V I S T Aと特異的に相互作用すること、及び、V I S T AのV S I G 8との相互作用が、T細胞の活性化、増殖、及び/または免疫サイトカイン産生の抑制効果を確認するアッセイを開示する。

【0007】

V S I G 8をV I S T Aに対する受容体として同定することは、臨床的、そして科学的に一層将来性がある。V I S T Aアンタゴニスト(例えば V I S T A m A b)は、腫瘍学及び感染症の治療において治療薬として有用であることが知られている。また、V I S T Aの断片をV I S T Aアンタゴニストとして使用してよく、この断片は、腫瘍学及び感染症の治療において治療薬として潜在的に有用である。更に、V I S T Aポリペプチド(例えば、V I S T A - I g融合タンパク質)は、自己免疫、炎症及びアレルギー性疾患の予防及び治療において有用であることが示されている。

10

【0008】

したがって、V I S T A - Rアゴニスト及びアンタゴニストの開発のための、第2の独立した標的を提供するので、V S I G 8も同様に有用である。実際、B7ファミリーにおける受容体に関して、今までで現れた最も効果的な治療薬は、(C T L A 4 { Y e r v o y } と P D - 1 { N o v o l u m a b }) であり、これらは共に、それぞれのリガンドに対する抗体というよりは、受容体シグナル伝達を遮断する抗体である。

20

【0009】

したがって、V I S T A / V I S T A - R相互作用を遮断、または阻害する、V S I G 8に対する抗体は、腫瘍学及び感染症の治療において、効果的な筈である。特に、V I S T A - Rアンタゴニストは潜在的に、黒色腫及び肺癌、またはH I V感染症等の、癌または感染症の適応症の治療において有用である。対照的に、V I S T A / V I S T A - Rの結合相互作用を促進、または向上させるV I S T A - Rアゴニストは潜在的に、T細胞の活性化、T細胞の増殖、またはサイトカイン産生が所望される、自己免疫性、アレルギー性、及び炎症の適応症、G V H D、移植または他の適応症の治療において有用である。

【0010】

更に、V - Rを同定することにより、免疫抑制剤としてのV I S T A - I gの臨床開発が著しく促進され、また、薬力学、標的結合、及び薬物動態学的研究の確認が更に容易になり、それは、最適の臨床結果をもたらすのに必要な受容体占有率の水準を確認するために使用してもよい。

30

【0011】

本発明は、V I S T Aに対する受容体としてのV S I G 8を同定することにより、これらの目的を満たす。

【発明の概要】

【0012】

本発明の目的は、結合アッセイ、及び機能アッセイを用いて、V S I G 8がV I S T Aに対する受容体であることを同定及び確認することである。

【0013】

同定した受容体を使用して、化合物、例えば、V I S T A / V I S T A - Rの結合相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する、アゴニスト及びアンタゴニスト抗V I S T A - R抗体、V I S T A - Rポリペプチド、V I S T A - R断片及び誘導體、並びにV I S T A - R融合タンパク質、を作製することもまた、本発明の目的である。

40

【0014】

V S I G 8アゴニストまたはアンタゴニスト、例えば、V I S T A - R及び/またはV I S T A / V I S T A - Rの結合相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する、Vアゴニスト及びアンタゴニスト抗V S I G 8抗体、並びに、V S I G 8ポリペプチド、V S I G 8断片及び誘導體、並びにV I S T A - R融合タンパク質、を使用して、免疫、特にT細胞及び樹状細胞免疫を制御することもまた、本発明の目的である。

50

【0015】

VISTA-Rアゴニストまたはアンタゴニスト、例えば、VISTA-R及び/またはVISTA/VISTA-Rの結合相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する、アゴニスト及びアンタゴニスト抗VISTA-R抗体、並びに、VISTA-Rポリペプチド、VISTA-R断片及び誘導体、並びにVISTA-R融合タンパク質、を使用して、CD4⁺またはCD8⁺T細胞の活性化、増殖、及びサイトカイン産生を制御することもまた、本発明の特定の目的である。

【0016】

VISTA-Rアゴニストまたはアンタゴニスト、例えば、VISTA-R及び/またはVISTA/VISTA-Rの結合相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する、アゴニスト及びアンタゴニスト抗VISTA-R抗体、並びに、VISTA-Rポリペプチド、VISTA-R断片及び誘導体、並びにVISTA-R融合タンパク質、を使用して、癌、ウイルス感染等の感染症を治療することもまた、本発明の特定の目的である。

10

【0017】

VISTA-Rアゴニストまたはアンタゴニスト、例えば、VISTA-R及び/またはVISTA/VISTA-Rの結合相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する、アゴニスト及びアンタゴニスト抗VISTA-R抗体、並びに、VISTA-Rポリペプチド、VISTA-R断片及び誘導体、並びにVISTA-R融合タンパク質、を使用して、自己免疫性、アレルギー性及び炎症性疾患の適応症を治療することもまた、本発明の特定の目的である。

20

【0018】

本発明の更なる目的は、同定したV-Rを用いて、免疫抑制剤としてのVISTA-Igの臨床開発を促進することと、薬力学、標的結合、及び薬物動態学的研究の確認を容易にすることと、受容体占有率のレベル、及び、VISTA-Ig治療用化合物に関して最適の臨床結果をもたらすために必要な用量を規定することである。

【0019】

本発明の特定の目的は、VISTAとVSI G 8の相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する化合物、例えば、アゴニスト抗VSI G 8抗体もしくは抗体断片、または、アンタゴニスト抗VSI G 8抗体もしくは抗体断片等の、VSI G 8を特異的に結合する抗体または抗体断片、を提供することである。

30

【0020】

本発明の特定の目的は、VISTAとVSI G 8の相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する化合物、例えばヒト化、ヒト、霊長類化、または抗VSI G 8抗体または抗体断片、例えばFab、Fab'、scFvまたはFab₂、を提供することである。

【0021】

本発明の特定の目的は、VISTAとVSI G 8の相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する化合物、例えば、VSI G 8の細胞外領域、または、VSI G 8、好ましくはヒト、霊長類またはマウスVSI G 8の細胞外領域に対して少なくとも80、90、95%またはそれ以上の配列同一性を有する、前記細胞外領域の誘導体のすべてまたは一部を含む化合物を提供することである。

40

【0022】

本発明の特定の目的は、VISTAとVSI G 8の相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する化合物、例えば、VSI G 8の細胞外領域全域の全体、または少なくとも90%を含む化合物を提供することである。

【0023】

本発明の特定の目的は、VISTAとVSI G 8、好ましくはヒト、霊長類またはマウスVSI G 8及び/またはVISTAの相互作用に拮抗する化合物を提供することである。

【0024】

本発明の特定の目的は、VISTAとVSI G 8の相互作用を刺激する、またはそれに

50

拮抗する化合物、例えば、V S I G 8 - I g 融合タンパク質等のV S I G 8 融合タンパク質、好ましくは、ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3もしくはI g G 4の定常領域、またはその断片を含み、任意で突然変異誘発され、F c Rもしくは補体結合、または他のF c エフェクター機能を取り除いたものを提供することである。

【0025】

本発明の特定の目的は、V I S T AとV S I G 8の相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する化合物、例えば、I g G 1またはI g G 3の定常領域またはその一部を含み、任意で突然変異誘発され、F c Rもしくは補体結合、または他のF c エフェクター機能を増強した化合物を提供することである。

【0026】

本発明の特定の目的は、V I S T AとV S I G 8の相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する化合物、例えば、水溶性ポリマーに付着して、血清半減期を増加させる化合物（P E G化タンパク質等）を提供することである。

【0027】

本発明の特定の目的は、V I S T AとV S I G 8を含み、例えば、前記V I S T A及び/またはV S I G 8の一方または両方が多量体である、単離した複合体を提供することである。

【0028】

本発明の特定の目的は、操作されたV I S T A及び/またはV S I G 8を発現し、その表面に、V I S T AとV S I G 8を含む複合体を含む組み換え細胞または単離細胞を提供することである。

【0029】

本発明の特定の目的は、V I S T AとV S I G 8を含む単離した複合体に特異的に結合する抗体または抗体断片であって、例えば、前記V I S T A及び/またはV S I G 8は多量体であり、更に、抗体は好ましくはヒト、ヒト化、霊長類化もしくはキメラ抗体であるか、またはF a b、F a b'、s c F vもしくはF a b₂である、抗体または抗体断片を提供することである。

【0030】

本発明の別の特定の目的は、V I S T AとV S I G 8を含む単離した複合体に特異的に結合する抗体または抗体断片であって、例えば、前記V I S T A及び/またはV S I G 8多量体であり、前記抗体は一価の、または複合体化していないV I S T AまたはV S I G 8に認識可能な程度に結合せず、更に、抗体は好ましくはヒト、ヒト化、霊長類化もしくはキメラ抗体であるか、またはF a b、F a b'、s c F vもしくはF a b₂である、抗体または抗体断片を提供することである。

【0031】

本発明の別の特定の目的は、例えば、癌、またはウイルス性、細菌性、原生動物性、酵母菌性もしくは真菌性、もしくは寄生性疾患等の感染症を治療するために、V I S T AとV S I G 8の相互作用を阻害するために、例えば、T細胞の活性化、増殖またはサイトカイン産生の、V I S T Aが関係する抑制を阻害または遮断するために、本発明に従ったアンタゴニスト化合物の使用方法を提供することである。

【0032】

本発明の別の特定の目的は、V I S T AとV S I G 8の相互作用を増強することにより、V I S T Aが関係する、T細胞の活性化、増殖またはサイトカイン産生の抑制を強化するために、例えば、自己免疫性、アレルギー性または炎症性状態を治療するために、本発明に従ったアゴニスト化合物の使用方法を提供することである。

【0033】

本発明の別の特定の目的は、検出可能な標識、リンカーまたは治療用部位に結合した、本発明に従ったアゴニストまたはアンタゴニスト化合物を提供することである。

【0034】

本発明の別の特定の目的は、本発明に従った、診断上または治療的有効量のアゴニスト

10

20

30

40

50

またはアンタゴニスト化合物を含む、例えば、ヒトの治療法での使用に好適な診断用または治療用組成物、例えば、静脈内、皮下または筋肉内投与可能な組成物を提供することである。

【0035】

本発明の別の特定の目的は、PD-1またはPD-L1アゴニストまたはアンタゴニスト（例えば、PD-1またはPD-L1アゴニストまたはアンタゴニストは、抗PD-1抗体もしくは抗体断片、抗PD-L1抗体もしくは抗体断片、一価もしくは多量体であり得るPD-L1ポリペプチドもしくはその断片、一価もしくは多量体であり得るPD-1ポリペプチドもしくはその断片、または、前述のいずれかを含む複合体もしくは融合タンパク質から選択される）と共に、本発明に従ったアゴニストまたはアンタゴニスト化合物を用いる、診断方法または治療方法を提供することである。

10

【0036】

本発明の別の特定の目的は、免疫細胞、例えばヒト免疫細胞を、本発明に従ったアゴニストまたはアンタゴニスト化合物と *in vitro* または *in vivo* で接触させ、例えば、接触した細胞を、癌もしくは感染症を有する対象、または炎症性、アレルギー性もしくは自己免疫性状態を有する対象等のヒト対象に注入する方法を提供することである。

【0037】

本発明の別の特定の目的は、VSI G 8を単独で、またはVISTA-Rと共に使用して、VSI G 8 / VISTAアゴニストまたはアンタゴニストを同定することを含むスクリーニングアッセイ、好ましくは、VSI G 8と結合し、VSI G 8 / VISTA相互作用を増強する化合物、または、T細胞免疫またはサイトカイン産生における、VISTA / VSI G 8相互作用の効果を阻害する化合物等の、VSI G 8と結合し、VSI G 8 / VISTA相互作用を阻害する化合物を同定する結合アッセイを提供することである。

20

【0038】

本発明の別の特定の目的は、VSI G 8を単独で、またはVISTA-Rと共に使用して、VSI G 8 / VISTAアゴニストまたはアンタゴニストを同定することを含むスクリーニングアッセイ、好ましくは、T細胞免疫またはサイトカイン産生におけるVISTA / VSI G 8相互作用の効果を増強する化合物をスクリーニングする機能アッセイを提供することである。これらのアッセイは *in vitro* であってよく、または、ヒトもしくは齧歯類VISTA、及び/またはヒトもしくは齧歯類VSI G 8を発現するトランスジェニック動物を使用してよく、また、ハイスループットスクリーニングアッセイであってよい。

30

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】TCRにより誘発された早期T細胞活性化をVISTAが阻害することを示す実験結果を含む。実験では、T細胞を単離して、CD3+ / - 対照IgまたはVISTA-Igとともに10分間培養した。全ERK、及びホスホErk (phospho-Erk) を検出した。

【図2】NCRの階層を示す概略図を含む。

40

【図3】VISTA mAbによる処置で、腫瘍増殖が減少することを示す実験結果を含む。実験では、マウスを皮下で、A.MB49、B.MCA105、もしくはC.EG7腫瘍細胞のいずれかで播種、または腹腔内でD.ID8ルシフェラーゼ腫瘍細胞で播種し、+1日目から開始し、隔日でVISTA mAb 13F3 (300 μg) により処置した。皮下の腫瘍増殖を監視した。ID8ルシフェラーゼ腫瘍に関して、Xenogen IVISを使用して30日目にマウスを撮像した。

【図4】mVISTA-IgG2aによる治療的処置は腎臓の損傷を逆転させ、NZBWF1 SLEモデルにおいて生存を延ばしたことを示す実験結果を含む。この実験では、NZBWF1メスマウスを、週齢24から、PBS (黒丸)、150 μgの対照IgG2a (青の正方形)、または150 μgのmVISTA-IgG2a (赤の三角形) により

50

3日毎に治療的に処置した。(A)病気の重症度を、タンパク尿により毎週監視した。グループあたり6匹の動物の平均±標準誤差としてデータを示し、これは3つの実験を表すものである。対照IgG2aとmVISTA-IgG2aとの間で統計的有意性を決定し、対応のないマン・ホイットニー検定により $p = 0.0156$ となった。VISTAで処置したマウスのうち、生存したのは6匹中5匹であったのに対し、PBSまたはIgG2a対照で処置したマウスの生存はゼロであった。

【図5】PD-1 PD-L1の相互作用を検出するためのパニングの使用を示す。CHO-S細胞に、示したGFPタグタンパク質をトランスフェクションした。48時間後に、プレートに固定したFcタンパク質(10 μ g/mL)上で1時間、細胞を培養した。非接着細胞を取り除き、結合した細胞をトリプシン-EDTAにより分離した。A)PD-L1-Fcに結合した後の、代表的な陽性及び陰性プロット。B)パニング後に回収した細胞の数。

【図6】VISTA-Igは、一次ヒトT細胞のCD3による活性化を抑制することができることを示す実験を含む。このデータは、形質転換したヒトT細胞株であるJurkat T細胞における、CD69の上方制御を、VISTA-Igを用いて防止することができるということを確認する。

【図7】全脾臓細胞を含有する試料に対して、濃縮したT細胞母集団におけるVSI G8の発現を比較した、qPCRアッセイの結果を含む。

【図8】VISTA融合タンパク質が、VSI G8を過剰発現する293細胞に特異的に結合することを示す実験を含む。

【図9】図9A~Cは、VSI G8とVISTAに対する抗体が、VISTA-IgとVSI G8との相互作用を遮断することを示す実験を含む。

【図10】VISTA-Igが、マウスVSI G8を過剰発現する細胞に結合する能力が低いことを示していることを示す実験を含む。

【図11】VISTAを過剰発現する細胞が、VSI G8を過剰発現する細胞に特異的にコンジュゲートすることを明らかにする実験を含む。

【図12】VSI G8に対する抗体がCD8 T細胞とNK細胞に結合することを明らかにする実験を含む。

【図13】VSI G8 mRNAはヒトCD4及びCD8 T細胞により発現されることを明らかにする実験を含む。

【図14】VISTAがVSI G8を介してT細胞にシグナル伝達し、T細胞の活性化を抑制することを示す実験を含む。GFP(対照)またはVISTA+GFPのいずれかを発現するA20細胞を、ISQペプチドの存在下においてDO11.10 T細胞とともにインキュベーションした。72時間の時点で、CD25の発現によりT細胞の活性化を測定した。

【図15】PD-1を含むVISTA-Igで処理したVSI G8発現のA20細胞上における、異なる免疫タンパク質の上方制御を示す実験を含む。

【図16-1】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-2】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-3】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-4】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-5】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-6】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-7】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-8】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-9】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-10】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【図16-11】VSI G8の種のオルソログの異なる配列を特定する表を含む。

【発明を実施するための形態】

【0040】

10

20

30

40

50

別段定めがない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者により一般的に理解される用語と同じ意味を有する。本明細書に記載する方法及び材料に類似または等価の方法及び材料を本発明、または本発明の試験に使用してよいが、好適な方法及び材料が本明細書に記載される。材料、方法及び実施例は説明を目的とするだけであり、限定を意図するものではない。本明細書に記載する分析化学、合成有機化学、並びに医薬及び製薬化学に関して利用される用語、並びにこれらの実験室手順及び技術は十分周知のものであり、当該技術分野において一般的に使用される。化学合成、化学分析、医薬品調製、配合、及び送達、並びに患者の治療については、標準的な技術を使用してよい。

【0041】

本明細書の説明、及び以下の特許請求の範囲全体で使用するとおり、文脈上別途明記しない限り、「a」、「an」及び「the」の意味には、複数形を含む。

【0042】

本明細書で使用する場合、「活性化受容体」は、抗原、(例えば、MHC分子の文脈における)複合体化抗原、Ig融合タンパク質、リガンド、または抗体と結合する免疫細胞受容体を広く意味する。活性化受容体は、T細胞受容体(TCR)、B細胞受容体(BCR)、サイトカイン受容体、LPS受容体、補体受容体、及びFc受容体であるが、それらに限定されない。例えば、T細胞受容体はT細胞上に存在し、CD3分子と会合している。MHC分子の文脈において、T細胞受容体は、抗原により(及び、ポリクローナルT細胞活性化試薬により)刺激される。TCRによるT細胞の活性化は、多くの変化、例えば、タンパク質のリン酸化、膜脂質の変化、イオンの移動、環状ヌクレオチドの改変、RNA転写の変化、タンパク合成の変化、及び細胞体積の変化をもたらす。例えば、T細胞受容体はT細胞上に存在し、CD3分子と会合している。MHC分子の文脈において、T細胞受容体は、抗原により(及び、ポリクローナルT細胞活性化試薬により)刺激される。TCRによるT細胞の活性化は、多くの変化、例えば、タンパク質のリン酸化、膜脂質の変化、イオンの移動、環状ヌクレオチドの改変、RNA転写の変化、タンパク合成の変化、及び細胞体積の変化をもたらす。

【0043】

本明細書で使用する場合、「アジュバント」とは、それ自体にいかなる特異的抗原効果も有することなく、免疫系を刺激し、ワクチンに対する応答を増加させる作用物質を意味する。

【0044】

本明細書において、疾患の「診断の補助」または「検出の補助」とは、対象が、特定の病状の特徴となる細胞、もしくは特定の病状の開始を有するか、または、VSI G 8及び/もしくはVISTAの発現を特徴とする免疫抑制、もしくは、例えば、慢性的及び非慢性的な疾患を患う個体において、自己免疫、炎症もしくはアレルギー反応の最中等における、VSI G 8の量が減少した細胞と特徴とする異常な免疫の上方制御等の免疫不全を含むかどうかを評価するために、特定のマーカーポリペプチドの発現レベル、または発現したRNAを単独、または1つ以上の他のマーカーと共に検出することを意味する。

【0045】

本明細書で使用する場合、「アレルギー性疾患」とは広く、アレルギー反応を伴う疾患を意味する。より具体的には、「アレルギー性疾患」とは、アレルゲンが特定されている疾患として定義され、ここでは、そのアレルゲンに曝露することと病理学的変化の開始に強力な相関関係があり、病理学的変化は、免疫学的メカニズムを有することが証明されている。本明細書においては、免疫学的メカニズムとは、白血球がアレルゲンの刺激に対して免疫応答を示すことを意味する。

【0046】

本明細書で使用する場合、「アミノ酸」とは広く、天然及び合成アミノ酸、並びに、天然アミノ酸に類似の様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物を意味する。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によりコードされるアミノ酸、並びに、後で修飾されるこれらの

10

20

30

40

50

アミノ酸（例えばヒドロキシプロリン、 α -カルボキシグルタメート、及びO-ホスホセリン）である。アミノ酸類似体とは、天然アミノ酸と同じ基本的な化学構造（即ち、水素、カルボキシル基、アミノ基に結合した炭素）、及びR基を有する化合物（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）を意味する。類似体は修飾R基を有する（例えばノルロイシン）か、または修飾ペプチド骨格を有してよいが、天然アミノ酸と同一の基本的な化学構造を保持する。アミノ酸模倣物とは、一般的なアミノ酸の化学構造とは異なるが、天然アミノ酸に類似の様式で機能する構造を有する化合物を意味する。

【0047】

本明細書で使用する場合、「アネルギー」もしくは「耐性」、または「延びた抗原特異的T細胞の抑制」もしくは「延びた免疫抑制」とは広く、活性化受容体が仲立ちする刺激に対する不応答性（refractivity）を意味する。不応答性は一般的に抗原特異的であり、寛容抗原への曝露を止めた後に持続する。例えば、（不応性とは対照的に）T細胞におけるアネルギーは、サイトカイン、例えばIL-2、産生の欠如により特徴づけられる。T細胞が抗原に曝露され、第2のシグナル（共刺激シグナル）の不存在下にて第1のシグナル（T細胞受容体またはCD-3が仲立ちするシグナル）を受けるときに、T細胞のアネルギーは発生する。これらの条件下にて、同じ抗原に細胞を再び曝露する（再曝露が共刺激分子の存在下で発生する場合でも）ことは、サイトカイン産生の失敗、故に増殖の失敗をもたらす。しかし、アネルギーT細胞は、サイトカイン（例えばIL-2）を用いて培養した場合、無関係の抗原に対する応答を開始することができ、増殖することが可能である。例えば、T細胞のアネルギーは、ELISAで測定する、Tリンパ球によるIL-2産生の欠如によって、または、インジケーター細胞株を使用した増殖アッセイによってもまた観察することができる。あるいは、レポーター遺伝子構築物を使用することができる。例えば、アネルギーT細胞は、5' IL-2遺伝子エンハンサーの制御下において異種プロモーターにより、または、エンハンサー内で見出すことができるAPI配列の多量体により誘発されるIL-2遺伝子転写を開始することができない（Kang et al. (1992) Science 257:1134）。共刺激シグナルを制御することで、免疫細胞のエフェクター機能の制御がもたらされる。

【0048】

本明細書で使用する場合、「抗体」とは広く、抗体の「抗原結合部」（「抗体部」「抗原結合断片」「抗体断片」も同じ意味で用いられる）、及び、全抗体分子を意味する。本明細書で使用する場合、「抗原結合部」という用語は、抗原（例えば、VSI G 8及び/もしくはVISTA、またはこれらの特定の部分）に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つ以上の断片を意味する。本明細書において言及される場合、「抗体」という用語は、全ポリクローナル及びモノクローナル抗体、並びにそれらの任意の抗原結合断片（即ち「抗原結合部」）または一本鎖を含む。「抗体」とは、ジスルフィド結合により相互に接続された、少なくとも2個の重（H）鎖と2個の軽（L）鎖またはこれらの抗原結合部を含む糖タンパク質を指す。それぞれの重鎖は、少なくとも1個の重鎖可変領域（本明細書ではV_Hと省略）、及び重鎖定常領域から成る。重鎖定常領域は、3つのドメインのCH1、C_m及びC_m-から成る。それぞれの軽鎖は、少なくとも1個の軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと省略）、及び軽鎖定常領域から成る。軽鎖定常領域は1つのドメイン（CL-）から成る。V_H及びV_L領域は更に、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる、超可変領域に細分することができ、相補性決定領域には、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる、より保存された領域が点在している。それぞれのV_H及びV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端まで、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4で配置された、3個のCDRと4個のFRで構成される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞（例えばエフェクター細胞）と、従来の補体系の第1の構成成分（Clq）を含む宿主組織または因子への、免疫グロブリンの結合を仲立ちし得る。更に一般的には、「抗体」という用語は、エピトープに適合し、エピトープを認識する特定の形状

10

20

30

40

50

を有する、任意のポリペプチド鎖を含有する分子構造を含むことが意図され、ここでは、1つ以上の非共有結合相互作用が、分子構造とエピトープとの間の複合体を安定化させる。典型的な抗体分子は免疫グロブリンであり、並びに、全ての源（例えばヒト、齧歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、他の哺乳類、ニワトリ、他のトリ等）からの、全ての種類の免疫グロブリン（IgG、IgM、IgA、IgE、IgD等）が「抗体」と見なされる。

【0049】

抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片により実施されることができ、抗体の「抗原結合部」という用語に包含される抗原結合断片の非限定例としては、(a) V_L 、 V_H 、 C_L 及び C_{H1} ドメインからなる一価断片の Fab 断片；(b) ヒンジ領域にてジスルフィド架橋により結合した2つの Fab 断片を含む二価断片の $F(ab')_2$ 断片；(c) V_H 及び C_{H1} ドメインからなる Fd 断片；(d) 抗体の1つのアームの V_L 及び V_H 領域からなる Fv 断片；(e) V_H ドメインからなる dAb 断片 (Ward, et al. (1989) Nature 341: 544 - 546)；並びに (f) 単離した相補性決定領域 (CDR) が挙げられる。更に、Fv 断片の2つのドメイン (V_L 及び V_H) は個別の遺伝子によりコードされるが、これらは、これらのドメインを、 V_L 及び V_H 領域の対が一価の分子を形成する、単一のタンパク質鎖 (一本鎖 Fv (scFv) として知られている) として作製することができる合成リンカーによる組み換え法を使用して、結合することができる。例えば、Bird, et al. (1988) Science 242: 423 - 426；Huston, et al. (1988) Proc Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883；及び Osbourn, et al. (1998) Nat. Biotechnol. 16: 778. を参照のこと。一本鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合部」という用語に包含されることが意図される。完全 IgG 分子または他のアイソタイプを生成するために、特異的 scFv の任意の V_H 及び V_L 配列が、ヒト免疫グロブリン定常領域の cDNA、またはゲノム配列に結合することができる。 V_H 及び V_L はまた、タンパク質化学作用または組み換え DNA 技術のいずれかを使用した、Fab、Fv、または免疫グロブリンの他の断片の生成で使用することも可能である。ダイアボディ等の、一本鎖抗体の他の形態もまた包含される。ダイアボディは、 V_H 及び V_L ドメインがポリペプチド一本鎖で発現するが、同じ鎖の2つのドメイン間で対形成をするにはあまりにも短いリンカーを使用することにより、このドメインを、別の鎖の相補性領域と対形成させることにより、2つの抗原結合部位を作製する、二価の二重特異性抗体である。例えば、Holliger, et al. (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448；Poljak, et al. (1994) Structure 2: 1121 - 1123 を参照のこと。更に、抗体、またはその抗原結合部 (抗原結合断片、抗体断片、抗体部) は、抗体または抗体部の、1つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有または非共有結合により形成された、より大きな免疫付着 (immunoadhesion) 分子の一部であってよい。免疫付着分子の例としては、四量体 scFv 分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用 (Kipriyanov, et al. (1995) Hum. Antibodies Hybridomas 6: 93 - 101)、及び、二価のビオチン化 scFv 分子を作製するための、システイン分子、マーカーペプチド及び C 末端ポリヒスチジンタグの使用 (Kipriyanov, et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047 - 1058) が挙げられる。Fab 及び $F(ab')_2$ 断片等の抗体部は、それぞれ、全抗体のパパインまたはペプシン分解等の従来技術を使用して、全抗体から調製することができる。更に、抗体、抗体部及び免疫付着分子は、本明細書に記載した標準的な組み換え DNA 技術を使用して入手することができる。抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、異種、同種異系、同系、またはこれらの改変形態、例えばヒト化またはキメラ抗体であってよい。

【0050】

「抗原を認識する抗体」及び「抗原に対して特異的な抗体」は本明細書で、「抗原に特

10

20

30

40

50

異的に結合する抗体」という用語と同じ意味で用いられ、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンまたはその断片を意味する。

【0051】

本明細書で使用する場合、「抗原」とは広く、動物を誘発して、その抗原のエピトープに結合可能な抗体を産生することが更に可能な抗体に結合可能な分子または分子の一部を指す。抗原は1つのエピトープ、または2つ以上のエピトープを有してよい。本明細書で言及する特異的な反応は、抗原が非常に選択的な様式で、対応する抗体と反応し、他の抗原により誘発され得る他の多くの抗体とは反応しないことを指す。対象の特定の抗原に対する、所望の増強された免疫応答の場合において、抗原としては、誘発され得る保護免疫応答が代表的な感染症の抗原が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0052】

本明細書で使用する場合、「抗原提示細胞」とは広く、プロフェッショナル抗原提示細胞（例えばBリンパ球、単球、樹状細胞、及びランゲルハンス細胞）、並びに、他の抗原提示細胞（例えばケラチノサイト、内皮細胞、星状細胞、線維芽細胞、及び希突起膠細胞）を指す。

【0053】

本明細書で使用する場合、「アンチセンス核酸分子」とは広く、mRNA配列に相補的な、または遺伝子のコード鎖に相補的なタンパク質をコードする「センス」核酸に相補的な（例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的な）ヌクレオチド配列を意味する。したがって、アンチセンス核酸分子は、センス核酸分子に水素結合することができる。

20

【0054】

本明細書で使用する場合、「アポトーシス」とは広く、当技術分野において既知の技術を使用して同定可能なプログラム細胞死を意味する。アポトーシス細胞は、細胞収縮、膜の小疱形成、及び、細胞の断片化において最盛となるクロマチン凝縮により特徴づけられ得る。アポトーシスを受ける細胞は、ヌクレオソーム間のDNA切断における特徴的パターンもまた示す。

【0055】

本明細書で使用する場合、「自己免疫」または「自己免疫疾患または状態」とは広く、個体自身の組織から生じる、また、これらに向けられる病気もしくは疾患、または、これらの共分離もしくは徴候、またはこれらからもたらされる状態を指し、これらを含む。本明細書において、自己免疫性状態としては、炎症性またはアレルギー性状態、例えば、組織の破壊と潜在的に関係している、自己抗原に対する宿主の免疫反応を特徴とする慢性疾患（関節リウマチ等）が挙げられる。

30

【0056】

本明細書で使用する場合、「B細胞受容体（BCR）」とは広く、B細胞に見られる、膜Ig（mIg）と他の膜貫通ポリペプチド（例えばIgA及びIg）との複合体を指す。mIgのシグナル伝達機能は、オリゴマーまたは多量体抗原による受容体分子の架橋により引き起こされる。B細胞はまた、抗免疫グロブリン抗体により活性化されることも可能である。BCRの活性化に際し、チロシンのリン酸化を含む多数の変化がB細胞で生じる。

40

【0057】

本明細書で使用する場合、「癌」とは広く、悪性増殖または腫瘍の原因となる、異常かつ無秩序な細胞分裂（例えば、制御されない細胞増殖）を特徴とする（侵襲性または転移性に関係ない）任意の腫瘍性疾患を指す。本明細書で使用する場合、「癌」または「癌性の」という用語は、非限定例が本明細書に記載される悪性増殖または腫瘍を引き起こす、異常かつ無秩序な細胞分裂を特徴とする、（侵襲性、非侵襲性または転移性に関係ない）任意の腫瘍性疾患を包含するように理解されなければならない。これには、制御されない細胞増殖を通常特徴とする、哺乳類におけるあらゆる生理学的条件が含まれる。癌の例は実施例で例示する。更なる癌としては、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、及び白血病が挙げられるが、これらに限定されない。かかる癌のより具体例としては、扁平上皮細胞癌、肺

50

癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、及び肺扁平上皮癌等）、腹膜癌、肝細胞癌、（胃腸癌を含む）胃癌、膵臓癌、グリア芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮体または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、及び様々な種類の頭頸部癌、並びに（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ性NHL；高悪性度小型非分割細胞NHL；巨大腫瘍病変NHL；マンテル細胞リンパ腫；AIDSに伴うリンパ腫；及びワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症を含む）B細胞リンパ腫；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；毛様細胞性白血病；慢性骨髓芽球性白血病；多発性骨髄腫並びに移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）が挙げられる。本発明の治療で対応可能な他の癌としては、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、及び白血病またはリンパ系悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。かかる癌のより具体例としては、結腸癌、膀胱癌、卵巣癌、黒色腫、扁平上皮細胞癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、及び肺扁平上皮癌等）、腹膜癌、肝細胞癌、（胃腸癌を含む）胃癌、膵臓癌、グリア芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮体または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、及び様々な種類の頭頸部癌、並びに（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ性（SL）NHL；中悪性度／濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ性NHL；高悪性度小型非分割細胞NHL；巨大腫瘍病変NHL；マンテル細胞リンパ腫；AIDSに伴うリンパ腫；及びワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症を含む）B細胞リンパ腫；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；毛様細胞性白血病；慢性リンパ性白血病；及び移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、並びに、母斑症（*phakomatoses*）、（脳腫瘍と関係するもの等の）浮腫、及びメイグス症候群と関係する異常血管増殖が挙げられる。癌は、結腸直腸癌、乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫（NHL）、腎細胞癌、前立腺癌、肝癌、膵癌、膵臓癌、軟部組織肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド癌腫、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択されるのが好ましい。例示的实施形態において、癌は初期の、または進行した（転移性を含む）膀胱癌、卵巣癌または黒色腫である。別の実施形態において、癌は結腸直腸癌である。本発明の治療で対応可能な癌性状態としては、V S I G 8及び／またはV I S T Aを発現するかまたは発現しない癌が挙げられ、更に、非転移性または非侵襲性、及び侵襲性または転移性癌も含み、ここで、免疫細胞、ストローマ細胞または病気の細胞によるV S I G 8及び／またはV I S T Aの発現は、抗腫瘍応答及び抗侵襲性免疫応答を抑制する。本発明の方法は特に、血管新生化腫瘍の治療に好適である。

10

20

30

【0058】

本発明に従った癌としては、V S I G 8及び／またはV I S T Aを発現するかまたは発現しない癌が挙げられ、更に、非転移性または非侵襲性、及び侵襲性または転移性癌（ここで、免疫細胞、ストローマ細胞または病気の細胞によるV S I G 8及び／またはV I S T Aの発現は、抗腫瘍応答及び抗侵襲性免疫応答を抑制する）、また、血管新生化腫瘍を特徴とするものも含む。

40

【0059】

本明細書における「癌治療」とは、癌を予防もしくは治療する、または癌の1つ以上の症状を緩和する任意の方法を意味する。通常は、かかる治療法は免疫活性化V S I G 8及び／またはV I S T Aポリペプチドまたは融合タンパク質、コンジュゲート、多量体（ホモ多量体もしくはヘテロ多量体）、または本発明に従った物質を含有する組成物を、単独で、またはより典型的には、即ち、V S I G 8及び／またはV I S T Aの発現が抗腫瘍応答、及び、化学療法もしくは放射線治療の効果、または生物学的効果を抑制する個体において、化学療法もしくは放射線治療、またはこれらの活性を増強するための他の生物学と組み合わせるかのいずれかで、投与することを含む。本発明に従って、抗癌活性を示す

50

任意の化学療法剤を使用することができる。化学療法剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体及び関係する阻害剤、ビンカルカロイド、エピポドフィロトキシン、抗生物質、L-アスパラギナーゼ、トポイソメラーゼ阻害剤、インターフェロン、白金配位錯体、アントラセンジオン置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、副腎皮質ステロイド、プロゲスチン、エストロゲン、抗エストロゲン薬、アンドロゲン、抗アンドロゲン薬、及び性ゴナドトロピン放出ホルモン類似体からなる群から選択されるのが好ましい。化学療法剤は、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン(LV)、イリノテカン、オキサリプラチン、カペシタビン、パクリタキセル及びドセタキセルからなる群から選択されるのがより好ましい。2種以上の化学療法剤を、抗VEGF抗体の投与と組み合わせて投与されるカクテルに使用することができる。1つの好ましい組み合わせの化学療法は、5-FUと1種以上の他の化学療法剤を含む、フルオロウラシルベースのものである。化学療法の組み合わせに好適な投与レジメンは、当技術分野において既知であり、例えば、Saltz et al. Proc ASCO 18:233(1999)及びDouillard et al. Lancet 355:1041-7(2000)に記載されている。生物学的製剤は、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、またはVISTAに対する抗体、及びPD-L1、PD-L2、CTLA-4またはVISTA融合タンパク質、並びにサイトカイン、増殖因子アンタゴニスト及びアゴニスト、ホルモン、並びに抗サイトカイン抗体等の、別の免疫増強剤であってよい。

10

【0060】

本明細書で使用する場合、「キメラ抗体」とは広く、抗原結合部位(可変領域)が、異なる、または変化したクラス、エフェクター機能及び/もしくは種の定常領域、または、キメラ抗体に新しい特性を付与する全く異なる分子に結合するように、定常領域またはその一部が変更、置換または交換された抗体分子を指し、例えば、酵素、毒素、ホルモン、増殖因子、薬剤、可変領域またはその一部が、異なる、または変化した抗原特異性を有する可変領域と変更、置換または交換されている。

20

【0061】

本明細書で使用する場合、「コード領域」とは広く、アミノ酸残基に翻訳されたコドンを含むヌクレオチド配列の領域を指し、「非コード領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域(例えば5'及び3'非翻訳領域)を指す。

30

【0062】

本明細書で使用する場合、「保存的に改変された変異体」とは、アミノ酸と核酸配列の両方に適用され、特定の核酸配列に関しては、保存的に改変された変異体とは、同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードするこれらの核酸、または核酸が、実質的に同一の配列に対してアミノ酸配列をコードしない場合を指す。遺伝暗号の縮退のため、機能が同一の多数の核酸が、任意の所与のタンパク質をコードする。「サイレント変異」とは、保存的に改変された核酸変異の1つの種である。本明細書における、ポリペプチドをコードする全ての核酸配列はまた、核酸の全ての可能なサイレント変異についても記載している。当業者は、核酸の各コドン(通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUGと、通常トリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く)を改変して、機能的に同一の分子を得てよいことを認識するであろう。

40

【0063】

本明細書で使用する場合、「相補的決定領域」「超可変領域」または「CDR」とは広く、抗体の軽鎖または重鎖の可変領域に見出される、超可変または相補性決定領域(CDR)の1つ以上を指す(Kabat, et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest National Institutes of Health, Bethesda, Md.を参照のこと)。これらの表現には、Kabat, et al. (1983) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. of Health and Human Servicesに

50

より規定される超可変領域、または、抗体の三次構造における超可変ループ (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917) が含まれる。各鎖のCDRはフレームワーク領域により近接しており、また、他の鎖のCDRと共に、抗原結合部位の形成に寄与している。CDRの中には、抗体-抗原相互作用においてCDRにより用いられる重要な接触残基を示す選択性決定領域 (SDR) と説明されている、選択アミノ酸が存在する (Kashmiri Methods 36: 25-34 (2005))。

【0064】

本明細書で使用する場合、「対照量」とは広く、マーカーの試験量と比較される、マーカーが取ることができる任意の量または任意の範囲の量を指す。例えば、マーカーの対照量は、特定の疾患もしくは状態を有する患者、またはかかる疾患もしくは状態を有しないヒトにおけるマーカーの量であってよい。対照量は、絶対量 (例えばマイクログラム/mL) または相対量 (例えばシグナルの相対強度) のいずれかであることができる。

10

【0065】

本明細書で使用する場合、「共刺激受容体」とは広く、共刺激シグナルを免疫細胞 (例えばCD28またはICOS) に伝達する受容体を指す。本明細書で使用する場合、「阻害性受容体」という用語には、負のシグナルを免疫細胞、例えばT細胞またはNK細胞に伝達する受容体を含む。

【0066】

本明細書で使用する場合、「共刺激する」とは広く、共刺激分子が、増殖またはエフェクター機能を誘発する、非活性化され、受容体が仲立ちする第2のシグナル (「共刺激シグナル」) を生み出す能力を指す。例えば、共刺激シグナルは、(例えば、T細胞受容体が仲立ちするシグナルを受け取ったT細胞における) サイトカイン分泌をもたらすことができ、(例えば、活性化受容体を介して) 細胞受容体が仲立ちするシグナルを受け取った免疫細胞は、本明細書においては「活性化免疫細胞」と称してよい。T細胞に関して、T細胞に対する共刺激シグナルの伝達には、シクロスポリンAにより阻害されないシグナル伝達経路が関係する。更に、共刺激シグナルは、T細胞内でのサイトカイン (例えばIL-2及び/もしくはIL-10) 分泌を誘発することができ、かつ/または、T細胞内での抗原に対する不応性の誘発、アネルギーの誘発、もしくは、細胞死の誘発を防止することができる。

20

30

【0067】

本明細書において、「共刺激ポリペプチド」または「共刺激分子」とは、T細胞の細胞表面分子との相互作用の際に、T細胞応答を制御するポリペプチドを指す。

【0068】

本明細書で使用する場合、「共刺激シグナル伝達」とは、抗原特異的T細胞応答の間に、抗原提示細胞上の共刺激ポリペプチドと、T細胞上の受容体との相互作用から生じるシグナル伝達活性である。1つの仮説に束縛されるものではないが、抗原特異的T細胞応答は2つのシグナル、すなわち1) T細胞受容体 (TCR) の、MHCとの関係において提示される抗原性ペプチドとの関与 (シグナル1)、及び2) 異なる共刺激受容体/リガンド対の間の接触により送達される、抗原に無関係な第2のシグナル (シグナル2) により仲立ちされると考えられている。1つの仮説に束縛されるものではないが、この「第2のシグナル」は、T細胞応答の種類 (活性化と阻害)、及び、この応答の強さと長さを決定するのに非常に重要であり、また、共刺激分子 (B7ファミリーのタンパク質等) からの、陽性と陰性の両方のシグナルにより制御される。

40

【0069】

本明細書において、「B7」ポリペプチドとは、B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H5、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-S3、並びにこれらの生物学的に活性な断片、及び/または変異体を含むがこれらに限定されない、T細胞を共刺激するB7ファミリーのタンパク質のメンバーを意味する。例示的な、生物学的に活性な断片断片としては、T細胞を共刺激する細胞外領域の、細胞外ドメイ

50

ンまたは断片が挙げられる。

【0070】

本明細書で使用する場合、「細胞質ドメイン」とは広く、細胞の細胞質に向かって延びるタンパク質の一部を意味する。

【0071】

本明細書で使用する場合、「診断の」とは広く、病態の存在または性質を特定することを指す。診断方法は、その感受性と特異性において異なる。診断アッセイの「感受性」とは、陽性と試験される病気に罹った個体の割合(%)（「真陽性」の%）である。アッセイにより検出されない、病気にかかった個体は「偽陰性」である。病気に罹っておらず、アッセイで陰性と試験される対象は「真陰性」と呼ばれる。診断アッセイの「特異性」は、1 - 偽陽性率であり、ここで、「偽陽性」率とは、陽性と試験される病気を有しない対象の割合として規定される。特定の診断方法は、状態の決定的な診断を行うものでない場合があるが、その方法が、診断に役立つ陽性指標をもたらすのであれば、その方法は十分である。

10

【0072】

本明細書で使用する場合、「診断すること」または「診断を補助する」とは広く、疾患もしくは症状を分類すること、及び/または、（例えば、V S I G 8 及び/もしくはV I S T A の発現の有無、並びに/または免疫細胞、ストローマ細胞、及び/もしくは病気を有すると推定される細胞による発現の増減に基づいて）個体が病状を有する可能性を測定すること、疾患の重症度を決定すること、疾患の進行を監視すること、疾患の転帰及び/または回復の見込みを予測することを意味する。「検出すること」という用語はまた任意で、前述の内容のいずれをも包含してよい。本発明に従った疾患の診断は、いくつかの実施形態においては、対象から入手した生体試料における、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの量の測定の影響を受ける場合があり、ここで、決定された量は、疾患の素因、または疾患の有無と相関関係にある可能性がある。「対象から入手した生体試料」は任意で、対象から物理的に取り除かれた試料もまた含み得ることを記しておかなければならない。

20

【0073】

本明細書で使用する場合、「有効量」とは広く、疾患を治療するために患者に投与した際に、疾患のかかる治療をもたらすのに十分である、化合物、抗体、抗原、または細胞の量を意味する。有効量は、予防（*prophylaxis*）に有効な量、及び/または予防（*prevention*）に有効な量であってよい。有効量は、徴候/症状の発生を防止する、徴候/症状の発生の重症度を低下させる、徴候/症状の発生を取り除く、徴候/症状が発生して進展するのを遅らせる、徴候/症状が発生して進行するのを防止する、かつ/または徴候/症状の発生の防止に影響を与えるのに有効な量であってよい。「有効量」は、疾患とその重症度、並びに、治療される患者の年齢、体重、病歴、罹病性、及び以前から存在する状態に応じて変化し得る。本発明の目的に関して、「有効量」という用語は、「治療的有效量」と同義である。

30

【0074】

本明細書で使用する場合、「細胞外ドメイン」または「ECD」とは広く、細胞表面から延びるタンパク質の一部を指す。

40

【0075】

本明細書で使用する場合、「発現ベクター」とは広く、原核細胞、酵母菌細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞を含む任意の細胞において、本発明の核酸配列を *in vitro* または *in vivo* で、構造的または誘発的に発現させるための、任意の組み換え発現系を指す。この用語は、直鎖状または環状発現系を含む。この用語は、エピソームを保持する、または宿主細胞細胞に組み込む発現系を含む。発現系は、自己増幅を行うか、またはそうではない、即ち、細胞内で一時的発現のみを行う能力を有することができる。この用語は、組み換え核酸の転写に必要な、最小限の要素のみを含有する組み換え発現カセットを含む。

50

【0076】

本明細書で使用する場合、「ファミリー」とは広く、ポリペプチドを指し、本発明の核酸分子は、共通の構造ドメインまたはモチーフを有し、かつ、本明細書で定義する十分なアミノ酸またはヌクレオチド配列相同性を有する、2種以上のポリペプチドまたは核酸分子を意味することを目的としている。ファミリーメンバーは天然または非天然であることができ、同じかまたは異なる種のいずれかに由来することができる。例えば、ファミリーは、ヒト由来の第1のポリペプチド、及び、ヒト由来の他の異なるポリペプチドを含有することができるか、あるいは、非ヒト由来のホモログ（例えばサルポリペプチド）を含有することができる。ファミリーメンバーは、共通の機能的特徴もまた有してよい。

【0077】

本明細書で使用する場合、「Fc受容体」(FcR)とは広く、免疫グロブリン分子(Ig)のFc部分に対する細胞表面受容体を指す。Fc受容体は、免疫応答に關与する多くの細胞で見出される。これまでに同定されているヒトFcRは、IgG(FcRと命名される)、IgE(FcRI)、IgA(FcR)、及び重合IgM/A(Fc μ R)を認識するものである。FcRは以下の細胞型に見出される：FcRI(肥満細胞)、FcRII(多くの白血球)、FcR(好中球)、及びFc μ R(腺上皮細胞、肝細胞)(Hogg Immunol. Today 9:185-86(1988))。幅広く研究されたFcRは、細胞免疫防御の中核をなし、炎症のメディエーターの放出、及び自己免疫疾患の病因に関わる加水分解酵素の刺激を担っている(Unkles, Annu. Rev. Immunol. 6:251-87(1988))。FcRは、マクロファージ/単核細胞、多形核白血球、及びナチュラルキラー(NK)細胞のFcRが、IgGが仲立ちする特異的認識の構成要素を与えるため、エフェクター細胞と、Igを分泌するリンパ球との間に重要な繋がりをもたらす。ヒト白血球は、IgGに対する、少なくとも3つの異なる受容体、すなわちhFcRI(単球/マクロファージで見出される)、hFcRII(単球、好中球、好酸球、血小板、場合によりB細胞、及びK562細胞株で見出される)、並びにFcIII(NK細胞、好中球、好酸球、及びマクロファージで見出される)を有する。

【0078】

本明細書で使用する場合、「フレームワーク領域」または「FR」とは広く、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域内にある1つ以上のフレームワーク領域を指す(Kabat, et al. "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md(1987)を参照のこと)。これらの表現には、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域内のCDRの間に挟入された、これらのアミノ酸配列領域が含まれる。

【0079】

本明細書で使用する場合、「異種」とは広く、核酸が、自然では互いに同じ関係で見出されない2つ以上のサブ配列を含むことを示す核酸の一部を指す。例えば、核酸は通常、組み換えにより作製され、新しい機能性核酸を作製するために、無関係の遺伝子からの2つ以上の配列(例えば、ある源からのプロモーター、及び別の源からのコード領域)を有する。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、自然で互いに同一の関係が見出されない2つ以上のサブ配列を含むことを示す(例えば融合タンパク質)。

【0080】

本明細書で使用する場合、「高親和性」とは広く、標的抗原または受容体に対して、少なくとも 10^{-6} M、より好ましくは 10^{-7} M、更により好ましくは少なくとも 10^{-8} M、及び更により好ましくは少なくとも 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} Mの K_D を有する抗体または融合タンパク質を指す。

【0081】

本明細書において、IgG抗体または融合タンパク質の「高親和性」とは、標的抗原または受容体に対して、 10^{-6} M以下、より好ましくは 10^{-7} M以下、好ましくは 10

10

20

30

40

50

10^{-8} M以下、より好ましくは 10^{-9} M以下、及び更により好ましくは 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} M以下の K_D を有する抗体を意味する。抗体に関して特に、「高親和性」結合は、異なる抗体アイソタイプで変えることができる。例えば、IgMアイソタイプの「高親和性」結合とは、 10^{-7} M以下、より好ましくは 10^{-8} M以下の K_D を有する抗体を指す。

【0082】

本明細書で使用する場合、「相同性」とは広く、核酸配列と参照核酸配列との、または、ポリペプチド配列と参照ポリペプチド配列との類似性の程度を指す。相同性は部分的、または完全であってよい。完全な相同性とは、核酸またはアミノ酸配列が同一であることを示す。部分的相同性核酸またはアミノ酸配列とは、参照核酸またはアミノ酸配列と同一でない配列である。相同性の程度は、例えば、デフォルトのパラメーターを使用した、国立生物工学情報センター(NCBI)のBlastPソフトウェアを使用した配列の比較によって決定することができる。「配列同一性」という用語は、「相同性」と同じ意味で使用してよい。

10

【0083】

本明細書で使用する場合、「宿主細胞」とは広く、本発明の組み換え発現ベクター等の本発明の核酸分子が導入される細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞(例えば大腸菌)、または、酵母菌、昆虫(例えばSF9)、両生類、もしくは哺乳類細胞、例えばCHO、HeLa、HEK-293等の真核細胞、例えば培養細胞、外植体、及びin vivo細胞であってよい。「宿主細胞」と「組み換え宿主細胞」という用語は、本明細書では同じ意味で用いられる。かかる用語は、特定の対象細胞のみではなく、かかる細胞の後代または潜在的な後代も指すものと理解されるべきである。変異または環境の影響のいずれかにより、ある特定の变化が継代で発生し得るので、後代は実際のところ、親細胞に同一でなくてもよいが、本明細書で使用する用語の範囲内に依然として含まれる。

20

【0084】

「ヒトモノクローナル抗体」とは、フレームワーク領域とCDR領域の両方が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する、単一の結合特異性を示す抗体を意味する。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子と軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック非ヒト動物(例えばトランスジェニックマウス)から入手したB細胞を含むハイブリドーマにより産生される。これには、例えば、治療薬または診断用薬等のエフェクター作用物質に結合した、完全ヒトモノクローナル抗体及びコンジュゲート、並びにこれらの変異体が含まれる。

30

【0085】

本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」とは広く、ヒト細胞により作製された、より類似する抗体に変更された可変領域と定常領域を有する非ヒト細胞により作製された抗体を含むことを指す。例えば、非ヒト抗体アミノ酸配列を改変して、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に見出されるアミノ酸に組み込む。本発明のヒト化抗体は、例えばCDR内に、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列(例えば、in vitroのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発、またはin vivoでの体細胞突然変異により導入された変異)によりコードされないアミノ酸残基を含んでよい。本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」という用語は、別の哺乳類種(例えばマウス)の生殖細胞系に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列にグラフトしている抗体もまた含む。

40

【0086】

本明細書で使用する場合、「ハイブリダイゼーション」とは広く、鎖が互いに逆平行に配置される際に、複数の相補性ヌクレオチドの間で水素結合を形成することによる、(部分的に相補的なものを含む)相補性ポリヌクレオチド鎖の物理的相互作用を指す。

【0087】

本明細書で使用する場合、「IgVドメイン」と「IgCドメイン」とは広く、Igスーパーファミリーメンバーのドメインを指す。これらのドメインは、Igフォールドと呼ばれる、異なる折り畳みパターンを有する構造単位に対応する。Igフォールドは、そ

50

れぞれが、全てではないが大部分のドメインの2つのシート間において、保存されたジスルフィド結合を有する5～10個のアミノ酸の逆平行鎖からなる、2つのシートのサンドイッチを含む。IgのIgCドメイン、TCR、及びMHC分子は、同じ種類の配列パターンを共有し、Igスーパーファミリーの中ではCIセットと呼ばれている。他のIgCドメインは、他のセットに含まれる。IgVドメインもまた、配列パターンを共有し、Vセットドメインと呼ばれている。IgVドメインはCドメインよりも長く、更なる鎖の対を形成する。

【0088】

本明細書で使用する場合、「免疫細胞」とは広く、造血由来であり、免疫応答に役割を果たす細胞を指す。免疫細胞としては、B細胞及びT細胞等のリンパ球；ナチュラルキラー細胞；樹状細胞、及び骨髄性細胞（単球、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、好塩基球、及び顆粒球等）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0089】

本明細書で使用する場合、「イムノアッセイ」とは広く、抗原に特異的に結合する抗体を用いるアッセイを指す。イムノアッセイは、特定の抗体の特異的結合の性質を使用して、抗原を単離、標的化、及び/または定量化することを特徴とし得る。

【0090】

本明細書で使用する場合、「免疫関連病（または疾患または状態）」は、自己免疫疾患、炎症性疾患及び臓器移植、同種異系の幹細胞移植、自己幹細胞移植、骨髄移植、及び移植片対宿主病の急性及び慢性的拒絶等の、グラフト移植拒絶に関係する免疫不全、を含むがこれらに限定されない群から選択される任意の病気、疾患または状態を包含するものと理解されなければならない。

20

【0091】

本明細書で使用する場合、「免疫応答」とは広く、T細胞の共刺激の制御により影響を受ける、T細胞が仲立ちする、及び/またはB細胞が仲立ちする免疫応答を指す。例示的な免疫応答としては、B細胞応答（例えば抗体産生）、T細胞応答（例えばサイトカイン産生、及び細胞毒性）、並びに、サイトカイン応答性細胞（例えばマクロファージ）の活性化が挙げられる。本明細書で使用する場合、免疫応答に関する「下方制御」という用語には、任意の1つ以上の免疫応答の低下が含まれ、免疫応答に関する「上方制御」という用語には、任意の1つ以上の免疫応答の増加が含まれる。ある種類の免疫応答を上方制御することは、別の種類の免疫応答の対応する下方制御をもたらすことができる。例えば、ある特定のサイトカイン（例えばIL-10）産生を上方制御することは、細胞免疫応答の下方制御をもたらすことができる。

30

【0092】

本明細書における「免疫性（Immunologic）」、「免疫性（immunological）」または「免疫」応答とは、レシピエント患者内のペプチドに対して向けられる体液性（抗体が仲立ちする）、及び/または細胞性（抗原特異的T細胞もしくはその分泌生成物により仲立ちされる）応答の進行を指す。かかる応答は、免疫原の投与により誘発される積極的な応答、または、抗体もしくはプライミングされたT細胞を投与することにより誘導される受動的な応答であることができる。1つの仮説に束縛されるものではないが、細胞免疫応答は、クラスIIまたはクラスI MHC分子と関係するポリペプチドエピトープを提示して、それぞれ、抗原特異的CD4⁺Tヘルパー細胞及び/またはCD8⁺細胞傷害性T細胞を活性化することにより誘発される。応答は、単球、マクロファージ、NK細胞、好塩基球、樹状細胞、星状細胞、ミクログリア細胞、好酸球の活性化、好中球または先天性免疫の他の構成要素の活性化または動員を伴ってもよい。細胞が仲立ちする免疫応答の存在は、増殖アッセイ（CD4⁺T細胞）またはCTL（細胞傷害性Tリンパ球）アッセイにより測定することができる。体液性応答と細胞応答の、免疫原の防御または治療効果に対する相対的な寄与は、免疫付与した同系動物の抗体とT細胞を個別に単離し、第2の対象における防御または治療効果を測定することにより識別することができる。

40

50

【0093】

「免疫原 (Immunogenic agent)」または「免疫原 (immunogen)」は、任意でアジュバントと共に哺乳類に投与をする際に、自身に対して免疫応答を誘発することができる部位である。

【0094】

本明細書において、「病原体」とは、哺乳類細胞、好ましくはヒト細胞に感染し、病状を引き起こす任意の病原体または作用物質を意味する。その例としては、細菌、酵母菌、真菌、原生動物、マイコプラズマ、ウイルス、プリオン、及び寄生生物が挙げられる。かかる病原体の例としては、例えば、(a) 例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス (例えば HSV - I、HSV - II、CMV、もしくは VZV)、ボックスウイルス (例えば天然痘もしくは痘疹等のオルソボックスウイルス、もしくは伝染性軟属腫)、ピコルナウイルス (例えばライノウイルスもしくはエンテロウイルス)、オルトミクソウイルス (例えばインフルエンザウイルス)、パラミクソウイルス (例えばパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、及び呼吸器合胞体ウイルス (RSV))、コロナウイルス (例えば SARS)、パポウイルス (例えば、陰部疣贅、尋常性疣贅、もしくは足底疣贅)、ヘパドナウイルス (例えば B 型肝炎ウイルス)、フラビウイルス (例えば C 型肝炎ウイルスもしくはデング熱ウイルス)、またはレトロウイルス (例えば HIV 等のレンチウイルス) による感染により生じる病気等のウイルス病；(b) 例えば、細菌、例えば、エシェリキア属、エンテロバクター属、サルモネラ属、ブドウ球菌属、赤痢菌属、リステリア属、アエロバクター属、ヘリコバクター属、クレブシエラ属、プロテウス属、シュドモナス属、ストレプトコッカス属、クラミジア属、マイコプラズマ属、肺炎球菌属、ナイセリア属、クロストリジウム属、バチルス属、コリネバクテリウム属、抗酸菌属、カンピロバクター属、ピブリオ属、セラチア属、プロビデンシア属、クロモバクテリウム属、ブルセラ属、エルシニア属、ヘモフィルス属、またはボルデテラ属による感染から生じる病気等の細菌病；(c) クラミジア感染症、(カンジダ症、アスペルギルス症、ヒストプラズマ症、クリプトコックス髄膜炎を含むがこれらに限定されない) 真菌症、(マラリア、ニューモシスチス・カリニ肺炎 (Pneumocystis carinii pneumonia)、リーシュマニア症、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症を含むがこれらに限定されない) 寄生虫症、並びに、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、致死性家族性不眠症及びクールー等のヒト疾患を引き起こすトリパノソマ (trypanosome) 感染及びプリオン等の他の感染症に係るものが挙げられる。

【0095】

本明細書において、「病原体抗原」とは、化合物が特定の病原体により発現し、抗原が、特定の免疫応答 (例えば、ウイルス等の病原体に対する、抗体または細胞が仲立ちする免疫応答) を誘発するのに使用され得る化合物 (例えばペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、糖タンパク質等)、またはそのコンジュゲート、断片もしくは変異体を指す。通常、抗原は部位、例えば、ウイルスまたは他の病原体の表面に発現するポリペプチドまたは糖タンパク質 (カプシドタンパク質または他の膜タンパク質等) を含む。

【0096】

本明細書において、「炎症性腸疾患」は、任意の炎症性の腸の状態を含み、特に、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎 (UC)、膠原性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病、及び不確定性大腸炎が挙げられる。

【0097】

本明細書で同じ意味で用いられる「炎症性疾患」「炎症性状態」及び/または「炎症」とは広く、慢性または急性の炎症性疾患を指し、炎症性自己免疫疾患及び炎症性アレルギー状態を明示的に含む。これらの状態としては例えば、有害な刺激に対する制御不全となった免疫応答を特徴とする炎症性異常、例えば病原体、損傷した細胞、または刺激源が挙げられる。炎症性疾患には、非常に多様なヒト疾患が存在する。炎症性プロセスにおける

10

20

30

40

50

、病因由来の非免疫性疾患としては、癌、アテローム性動脈硬化症、及び虚血性心疾患が挙げられる。炎症と関係する疾患の例としては、慢性前立腺炎、糸球体腎炎、過敏症、骨盤内炎症性疾患、再灌流傷害、サルコイドーシス、血管炎、間質性膀胱炎、正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、筋炎、抗シンセターゼ症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、PAPA症候群、ブラウ症候群、痛風、成人及び青年ステイル病、クリノピリノパシー(cryopyrinopathy)、マック・ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群、全身型若年性特発性関節炎、高IgD症候群、シュニッツラー症候群、TNF受容体関連周期性症候群(TRAPS)、歯肉炎、歯周炎、肝炎、硬変、脾炎、心筋炎、血管炎、胃炎、痛風、痛風性関節炎、並びに、乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹、及び座瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患が挙げられる。

10

【0098】

本明細書で使用する場合、「阻害シグナル」とは広く、免疫細胞上の阻害性受容体分子を介して伝達されるシグナルを指す。シグナルは、活性化受容体を介して(例えばTCR、CD3、BCR、またはFc分子を介して)あるシグナルに拮抗し、例えば、セカンドメッセンジャーの産生；増殖；または、免疫細胞におけるエフェクター機能(例えば、ファゴサイトーシス、抗体産生、もしくは細胞細胞毒性の低下、もしくは、免疫細胞がメディエーター(例えばサイトカイン(IL-2等)、及び/もしくはアレルギー反応のメディエーター)を産生することができないこと)；またはアネルギーの発達の阻害をもたらすことができる。

20

【0099】

本明細書で使用する場合、「単離(した)」とは広く、自然の元の環境から取り除かれた物質を指し、それ故、自然環境から人の手により変化が加えられており、「組み換え」ポリペプチドを含む。単離した物質は例えば、ベクター系に含まれる外因性核酸、宿主細胞内に含有される外因性核酸、または、元の環境から取り除かれており、故に人の手により変更されている任意の物質(例えば「単離抗体」)であってよい。例えば、本明細書で使用する場合、「単離(した)」または「精製(した)」とは広く、生物学的基質が由来する細胞もしくは組織源からの細胞物質もしくは他の汚染タンパク質を実質的に含まない、または、化学合成をした場合に化学物質前駆体、もしくは他の化学物質を実質的に含まないタンパク質、DNA、抗体、RNA、または生物学的に活性なそのタンパク質を意味する。本明細書で使用する場合、「単離(した)」という用語は、化合物が自然に存在するのとは異なる環境にある、例えば、自然では見出されない濃度までペプチドを濃縮すること等により、自然の外部環境から単離した対象の化合物(例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)を指す。「単離(した)」には、対象の化合物に対して実質的に濃縮された、かつ/または対象の化合物が部分的もしくは実質的に精製された試料内に存在する化合物を含む。

30

【0100】

本明細書で使用する場合、「単離抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体(例えば、VSI8及び/またはVISTAを特異的に結合する抗体)を実質的に含まず、かつVSI8以外の抗原を特異的に結合する抗体を実質的に含まない抗体を指すことを目的としている。更に、単離抗体は、他の細胞物質及び/または化学物質を実質的に含まなくてよい。

40

【0101】

本明細書において、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる抗体クラス(例えばIgMまたはIgG1)を指す。

【0102】

本明細書で使用する場合、「K-assoc」または「K_a」とは広く、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を指し、本明細書で使用する場合、「Kdiss」または「Kd」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指す。

50

【0103】

本明細書で使用する場合、「 K_D 」という用語は、 K_a に対する K_d の比（即ち K_d / K_a ）から得られ、モル濃度（ M ）として表現される解離定数を指すことを目的としている。抗体に対する K_D の値は、プラズモン共鳴（*Biacore*（登録商標））、*ELISA*及び*KINEXA*等の、当該技術分野において十分に確立された方法を使用して決定することができる。抗体の K_D を決定する好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を使用すること、好ましくは、*Biacore*（登録商標）システムまたは*ELISA*等によるバイオセンサーシステムを使用することである。

【0104】

本明細書で使用する場合、「標識」または「検出可能部位」とは広く、分光法、光化学法、生化学的方法、免疫化学法、化学的方法、または他の物理的方法により検出可能な組成物を指す。

10

【0105】

本明細書で使用する場合、「低ストリンジェンシー」、「中ストリンジェンシー」「高ストリンジェンシー」または「超高ストリンジェンシー条件」とは広く、核酸ハイブリダイゼーション及び洗浄のための条件を意味する。ハイブリダイゼーション反応を行うための手引きは、*Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology* (5th Ed.) *John Wiley & Sons*, NY (2002)に見出すことができる。例示的な特定のハイブリダイゼーション条件としては、(1)約45 での6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（*SSC*）、続いて、0.2X *SSC*、0.1% *SDS*（少なくとも50）（洗浄温度は、低ストリンジェンシー条件では55 まで増加させることができる）における2回の洗浄の、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；(2)約45 での6X *SSC*、続いて、0.2X *SSC*、0.1% *SDS*（60）における1回以上の洗浄の、中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；(3)約45 での6X *SSC*、続いて、0.2X *SSC*、0.1% *SDS*（65）における1回以上の洗浄の、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；及び、(4)0.5Mリン酸ナトリウム、7% *SDS*（65）、続いて、0.2X *SSC*、及び1% *SDS*（65）での1回以上の洗浄の、超高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0106】

本明細書で使用する場合、「哺乳類」とは広く、皮膚を体毛で覆い、メスは幼体に栄養を与えるのに、乳を作り出す乳腺を有することを特徴とする、ヒトを含む、全ての哺乳類温血脊椎動物を指す。哺乳類の例としては、アルパカ、アルマジロ、カピバラ、ネコ、ラクダ、チンパンジー、チンチラ、ウシ、イヌ、ヤギ、ゴリラ、ハムスター、ウマ、ヒト、キツネザル、ラマ、マウス、非ヒト霊長類、ブタ、ネズミ、ヒツジ、トガリネズミ、リス、バク及び野ネズミが挙げられるが、これらに限定されない。哺乳類としては、ウシ科動物、イヌ科動物、ウマ科動物、ネコ科動物、マウス科動物、ヒツジ科動物、ブタ科動物、霊長類、及び齧歯類種が挙げられるが、これらに限定されない。哺乳類はまた、ワシントンD.Cの国立自然史博物館（スミソニアン協会）により保管されている、世界の哺乳類種に記載されているもの全ても含む。

40

【0107】

本明細書で使用する場合、「天然核酸分子」とは広く、自然で生じる（例えば、天然タンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有するRNAまたはDNA分子を指す。

【0108】

本明細書で使用する場合、「核酸」または「核酸配列」とは広く、一本鎖または二本鎖形態のいずれかの、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを指す。この用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む数核酸、即ちオリゴヌクレオチドを包含する。本用語はまた、合成骨格を有する核酸に似た構造も包含する。特に断りのない限り、特定の核酸配列は、核酸の保存的に改変された変異体（例えば縮重コドン置換）及び相補配

50

列、並びに、明示的に示されている配列もまた暗示的に包含する。「核酸」という用語は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチドと同じ意味で用いられる。

【0109】

「オリゴマー化ドメイン」または「多量体化ドメイン」または「二量体化ドメイン」は、本明細書では同じ意味で用いられ、広く、V S I G 8及び/もしくはV I S T A細胞外ドメインまたはこれらの断片に結合した際に、オリゴマー化を促進するドメインを指す。前記オリゴマー化ドメインは、追加のジスルフィド結合により更に安定化できる、自己会合するヘリックス、例えばロイシンジッパーを含む。このドメインは、ポリペプチドの、機能性結合タンパク質の中への*in vivo*フォールディングを容易にすると考えられているプロセスである、膜にわたるベクターによるフォールディングに適合するように設計される。その例は、当技術分野において既知であり、例えば、コイル状GCN4、及びCOMPが挙げられる。ヘリックスのコイルドコイルは恐らく、タンパク質で見られる、最も一般的なサブユニットオリゴマー化モチーフである。したがって、コイルドコイルは種々の異なる機能を果たす。転写活性化因子の複数のファミリーにおいては、例えば、短いロイシンジッパーは、DNA上での、DNA結合領域の位置特定において重要な役割を果たす(El lenberger, et al. (1992) Cell 71: 1223 - 1237)。コイルドコイルは、中間径フィラメントタンパク質のオリゴマーを形成するためにもまた使用される。コイルドコイルタンパク質は更に、小胞とウイルス性膜の両方の融合において、重要な役割を果たすようである(Skehel and Wiley Cell 95: 871 - 874 (1998))。両方の場合において、融合される膜の中に埋め込まれた疎水性配列は、長いヘリックスのバンドルで構成される、棒状複合体の同じ末端に位置する。複合体が膜融合のためにアSEMBLするため、この分子配列は、近接する膜の付着を引き起こすと考えられている。コイルドコイルは多くの場合、オリゴマー化を制御するために使用される。コイルドコイルは、GCN4、ウイルス性融合ペプチド、SNARE複合体、及びある特定のtRNAシンセターゼ等を含むがこれらに限定されない転写因子を含む、多くの種類のタンパク質において見出される。非常に長いコイルドコイルは、トロポミオシン、中間径フィラメント、及び紡錘形の極と本体を有する構成成分等のタンパク質で見出される。コイルドコイルは、平行または逆平行方向に会合する、非常に秩序立った様式で互いの周りにスーパーコイル構造を取った多数のヘリックスを有する。しかし、二量体と三量体が最も一般的である。ヘリックスは同じタンパク質、または異なるタンパク質に由来してよい。コイルドコイルは、疎水性の繋ぎ目を互いに埋めるように交わった、構成成分のヘリックスにより形成される。疎水性の繋ぎ目が各ヘリックスの周りでねじれると、ヘリックスもまたねじれて互いにコイル状となり、疎水性の繋ぎ目を埋めてスーパーコイルを形成する。これは、構造をコイルドコイルとして画定するノブホールパッキングとして知られている、隣接ヘリックス間の側鎖の特徴的な錯合である。ヘリックスは、この種の相互作用を発生させるには同方向に配向させる必要はないが、平行構造がより一般的である。逆平行構造は三量体では非常に稀であり、五量体では知られていないが、2つのヘリックスが多くの場合、短いループで接続している分子内二量体においてはより一般的である。細胞外空間では、ヘテロ三量体コイルドコイルタンパク質のラミニンは、基底膜の形成に重要な役割を果たす。他の例は、3つ(トロポスポンジン1及び2)または5つ(トロポスポンジン3、4及びCOMP)の鎖が接続する、トロポスポンジン及び軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP)である。分子は花のブーケのような概観を有し、このようなオリゴマー構造を取る理由は恐らく、C末端ドメインの、細胞受容体との多価相互作用である。酵母菌転写活性化因子GCN4は、塩基性領域ロイシンジッパー(bZIP)DNA結合モチーフを含有する、30種類の同定された真核細胞タンパク質の1つである(El lenberger, et al. Cell 71: 1223 - 1237 (1992))。bZIP二量体は、カルボキシ末端の34塩基にまたがり平行なコイルドコイルを形成し、DNA結合部位の主溝を通過してアミノ末端に向かって徐々に発散する連続したヘリックスの対である。コイルドコイル

10

20

30

40

50

二量体化界面は、DNA軸に対してほとんど垂直に配向され、文字「T」の概観を複合体にもたす。bZIPは、平行のヘリックスコイルドコイルの中に共に束ねる、疎水性残基と無極性残基の4-3の7残基の繰り返しを含有する(Elleberger, et al. Cell 71:1223-1237(1992))。二量体の安定性は、7残基の繰り返しの位置a及びdにあるロイシンと無極性残基の、横からの束ね合わせ、並びに、GCN4ロイシンジッパーペプチドの結晶構造として示される、ヘリックス内、及びヘリックス間の、数が限定された塩橋からもたらされる(Elleberger, et al. Cell 71:1223-1237(1992))。別の例は、Mr52,000のサブユニットのホモ三量体としての、ウシの気管軟骨から単離したCMP(マトリリン-1)(Paulsson & Heinegard(1981), Biochem. J. 197:367-375)であり、ここで、各サブユニットは、vWFA1モジュール、単一のEGFドメイン、vWFA2モジュール及び、5個の7塩基にまたがるコイルドコイルドメインから構成される(Kiss, et al. J. Biol. Chem. 264:8126-8134(1989); Hauser and Paulsson J. Biol. Chem. 269:25747-25753(1994))。精製したCMPの電子顕微鏡法では、各サブユニットが、コイルドコイルに対応する共通の箇所から現れる楕円形を形成する、ブーケのような三量体構造を示した(Hauser and Paulsson J. Biol. Chem. 269:25747-25753(1994))。マトリリン-1のコイルドコイルドメインは、広範囲にわたって研究されている。この三量体構造は、非変性条件下における、鎖間のジスルフィド結合の完全な還元の後でも保持される(Hauser and Paulsson J. Biol. Chem. 269:25747-25753(1994))。更に別の例は、軟骨オリゴマー基質スタンパク質(COMP)である。非コラーゲン性の糖タンパク質であるCOMPは、軟骨で最初に同定された(Hedbom, et al. J. Biol. Chem. 267:6132-6136(1992))。このタンパク質は、N末端の7塩基の繰り返し領域(cc)、続いて、4つの上皮増殖因子(EGF)様ドメイン(EF)、7つのカルシウム結合ドメイン(T3)、そしてC末端の球状ドメイン(TC)から構成される5つのサブユニットの、524kDaのホモ五量体である。このドメイン構成に従うと、COMPはトロンボスポンジンファミリーに属する。aとdの位置に優先的に疎水性残基を有する7塩基の繰り返し(abcdefg)_nが、ヘリックスのコイルドコイルドメインを形成する(Cohen and Parry Science 263:488-489(1994))。近年、COMPの、組み換えを行った5本鎖によるコイルドコイルドメイン(COMPcc)が結晶化され、その構造が0.2nmの解像度で解明された(Malashkevich, et al. Science 274:761-765(1996))。

【0110】

本明細書で使用する場合、「作用可能に結合した」とは広く、2つのDNA断片によりコードされたアミノ酸配列がフレーム内にとどまるように、2つのDNA断片が結合する場合を指す。

【0111】

本明細書で使用する場合、「パラトープ」とは広く、抗原を認識する抗体の一部分(例えば、抗体の抗原結合部位)を意味する。パラトープは、抗体のFv領域の小さな領域(例えば15~22アミノ酸)であってよく、抗体の重鎖及び軽鎖の一部を含有してよい(Goldsby, et al. Antigenes (Chapter 3) Immunology (5th Ed.) New York: W. H. Freeman and Company (57~75ページ)を参照のこと)。

【0112】

「患者」または「対象」または「レシピエント」、「個体」または「治療される個体」は、本明細書では同じ意味で用いられ、病状を緩和するか、または病状の発生もしくは再発を予防するかのいずれかのために治療を必要とする任意の動物を広く意味する。また、

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、「患者」とは広く、危険因子、病歴、罹病性、症状、及び徴候を有するか、以前に診断されたか、疾患の患者母集団の危険性があるか、またはその一員である任意の動物を指す。患者は、ヒト等の臨床患者、またはコンパニオンアニマル、ペット動物、家畜動物、外来動物、もしくは動物園の動物等の獣医学用患者であってよい。

【0113】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は同じ意味で用いられ、修飾（例えばリン酸化またはグリコシル化）に関係なく、任意の長さのアミノ酸残基のポリマーを広く指す。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の類似体または模倣物であるアミノ酸ポリマー、及び、天然アミノ酸ポリマーに適用される。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の人工キメラ模倣物であるアミノ酸ポリマー、並びに、天然アミノ酸ポリマー及び非天然アミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドは例えば、糖質残基を付加することで修飾し、糖タンパク質を形成することが可能である。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は明示的に、糖タンパク質、及び非糖タンパク質を含む。

10

【0114】

本明細書で使用する場合、「プロモーター」とは広く、核酸の転写を指示する核酸配列アレイを指す。本明細書で使用する場合、プロモーターには、転写開始部位付近に必要な核酸配列、例えば、ポリメラーゼII型プロモーターの場合、TATAエレメントが含まれる。プロモーターはまた任意で、遠位のエンハンサーまたはリプレッサーエレメントを含み、これらは、転写開始部位から最大数千塩基対離れて位置することができる。「構成的」プロモーターは、大部分の環境及び成長条件化にて活性なプロモーターである。「誘導性プロモーター」とは、環境または成長制御下にて活性なプロモーターである。

20

【0115】

本明細書で使用する場合、「予防的有効量」とは広く、病気の予防、または病気の再発の防止のために患者に投与する場合、病気または再発の予防に影響を及ぼすのに十分な化合物の量を指す。予防的有効量は、徴候及び/または症状の発生を予防するのに有効な量であってよい。「予防的有効量」は、疾患とその重症度、及び、治療される患者の年齢、体重、病歴、状態に対する疾病素質、以前の状態に応じて変化し得る。

【0116】

「予防ワクチン」及び/または「予防ワクチン接種」とは、癌または感染状態等の病気と関係する病気または症状を予防するために用いられるワクチンを指す。

30

【0117】

本明細書で使用する場合、「予防」とは広く、徴候及び/もしくは症状が患者に現れていないか、寛解期であるか、または以前に患者に現れていた場合の、一連の治療法を指す。予防には、患者の病気の治療の後に発生する病気の予防が含まれる。更に、予防には、病気が潜在的に進行し得る患者、特に、病気に感染しやすい患者（例えば、危険因子を有するか、または病気の進行の危険性を有する患者母集団の一員）を治療することが含まれる。

【0118】

本明細書で使用する場合、「組み換え」とは、生成物、例えば細胞、核酸、タンパク質、またはベクターに関して、細胞、核酸、タンパク質もしくはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入、もしくは天然核酸もしくはタンパク質の変更により改変されているか、またはその細胞が、そのように改変された細胞に由来することを広く指す。したがって、例えば、組み換え細胞は、細胞のネイティブ（非組み換え）な形態内に見出されない遺伝子を発現するか、または別様では異常発現するか、低度に発現するか、もしくは全く発現しないネイティブな遺伝子を発現する。

40

【0119】

本明細書で使用する場合、「組み換えヒト抗体」という用語には、(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子を導入もしくは染色体に導入した動物（例えばマウス）から単離した抗体、またはそれから調製したハイブリドーマ（以下に詳述）、(b) 例えばトランスフェクト

50

ーマから形質転換してヒト抗体を発現する宿主細胞から単離した抗体、(c)組み換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離した抗体、及び(d)他のDNA配列に対してヒト免疫グロブリン遺伝子配列をスプライシングすることを伴う任意の他の方法により調製、発現、作製または単離した抗体等の、組み換え法により調製、発現、作製、または単離された全てのヒト抗体が含まれる。かかる組み換えヒト抗体は、フレームワーク領域とCDR領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかし、ある特定の実施形態において、かかる組み換えヒト抗体を*in vitro*の突然変異誘発(または、ヒトIg配列のトランスジェニック動物を用いる場合、*in vivo*の体節突然変異誘発)に供することが可能であるため、組み換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系のVH及びVL配列に由来し、これらに係するが、*in vivo*ではヒト抗体生殖細胞系レパートリー内に自然では存在し得ない配列である。

10

20

30

40

50

【0120】

本明細書で使用する場合、「シグナル配列」または「シグナルペプチド」とは広く、分泌性、及び膜結合ポリペプチドのN末端にて生じ、かつ、多数の疎水性アミノ酸残基を含有する約15個以上のアミノ酸を含有するペプチドを指す。例えば、シグナル配列は、少なくとも約10~30個のアミノ酸残基、好ましくは約15~25個のアミノ酸残基、より好ましくは約18~20個のアミノ酸残基、更により好ましくは約19個のアミノ酸残基を含有し、かつ、少なくとも約35~65%、好ましくは約38~50%、及びより好ましくは約40~45%の疎水性アミノ酸残基(例えばバリン、ロイシン、イソロイシンまたはフェニルアラニン)を有する。「シグナル配列」はまた、当該技術分野においては、「シグナルペプチド」とも呼ばれ、かかる配列を含有するポリペプチドを脂質二分子膜に向ける役割を果たし、分泌時に切断される。

【0121】

本明細書で使用する場合、抗体への「特異的(または選択的)結合」、または「~との特異的(または選択的)免疫反応性」、または「特異的に相互作用または結合する」とは広く、いくつかの実施形態において、タンパク質及び他の生態(*biologies*)の異質母集団の存在を決定する結合反応を指すタンパク質またはペプチド(または他のエпитープ)を指す。例えば、指定したイムノアッセイ条件下において、特定の抗体は、バックグラウンド(非特異的シグナル)よりも少なくとも2倍を超えて特定のタンパク質に結合し、試料中に存在する他のタンパク質には、実質的に大量に結合しない。通常は、特異的または選択的反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍であり、そしてより典型的には、バックグラウンドの約10~100倍を超える。

【0122】

本明細書で使用する場合、「特異的にハイブリダイゼーション可能な」と「相補的」とは広く、核酸が、従来のワトソン-クリック、または非従来の種類の別の核酸配列とともに水素結合を形成することができることを意味する。核酸分子と相補配列の結合自由エネルギーは、核酸の関係機能(例えばRNAi活性)の処理を可能にするのに十分なものである。核酸分子の結合自由エネルギーの測定は、当該技術分野において周知である(例えば、Turner, et al. *CSH Symp. Quant. Biol. LI*: 123-33 (1987); Frier, et al. *PNAS* 83: 9373-77 (1986); Turner, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 3783-85 (1987)を参照のこと)。パーセント相補性は、第2の核酸配列と水素結合(例えば、ワトソン-クリック塩基対)を形成可能な核酸分子内の、連続した残基の割合(%)を示す(例えば、10個のうち少なくとも約5、6、7、8、9、10個が、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、及び100%の相補性である(それらの値を含む))。「完全に相補的な」、または100%相補性とは広く、ある核酸配列の全ての連続した残基が、第2の核酸配列内の同数の連続した残基と水素結合していることを意味する。

【0123】

「実質的相補性」とは、非相補性となるように選択された、オーバハング等のポリヌクレオチド鎖の領域を除いて、約90%の相補性を示すポリヌクレオチド鎖を意味する。特異的結合は、特異的結合が所望される条件下において、即ち、*in vivo*アッセイもしくは治療的処理の場合における生理的条件下において、または、*in vitro*アッセイの場合は、アッセイが実施される条件下において、非標的配列への、オリゴマー化合物の非特異的結合を避けるために、十分な程度の相補性を必要とする。非標的配列は通常、少なくとも5個のヌクレオチドが異なっていてよい。

【0124】

本明細書で使用する場合、病気の「徴候」とは広く、検査で発見可能な、患者の病気を示す任意の異常、すなわち病気の主観的な指標である症状とは対照的に、病気の客観的な指標を意味する。

10

【0125】

本明細書で使用する場合、「固体支持体」、「支持体」及び「基質」とは広く、滑らかな支持体（例えば金属、ガラス、プラスチック、ケイ素、及びセラミック表面）並びにテキスチャード及び多孔質物質を含むがこれらに限定されない、別の物質が付着可能な、個体または半固体構造物を提供する任意の物質を指す。

【0126】

本明細書で使用する場合、V S I G 8 及び / または V I S T A の「可溶性エクトドメイン (E C D) 」または「エクトドメイン」または「可溶性 V S I G 8 または V I S T A タンパク質 / 分子」とは、V S I G 8 及び / もしくは V I S T A 融合タンパク質、または V S I G 8 及び / もしくは V I S T A E C D - I g 融合タンパク質を含むがこれらに限定されない、細胞表面に結合していない V S I G 8 及び / または V I S T A 分子、またはその任意の一部を意味し、ここで、V S I G 8 及び / もしくは V I S T A の細胞外ドメイン、またはこれらの断片は、融合分子を可溶性にする免疫グロブリン (I g) 部位、またはその断片及び誘導體、パピローマウイルス E 7 遺伝子産物、黒色腫関連抗原 p 9 7 もしくは H I V エンベロープタンパク質、またはこれらの断片及び誘導體等の、生物学的に活性な、または化学的に活性なタンパク質の一部と融合または結合した、V S I G 8 及び / または V I S T A の細胞外ドメインを有するタンパク質 ; V S I G 8 及び / もしくは V I S T A - I g 等のハイブリッド (キメラ) 融合タンパク質、またはこれらの断片及び誘導體に融合している。かかる融合タンパク質を、以下で更に詳細に記載する。

20

30

【0127】

本明細書において、「可溶性 V S I G 8 または V I S T A タンパク質 / 分子」は、膜貫通ドメインが取り除かれ、タンパク質が可溶性となった V S I G 8 もしくは V I S T A 分子、またはこれらの断片及び誘導體 ; これらの断片、一部分または誘導體、及び、可溶性 V S I G 8 または V I S T A 変異分子もまた含む。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った方法で使用する可溶性 V S I G 8 または V I S T A 分子は、シグナル (リーダー) ペプチド配列を含んでも、含まなくてもよい。

【0128】

本明細書において、治療または診断の文脈における「対象」または「患者」または「個体」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」という用語としては、全ての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類、即ち、トリ及び哺乳類対象を含むがこれらに限定されない、本発明に従って治療するのに好適な任意の動物等の、哺乳類及び非哺乳類が挙げられ、好ましくは哺乳類である。本発明に従って治療される必要がある、任意の哺乳類対象が好適である。両方の性、そして、成長の任意の段階 (即ち新生児、乳児、少年、思春期、及び成人) のヒト対象を、本発明に従って治療することができる。本発明は、動物対象、特に、獣医学的目的、並びに薬剤スクリーニング及び薬剤開発目的用のマウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ及びウマ等の哺乳類対象でもまた実施してよい。「対象」は、「個体」及び「患者」と同じ意味で用いられる。

40

【0129】

50

本明細書で使用する場合、「化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」とは広く、V S I G 8またはV I S T Aタンパク質であって、これらのタンパク質が、タンパク質合成に係る化学物質前駆体または他の化学物質から単離されている、V S I G 8またはV I S T Aタンパク質の調製物を指す。一実施形態では、「化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という表現には、(乾燥重量で)約30%未満の化学物質前駆体または非V S I G 8化学物質、より好ましくは、約20%未満の化学物質前駆体または非V S I G 8もしくはV I S T A化学物質、更により好ましくは約10%未満の化学物質前駆体または非V S I G 8もしくはV I S T A化学物質そして最も好ましくは、約5%未満の化学物質前駆体または非V S I G 8もしくはV I S T A化学物質を有するV S I G 8またはV I S T Aタンパク質の調製物が含まれる。

10

【0130】

本明細書で使用する場合、病気の「症状」とは広く、患者が経験し、病気であることを示す、任意の病的現象、または、通常の構造、機能、もしくは感覚から離れることを指す。

【0131】

本明細書で使用する場合、「T細胞」とは広く、CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞を指す。「T細胞」という用語は、Tヘルパー1型T細胞と、Tヘルパー2型T細胞の両方もまた含む。

【0132】

本明細書で使用する場合、「治療法」、「治療用」、「治療すること」、または「治療」とは広く、病気を治療すること、病気もしくは臨床的症状の進行を阻止もしくは低減すること、及び/または病気を和らげること、病気もしくはその臨床的症状の回復を引き起こすことを意味する。治療は、病気、徴候、及び/もしくは病気の症状の予防、治療、療法、低減、緩和、並びに/または、軽減をもたらすことを包含する。治療法は、進行中の病気の徴候及び/または症状(例えば炎症、痛み)を有する患者における、徴候及び/または症状の緩和を包含する。治療はまた、「予防」も包含する。治療目的のための「低減した」という用語は広く、徴候及び/または症状の、臨床的に著しい低減を指す。治療には、徴候及び/または症状(例えば炎症、痛み)の再発または反復を治療することが含まれる。治療には、任意の時間における徴候及び/または症状の発生を妨げること、並びに、既存の徴候及び/または症状を低減させ、既存の徴候及び/または症状を取り除くこと

20

30

【0133】

「治療用ワクチン」及び/または「治療用ワクチン接種」とは、癌等の病気、または感染状態を治療するために使用されるワクチンを指す。

【0134】

本明細書で使用する場合、「Treg細胞」(場合によっては、サプレッサーT細胞、または誘発性Treg細胞(もしくはiTreg)とも呼ばれる)とは、免疫系を制御し、自己抗原に対する寛容性を維持し、自己免疫疾患を排除することができるT細胞の部分集団を指す。Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺制御性T細胞(Treg)は、通常下で末梢性寛容を維持するのに非常に重要である。

40

【0135】

本明細書で使用する場合、「膜貫通ドメイン」とは広く、原形質膜にまたがる、長さが約15アミノ酸残基のアミノ酸配列を指す。より好ましくは、膜貫通ドメインは、少なくとも約20、25、30、35、40、または45アミノ酸残基を含み、原形質膜にまたがる。膜貫通ドメインは疎水性残基内に豊富であり、通常はヘリックス構造を有する。一実施形態では、膜貫通領域のアミノ酸の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上が疎水性、例えばロイシン、イソロイシン、チロシン、またはトリプトファンである。膜貫通ドメインは、例えばZagotta, et al. A

50

n n u . R e v . N e u r o s c i . 1 9 : 2 3 5 - 2 6 3 (1 9 9 6) に記載されている。

【 0 1 3 6 】

本明細書で使用する場合、「トランスジェニック動物」とは広く、動物の1つ以上の細胞が「導入遺伝子」を含む、非ヒト動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはマウスを指す。「導入遺伝子」という用語は、トランスジェニック動物が成長する細胞のゲノム内に組み込まれ、かつ、成熟動物のゲノム内に保持された外因性DNAを指し、例えばトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織内での、コードされた遺伝子産物の発現を指令する。

【 0 1 3 7 】

本明細書で使用する場合、「腫瘍」とは広く、組織新生物の形態、特に、内因性組織の、多かれ少なかれ脱阻害された、自然的、自律的及び不可逆的な過剰増幅形態の少なくとも1つの細胞または細胞塊を指し、この増殖は、特定の細胞及び組織機能の、多少の明確な喪失と関係した規則的なものである。この細胞または細胞塊は、その増殖に関しては、自身により、または、宿主生物の制御メカニズムにより効果的に阻害されず、例えば結腸直腸癌、黒色腫または癌種となっている。腫瘍抗原としては、悪性細胞自体に存在する抗原だけでなく、内皮細胞及び他の血管構成成分を含む、腫瘍の間質支持組織に存在する抗原もまた含まれる。

【 0 1 3 8 】

本明細書で使用する場合、「不応性」とは広く、刺激、例えば、活性化受容体またはサイトカインを介する刺激に対する免疫細胞の不応答性を意味する。不応性は例えば、免疫抑制剤、または高用量の抗原への曝露のために生じる可能性がある。

【 0 1 3 9 】

本明細書で使用する場合、「ワクチン」とは、特定の病気（例えば癌または感染症）に対する免疫を改善する生物学的調製物を指し、ここでワクチンは、病気の特異的抗原、例えば、免疫応答が誘発される病気に対する癌抗原または病原体抗原を含む。ワクチンには通常、免疫系を刺激する、免疫増強剤としてのアジュバントが含まれる。これには、（病気を予防する）予防用ワクチン、及び（病気またはその症状を治療する）治療用ワクチンが挙げられる。

【 0 1 4 0 】

本明細書で使用する場合、「可変領域」または「 V_R 」とは広く、抗体が抗原に直接結合するのに関係する、抗体内の軽鎖及び重鎖のそれぞれの対の中に存在するドメインを指す。それぞれの重鎖は、一端に可変領域（ V_H ）、続いていくつかの定常領域を有する。それぞれの軽鎖は一端に可変領域（ V_L ）を、そして他端に定常領域を有し、軽鎖の定常領域は重鎖の第1の定常領域と並んでおり、軽鎖可変領域は重鎖可変領域と並んでいる。

【 0 1 4 1 】

本明細書で使用する場合、「ベクター」とは広く、核酸分子であって、この核酸分子が結合した別の核酸分子を運搬可能な核酸分子を指す。ベクターの種類の一つは「プラスミド」であり、これは、追加のDNAセグメントが中にライゲーションされ得る、環状の二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、ここでは、追加のDNAセグメントがウイルスゲノム内にライゲーションされ得る。ある特定のベクターは、そのベクターが導入される宿主細胞内での自律複製が可能である（例えば、細菌由来の複製物を有する細菌ベクターと、エピソーム哺乳類ベクター）。宿主細胞内に導入する際に、他のベクター（例えば非エピソーム哺乳類ベクター）を宿主細胞のゲノム内に組み込むことにより、宿主ゲノムと共に複製される。更に、ある特定のベクターは、作用可能に結合する遺伝子の発現を指令することができる。本明細書において、ベクターは「組み換え発現ベクター」または単に「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組み換えDNA技術において有用な発現ベクターは多くの場合、プラスミドの形態である。プラスミドがベクターの最も一般的に使用されている形態であるので、本明細書において、「プラスミド」と「ベクター」は同じ意味で使用してよい。しかし、本発明は、等価な機能を有する

10

20

30

40

50

かかる他の形態の発現ベクター、例えばウイルスベクター（例えば、複製能欠失型レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）を含むことを意図している。本技術及び手順は通常、当該技術分野において周知の従来の方法に従って、そして、本明細書を通して引用及び議論される、種々の一般的、及びより具体的な参考文献に記載されているとおりに実施される。例えば、Sambrook, et al. *Molec. Cloning: Lab. Manual* [3rd Ed] Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)を参照のこと。組み換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、及び組織培養、並びに形質転換（例えば電気穿孔法、リポフェクション）のために標準的な技術を使用してよい。酵素反応及び精製技術は、メーカーの規格書に従って、または当該技術分野において一般に行われる、もしくは本明細書に記載されるとおりに実施してよい。

10

【0142】

本出願で使用する特定の用語及び表現を規定したので、本発明に包含される、特定の種類のVSI G 8ポリペプチド、融合タンパク質、抗VSI G 8抗体及び抗原結合抗体断片、並びに、これらの作製方法及び使用方法を以下で更に記載する。

【0143】

表1に示すとおり、Igスーパーファミリーは、B7ファミリーリガンド及び受容体を含む、多くの非常に重要な免疫制御因子を含む。これらのうち、最も特質決定された共刺激因子リガンドは、プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）上で発現し、受容体がCD28、PD-L1及びCTLA-4である、CD80及びCD86である（12）。これらの標的は、自己免疫及び癌の治療において、貴重な臨床標的であることが証明されている。

20

【0144】

【表1】

表1：B7ファミリーリガンド及び受容体による、陽性及び陰性T細胞制御			
リガンド	受容体	経路	ノックアウトマウス表現型
B7-H2 (ICOSL)	ICOS	T細胞共刺激	Tヘルパー分化及び融合に障害あり
B7-H3	不明		Th1分化及びEAE病が増加
B7-1 (CD80) ; B7-2 (CD86)	CD28 CTLA-4		適応免疫に障害あり
B7-DC (PD-L2)	PD-1	T細胞共阻害	重度の自己免疫
B7-H1 (PD-L1)	PD-1		軽度の自己免疫
B7-H4 (B7S1, B7X)	不明		NOD及びEAEモデルにおいて、病気が増加
VISTA	不明		先天性免疫及び宿主防御が増強
			軽度の自己免疫

30

【0145】

B7ファミリーリガンドは拡大して、共刺激性B7-H2 (ICOSリガンド) 及びB7-H3 (未知の受容体)、並びに、共阻害性B7-H1 (PD-L1)、B7-DC (PD-L2)、B7-H4 (B7S1またはB7x; 未知の受容体)、B7-H5 (ヒトのみ) (13) 及びB7-H6 (12、14) も含んでいる。PD-L1 PD-1相互作用、CTLA-4と、そのリガンドであるB7-1及びB7-2との関与についてのメカニズムの研究は、製薬及びバイオテクノロジー業界に、アウトカムを予想し、PK及びPD研究を戦略的に設計し、治療的関与と関係する毒性を理解するだけの力を与えた。これらの治療薬の成功は、受容体-リガンド相互作用の理解を含む、MOAについての包括的理解により非常に向上した。特に、さほど発達していないNCRリガンドの中には、恐らくリガンド結合の低密度及び低親和性故の、受容体の同定における特別の困難さのため

40

50

に、同定された受容体が存在しないものもある。

【0146】

T細胞の活性化のV領域免疫グロブリン含有抑制因子(15)(VISTA)は、最も近い系統的親戚がPD-L1である、負のチェックポイント制御因子(NCR)リガンドである。VISTAは、休止T細胞の活性化を非常に大きく抑制することが示されている。ヒトとマウスの両方において、VISTAの発現は、造血においては制限され、骨髄コンパートメントでは大量に発現し、T細胞ではより強さが低い(16)。PD-L1及びPD-1の遮断のように、VISTAを遮断することで、癌のマウスモデルにおいて免疫が増強される(17)。

【0147】

VISTAの効果を遮断または阻害する抗体を使用して、ヒト免疫応答、特に悪性腫瘍及び感染症に対する免疫応答を増強してよい。対照的に、可溶性VISTA(例えばVISTA-Ig)等のVISTAを刺激する分子を使用して、自己免疫性、アレルギー性または炎症性免疫応答等の、望ましくないヒト免疫応答を抑制してよい。本発明に先立って、VISTAに対する受容体は報告されていない。本明細書で開示した、この受容体の同定により、腫瘍学、感染症、自己免疫性、アレルギー性及び炎症性発症の治療のための、他の治療薬の設計が容易となることが予想される。同様に、受容体を同定することにより、受容体と会合したVISTAが免疫を制御する方法についてのより一層の理解が促進される。

【0148】

これに基づき、本発明の目的は、VISTAに対する受容体を同定することであった。VISTAの類似体である、この受容体に拮抗するか、またはこの受容体の、VISTAへの結合を制御(阻害もしくは遮断)する化合物は、TまたはNK細胞免疫の上方制御が所望される、癌または感染症の病状の治療に有用なはずである。VISTAの更なる類似体である、この受容体を刺激するか、または、VISTAへの、この受容体の結合を制御する(促進するもしくは増強する)化合物は、TまたはNK細胞免疫の下方制御が所望される、自己免疫、アレルギー、炎症、GVHD、移植、または細胞もしくは遺伝子治療の状態に有用な筈である。

【0149】

同定されたB7受容体ファミリーの全てのメンバーが、Igスーパーファミリーのメンバーであるので、VISTA受容体は、発明者らにより、B7ファミリーのメンバーと予測された。このIgスーパーファミリーには、共に可溶性であるタンパク質、並びに、細胞-細胞シグナル伝達/相互作用、付着及び通信に関係する膜タンパク質が含まれる。これらの分子は全て、IgV領域(IgV)または定常領域(IgC)のこれらのドメインに類似のドメインを含有する。このドメインは通常、長さが70~110アミノ酸であり、BとF鎖のシステイン残基間に形成された、2つの平行なシートにより形成されるサンドイッチのような構造を有する特徴的なIgフォールドを有し、Igフォールドを安定化させる。

【0150】

1つのIgVドメイン、及び1つのIgCドメインを有する、これらの受容体(CD80、CD86、ICOSL、PD-L1及びPD-L2)のリガンドとは対照的に、B7受容体(CTLA-4、ICOS、PD-1)は1つのIgVドメインを有する。興味深いことに、VISTAは、ファミリー内の受容体のように、1つのIgVドメインを有する。したがって、VISTAは、(T細胞の活性化を抑制する)リガンドのような活性に加えて、細胞シグナル伝達機能もまた有し得る。このことに関わらず、このファミリーで現在同定されている受容体とリガンドは全て、Igスーパーファミリーのメンバーであるため、発明者らは、VISTAの結合パートナーは、B7ファミリーのメンバーを含むことを予測した。

【0151】

出版物(15、16及び17)で公開されている研究及び参考文献は、VISTAは新

10

20

30

40

50

規かつ構造的に異なる、鍵となる特徴が以下の通りである、I gスーパーファミリーの阻害リガンドであることを示している。

(i) V I S T A の発現が造血コンパートメント内に排他的に存在し、成熟骨髄細胞 (D C 及び M a c 、 C D 1 1 b b r i g h t) では高く、C D 4 + T 細胞、T r e e g 及び C D 8 + T 細胞では低レベルで発現する。

(i i) 固定化され不溶性のマウス V I S T A - I g 融合タンパク質、または A P C における V I S T A の発現は、i n v i t r o でマウス P D - 1 + 及び P D - 1 - C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞の増殖 (1 5) 並びにサイトカイン産生を抑制する。このことは、V I S T A が免疫抑制性であり、P D - 1 が V I S T A の受容体ではないことを確立する。

(i i i) V I S T A - I g は、初期の T 細胞活性化抗原 (C D 6 9 、 C D 4 4) の発現、及び p - E R K の活性化を抑制し、このことは、V I S T A の受容体 (V - R) が休止 T 細胞で発現することを示唆している。

(i v) V I S T A m A b (1 3 F 3) を遮断することにより、自己免疫 (E A E) が一層悪化した (1 5) 。

(v) V I S T A m A b は、複数のマウス腫瘍モデルにおける腫瘍の寛解を誘発する (1 7) 。

(v i) V I S T A は、ヒト (1 6) 及びマウス (1 7) C D 4 + T 細胞の両方における、F o x p 3 の発現を誘発する。

(v i i) V I S T A - I g を投与することにより、マウス S L E 及びマウス E A E の抑制を誘発する。

(v i i i) マウス V I S T A における全ての発見は、i n v i t r o のヒト T 細胞上のヒト V I S T A でも繰り返されている (1 6) 。

【 0 1 5 2 】

更に、未だに、免疫制御における V I S T A の影響が全て明らかとなっているわけではないが、この N C R リガンドは、T 細胞増殖のシャットダウン (1 6) と F o x p 3 発現の誘発 (1 7) において、P D - L 1 同様に活性であるように思われる。V I S T A は、骨髄細胞では恒常的に高レベルで発現しており (1 5 、 1 6) 、休止 T 細胞、明らかに活性化した T 細胞、及びメモリー T 細胞の活性化を抑制することができる (1 5 、 1 6) 。

【 0 1 5 3 】

前述の内容に更に基づき、発明者らは更に、V I S T A 受容体が休止 T 細胞でも発現する可能性が高いことを理論付けた。この理論は、部分的には、T C R が誘発したホスホ - E R K 活性化 (活性化の 1 0 分後) が、V I S T A - I g により完全に阻止され得る (図 1) という事実に基づいたものであった。更に、T 細胞の活性化 (C D 6 9 、 C D 6 2 L 、 C D 4 4) における最も早い変化もまた、V I S T A - I g 1 により完全に阻止された (1 5 、 1 6) 。

【 0 1 5 4 】

また、B i a C o r e 分析では、V I S T A - I g は、既知の B 7 もしくは P D ファミリーメンバーのいずれにも結合しない (データは図示せず) 、か、または、C D 2 8 、 C T L A - 4 、 P D - 1 、 T L T - 2 、 T L T 4 、 C D 3 0 0 A 、及び C D 3 0 0 D を過剰発現する細胞に結合しない (非公表のデータ) ことが示された。V I S T A - I g が、刺激の 1 0 分後に C D 3 ホスホ - E R K シグナルを抑制する能力 (図 1) に基づき、V I S T A - R の発現が休止 T 細胞で予測されている。

【 0 1 5 5 】

加えて、V I S T A が B 細胞には機能的影響を及ぼしていない事実を考慮して、発明者らは更に、V I S T A 受容体は、B 細胞の活性化または増殖に影響を及ぼさない可能性が高く、また、休止もしくは活性化 B 細胞で認識可能な程度に発現しない可能性が高いことを予測した。

【 0 1 5 6 】

陰性制御因子としての V I S T A

V I S T A は、(認識活性化の前に) 少なくとも T C R の持続性シグナル伝達 (t o n

10

20

30

40

50

ic signaling)を陰性制御するようであり(図2)、無差別のT細胞の活性化を防止するためのレオスタットとして恒常的に機能する。このことは、VISTA-/-マウスに見られる、活性化T細胞の頻度の高さと一致する(データは示さず)。しかし、VISTAは活性化後のT細胞機能もまた抑制することができるという観察結果は、T細胞の認識活性化の後でも、VISTAは同様に効果的な陰性制御因子であり得ることを示唆している。

【0157】

PD-L1/PD-1、及びCTLA-4/CD80/86は本質的に、受容体がT細胞の活性化後に上方制御だけが行われるという、異なる経路である。対照的に、VISTAは排他的に造血において制限されており、それ故、VISTAの主な役割は、二次リンパ器官(SLO)、または、非造血細胞の組織で発現するPD-L1とは異なり、重度の白血球浸潤(TME等)が存在する部位で果たされるようである。したがって、VSI8もしくはVISTA、及び/またはVISTA/VISTA-R相互作用を制御する化合物は、初期のT細胞活性の制御において、本質的に異なる役割を果たす筈である。

10

【0158】

癌の陰性チェックポイント制御因子としてのVISTA

癌のマウスモデルでの研究は、VISTAの抑制機能に対する、更なる大きな洞察をもたらした。VISTAは、ナイーブマウスの骨髄細胞では高いレベルで発現するが、腫瘍微小環境(TME)内の骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)でのVISTA発現は、極めて高い。更に、4つの異なる腫瘍モデルのマウスをVISTAで処置することにより、腫瘍増殖が劇的に減少する(図3)。これらの所見は、MDSCで発現したVISTAは、防御のための抗腫瘍免疫の発達に干渉する、主な抑制分子であり、また、VISTAはこの抑制活性を緩和し、免疫の介入を可能にして腫瘍増殖を遅らせることを示唆している。これらの所見は更に、自己免疫疾患における骨髄細胞のVISTAは、炎症の程度を制御する中心的な機能を果たすという仮説を支持している。VISTAはこれらの腫瘍では発現しない。

20

【0159】

チェックポイント制御因子Igリガンド

自己免疫の進行の制御において、NCRが非常に重要な役割を果たすということについては、ほとんど疑いがない。WT C57Bl/6 bkgにおいて、CTLA-4-/-マウスでは、侵襲性の全身性自己免疫疾患が進行し(4~6)、Balb/c bkgのPD-1-/-マウスでは、心筋症と軽度の狼瘡が進行する(7、19)。ヒトにおいては、PD-1またはCTLA-4の遮断における、免疫が関係する主な毒性は、自己免疫疾患の出現である。「単純な」負の調節の背後では、自然の(n)Tregへの影響を通して、または、ナイーブT細胞の適応性(a)Tregへの転換を向上させることにより、多くのNCRがTreg機能に影響を及ぼしている。新しいデータは、アゴニストによる、正に關与するNCR経路は、免疫抑制を誘発することにより治療効果をもたらすことを示している。対応する受容体を介して免疫抑制シグナルを積極的に誘発する、NCRリガンドのIg融合タンパク質(B7-Ig)(B7-H4-Ig、VISTA-Ig、PD-L1-Ig)は、自己免疫の治療において、効果的な治療薬のようである。

30

40

【0160】

研究では、PD-L1-IgとPD-L2-Igは免疫抑制剤と組み合わせて、心臓同種異系移植片の生存(23)、及び角膜同種異系移植片の生存(24)を著しく延ばすことができた、という説得力のあるデータが示されている。B7-H4は、CIA、EAE、及び糖尿病での抑制活性を示している(25~29)。モデルによっては、このことは、Th1またはTh17集団のTreg機能及び/または阻害の増強によるものであるように思われる(25~29)。我々は、PD-L1及びB7-H4同様に、VISTAはTregへの転換を高めることができ、このことは、自己反応性の制御に重要であり得ることを示している(16)。ヒト治療薬の開発に関して、2013年1月に第一三共は、B7-H4-Igを用いた、関節リウマチの第1相試験を開始した(27、29、30)。

50

【0161】

他のB7-Ig同様に、VISTA-Igは完全に、*in vitro*での、CD3により誘発されたT細胞の増殖、及び、実質的に全ての、初期のT細胞活性のシャットダウンを阻止することができる(15~17)。VISTA-IgがT細胞の活性化を低下させることができるということを考慮して、我々は、全身性エリテマトーデスのマウスモデルにおける、VISTA-Igの治療効果を評価した。SLE腎炎の進行の根本にあるメカニズムの1つは、炎症性骨髄細胞が後で腎臓に動員されることでT細胞が慢性的に活性化され、病状が進行することを示唆している。十分に特性決定されたマウス株のBWF1は、循環自己反応性抗体の存在、炎症性サイトカインの増加、免疫複合体沈着系球体腎炎(GN)、進行性タンパク尿、及び腎不全による不健全な死を含む、ヒト狼瘡において見られるものと類似の自己免疫腎疾患を発症する。確立した腎疾患をVISTA-Igが抑制できるかどうかを決定するために、BWF1マウスを、VISTA-Ig G2aで24週間処置した。この介入により、これらのマウスにおいて、タンパク尿の急速かつ劇的な逆転、及び著しく延びた生存が得られた(図4)。VISTA-Ig処置による、活性化T細胞の頻度の低下、並びに、*in vivo*でのFoxp3シグナル及びサイトカイン産生の増加もまた、我々は示した(データは示さず)。我々は、V-Rを介するシグナルの強度に応じて、V-Rを介する活性シグナル伝達が、T細胞の不応性及び/またはaTregの出現を誘発することを提示している(15、16)。VISTA-Igの同様の治療効果もまた、T細胞が仲立ちする従来病気である、多発性硬化症のマウスモデルにおいて見られている(図示せず)。

10

20

【0162】

前述の内容に基づくと、VISTA-Igを用いる効果的治療法の開発は、V-Rの同定により大なる利益が得られ、VISTAに対する標的細胞集団を明確に規定し、かつ、PK及びPD研究において更に役立つものとなる。

【0163】

A. VISTA受容体を同定するのに使用した方法

1. 多量体VISTAの結合を検出することによる、V-Rの同定

VISTA受容体の同定に非常に重要なことは、質の高い多量体リガンドを作製することである。この理由は、VISTAの、受容体との予測される相互作用が非常に低い可能性が高い(μM)ことである。この予測は、PD-1とPD-L1の相互作用が低い(K_d が526 nM; PD-L2とは K_d が89 nM)という事実に基づいている。リガンドまたは受容体のいずれかが過剰発現している場合、PD-1 PD-L1の相互作用を観察することができる(34)。しかし、別様においてPD-1 PD-L1の結合を観察するために、四量体等の多量体リガンドを使用しなければならない。あるいは、リガンドまたは受容体を過剰発現する細胞を、相補性結合タンパク質で覆ったプラスチック皿で速やかにパニングすることができる(35)。

30

40

【0164】

この予測に基づいて、我々は、二量体化、オリゴマー化または多量体化、及びパニングに好適なVISTAリガンドを作製した。高分子量の骨格を有する多量体を作製するために、例えば、VISTA-Igを、N末端BirA部位で改変した。Immudex(<http://www.immudex.com>)を用いて作業をし、VISTA-Igのdextramer(C)(VISTA-dextramer)を作製した。これらは、リガンドを、予め規定した化学量論でデキストラン骨格に結合させることにより作製した、非常に高分子量の多量体である。これらの多量体は、従来のアビジンベースの四量体を使用するよりも、受容体の検出では一層感度が高い。予備データは、VISTA-dextramerは、*in vitro*でT細胞を抑制する活性を有することを示す(データは示さず)。

【0165】

特に、VISTA二量体を、V-Rの同定のために使用してよい。VISTAの元の構造的特徴記述を、PD-L1分子内の構造モチーフを使用してモデリングした(15)。

50

しかし、F a b断片に基づく代替モデルは、V I S T Aは、システイン残基を使用したジスルフィド架橋を伴う二量体を形成し得ることを示唆している。この推定上の二量体構造を支持するものとして、3つのグリコシル化部位がV I S T Aポリペプチド内に位置し、これらのポリペプチドは、推定の二量体界面部位からは十分に離れた距離で位置しており、二量体形成を可能にしているようである。これらの所見は、天然の機能性V I S T Aが二量体として存在可能であるという事実を支えるものである。この理論は更に、機能的な研究における、V I S T A - F cタンパク質の使用により否定されるものではない。これは、この融合タンパク質が、二量体化を可能にし得るF c部分において、鎖間のジスルフィド架橋を含有するためではない。更に、比較的長く柔軟なリンカーが、長くて柔軟性のあるリンカー等の融合 (f u s i o n) 欠失タンパク質ではなく、活性が一層強力なV I S T A I g融合タンパク質をもたらすということが見出されている。

10

【0166】

この観察結果は、このリンカーが、2つの鎖の、特定の方法での相互作用 (二量体化) を促進し得るので、V I S T Aが機能性二量体を形成することもまた支持するものである。したがって、V I S T A細胞外I g VドメインとC H 3タンパク質 (V I S T A - C H 3) を含む融合タンパク質が作製され、このタンパク質は、V I S T Aの二量体形成を可能にする筈である (即ち、2つの鎖のC末端を互いに接近させない)。非還元条件下においてのみ、S D S - P A G Eはこのタンパク質が二量体であることを示し、このことは、V I S T A鎖間ジスルフィド架橋が存在することを示唆している。架橋が発生することができる唯一の位置はV I S T A I g Vであるため、このことは更に、適切な条件下でV I S T Aが共有結合のホモ二量体を形成することを示唆している。

20

【0167】

したがって、V - Rの検出に関しては、V I S T A - I gと比較してV I S T A - C H 3が好ましいリガンドであることが理論化された。したがって、C末端B i r A部位を有するV I S T A - C H 3は、受容体の発見作業用のための酵素ビオチン化での使用に好適であることが想到された。したがって、これらのV I S T AリガンドがT細胞に検出可能な程度に結合することは、未だに示されていない。しかし、このファミリーにおけるリガンドと受容体の相互作用の親和性が低いために、このことは驚くべきことではない。他のP Dリガンドと同様に、これらのV I S T Aリガンドは、過剰発現した際にV - Rと検出可能な程度に結合することが予想された。四量体P D - L 1は単量体P D - L 1 3 1よりも、P D - 1に100倍高く (K dは 6×10^{-8} M) 結合したことを示したため、このことは、合理的な考えであった。より高い結合力を有するリガンドが受容体の検出に使用され、リガンド結合に基づく発現クローニングが成功した (B T L A - 4) (3 1、3 2)。

30

【0168】

前述の内容に基づいて、発明者らは、可溶性リガンドを使用する場合のV - Rの同定に努力を集中させ、ここで、アッセイで使用した可溶性リガンドはV I S T A - d e x t r a m e r (V I S T A 1 9 - d e x : 2 5 0 Kのデキストラン骨格上の19分子のV I S T A) を含むか、またはV I S T A二量体を含む。

【0169】

2. パニングと可溶性リガンド結合による、候補ライブラリーのスクリーニング

U n i p r o t / S w i s s P r o tデータベースから、約200個の候補の膜貫通I g / T N F - ファミリーメンバーをコードするプラスミドを選択し購入した。これらの遺伝子の選択は、造血細胞での発現、及び、文献から入手した、いくつかの遺伝子の既知の活性に基づいた。これらのプラスミドは、当該候補遺伝子に対するオープンリーディングフレーム、並びに、プラスミドのトランスフェクション及び発現を確認するためのG F Pの両方を含有する。P O Cとして、P D - 1 / G F Pをs - C H O細胞にトランスフェクションした。一晚培養した後、G F P⁺細胞の特異的付着を容易に観察し、プレートに結合した他のリガンドではなく、P D - L 1に対して定量化できた (図 5)。

40

【0170】

50

ハイスループット作業のために、200を超える選択遺伝子の候補リストからの、GFPタグ化したタンパク質 (Origene) 用のCMV発現ベクターと共に、CHO-S細胞 (Life Technologies) を96ウェルフォーマット内でトランスフェクションした。24時間後、細胞を、VISTA-Fc融合タンパク質、または無関係のFc融合タンパク質のいずれかでコーティングしたプレートの上で分け、1時間培養した。新しい96ウェルプレートに穏やかにピペティングすることにより、付着していない細胞を回収する。トリプシン-EDTA処理により付着細胞を分離し、両方の母集団をフローサイトメトリーにより調査する。本方法ではごくわずかのバックグラウンドを示し、陽性は、光学顕微鏡を用いてもはっきりと確認できる。これに基づくと、V-Rを過剰発現するCHO-S細胞は、VISTA-Igでコーティングしたプレートに検出可能な程度に結合する筈である。

10

【0171】

3. リガンド結合による、アレイ候補のスクリーニング

組み換え蛍光VISTA19-dexを使用して、膜タンパク質ライブラリー、例えばRetrogenix (UK) <http://www.retrogenix.com>により作製した (~3800個の独自の遺伝子) ライブラリーをスクリーニングし、簡単なハイスループット結合アッセイで、推定上の結合パートナーを同定してよい。遺伝子はHEK293細胞のアレイで発現し、蛍光色素が結合したりガンドを、結合パートナーを発現する細胞の検出に使用する。

20

【0172】

4. 酵母菌のツーハイブリッドスクリーニング

代替的に、または更に、Hybrigenics (フランス) により開発されたシステム等の、酵母菌ツーハイブリッドシステム (<http://www.hybrigenics-services.com>) を使用して、活性化、及び非活性化された健全なヒトPBMCから構築したVISTA-ECDおとり及び獲物ライブラリーを用いながら、VISTAの推定受容体を同定してよい。

【0173】

これらの方法において、VISTAの細胞外ドメインのコード配列 (aa33~195; Genbankアクセッション番号 gi:62339431) をPCR増幅し、LexAに対するN末端融合としてpB29にクローニングする (N-VISTA-LexA-C)。構築物を、インサート全体を配列決定することによる正当性について確認し、続いておとりとして使用し、それぞれ元のpBTM116 (37、38) 及びpGADGH (39) プラスミドに由来するpP6、pB29及びpP6内に構築した、ランダムにプライミングした白血球と、活性化単核球のcDNAライブラリーをスクリーニングする。

30

【0174】

以前に記載されているYHGX13 (Y187 ade2-101::loxP-kanMX-loxP, mat) とL40 Gal4 (mata) 酵母菌株 (40) との組み合わせアプローチを使用して、6300万個のクローン (ライブラリーの複雑性の6倍) をスクリーニングしてよい。トリプトファン、ロイシン及びヒスチジンを欠く培地上で、161 His+コロニーを選択する。陽性クローンの獲物断片をPCR増幅し、5'及び3'接合部にて配列決定する。得られる配列を使用して、完全な自動化手順を用いて、Genbankデータベース (NCBI) の対応する、相互作用するタンパク質を同定する。次に、信頼スコア (PBS、予想生物学的スコア) を、前述のとおり各相互作用に帰する (41)。

40

【0175】

5. 全体のサイレンシング

VISTA-Igは、一次ヒトT細胞のCD3を抑制することができることを、我々は示した。一次細胞において活性のみを有することに対する制限の1つは、一次細胞の遺伝子操作が難しいことである。ここで、予備データが、形質転換したヒトT細胞株であるJurkat T細胞におけるCD69の上方制御が、VISTA-Igを使用して防ぐ

50

ことができることを確立している(図5)。この所見により、Jurkat細胞を使用して、VISTAにより誘発されるCD69発現の抑制を遺伝子的にサイレンシングし、V-Rの同定を試みるのが可能となる。これらの方法において、Sigma製のMISSION shRNA全ゲノムライブラリーを使用する。ライブラリーを10本の管に分け、各管は、~2,000個の遺伝子を標的とする~12,000個のshRNA構築物を含有する。細胞1つあたりにおいて、1つの遺伝子のみがノックダウンされるMOIで、Jurkat細胞をライブラリーにトランスフェクションする。

【0176】

形質導入した細胞を、ピューロマイシンの存在下において培養し、かつ/または分類してshRNA発現細胞を選択する。安定してノックダウンした細胞を抗CD3+/VISTA-Igで24時間刺激し、VISTA-Igの存在下のCD69⁺細胞を陽性ヒットとして数える。CD69に加えて、IL-2産生の回復もまた使用して、受容体サイレンシングに対応する。CD69⁺細胞を分類し、ディープシーケンシング及びデコンボリユーション技術を使用して、shRNAの同定をSigmaにより行ってよい。追加のアッセイ(例えば、増殖及び複数のサイトカイン)を使用した、Jurkat細胞と一次T細胞の両方における、単一の遺伝子ノックダウンと過剰発現アプローチにより、トッブ候補の特異性を試験してよい。

10

【0177】

6. 発現クローニング

Freemanと同僚により繰り返し使用されてきた、B7受容体を発見するための立証された戦略(35、36)。約 3×10^6 個の一次インサートを含む、切断していない完全長ORF cDNAライブラリーを、CloneMiner(商標)II cDNAライブラリー構築キットと、Gateway(登録商標)組み換えシステム(Life Technologies)を使用して、VISTA応答性ヒトT細胞株から単離した全mRNAから1方向にクローニングし、続いて、サブトラクティブハイブリダイゼーションを使用した正規化により、より頻度の少ないmRNA種の提示を向上させる。得られるcDNAライブラリーを、ヒト伸長因子1-プロモーターの下流、かつIRES(内部リボソーム侵入部位)-ZsGreen1蛍光タンパク質カセットの上流のGateway(登録商標)適合性DEST発現ベクターに直接入れて交換し、同じmRNA種からのクローニングcDNAインサートの同時発現を追跡する。VISTA-Igでコーティングしたプレート上で、ライブラリートランスフェクションしたCHO-S細胞の数ラウンドのパニングを行い、VISTA受容体の発現を強化する。高い割合(frequency)で細胞がプレートに付着する(50%超)と、プラスミドが単離して、クローン伸長のために細菌の中に形質転換され、配列決定される。

20

30

【0178】

B. 推定上のV-R(VISTA-R)が本物のVISTA受容体であることを確認するための機能アッセイ

上述の方法のいずれかにより同定した、推定上のVISTA-R候補を機能アッセイで評価して、推定上のV-Rの結合相互作用が、免疫、とりわけT細胞の活性化、増殖及びサイトカイン産生における抑制効果におけるVISTAの影響に対して、制御効果を有することを確認してよい。例示的なアッセイを以下で説明する。

40

【0179】

1. 抗V-Rモノクローナル抗体によるVISTA機能の遮断: 抗V-Rモノクローナル抗体の存在下における、VISTA-Igが仲立ちするT細胞抑制の逆転

組み換えVISTA-Ig融合タンパク質は、用量に依存して、抗CD3(OKT3)が仲立ちする*in vitro*でのT細胞増殖及びサイトカイン産生を抑制する。したがって、(アゴニストまたはアンタゴニスト活性を有しない、遮断/中和抗体である)抗V-R抗体の存在下において、VISTA-Fcの抑制効果が阻害される。

【0180】

例えば、例示的な抗V-R抗体の遮断アッセイにおいて、96ウェルプレートを、37

50

で1時間、抗CD3抗体(OKT3)のみ、または抗CD3とVISTA-Igのいずれかでコーティングする。抗CD3及びVISTA-Igをそれぞれ、2.5及び10ug/mLの最終濃度で使用してよい。健常ドナーの末梢血からの、20万個の精製ヒトT細胞を各ウェルに加える。抗V-R mAbの存在下において、二重実験を行う。プレートを37℃で5日間インキュベーションする。5日目において、サイトカイン(IFN- γ 及びIL-2)分析のために30uLの上清を取り除き、トリチウム標識したチミジン(25 μ L)を細胞培養物に加える。次に、細胞を更に8時間培養した後で、トリチウムの組み込みにより細胞増殖を測定する。

【0181】

2. VISTA受容体ノックアウト細胞株を作製することによる、VISTA機能の遮断
VISTA機能におけるV-Rの効果、またはJurkat細胞株を使用して更に確認してよく、ここでは、推定上のV-Rの発現がノックアウトされている。例示的な方法について以下で説明する。

【0182】

方法A

組み換えVISTA-Ig融合タンパク質は、用量に依存して、リンパ腫細胞株であるJurkat細胞における、抗CD3(OKT3)が誘発するCD69及びIL-2上方制御を抑制する。レンチウイルスshRNAのサイレンシング技術を使用して、Jurkat細胞内のVISTA受容体候補をノックダウンする。かかるノックアウト細胞は、VISTA-Igが仲立ちする抑制に対して不応性である。

【0183】

遺伝子特異的なshRNAレンチウイルス粒子を構築して、VSI G8をノックダウンする(Mission shRNA粒子、Sigma製のTCRライブラリー)。Jurkat細胞を、最適化した感染多重度にてshRNAレンチウイルス粒子により形質導入し、非特異的な遺伝子欠失を持たない標的遺伝子の、90%を超えるノックダウンを達成する。形質導入した細胞を、ピューロマイシン剤の存在下にて選択する。標的遺伝子の特異性、及びノックダウンの程度を定量PCRにより確認する。この細胞を、VISTA-Igの存在下または不存在下にて、抗CD3により刺激する。フローサイトメトリー及びIL-2により評価したCD69の量を、72時間後に培養物の上清中でELISAにより測定する。

【0184】

方法B

組み換えVISTA-Ig融合タンパク質は、用量に依存して、抗CD3(OKT3)が仲立ちするin vitroでのT細胞増殖及びサイトカイン産生を抑制する。レンチウイルスshRNAのサイレンシング技術を使用して、VISTA受容体の候補をT細胞においてノックダウンする。かかるノックアウト細胞は、VISTA-Igが仲立ちする抑制に対して不応性の筈である。

【0185】

遺伝子特異的なshRNAレンチウイルス粒子を構築して、VSI G8をノックダウンする(Sigma製のMission shRNA粒子、TCRライブラリー)。健全なドナーからのT細胞を、最適化した感染多重度にて、shRNAレンチウイルス粒子で形質導入し、非特異的な遺伝子欠失を持たない標的遺伝子の、90%を超えるノックダウンを達成する。形質導入した細胞を、ピューロマイシン剤の存在下にて選択する。標的遺伝子の特異性、及びノックダウンの程度を、定量PCRにより確認する。VISTA-Igの存在下または不存在下にて、抗CD3が仲立ちするT細胞増殖アッセイを上述のとおり実施する。サイトカインと細胞増殖を評価する。

【0186】

3. V-R発現アッセイ

一次ヒトT細胞とJurkat細胞を使用するサイレンシング法により、推定上のV-Rをサイレンシングすること、または、プレートに結合した抗V-R抗体を使用した抗体

10

20

30

40

50

遮断アッセイにより、T細胞の活性化の抑制を誘発することに加えて、VISTAに対する本物の受容体としての、推定上のV-Rの確認を、T細胞上でmRNAとタンパク質の発現を検出することにより、更に確認してよい。

【0187】

これらのアッセイは、適切な対象と比較して、T細胞またはJurkat細胞において、V-R mRNAまたはタンパク質のレベルを検出する。これらの発現アッセイは、本物のV-Rは構造的に、休止T細胞により、そしてJurkat細胞により発現されることを示すことが予測される。

【0188】

実施例で詳細を記載するとおり、VISTA受容体が明らかとなり、これは、Vセット及び免疫グロブリンドメイン含有タンパク質8、即ちVSI G 8であることが発見された。

10

【0189】

C. VISTA/V-Rアゴニスト及びアンタゴニストを作製するためのVSI G 8の使用、並びに、治療法及び診断における使用

同定したV-Rを使用して、VISTA/V-Rアゴニストまたはアンタゴニストを同定する。これらのアゴニスト及びアンタゴニスト化合物としては特に、TまたはNK免疫におけるVSI G 8の効果を刺激する、またはそれに拮抗する抗体及び抗体断片、並びに好ましくは、VISTAとVSI G 8の相互作用を阻害または促進する化合物が挙げられる。これらの抗体は、免疫原としての、VSI G 8ポリペプチド、またはその断片もしくはコンジュゲートを使用した周知のin vivoまたはin vitro免疫付与により得られてよい。好ましくは、これらの抗体及び抗体断片としては、Fab、Fab'、scFv、(Fab)₂、IgNar、metMab等の、ヒト、ヒト化、霊長類化及びキメラ抗体、並びに抗体断片、並びに、他の既知の種類の抗体及び抗体断片が挙げられる。

20

【0190】

これらのアゴニスト及びアンタゴニスト化合物としては更に、ポリペプチド、即ち、VSI G 8の細胞外領域のすべてもしくは一部を含むポリペプチド、または、VSI G 8の細胞外領域に対して少なくとも80、90、95、もしくは99%の配列同一性を有するポリペプチド、または、その中のIgVもしくはIgCドメイン等の、ポリペプチドの一部が挙げられる。これらのVSI G 8ポリペプチドはまた、Ig定常領域（例えばIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4定常領域）等の、別のポリペプチドにも融合してよく、任意で突然変異誘発され、FcR及び/もしくは補体結合、または他のエフェクター機能を向上または阻害してもよい。また、アゴニストまたはアゴニストは、VSI G 8ポリペプチドまたは断片の1つ以上のコピーを含んでよく、即ち、化合物は多量体であってよく、VSI G 8ポリペプチドのコピーには、リンカー、例えば、少なくとも15~25アミノ酸であり、1つ以上のセリン残基を含有するペプチド等の、長くて柔軟性のあるペプチドが介在してよい。

30

【0191】

更に、本発明に従ったアゴニスト及びアンタゴニスト化合物は、VISTA/VSI G 8の結合相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する小分子を更に含む。

40

【0192】

本発明に従ったアンタゴニストは、実質的に、TまたはNK細胞免疫における、VISTAの抑制効果を阻害するか防止するのが好ましい。これは、VISTA及び/またはVSI G 8を発現する細胞を用いる、in vitroでのセルベースアッセイを使用して検出されてよい。アンタゴニストは、T細胞の活性化もしくは増殖、またはNK T細胞の活性化もしくは増殖における、VISTAが仲立ちする抑制効果を阻害するかまたは遮断する。例えば、アンタゴニストは、好適な対象と比較して、CD8⁺もしくはCD4⁺T細胞の活性化、またはCD8⁺もしくはCD4⁺T細胞の増殖を増加させ、かつ/または、NK細胞が仲立ちする活性を促進する。

50

【0193】

逆に、本発明に従ったアゴニストは、TまたはNK細胞免疫におけるVISTAの抑制効果を増強または向上させるのが好ましい。このことは、VISTA及び/またはVSI G8を発現する細胞を用いるセルベースアッセイを*in vitro*で使用することにより検出され得る。アゴニストは、T細胞の活性化もしくは増殖、またはNK細胞が仲立ちする活性において、VISTAが仲立ちする抑制効果を促進する。例えば、アゴニストは、好適な対照と比較して、CD8⁺もしくはCD4⁺T細胞の活性化もしくは増殖、またはNKが仲立ちする細胞機能（例えば細胞溶解）を抑制する。

【0194】

かかるアゴニスト及びアンタゴニストを同定するために使用するスクリーニング法は任意で、ハイスループットフォーマットの影響を受けてよい。

10

【0195】

同定したアゴニスト及びアンタゴニストを、ヒトの治療法で使用するために配合してよい。これには、好適な安定剤、賦形剤または担体の添加を含んでよい。更に、アゴニストまたはアゴニストを改変することにより、例えば、1種以上の水溶性ポリマー（ポリエチレングリコールポリマー等）を結合することにより、またはアシル化により、*in vivo*安定性を高めてよい。かかる部位をタンパク質に結合させる方法は、当該技術分野において周知である。

【0196】

前述のとおり、本発明に従ったアゴニストを含有する組成物を使用して、T細胞免疫を阻害し、自己免疫性、アレルギー性または炎症性状態等の、治療が所望される条件を治療してよい。これらの組成物は、T細胞の活性化または増殖の抑制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、一定量の本発明に従ったアゴニストを含んでよい。かかる自己免疫性、炎症性及びアレルギー性状態としては、例えば、関節炎状態（例えばRA、乾癬性関節炎）、強皮症、多発性硬化症、狼瘡、IBD、ITP、糖尿病、サルコイドーシス、アレルギー性喘息等が挙げられる。

20

【0197】

本発明に従ったアンタゴニストを含有する組成物を使用して、T細胞免疫を促進し、癌及び感染症の発症等、治療が所望される状態を治療してよい。これらの組成物は、T細胞の活性化または増殖の促進を必要とする対象、例えば癌状態の対象においてT細胞の活性化または増殖を促進するのに効果的な、本発明に従った一定量のアンタゴニストを含む。

30

【0198】

対象のアンタゴニストで治療可能な癌としては、任意の例として黒色腫、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、肝癌、膵癌、腎臓癌、皮膚癌が挙げられる。

【0199】

本発明に従ったアンタゴニストで治療可能な感染症としては、ウイルス病（例えばHIV、HPV、EBV、脳炎、ヘルペス、他のボックスウイルス、及び他の既知のヒトウイルス）、寄生虫病、細菌病、真菌または酵母菌関連症、及び、ヒトに影響を及ぼす他の感染症が挙げられる。

40

【0200】

上で特定した病状は、例示的なものであり排他的なものではないことが意図されるものと理解されるべきである。加えて、対象のアゴニストまたはアンタゴニストを、同一または異なる時間にて、同一または異なる組成物中で投与されてよい、他の治療薬と組み合わせる。例えば、対象のアゴニストまたはアンタゴニストを、PD-1もしくは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、または他の受容体アゴニストもしくはアンタゴニストを含む治療レジメンで投与してよい。

【0201】

特定の生殖細胞系配列を有する抗VSI G8抗体

50

ある特定の実施形態において、本発明に従った抗V S I G 8抗体は、特定の生殖細胞系重鎖免疫グロブリン遺伝子からの重鎖可変領域、及び/または、特定の生殖細胞系軽鎖免疫グロブリン遺伝子からの軽鎖可変領域を含む。例えば、かかる抗V S I G 8抗体は、抗体の可変領域を、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得た場合、特定の生殖細胞系配列「の生成物」、またはこれ「に由来する」重鎖または軽鎖可変領域を含むヒト抗体を含むか、これからなつてよい。かかる系は、対象の抗原により、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスを免疫付与すること、または、対象の抗原を有するファージに表示されるヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることを含む。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列「の生成物」、またはこれ「に由来する」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列を、ヒト生殖細胞系免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、ヒト抗体の配列に最も近似する配列（即ち、%同一性が最大）のヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を選択することにより同定することができる。

10

【0202】

特定のヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列「の生成物」、またはこれ「に由来する」ヒト抗体は、例えば、自然発生する体細胞突然変異、または部位での変異を意図的に導入することにより、生殖細胞系配列と比較して、アミノ酸の相違を含有してよい。しかし、選択したヒト抗体は通常、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも90%の同一性となり、他の種の生殖細胞系免疫グロブリンアミノ酸配列（例えばマウス生殖細胞系配列）と比較した場合に、ヒト抗体がヒトであることを同定するアミノ酸残基を含有する。ある特定の場において、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によりコードされたアミノ酸配列に対して、少なくとも95、96、97、98、または99%、あるいは少なくとも96%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列であつてよい。通常、特定のヒト生殖細胞系配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列とは、10個以下のアミノ酸の相違を示す。特定の場において、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によりコードされたアミノ酸配列とは5個以下、あるいは4、3、2、または1個以下のアミノ酸の相違を示してよい。

20

【0203】

相同性抗体

ある特定の実施形態において、本発明に従った抗V S I G 8抗体は、それぞれ、好ましい抗V S I G 8抗体の単離した抗V S I G 8アミノ酸配列に相同であるアミノ酸配列を含む重鎖及び軽鎖可変領域を含み、抗体は、親抗V S I G 8抗体の所望の機能的性質を保持する。本明細書で使用する場合、2つのアミノ酸配列間の%相同性は、2つの配列間の%同一性に等しい。2つの配列間の%同一性は、配列が共有する同一位置の数の関数（即ち、%相同性 = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100）であり、2つの配列の最適アラインメントのために導入する必要がある、ギャップの数と各ギャップの長さを考慮に入れる。2つの配列間の%同一性の配列の比較と測定は、非限定的例として以下に記載するように、数学的アルゴリズムを使用して行うことができる。

30

【0204】

2つのアミノ酸配列間の%同一性は、P A M 1 2 0重量残基表、ギャップ長ペナルティ12、及びギャップペナルティ4を使用する、A L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたE . M e y e r s and W . M i l l e r (C o m p u t . A p p l . B i o s c i . , 4 : 1 1 - 1 7 (1 9 8 8)) のアルゴリズムを使用して決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間の%同一性は、B l o s s u m 6 2マトリックスまたはP A M 2 5 0マトリックスのいずれか、及びギャップの重み16、14、12、10、8、6、または4、及び長さの重み1、2、3、4、5、または6を使用する、G C Gソフトウェアパッケージ（市販されている）のG A Pプログラムに組み込まれているN e e d l e m a n及びW u n s c h (J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 4 - 4 5 3 (1 9 7 0)) アルゴリズムを使用して決定することができる。

40

【0205】

50

加えて、または代替的に、本発明のタンパク質配列を更に「クエリー配列」として使用し、例えば関係する配列を同定するための公的データベースの検索を行うことができる。かかる検索は、Altschul, et al. (1990) J Mol Biol. 215: 403-10のXBLASTプログラム(バージョン2.0)を使用して実施することができる。BLASTタンパク質の検索は、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体分子に相同的なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長さ=3を用いて実施することができる。比較目的のためのギャップアラインメントを得るために、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402に記載されているギャップBLASTを使用することができる。BLAST、及びギャップBLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えばXBLAST及びNBLAST)のデフォルトパラメーターを使用することができる。

10

【0206】

保存的改変を有する抗体

ある特定の実施形態において、本発明に従った抗VSI G8抗体は、CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む重鎖可変領域と、CDR1、CDR2及びCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含み、ここで、これらのCDR配列の1つ以上は、本明細書の方法を使用して単離及び作製した好ましい抗VSI G8抗体に基づいた特定のアミノ酸配列、またはその保存的改変を含み、抗体はそれぞれ、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗VSI G8抗体の所望の機能的性質を保持する。

20

【0207】

様々な実施形態において、抗VSI G8抗体は例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であることができる。本明細書で使用する場合、「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に著しく影響を及ぼさないか、結合特性を著しく変えないアミノ酸改変を意味することを意図している。かかる保存的改変としては、アミノ酸置換、付加及び欠失が挙げられる。部位特異的突然変異誘発及びPCRによる突然変異誘発等の当該技術分野において既知の技術により、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従って、改変を抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分岐側鎖を有するアミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体のCDR領域内の1つ以上のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーの他のアミノ酸残基で置換することができ、変更した抗体を、本明細書に記載される機能アッセイを使用して保持された機能(即ち、(c)~(j)で説明した機能)について試験することができる。

30

40

【0208】

同一のエピトープに結合する抗VSI G8抗体

ある特定の実施形態において、本発明に従った抗VSI G8抗体は、免疫刺激の制御といった所望の機能的性質、及び関係する機能を有する。同一のエピトープ特異性を有する他の抗体を選択してよく、これらは所望の抗体との、VSI G8抗原への結合に関して交差競合の能力を有する。あるいは、VSI G8ポリペプチド全体を含むオーバーラップペプチドのライブラリーを使用して、所望の抗体のエピトープ特異性を測定してよく、例えば、ライブラリー内の同じペプチド、またはペプチドの1つ以上の残基に結合する、V S

50

I G 8 及び抗体の所望のエピトープを含有する部分を構成する十五量体またはオーバーラップペプチドライブラリ - が、同じ直鎖または立体構造エピトープを結合することを決定する。

【0209】

操作され、修飾された抗体

ある特定の実施形態において、修飾抗体を改変するための抗 V S I G 8 抗体出発物質に由来する 1 つ以上の V H 及び / または V L 配列を有する抗体を使用して、本発明に従った抗 V S I G 8 抗体を調製することができ、この修飾抗体は、出発抗体とは変化した性質を有し得る。例えば、1 つ以上の C D R 領域及び / または 1 つ以上のフレームワーク領域内の、1 つまたは両方の可変領域 (即ち、V H 及び / または V L) 内の 1 つ以上の残基を修飾することにより、抗体を改変することができる。加えて、または代替的に、定常領域内の残基を修飾する、例えば、抗体のエフェクター機能を変更することにより、抗体を操作することができる。

10

【0210】

実施可能な可変領域の操作の種類の一つは、C D R グラフティングである。抗体は標的抗原と、主に 6 個の重鎖及び軽鎖相補性決定領域 (C D R) 内に位置するアミノ酸残基を通して、相互作用する。このため、C D R 内のアミノ酸配列は、C D R 外の配列よりも、個々の抗体間でより多様的である。C D R 配列は大部分の抗体 - 抗原相互作用を担うため、異なる性質を有する異なる抗体のフレームワーク配列にグラフティングした、特定の天然抗体からの C D R 配列を含む発現ベクターを構築することにより、特定の天然抗体の性質を模倣する組み換え抗体を発現することが可能である (例えば、R i e c h m a n n , L . e t a l . (1 9 9 8) N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7 ; J o n e s , P . e t a l . (1 9 8 6) N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 ; Q u e e n , C . e t a l . (1 9 8 9) P r o c . N a t l . A c a d . を参照、U . S . 8 6 : 1 0 0 2 9 - 1 0 0 3 3 ; 米国特許出願第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号 (W i n t e r) 並びに同第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号 ; 同 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号 ; 同 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号及び同 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号 (Q u e e n e t a l .) を参照のこと)。

20

【0211】

好適なフレームワーク配列は、生殖細胞系抗体遺伝子配列を含む、公的な D N A データベースまたは公開された参考文献から入手することができる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系 D N A 配列は、「V B a s e」ヒト生殖細胞系配列データベース (インターネットで入手可能)、並びに、K a b a t , E . A . , e t a l . (1 9 9 1) S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , F i f t h E d i t i o n , U . S . D e p a r t m e n t o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s , N I H P u b l i c a t i o n N o . 9 1 - 3 2 4 2 ; T o m l i n s o n , I . M . , e t a l . (1 9 9 2) " T h e R e p e r t o i r e o f H u m a n G e r m l i n e V H S e q u e n c e s R e v e a l s a b o u t F i f t y G r o u p s o f V H S e g m e n t s w i t h D i f f e r e n t H y p e r v a r i a b l e L o o p s " J . M o l . B i o l . 2 2 7 : 7 7 6 - 7 9 8 ; 及び C o x , J . P . L . e t a l . (1 9 9 4) " A D i r e c t o r y o f H u m a n G e r m - l i n e V H S e g m e n t s R e v e a l s a S t r o n g B i a s i n t h e i r U s a g e " E u r . J I m m u n o l . 2 4 : 8 2 7 - 8 3 6 ; に見出すことができ、それぞれの内容は明示的に、参考として本明細書に組み込まれる。

30

40

【0212】

他の種類の可変領域修飾は、V H 並びに / または V L C D R 1、C D R 2 及び / もしくは C D R 3 領域内のアミノ酸残基を変異することにより、対象の抗体の 1 つ以上の結合特性 (例えば親和性) を改善することである。部位特異的突然変異誘発または P C R による突然変異誘発を行って変異を導入することができ、抗体結合、または対象の他の機能的

50

性質への影響を、適切な *in vitro* または *in vivo* アッセイで評価することができる。(上述の) 保存的改変を導入するのが好ましい。変異はアミノ酸置換、付加または欠失であってよいが、置換が好ましい。更に、通常は CDR 領域内の 1、2、3、4、または 5 個の残基が変更される。

【0213】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った改変抗体としては、例えば、抗体の性質を改善するために、VH 及び/または VL 内のフレームワーク残基に改変が行われた抗体が挙げられる。典型的には、かかるフレームワーク改変を行って、抗体の免疫原性を低下させる。例えば、1つのアプローチは、1つ以上のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系配列に「復帰突然変異」させることである。より具体的には、体細胞突然変異を受けた抗体は、抗体が由来する生殖細胞系配列とは異なるフレームワーク残基を含有してよい。かかる残基は、抗体のフレームワーク配列を、抗体が由来する生殖細胞系配列と比較することにより同定することができる。

10

【0214】

フレームワークまたは CDR 領域内で行われた改変に加えて、またはその代わりに、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体を操作して、Fc 領域内に、通常は抗体の1つ以上の機能的性質、例えば血清の半減期、補体結合、Fc 受容体結合、及び/または抗原依存性の細胞毒性を変更した改変を含めてよい。更に、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体を化学修飾する(例えば、1つ以上の化学部位を抗体に結合させることができる)か、または修飾してそのグリコシル化を変更し、抗体の1つ以上の機能的性質を再び変更してよい。かかる実施形態を、以下で更に記載する。Fc 領域内の残基の付番は、Kabat の EU インデックスの付番である。

20

【0215】

一実施形態では、CH1 のヒンジ領域を、ヒンジ領域内のシステイン残基の数を変更(例えば増減)するように改変する。本アプローチは、米国特許第 5,677,425 号(Bodmer et al.) に更に記載されている。CH1 のヒンジ領域内のシステイン残基の数を変更し、例えば、軽鎖及び重鎖のアセンブリを容易にするか、または抗体の安定性を増減する。

【0216】

別の実施形態において、抗体の Fc ヒンジ領域を変異させ、抗体の生物学的半減期を減少させる。より具体的には、抗体が、ネイティブの Fc ヒンジドメインの SpA 結合と比較して、低下したブドウ球菌プロテイン A (SpA) 結合を有するように、Fc ヒンジ断片の CH2 - CH3 ドメインの界面領域に1つ以上のアミノ酸変異を導入する。本アプローチは、米国特許第 6,165,745 号(Ward et al.) に更に詳細に記載されている。

30

【0217】

別の実施形態において、抗体を改変して、生物学的半減期を増加させる。種々のアプローチが可能である。例えば、米国特許第 6,277,375 号(Ward) に記載のとおり、以下の変異: T252L、T254S、T256F の1つ以上を導入することができる。あるいは、生物学的半減期を増加させるために、米国特許番号第 5,869,046 号及び同第 6,121,022 号(Presta et al.) に記載のとおり、抗体を CH1 または CL 領域内で変更し、IgG の Fc 領域の CH2 ドメインの2つのループから入手した、サルベージ受容体結合エピトープを含有させる。

40

【0218】

更に他の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置換することにより Fc 領域を変更し、抗体のエフェクター機能を変更する。例えば、アミノ酸残基 234、235、236、237、297、318、320 及び 322 から選択される1つ以上のアミノ酸を、抗体が、エフェクターに対して変化した親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。親和性が変化したエフェクターリガンドは例えば、Fc 受容体、または補体の CL 成分である

50

ことができる。本アプローチは、米国特許番号第 5, 624, 821 号及び同第 5, 648, 260 号 (共に Winter et al.) に、更に詳細に記載されている。

【0219】

別の例において、アミノ酸残基 329、331 及び 322 から選択される 1 つ以上のアミノ酸を、抗体が変化した C1q 結合、及び/または低下した、もしくは消滅した補体依存性細胞傷害 (CDC) を有するように、異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。本アプローチは、米国特許番号第 6, 194, 551 号 (Idusogie et al.) に更に詳細に記載されている。

【0220】

別の実施例において、アミノ酸の位置 231 及び 239 内の 1 つ以上のアミノ酸残基を変更することにより、抗体が補体を固定する能力を変化させる。本アプローチは、PCT 国際公開特許第 94/29351 号 (Bodmer et al.) に更に記載されている。

10

【0221】

更に別の実施例において、以下の位置における 1 つ以上のアミノ酸を改変することにより、Fc 領域を改変し、抗体が抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を仲立ちする能力を増加させ、かつ/または、Fcy 受容体に対する抗体の親和性を増加させる：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 または 439。本アプローチは、PCT 国際公開特許第 00/42072 号 (Presta) に更に記載されている。更に、FcRI、FcRII、FcRIII 及び FcRn に対する、ヒト IgG1 の結合部位がマッピングされ、向上した結合を有する変異体が記載されている (Shields, R. L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591 - 6604 を参照)。位置 256、290、298、333、334 及び 339 における特定の変異が、FcRIII への結合を改善することが示されている。更に、以下の組み合わせの変異体が、FcRIII への結合を改善することが示されている：T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A 及び S298A/E333A/K334A。更に、M252Y/S254T/T256E または M428L/N434S 等の変異は、FcRn への結合を改善し、抗体循環半減期を増加させる (Chan CA and Carter PJ (2010) Nature Rev Immunol 10: 301 - 316 を参照のこと)。

20

30

【0222】

更に別の実施形態において、抗体を改変して、in vivo での Fab アーム交換をなくすことができる。特に、本 (this) プロセスは、機能的に一価の二重特異的抗体 (bisppecific) を効果的にもたらす他の IgG4 抗体との間での、IgG4 半分子 (1 つの重鎖と 1 つの軽鎖) の交換を伴う。重鎖のヒンジ領域及び定常領域に対する変異は、この交換をなくすことができる (Aalberse, RC, Schuurman J., 2002, Immunology 105: 9 - 19 を参照)。

40

【0223】

更に別の実施形態において、抗体のグリコシル化形成を改変する。例えば、非グリコシル化抗体を作製することができる (即ち、抗体がグリコシル化形成を欠いている)。グリコシル化形成を変異して、例えば抗原に対する抗体の親和性を増加させることができる。かかる糖質の改変は、例えば、抗体配列内のグリコシル化形成部位の 1 つ以上を変異することにより行うことができる。例えば、1 つ以上の可変領域フレームワーク糖鎖形成部位を取り除くことで、その部位における糖鎖形成を取り除いた 1 つ以上のアミノ酸置換基を

50

作製することができる。かかる非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させることができる。かかるアプローチは、米国特許第5,714,350号及び同第6,350,861号(Co et al.)に更に詳細に記載されている。

【0224】

加えて、または代替的に、別の種類のグリコシル化形成を有する抗体、フコシル残基の量が減少した低フコシル化抗体、またはバイセクティングGlcNac構造が増加した抗体等を作製することができる。かかる、変化した糖鎖形成パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが示されている。かかる糖質改変は、例えば、抗体を、グリコシル化形成機構が変化した宿主細胞内で発現させることにより行うことができる。グリコシル化形成機構が変化した細胞は、当該技術分野において説明されてきており、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った組み換え抗体を発現することにより、グリコシル化形成が変化した抗体を作製する宿主細胞として使用することができる。例えば、細胞株のMs704、Ms705、及びMs709はフコシルトランスフェラーゼ遺伝子であるFUT8(a(1,6)フコシルトランスフェラーゼ)を欠いており、Ms704、Ms705、及びMs709細胞株内で発現する抗体が、糖質上にフコースを欠くこととなる。Ms704、Ms705、及びMs709FUT8細胞株は、2つの置換ベクターを使用して、CHO/DG44細胞内でFUT8遺伝子を標的攪乱することにより作製される(例えば、米国特許公報第20040110704号(Yamane et al.)及びYamane-Ohnuki et al.(2004)Biotechnol Bioeng 87:614-22を参照)。別の例として、EP1,176,195(Hanai et al.)では、かかる細胞株内で発現する抗体が、1,6結合に関係する酵素を減少させるか取り除くことにより、低フコシル化を示すようにフコシルトランスフェラーゼをコードする、機能が攪乱されたFUT8遺伝子を有する細胞株について記載されている。Hanai et al.はまた、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低い、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)についても記載している。PCT国際公開特許第WO03/035835号(Presta)は、Asn(297)結合糖質にフコースを結合させる能力が低下し、その宿主細胞内に発現する抗体の低フコシル化もまたもたらす、変異CHO細胞株であるLec13細胞について記載している(Shields, R.L. et al.(2002)J. Biol. Chem. 277:26733-26740もまた参照)。Umana et al.によるPCT国際公開特許第99/54342号は、改変した細胞株で発現する抗体が、増加したバイセクティングGlcNac構造を示し、抗体のADCC活性の増加をもたらす、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ(例えばP(1,4)-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように改変した細胞株について記載している(Umana et al.(1999)Nat. Biotech. 17:176-180もまた参照のこと)。あるいは、抗体のフコース残基を、フコシダーゼ酵素を使用して切断してよい。例えば、フコシダーゼの-L-フコシダーゼは、抗体のフコシル残基を取り除く(Tarentino, A.L. et al.(1975)Biochem. 14:5516-23)。

【0225】

本発明により想到される、本明細書の抗体の他の改変は、例えば、半減期を増加させるための、PEG化、または他の水溶性部位(通常はポリマー)の付加である。抗体をPEG化して、例えば抗体の生物学的(例えば血清)半減期を増加させることができる。抗体をPEG化するために、抗体またはその断片を、1つ以上のPEG基が、抗体または抗体断片に結合する条件下において、通常は、反応性エステルまたはPEGのアルデヒド誘導体等のポリエチレングリコール(PEG)と反応させる。PEG化は、反応性PEG分子(または類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を通して行うのが好ましい。本明細書で使用する場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ(Ci-Ci)アルコキシもしくはアリーロキシポリエチレングリコール、ま

10

20

30

40

50

たはポリエチレングリコール - マレイミド等の、他のタンパク質を誘導体化するために使用した P E G の形態のいずれかを包含することを意図している。ある特定の実施形態において、P E G 化する抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質を P E G 化する方法は、当技術分野において既知であり、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従って抗体に適用することができる。例えば、E P 0 1 5 4 3 1 6 (N i s h i m u r a e t a l .) 及び E P 0 4 0 1 3 8 4 (I s h i k a w a e t a l .) を参照のこと。

【0226】

抗体の操作方法

ある特定の実施形態において、 V_H 及び V_L 配列を有する、本発明に従った抗 V S I G 8 抗体を使用して、 V_H 及び / もしくは V_L 配列、またはこれらに結合した定常領域をそれぞれ改変することにより、新規の抗 V S I G 8 抗体を作製してよい。したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った別の態様において、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗 V S I G 8 抗体の構造的特徴を使用して、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体の少なくとも 1 つの機能的性質、例えばヒト V S I G 8 への結合を維持する、構造的に関係のある抗 V S I G 8 抗体を作製する。例えば、1 つの V S I G 8 抗体またはその変異体の、1 つ以上の C D R 領域を、既知のフレームワーク領域及び / または他の C D R と組み換えにより組み合わせ、上述のとおり、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った、追加の遺伝子組み換え抗 V S I G 8 抗体を作製することができる。他の種類の改変には、以前のセクションに記載したものが含まれる。操作方法のための出発物質は、本明細書において提供する V_H 及び / もしくは V_L 配列の 1 つ以上、またはその 1 つ以上の C D R 領域である。操作抗体を作製するために、本明細書において提供する V_H 及び / もしくは V_L 配列の 1 つ以上、またはその 1 つ以上の C D R 領域を有する抗体を実際に調製する（即ち、タンパク質として発現させる）必要はない。むしろ、配列に含まれる情報を出発物質として使用して、元の配列に由来する「第二世代」配列を作製し、続いて、「第二世代」の配列を調製して、タンパク質として発現させる。

【0227】

標準的な分子生物学的技術を使用して、変化した抗体配列を調製して発現させることができる。好ましくは、変化した抗体配列によりコードされる抗 V S I G 8 抗体は、本明細書において提供する方法及び配列を用いて作製した、それぞれ抗 V S I G 8 抗体の機能的性質を 1 つ、いくつか、または全て保持する抗体であり、これらの機能的性質としては、特定の K D レベル以下での V S I G 8 抗原への結合、及び / または免疫応答の制御、及び / または所望の標的細胞（例えば、V S I G 8 抗原を発現するもの等）への選択的結合が挙げられる。

【0228】

変化した抗体の機能的性質は、当該技術分野において使用可能な、及び / または本明細書に記載される標準的なアッセイを使用して評価することができる。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った、抗体の操作方法のある特定の実施形態において、抗 V S I G 8 抗体コード配列の全て、または一部に沿ってランダムに、または選択的に変異を導入することができる、得られる改変抗 V S I G 8 抗体を、結合活性、及び / または他の所望の機能的性質についてスクリーニングすることができる。

【0229】

変異方法は、当該技術分野において説明されている。例えば、P C T 国際公開特許第 W O 0 2 / 0 9 2 7 8 0 号 (S h o r t) は、飽和突然変異誘発、合成ライゲーションアセンブリ、またはこれらの組み合わせを使用した、抗体変異体の作製及びスクリーニング法について記載している。あるいは、P C T 国際公開特許第 0 3 / 0 7 4 6 7 9 号 (L a z a r e t a l .) は、コンピューターによるスクリーニング方法を使用して、抗体の生理化学的性質を最適化する方法について記載している。

【0230】

V S I G 8 断片ポリペプチド

V S I G 8の「可溶性エクトドメイン (E C D)」または「エクトドメイン」または「可溶」形態という用語は、対応するタンパク質をコードする核酸配列もまた指す。任意で、V S I G 8 E C Dタンパク質及びその断片は、配列番号1～3のいずれかに記載したポリペプチド配列、並びに/または、そのポリペプチド配列と少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは少なくとも90%の配列同一性、更により好ましくは、そのポリペプチド配列と少なくとも95、96、97、98、もしくは99%の配列同一性を有する変異体、並びに/またはその融合体及び/もしくはコンジュゲート、並びに/またはこれをコードするポリヌクレオチドのいずれか1つを指す。

【0231】

特に、V S I G 8の細胞外ドメインの断片は、V S I G 8の細胞外ドメインのI g Vドメインの任意の一部に対応する、またはV S I G 8の細胞外ドメインのI g Vドメインを含む任意の配列を含むことができる。

10

【0232】

V S I G 8タンパク質は、細胞外ドメイン内の免疫グロブリンドメインであり、抗体の可変領域に関係するI g Vドメイン(またはVドメイン)を含有する。I g Vドメインは、他のB7ファミリーメンバー同様に、受容体の結合を担い得る。細胞外ドメインのI gドメインは、このフォールドでは一般的で、構造機能にとって重要であり得る、ドメイン内のシステイン残基間で形成される1つのジスルフィド結合を含む。

【0233】

一実施形態では、V S I G 8の可溶性断片が提供される。融合タンパク質のセクションにおいて以下にて更に詳細に記載するように、かかる可溶性断片は任意で、第1の融合パートナーとして記載されてよい。有用な断片は、単独で、または、融合タンパク質に含まれるかもしくは多量体化した場合に、(例えば、T及びNK細胞上で発現する、並びに/またはT細胞及び/もしくはNK細胞の活性化を制御(阻害もしくは促進)する)天然の1つ以上の受容体への結合能力を保持する断片である。完全長V S I G 8の断片であるV S I G 8ポリペプチドは通常、完全長V S I G 8と比較して、免疫及び特定の免疫細胞において、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、100%、あるいは100%を超える、天然受容体への結合能力、及び/または、V S I G 8の1つ以上の機能的効果の制御(作動性もしくは拮抗性)を有する。可溶性V S I G 8ポリペプチド断片は、生み出す細胞から除去、分泌、または別様においては抽出され得るV S I G 8ポリペプチドの断片である。別の実施形態において、V S I G 8ポリペプチドの可溶性断片は、V S I G 8生物活性を保持するV S I G 8細胞外ドメインの断片、例えば、1つまたは複数の天然受容体に結合する能力を保持し、かつ/またはTもしくはNK細胞活性化を制御する(阻害もしくは促進する)断片を含む。細胞外ドメインは、膜貫通ドメインからの1、2、3、4、もしくは5個の連続アミノ酸、及び/またはシグナル配列からの1、2、3、4、もしくは5個の連続アミノ酸を含むことができる。

20

30

【0234】

あるいは、細胞外ドメインは、C末端、N末端、またはその両方から取り除いた、1、2、3、4、5個またはそれ以上のアミノ酸を有することができる。

40

【0235】

いくつかの実施形態では、V S I G 8細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号1、2、または3のいずれか1つに記載されるI g Vドメインのアミノ酸配列、またはその断片もしくは変異体を含む。他の実施形態では、V S I G 8細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号1～3のいずれか1つに記載されているI g Vドメインのアミノ酸配列から本質的になる。

【0236】

通常、V S I G 8ポリペプチド断片は、シグナル配列をコードする配列を含む核酸から発現する。シグナル配列を未成熟ポリペプチドから切断し、シグナル配列を欠く成熟ポリペプチドを作製する。標準的な分子生物学的技術を使用して、V S I G 8のシグナル配列

50

を別のポリペプチドのシグナル配列で置き換え、発現レベル、分泌、溶解性、またはポリペプチドの他の性質に影響を与えることができる。V S I G 8シグナルペプチド配列を置き換えるために使用するシグナルペプチド配列は、当該技術分野において公知であり得る。

【0237】

V S I G 8の、かかる「可溶性エクトドメイン (E C D)」または「エクトドメイン」または「可溶性」形態は、免疫、並びに、細胞毒性またはエフェクターT細胞、T r e g及びNK細胞等の、特定の種類の免疫細胞への、V S I G 8の影響の1つ以上を制御する(刺激する、またはそれに拮抗する)のが好ましい。

【0238】

V S I G 8ポリペプチドの変異体

少なくともいくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるアッセイのいずれかにより示される生物活性を増大させる、または、タンパク質の半減期もしくは安定性を増大させるものを含む、V S I G 8ポリペプチドの有用な変異体を包含する。可溶性V S I G 8タンパク質、またはV S I G 8タンパク質活性を有するその断片もしくは融合物をそれぞれ操作して、生物活性を増大させることができる。更なる実施形態において、V S I G 8タンパク質または融合タンパク質を、免疫細胞(例えばT細胞)への分子の結合を増大させ、阻害シグナルをT細胞に伝達する、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、または挿入により改変する。前述の特許請求の範囲のいずれかに従った、単離または組み換えV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、少なくとも1つの半減期延長部位を含む。

【0239】

かかる半減期延長部位としては例えば、ポリエチレングリコール (P E G)、モノメトキシP E G (m P E G)、X T E N分子、r P E G分子、アドネクチン、血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、免疫グロブリン定常領域もしくはその断片、またはアシル基が含まれる。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチド、または半減期延長部位、または他の異種分子を含む、半減期を変更した、本発明に従った単離または組み換えV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、前記異種ポリペプチド、半減期延長部位、または他の異種分子を欠く他の部分は同一の分子と比較して、V S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質の *i n v i v o* 半減期を少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、またはそれ以上増加させてよい。

【0240】

他の任意の変異体は、操作をして、ある種類のT細胞と他の免疫細胞、またはNK細胞に選択的に結合するこれらのV S I G 8タンパク質である。例えば、V S I G 8ポリペプチドを任意で、制御性T細胞、T r e g、T h 0、T h 1、T h 17、T h 2もしくはT h 22細胞、またはNK細胞に結合するように操作することができる。好ましい結合とは、ある種類の細胞に対して、別の種類の細胞よりも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれを超えて結合することを指す。V S I G 8タンパク質の更に他の変異体を操作して、それぞれ野生型V S I G 8タンパク質と比較して、免疫細胞への結合を低下させることができる。これらの変異体を、より強力な結合特性を有する変異体と組み合わせ使用し、適度な影響力を有する免疫応答を制御することができる。

【0241】

また任意で、変異V S I G 8タンパク質を操作して、野生型と比較して半減期を増加させることができる。これらの変異体は通常、酵素による分解に耐性を有するように改変される。例示的な改変としては、酵素による分解に耐性を有する改変アミノ酸残基及び改変ペプチド結合が挙げられる。これを達成するための種々の改変が、当該技術分野において既知である。

【0242】

V S I G 8のかかる変異形態は、免疫、及び、細胞毒性もしくはエフェクターT細胞、

10

20

30

40

50

Treg、MDS C、他のサブレッサー細胞型またはNK細胞等の特定の種類の免疫細胞への、V S I G 8の1つ以上の影響を制御する（刺激する、またはそれに拮抗する）のが好ましい。

【0243】

V S I G 8融合タンパク質

少なくともいくつかの実施形態に従うと、V S I G 8融合ポリペプチドは、第2のポリペプチドに直接、または、2つのタンパク質を結合するのに有用なリンカーペプチド配列、もしくは化学リンカーを介して融合した、V S I G 8タンパク質の全てまたは一部を含む第1の融合パートナーを有する。V S I G 8ポリペプチドは第2のポリペプチドに任意で融合し、本明細書に記載した融合タンパク質を形成してよい。第2のポリペプチドが存在することにより、V S I G 8融合ポリペプチドの可溶性、安定性、親和性及び/または結合価を変更することができる。本明細書で使用する場合、「結合価」とは、1分子当たりで利用可能な結合部位の数を意味する。一実施形態において、第2のポリペプチドは、異なる源または異なるタンパク質からのポリペプチドである。

10

【0244】

少なくともいくつかの実施形態に従うと、V S I G 8タンパク質または断片は、免疫関連疾患、感染症、敗血症、癌の治療に対する活性、及び/または本明細書に記載した遺伝子導入に続く、望ましくない免疫活性化の遮断に対して選択される。

【0245】

一実施形態では、第2のポリペプチドは、好ましくは、ヒト免疫グロブリンC y 1、C y 2、C y 3、もしくはC y 4鎖のヒンジ、C m及びC m領域、または、マウス免疫グロブリンC y 2 a鎖のヒンジ、C m及びC m領域に対応するアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン重鎖定常領域の1つ以上のドメインを含有する。少なくともいくつかの実施形態に従うと、融合タンパク質は、2つ以上の標的を任意で架橋可能な、二量体融合タンパク質である。所望の二量体融合タンパク質において、二量体は、二量体化した通常のI g重鎖でジスルフィド結合している同じC y s残基である、2つのI g重鎖のヒンジ領域内における、C y s残基の共有結合からもたらされる。かかるタンパク質は、V S I G 8ポリペプチド、その断片または融合タンパク質と呼ばれる。

20

【0246】

一実施形態では、免疫グロブリン定常ドメインは、特定の細胞型への結合を向上もしくは低下させる、生物学的利用能を増大させる、または、V S I G 8ポリペプチド、融合タンパク質もしくはその断片の安定性を増加させる1つ以上のアミノ酸挿入、欠失または置換を含有してよい。好適なアミノ酸置換としては、上述した保存的、及び非保存的置換が挙げられる。

30

【0247】

融合タンパク質は任意で、2つ以上の融合タンパク質を二量体化または多量体化するように機能するドメインを含有する。ペプチド/ポリペプチドリンカードメインは、個別のドメインであることができるか、あるいは、融合タンパク質の他のドメイン（V S I G 8ポリペプチドまたは第2のポリペプチド）の1つの中に含有されることができるかの、いずれかである。同様に、融合タンパク質を二量体化または多量体化するように機能するドメインは、個別のドメインであることができるか、あるいは、融合タンパク質の他のドメイン（V S I G 8ポリペプチド、第2のポリペプチドまたはペプチド/ポリペプチドリンカードメイン）の1つの中に含有されることができるかの、いずれかである。一実施形態では、二量体化/多量体化ドメインとペプチド/ポリペプチドリンカードメインは同一である。二量体化/多量体化ドメインとリンカーの、更に具体的で例示的、かつ非限定的例を以下で示す。

40

【0248】

少なくとも本発明のいくつかの実施形態に従った、本明細書にて開示した融合タンパク質は式I：N - R 1 - R 2 - R 3 - Cであり、式中、「N」は融合タンパク質のN末端を表し、「C」は融合タンパク質のC末端を表す。更なる実施形態において、「R 1」はV

50

S I G 8 ポリペプチドであり、「R 2」は任意のペプチド/ポリペプチドまたは化学リンカードメインであり、「R 3」は第 2 のポリペプチドである。あるいは、R 3 は V S I G 8 ポリペプチドであってよく、R 1 は第 2 のポリペプチドであってよい。リンカーの種々の非限定的例を、以下で更に詳細に記載する。

【0249】

任意で融合タンパク質は、任意で、1つ以上のアミノ酸（例えば G S ）のリンカーペプチドにより、1つ以上の「半減期延長部位」に融合した、本明細書に記載した V S I G 8 ポリペプチド断片を含む。「半減期延長部位」とは、タンパク質に付加した場合に、対象の体内（例えば、対象の血漿）における、そのタンパク質の *in vivo* 半減期を延長する任意の部位、例えば、ポリペプチド、小分子またはポリマーである。例えば、本発明の一実施形態において、半減期延長部位は、ポリエチレングリコール（PEG）、モノメトキシPEG（mPEG）、XTEN分子、rPEG分子、アドネクチン、血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、免疫グロブリン定常領域もしくはその断片、またはアシル基である。本発明の一実施形態において、PEGは、5、10、12、20、30、40または50 kDa またはそれより大きい部位か、または約12000個のエチレングリコール単位を含む（PEG12000）である。本発明に従った単離または組み換えV S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質は、少なくとも1つの半減期延長部位を任意で含んでよい。半減期延長部位としては、PEG、XTEN分子、rPEG分子、アドネクチン、血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、免疫グロブリン定常領域もしくはその断片、またはアシル基が挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明に従ったV S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質に含有される異種ポリペプチド、半減期延長部位、または他の異種分子は、前記異種ポリペプチド、半減期延長部位、または他の異種分子を欠く別様の同一分子と比較して、前記単離または組み換えV S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質の *in vivo* 半減期を少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、またはそれ以上増加させてよい。

10

20

【0250】

融合タンパク質はまた、任意で、化学合成法により調製してもよく、合成中または合成後のいずれかに、「結合部」が化学的にもたらされる。

【0251】

例えば、米国特許第5,547,853号（Wallner et al.）に記載されているように（非限定的例としてのみ、本明細書に全体が記載されているかのように、参照として本明細書に組み込まれている）、架橋、及び他のかかる方法を、（上述した遺伝子レベルでの融合方法と共に）任意で使用してよい。

30

【0252】

本発明に従って、免疫グロブリンの定常領域を含む免疫グロブリンの一部との融合により、本発明のタンパク質から融合タンパク質を調製してもよい。より好ましくは、免疫グロブリンの一部は、任意で、及びより好ましくはヒト重鎖定常領域である重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、最も好ましくはIgG重鎖定常領域であり、任意で、かつ最も好ましくはFc鎖であり、最も好ましくは、ヒンジ、Cm及びCmドメインを含むIgGF_c断片である。Fc鎖は任意で、既知または「野生型」のFc鎖であってよく、あるいは、変異して、または切断されていてよい。融合タンパク質のFcタンパク質は、任意でアイソタイプもしくはサブクラスにより変異されてよく、キメラもしくはハイブリッドであってよく、かつ/または、例えば、エフェクター機能を改善するために、半減期、組織への接近性を調節するために、安定性等の生物物理学的特徴を増強するために、そして産生効率を改善する（そして、コストを下げる）ために、改変してよい。開示した融合タンパク質の構築に有用な多くの改変、及びこれらの作製方法は当技術分野において既知であり、例えば、Mue l l e r , e t a l , M o l . I m m u n . , 3 4 (6) : 4 4 1 - 4 5 2 (1 9 9 7) , S w a n n , e t a l . , C u r r . O p i n . I m m u n . , 2 0 : 4 9 3 - 4 9 9 (2 0 0 8) , a n d P r e s t a , C u r r . O p i n . I m m u n . 2 0 : 4 6 0 - 4 7 0 (2 0 0 8) を参照のこと。いくつかの実施形態では

40

50

、Fc領域は天然のIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4 Fc領域である。いくつかの実施形態では、Fc領域はハイブリッド、例えば、IgG2/IgG4 Fc定常領域からなるキメラである。

【0253】

Fc領域の改変としては、Fcγ受容体と補体への結合を防止するために改変したIgG4、1つ以上のFc受容体への結合を改善するために改変したIgG1、エフェクター機能を最小限に抑えるために改変した(アミノ酸の変化)IgG1、変更したグリカンを含む/グリカンを含まないIgG1(通常は、発現宿主を変更すること、または位置297のAsnを置換することによる)、FcRnへのpH依存性結合を変更したIgG1が挙げられるが、これらに限定されない。Fc領域は、ヒンジ領域全体、またはヒンジ領域全体未満を含んでよい。別の実施形態において、Fcドメインは、低親和性阻害Fc受容体CD32B(FcγRIIB)への結合を低下させ、かつ、低親和性活性化Fc受容体CD16A(FcγRIIIa)への、野生型レベルの結合を維持するか、結合を向上させる1つ以上のアミノ酸挿入、欠失または置換を含有してよい。

10

【0254】

別の実施形態は、半減期を増加させるFcR(Fcγ受容体)への結合が低下した、IgG2-4ハイブリッド、及びIgG4変異体を含む。例示的なIgG2-4ハイブリッド、及びIgG4変異体は、Angal, S. et al., *Molecular Immunology*, 30(1):105-108(1993); Mueller, J. et al., *Molecular Immunology*, 34(6):441-452(1997); 及び、米国特許第6,982,323号(Wang et al.)に記載されている。いくつかの実施形態では、IgG1及び/またはIgG2ドメインを欠失する;例えば、Angal et al., *Molecular Immunology*, 30(1):105-108(1993)では、セリン241がプロリンで置き換えられたIgG1及びIgG2について記載されている。

20

【0255】

更なる実施形態において、Fcドメインは、CD16Aへの結合を向上させるアミノ酸挿入、欠失、または置換を含有する。CD16Aへの結合を向上させ、CD32Bへの結合を低下させる、ヒトIgG1のFcドメイン内での多数の置換は、当技術分野において既知であり、Stavénhagen, et al., *Cancer Res.*, 57(18):8882-90(2007)に記載されている。CD32Bへの結合が低下し、かつ/またはCD16Aへの結合が増加したヒトIgG1 Fcドメインの例示的変異体は、F243L、R929P、Y300L、V305IまたはP296L置換を含有する。これらのアミノ酸置換は、任意の組み合わせでヒトIgG1 Fcドメイン内に存在してよい。

30

【0256】

一実施形態では、ヒトIgG1 Fcドメイン変異体は、F243L、R929P及びY300L置換を含有する。別の実施形態において、ヒトIgG1 Fcドメイン変異体は、F243L、R929P、Y300L、V305I及びP296L置換を含有する。別の実施形態において、ヒトIgG1 Fcドメイン変異体は、N297A/Q置換を含有する。これは、これらの変異体がFcR結合を消滅させるためである。変異の非限定的な実例的、例示の種類は、2006年2月16日公開の米国特許出願第20060034852号に記載されており、その明細書に全体が記載されているかのように、参考として本明細書に組み込まれる。「Fc鎖」という用語はまた、任意でいかなる種類のFc断片をも含む。

40

【0257】

IgGサブクラス内での、抗体の定常領域が仲立ちする活性に大切な、特定のいくつかのアミノ酸残基が同定されている。これらの特定のアミノ酸の包含、置換または除外はそれ故、特定の免疫グロブリン定常領域が仲立ちする活性の包含または除外を可能にする。更に、特定の変化は、例えば非グリコシル化、及び/またはFc鎖への他の所望の変化を

50

もたらし得る。少なくとも、いくつかの変化を任意に加えて、望ましくないと考えられているFcの機能、例えば、以下にて更に詳細に記載する望ましくない免疫系効果を遮断してよい。

【0258】

融合タンパク質の活性を制御するために加えられ得る、Fcへの変異の非限定的実例としては、以下の変化(Kabat EA et al: Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, (1991)により、Fc配列に関して与えられる)またはこれらの組み合わせが挙げられる: 220C S; 233~238 ELLGGP EAEGAP; 265D A (好ましくは、434N Aと組み合わせる); 297N A (例えば、Nグリコシル化を遮断するため); 318~322 EYKCK AYACA; 330-331 AP SS; (例えば、これらの変異、及びそれらの効果の説明については、M. Clark, Chemical Immunol and Antibody Engineering, pp 1-31を参照のこと)。上記の変化を特徴とするFc鎖の構造は、任意で、そして好ましくは、ヒンジ領域と、Cm及びCmドメインとの組み合わせを含む。

10

【0259】

上記の変異は任意で、所望の特性を向上させるか、あるいは望ましくない特性を遮断するために実行されてよい。例えば、抗体の非グリコシル化は、一方、任意で、望ましくない機能であり得る、T細胞の枯渇の遮断、またはサイトカイン放出の誘発を行う一方、所望の結合機能性を維持することが示された(M. Clark, Chemical Immunol and Antibody Engineering, pp 1-31を参照)。331プロリンをセリンで置換することにより、補体を活性化する能力を遮断してよく、この能力は任意で、望ましくない機能と考えられ得る(M. Clark, Chemical Immunol and Antibody Engineering, pp 1-31を参照)。この変更と組み合わせ、位置330でアラニンをセリンに変更することによってもまた、補体を活性化する能力を遮断する所望の効果が向上し得る。

20

【0260】

残基235及び237は、上述の233~238の残基の遮断を変更することにより、ADCCが望ましくない機能であると考えられる場合に、かかる活性もまた遮断し得るように、細胞が仲立ちする抗体依存性細胞毒性(ADCC)に関与することが示された。残基220は通常、IgG1からのFcではシステインであり、これは、重鎖が軽鎖と共有結合を形成する部位である。任意で、この残基を別のアミノ酸残基(例えばセリン)に変更し、または欠失もしくは切断により、任意の種類の共有結合を避けてよい(M. Clark, Chemical Immunol and Antibody Engineering, pp 1-31を参照)。

30

【0261】

残基265及び434に対する上記の変化を任意で行い、Fc受容体への結合を低下または遮断してよく、これは任意で、免疫系機能に関係する、Fcの望ましくない機能性を遮断し得る(Binding site on Human IgG1 for Fc Receptors, Shields et al, Vol 276, pp 6591-6604, 2001を参照)。

40

【0262】

上記の変化は、所望の変化の単なる解説を意図するものであり、如何様にも限定を行うことを意図するものではない。更に、上記説明は説明目的のために提供され、単一の仮説により束縛されることを望まない。更なる実施形態において、融合タンパク質は、IgFc領域に融合したVSI G8の細胞外ドメイン、またはその断片を含む。以前に記載されたように(Chapoval, et al., Methods Mol. Med, 45: 247-255 (2000))、組み換えIg VSI G8ポリペプチド、その断片または融合タンパク質を、VSI G8の細胞外ドメインのコード領域、またはその断片を、

50

ヒト I g G 1 またはマウス I g G 2 a の F c 領域に融合することにより調製することができる。

【0263】

任意で、V S I G 8 E C D とは、ヒト免疫グロブリン F_c に融合したヒト V S I G 8 E C D のアミノ酸配列を含む融合タンパク質もまた指す。任意で、前記融合タンパク質は、配列番号 1、2、3 で説明されているヒトまたは非ヒト V S I G 8 E C D のアミノ酸配列、またはその断片を含む。

【0264】

別の実施形態において、第 2 のポリペプチドは、追加の分子が V S I G 8 融合タンパク質に結合可能な、コンジュゲーションドメインを有し得る。かかる一実施形態において、コンジュゲート分子は、融合タンパク質を特定の臓器または組織に標的化することができ、かかる標的化ドメイン及び/または分子の、更なる特定の実例的、非限定的例を以下で示す。

【0265】

かかる別の実施形態において、コンジュゲート分子は、V S I G 8 融合タンパク質の効果を上向または増強することができる、別の免疫賦活剤である。別の実施形態において、コンジュゲート分子は、ポリエチレングリコール (P E G) である。いくつかの実施形態では、本発明に従った V S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質は結合領域を含み、ここで、結合タンパク質は 2 つ以上の標的を架橋することができる。いくつかの実施形態では、本発明に従った V S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質は別の結合部位を含み、ここで、結合部位は腫瘍細胞、病原体 (例えばウイルス、バクテリア、マイコプラズマ (m y c o p l a s m)、真菌、酵母菌もしくは寄生生物)、またはそれらに感染した細胞、免疫細胞、または疾患部位を標的とする。

【0266】

いくつかの実施形態では、本発明に従った V S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質は、少なくとも 1 つの異種ポリペプチドを含み、それは受容体、ホルモン、サイトカイン、抗原、B 細胞標的、NK 細胞標的、T 細胞標的、T N F 受容体スーパーファミリーメンバー、ヘッジホッグファミリーメンバー、受容体型チロシンキナーゼ、プロテオグリカン関連分子、T G F - スーパーファミリーメンバー、W n t 関連分子、受容体リガンド、樹状細胞標的、骨髄細胞標的、単核細胞 / マクロファージ細胞標的、または血管新生標的であってよい。

【0267】

いくつかの実施形態では、本発明に従った V S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質は、少なくとも 1 つの抗原 (例えば腫瘍抗原、自己抗原、アレルゲン、または病原体抗原) を含む。

【0268】

いくつかの実施形態では、本発明に従った V S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質は、2 B 4 / S L A M F 4、I L - 2 R a、4 - 1 B B / T N F R S F 9、I L - 2 R、A L C A M、B 7 - 1 / C D 8 0、I L - 4 R、B 7 - H 3、B L A M E / S L A M F 8、B T L A、I L - 6 R、C C R 3、I L - 7 R a、C C R 4、C X C R 1 / I L - 8 R A、C C R 5、C C R 6、I L - 1 0 R a、C C R 7、I L - 1 0 R、C C R 8、I L - 1 2 R i、C C R 9、I L - 1 2 R 2、C D 2、I L - 1 3 R a 1、I L - 1 3、C D 3、C D 4、I L T 2 / C D 8 5 j、I L T 3 / C D 8 5 k、I L T 4 / C D 8 5 d、I L T 5 / C D 8 5 a、I n t e g r i n a 4 / C D 4 9 d、C D 5、I n t e g r i n a E / C D 1 0 3、C D 6、I n t e g r i n a M / C D 1 1 b、C D 8、I n t e g r i n a X / C D 1 1 c、I n t e g r i n 2 / C D 1 8、K I R / C D 1 5 8、C D 2 7 / T N F R S F 7、K I R 2 D L 1、C D 2 8、K I R 2 D L 3、C D 3 0 / T N F R S F 8、K I R 2 D L 4 / C D 1 5 8 d、C D 3 1 / P E C A M - 1、K I R 2 D S 4、C D 4 0 リガンド / T N F S F 5、L A G - 3、C D 4 3、L A I R 1、C D 4 5、L A I R 2、C D 8 3、ロイコトリエン B 4 R 1、C D 8 4 / S L A M F 5、N C A

10

20

30

40

50

M - L1、CD94、NKG2A、CD97、NKG2C、CD229 / SLAMF3、NKG2D、CD2F - 10 / SLAMF9、NT - 4、CD69、NTB - A / SLAMF6、共通鎖 / IL - 2 Ry、Osteopontin、CRACC / SLAMF7、PD - 1、CRTAM、PSGL - 1、CTLA - 4、RANK / TNFRSF11A、CX3CR1、CX3CL1、L - セレクチン、CXCR3、SIRP i、CXCR4、SLAM、CXCR6、TCCRAYSX - 1、DNAM - 1、チモポエチン、EMMPRIN / CD 147、TIM - 1、EphB6、TIM - 2、Fas / TNFRSF6、TIM - 3、Fas リガンド / TNFSF6、TIM - 4、FeyRIII / CD16、TIM - 6、GITR / TNFRSF18、TNFR1 / TNFRSFIA、グラニューライシン、TNFR11 / TNFRSF1B、HVEM / TNFRSF14、TRAIL R1 / TNFRSF10A、ICAM - 1 / CD54、TRAIL R2 / TNFRSF10B、ICAM - 2 / CD102、TRAIL R3 / TNFRSF10C、IFN - R1、TRAIL R4 / TNFRSF10D、IFN - R2、TSLP、IL - 1 R1及びTSLP Rからなる群から選択されるT細胞標的を含む。

10

【0269】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、B7 - 1 / CD80、ILT4 / CD85d、B7 - H1、ILT5 / CD85a、共通鎖、インテグリンa4 / CD49d、BLAME / SLAMF8、インテグリンaX / CD11c、CCL6 / C10、インテグリン2 / CD18、CD155 / PVR、インテグリン3 / CD61、CD31 / PECAM - 1、ラテクシン (Latexin)、CD36 / SR - B3、ロイコトリエンB4 R1、CD40 / TNFRSF5、LIMPII / SR - B2、CD43、LMIR1 / CD300A、CD45、LMIR2 / CD300c、CD68、LMIR3 / CD300LF、CD84 / SLAMF5、LMIR5 / CD300LB、CD97、LMIR6 / CD300LE、CD163、LRP - 1、CD2F - 10 / SLAMF9、MARCO、CRACC / SLAMF7、MD - 1、ECF - L、MD - 2、EMMPRIN / CD 147、MGL2、エンドグリン / CD105、オステオアクチビン (Osteoactivin) / GPNMB、FcR1 / CD64、オステオポンチン、FcRIIB / CD32b、PD - L2、FcRIIC / CD32c、Siglec - 3 / CD33、FcRIIA / CD32a、SIGNR1 / CD209、FeyRIII / CD16、SLAM、GM - CSFRa、TCCRWSX - 1、ICAM - 2 / CD102、TLR3、IFN - y R1、TLR4、IFN - y R2、TREM - 1、IL - 1 RII、TREM - 2、ILT2 / CD85j、TREM - 3、ILT3 / CD85k、TREM1 / TLT - 1、2B4 / SLAMF4、IL - 10 Ra、ALCAM、IL - 10 R、アミノペプチダーゼN / ANPEP、ILT2 / CD85j、共通鎖、ILT3 / CD85k、C1q R1 / CD93、ILT4 / CD85d、CCR1、ILT5 / CD85a、CCR2、インテグリン4 / CD49d、CCR5、インテグリンaM / CD11b (CCR8)、インテグリンX / CD11c、CD155 / PVR、インテグリン2 / CD18、CD14、インテグリン3 / CD61、CD36 / SR - B3、LAIR1、CD43、LAIR2、CD45、ロイコトリエンB4 R1、CD68、LIMPII / SR - B2、CD84 / SLAMF5、LMIR1 / CD300A、CD97、LMIR2 / CD300c、CD163、LMIR3 / CD300LF、凝固因子I11 / Tissue Factor、LMIR5 / CD300LB、CX3CR1、CX3CL1、LMIR6 / CD300LE、CXCR4、LRP - 1、CXCR6、M - CSFR、DEP - 1 / CD148、MD - 1、DNAM - 1、MD - 2、EMMPRIN / CD147、MMR、エンドグリン / CD105、NCAM - L1、FcR1 / CD64、PSGL - 1、FcYRIII / CD16、RP105、G - CSFR、L - セレクチン、GM - CSFR、Siglec - 3 / CD33、HVEM / TNFRSF14、SLAM、ICAM - 1 / CD54、TCCRAYSX - 1、ICAM - 2 / CD

20

30

40

50

102、TREM-1、IL-6 R、TREM-2、CXCR1/IL-8 RA、TREM-3及びTREML1/TLT-1からなる群から選択される少なくとも1つの単核細胞/マクロファージ細胞標的を含む。

【0270】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、CD36/SR-B3、LOX-1/SR-E1、CD68、MARCO、CD163、SR-AI/MSR、CD5L、SREC-I、CL-P1/COLEC12、SREC-II、LIMPII/SR-B2、RP105、TLR4、TLR1、TLR5、TLR2、TLR6、TLR3、TLR9、4-IBBリガンド/TNFSF9 (IL-12/IL-23 p40、4-アミノ-1,8-ナフタルイミド、ILT2/CD85j、CCL21/6Ckine、ILT3/CD85k、8-オキソ-dG、ILT4/CD85d、8D6A、ILT5/CD85a、A2B5、インテグリン α 4/CD49d、Aag、インテグリン2/CD18、AMICA、ランゲリン(Langerin)、B7-2/CD86、ロイコトリエンB4 R1、B7-H3、LMIR1/CD300A、BLAME/SLAMF8、LMIR2/CD300c、Clq R1/CD93、LMIR3/CD300LF、CCR6、LMIR5/CD300LB、CCR7、LMIR6/CD300LE、CD40/TNFRSF5、MAG/Siglec-4a、CD43、MCAM、CD45、MD-1、CD68、MD-2、CD83、MDL-1/CLEC5A、CD84/SLAMF5、MMR、CD97、NCAM-L1、CD2F-10/SLAMF9、オステオアクチビン(Osteoactivin)/GPNMB、Chem23、PD-L2、CLEC-1、RP105、CLEC-2、Siglec-2/CD22、CRACC/SLAMF7、Siglec-3/CD33、DC-SIGN、Siglec-5、DC-SIGNR/CD299、Siglec-6、DCAR、Siglec-7、DCIR/CLEC4A、Siglec-9、DEC-205、Siglec-10、デクチン-1/CLEC7A、Siglec-F、デクチン-2/CLEC6A、SIGNR1/CD209、DEP-1/CD148、SIGNR4、DLEC、SLAM、EMMPRIN/CD147、TCCR/WSX-1、FcR1/CD64、TLR3、FcRIIB/CD32b、TREM-1、FcRIIC/CD32c、TREM-2、FcyRIIA/CD32a、TREM-3、FcRIII/CD16、TREML1/TLT-1、ICAM-2/CD102及びパニロイドR1からなる群から選択される少なくとも1つの樹状細胞標的を含む。

【0271】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、4-1BB/TNFRSF9、NGFR/TNFRSF16、BAFFR/TNFRSF13C、オステオプロテゲリン/TNFRSF11B、BCMA/TNFRSF17、OX40/TNFRSF4、CD27/TNFRSF7、RANK/TNFRSF11A、CD30/TNFRSF8、RELT/TNFRSF19L、CD40/TNFRSF5、TACI/TNFRSF13B、DcR3/TNFRSF6B、TNFRI/TNFRSF1A、DcTRAILR1/TNFRSF23、TNFRII/TNFRSF1B、DcTRAILR2/TNFRSF22、TRAILR1/TNFRSF10A、DR3/TNFRSF25、TRAILR2/TNFRSF10B、DR6/TNFRSF21、TRAILR3/TNFRSF10C、EDAR、TRAILR4/TNFRSF10D、Fas/TNFRSF6、TROY/TNFRSF19、GITR/TNFRSF18、TWEAKR/TNFRSF12、HVEM/TNFRSF14、XEDAR、リンフォトキシンR/TNFRSF3、4-1BBリガンド/TNFSF9、リンフォトキシン、APRIL/TNFSF13、リンフォトキシン/TNFSF3、BAFF/TNFSF13C、OX40リガンド/TNFSF4、CD27リガンド/TNFSF7、TL1A/TNFSF15、CD30リガンド/TNFSF8、TNF-a/TNFSFIA、CD40リガンド/TNFSF5、TNF-/TNFSF1B、EDA-A2、TRAIL/TNFSFIO、F

10

20

30

40

50

a sリガンド/TNFSF6、TRANCE/TNFSF11、GITRリガンド/TNFSF18、TWEAK/TNFSFL2及びLIGHT/TNFSF14からなる群から選択される少なくとも1つのTNF受容体スーパーファミリーメンバーを含む。

【0272】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、パッチド及びスーズンドからなる群から選択される少なくとも1つのヘッジホッグファミリーメンバーを含む。

【0273】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、Ax1、FGFR4、ClqR1/CD93、FGFR5、DDR1、Flt-3、DDR2、HGF R、Dtk、IGF-IR、EGFR、IGF-IRR、Eph、INSRR、EphA1、インスリンR/CD220、EphA2、M-CSFR、EphA3、Mer、EphA4、MSP R/Ron、EphA5、MUSK、EphA6、PDGFRa、EphA7、PDGFR、EphA8、Ret、EphB1、ROR1、EphB2、ROR2、EphB3、SCFR/c-kit、EphB4、Tie-1、EphB6、Tie-2、ErbB2、TrkA、ErbB3、TrkB、ErbB4、TrkC、FGFR1、VEGFR1/Flt-1、FGFR2、VEGFR2/Flk-1、FGFR3、及びVEGFR3/Flt-4からなる群から選択される少なくとも1つの受容体型チロシンキナーゼを含む。

【0274】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、アクチビンRIA/ALK-2、GFRa-1、アクチビンRIB/ALK-4、GFRa2、アクチビンRHA、GFRa-3、アクチビンRUB、GFRa-4、ALK-1、MISRII、ALK-7、Ret、BMPRII/ALK-3、TGF-betaR1/ALK-5、BMPRII/ALK-6、TGF-RII、BMPRII、TGF-R11b、エンドグリン/CD105及びTGF-RIIIからなる群から選択される少なくとも1つのトランスフォーミング増殖因子(TGF)スーパーファミリーメンバーを含む。

【0275】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、Frizzled-1、Frizzled-8、Frizzled-2、Frizzled-9、Frizzled-3、sFRP-1、Frizzled-4、sFRP-2、Frizzled-5、sFRP-3、Frizzled-6、sFRP-4、Frizzled-7、MFRP、LRP5、LRP6、Wnt-1、Wnt-8a、Wnt-3a、Wnt-10b、Wnt-4、Wnt-11、Wnt-5a、Wnt-9a及びWnt-7aからなる群から選択される少なくとも1つのWnt関連分子を含む。

【0276】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、4-1BBリガンド/TNFSF9、リンフォトキシン、APRIL/TNFSF13、リンフォトキシン/TNFSF3、BAFF/TNFSF13C、OX40リガンド/TNFSF4、CD27リガンド/TNFSF7、TL1A/TNFSF15、CD30リガンド/TNFSF8、TNF-a/TNFSFIA、CD40リガンド/TNFSF5、TNF- /TNFSF1B、EDA-A2、TRAIL/TNFSF10、Fasリガンド/TNFSF6、RANCE/TNFSF111、GITRリガンド/TNFSF18、TWEAK/TNFSF12、LIGHT/TNFSF14、アンフィレグリン、NRG1アイソフォームGGF2、ベータセルリン、NRG1アイソフォームSMDF、EGF、NRG1-aHRG1-a、エビジェン、NRG1-1/HRG1-1、エビジェン、TGF-a、HB-EGF、TMEFF1/トモレグリン(Tomoregulin)-1、ニューレグリン-3、TMEFF2、IGF-I、IGF-II、インスリン、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンC、

10

20

30

40

50

BMP - 2、BMP - 7、BMP - 3、BMP - 8、BMP - 3 b / GDF - 10、BMP - 9、BMP - 4、BMP - 15、BMP - 5、デカペンタプレジック、BMP - 6、GDF - 1、GDF - 8、GDF - 3、GDF - 9、GDF - 5、GDF - 11、GDF - 6、GDF - 15、GDF - 7、アルテミン (Artemin)、ニューロツリン、GDNF、パーセフィン、TGF - 1、TGF - 2、TGF - 1、TGF - 3、LAP (TGF - 1)、TGF - 5、Latent TGF - 1、Latent TGF - b p1、TGF - 1.2、Lefty、Nodal、MIS / AMH、酸性FGF、FGF - 12、塩基性FGF、FGF - 13、FGF - 3、FGF - 16、FGF - 4、FGF - 17、FGF - 5、FGF - 19、FGF - 6、FGF - 20、FGF - 8、FGF - 21、FGF - 9、FGF - 23、FGF - 10、KGF / FGF - 7、FGF - 11、ニューロピリン - 1、PIGF、ニューロピリン - 2、PIGF - 2、PDGF、PDGF - A、VEGF、PDGF - B、VEGF - B、PDGF - C、VEGF - C、PDGF - D、VEGF - D及びPDGF - ABからなる群から選択される少なくとも1つの受容体リガンドを含む。

【0277】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、扁平上皮細胞癌抗原1 (SCCA - 1)、(PROTEIN T4 - A)、扁平上皮細胞癌抗原2 (SCCA - 2)、卵巢癌腫抗原CA125 (1A1 - 3B; KIAA0049)、ムチン1 (腫瘍関連ムチン; 癌腫関連ムチン; 多型上皮ムチン; PEM; PEMT; EPISIALIN; 腫瘍関連上皮膜抗原; EMA; H23AG; 落花生反応性泌尿器ムチン (Peanut - Reactive Urinary Mucin); PUM; 及び乳癌関連抗原DF3)、CTCL腫瘍抗原se1 - 1、CTCL腫瘍抗原se14 - 3、CTCL腫瘍抗原se20 - 4、CTCL腫瘍抗原se20 - 9、CTCL腫瘍抗原se33 - 1、CTCL腫瘍抗原se37 - 2、CTCL腫瘍抗原se57 - 1、CTCL腫瘍抗原se89 - 1前立腺特異的膜抗原、5T4癌胎児性栄養膜糖タンパク質、Orf73カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス、MAGE - C1 (癌/精巢抗原CT7)、MAGE - B1抗原 (MAGE - XP抗原; DAM10)、MAGE - B2抗原 (DAM6)、MAGE - 2抗原、MAGE - 4a抗原、MAGE - 4b抗原、大腸癌抗原NY - CO - 45、肺癌抗原NY - LU - 12変異体A、癌関連表面抗原、腺癌抗原ART1、腫瘍随伴性脳・精巢癌抗原 (腫瘍神経細胞 (onc neuronal) 抗原MA2; 腫瘍随伴性神経細胞抗原)、神経腫瘍学的腹部抗原2 (NOVA2)、肝細胞癌抗原遺伝子520、腫瘍関連抗原CO - 029、腫瘍関連抗原MAGE - X2、滑膜肉腫、Xブレークポイント2、T細胞により認識される扁平上皮細胞癌抗原、血清学的規定大腸癌抗原1、血清学的規定乳癌抗原NY - BR - 15、血清学的規定乳癌抗原NY - BR - 16、クロモグラニンA、副甲状腺分泌タンパク質1、DUPAN - 2、CA 19 - 9、CA 72 - 4、CA 195並びにL6からなる群から選択される少なくとも1つの腫瘍抗原を含む。

【0278】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD38、CD39、CD40、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CD78、CD79a / b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD89、CD98、CD126、CD127、CDw130、CD138及びCDw150からなる群から選択される少なくとも1つのB細胞標的を含む。

【0279】

いくつかの実施形態においては、本発明に従ったV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン様2、アンジオポエチン - 2、アンジオポエチン様3、アンジオポエチン - 3、アンジオポエチン様7 / CDT6、アンジオポエチン - 4、Tie - 1、アンジオポエチン様1、Tie - 2、アンジオジェニン、

iNOS、凝固因子I11/組織因子、nNOS、CTGF/CCN2、NOV/CCN3、DANCE、OSM、EDG-1、Plfr、EG-VEGF/PK1、プロリフェリン、エンドスタチン、ROB04、エリスロポエチン、トロンボスポンジン-1、キニノスタチン(Kininostatin)、トロンボスポンジン-2、MFG-E8、トロンボスポンジン-4、一酸化窒素、VG5Q、eNOS、EphA1、EphA5、EphA2、EphA6、EphA3、EphA7、EphA4、EphA8、EphB1、EphB4、EphB2、EphB6、EphB3、エンフリン-A1、エフリン-A4、エフリン-A2、エフリン-A5、エフリン-A3、エフリン-B1、エフリン-B3、エフリン-B2、酸性FGF、FGF-12、塩基性FGF、FGF-13、FGF-3、FGF-16、FGF-4、FGF-17、FGF-5、FGF-19、FGF-6、FGF-20、FGF-8、FGF-21、FGF-9、FGF-23、FGF-10、KGF/FGF-7、FGF-11、FGFR1、FGFR4、FGFR2、FGFR5、FGFR3、ニューロピリン-1、ニューロピリン-2、セマフォリン3A、セマフォリン6B、セマフォリン3C、セマフォリン6C、セマフォリン3E、セマフォリン6D、セマフォリン6A、セマフォリン7A、MMP、MMP-1、MMP-12、MMP-2、MMP-13、MMP-3、MMP-14、MMP-7、MMP-15、MMP-8、MMP-16/MT3-MMP、MMP-9、MMP-24/MT5-MMP、MMP-10、MMP-25/MT6-MMP、TIMP-1、TIMP-3、TIMP-2、TIMP-4、ACE、IL-13Ra1(IL-13)ClqR1/CD93、インテグリン4/CD49d、VE-カドヘリン、インテグリン2/CD18、CD31/PECAM-1、KLF4、CD36/SR-B3、LYVE-1、CD151、MCAM、CL-P1/COLEC12、ネクチン-2/CD112、凝固因子I11/組織因子、E-セレクチン、D6、P-セレクチン、DC-SIGNR/CD299、SLAM、EMMPRIN/CD147、Tie-2、エンドグリン/CD105、TNFRI/TNFRSF1A、EPCR、TNFRII/TNFRSF1B、エリスロポイエチンR、TRAILR1/TNFRSF10A、ESAM、TRAILR2/TNFRSF10B、FABP5、VCAM-1、ICAM-1/CD54、VEGFR2/Flk-1、ICAM-2/CD102、VEGFR3/Flt-4、IL-1RI及びVG5Qからなる群から選択される少なくとも1つの血管新生標的を含む。

【0280】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドを含み、少なくとも1つの異種ポリペプチド、及び/もしくは結合部位またはVSI G8ポリペプチドは、アミノ酸スペーサーにより互いに結合している。

【0281】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、VSI G8ポリペプチドを含み、少なくとも1つの異種ポリペプチド、及び/もしくは結合部位またはVSI G8ポリペプチドは、十分な長さのアミノ酸残基のアミノ酸スペーサーにより互いに結合されるため、異なる部位が個々の標的に上手く結合することができる。

【0282】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、本明細書にて開示する、2~10個のVSI G8 ECDポリペプチドのいずれか、またはその断片を含む。

【0283】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、1つ以上のVSI G8ポリペプチド、及び、VSI G8ポリペプチドの断片ではないポリペプチドを任意で含む異種リンカーにより任意で中断される、少なくとも1つの異種ポリペプチドを含む。

10

20

30

40

50

【0284】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、5～50個のアミノ酸残基、より好ましくは5～25個のアミノ酸残基を含むペプチドであるリンカーを含む。

【0285】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、グリシン、セリン、及び/またはアラニン残基を含むか、これらから本質的になるリンカーを含む。

【0286】

いくつかの実施形態では、本発明に従ったV S I G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質は、5～50個、5～25個、5～15個、4～14個、4～12個、またはそれ以上のアミノ酸残基を含む、例えばグリシン、セリン及び/またはアラニン残基を含むか、またはこれらからなり得るリンカーを含む。

10

【0287】

ペプチドまたはポリペプチドリノードメイン

V S I G 8融合タンパク質は任意で、第2のポリペプチドからV S I G 8ポリペプチドを分離する、ペプチドまたはポリペプチドリノードメインを含有してよい。かかるリンカードメインの種々の非限定的例は、本明細書に記載されている。一実施形態では、リンカードメインは、免疫グロブリンのヒンジ領域を含有する。更なる実施形態において、ヒンジ領域はヒト免疫グロブリンに由来する。ヒンジが由来することができる好適なヒト免疫グロブリンとしては、I g G、I g D及びI g Aが挙げられる。更なる実施形態において、ヒンジ領域はヒトI g Gに由来する。免疫グロブリンヒンジ領域と他のドメインのアミノ酸配列は、当該技術分野において周知である。別の実施形態において、リンカードメインは任意で上述した免疫グロブリンのヒンジ領域を含有し、1つ以上の追加の免疫グロブリンドメインを更に含む。

20

【0288】

他の好適なペプチド/ポリペプチドリノードメインは任意で、天然、または非天然のペプチドまたはポリペプチドを含む。ペプチドリノード配列は、少なくとも長さが2個のアミノ酸である。任意で、ペプチドまたはポリペプチドドメインは、柔軟なペプチドまたはポリペプチドである。本明細書において、「柔軟なリンカー」とは、柔軟なリンカーの不存在下で結合した2つのポリペプチドよりも、結合した2つのポリペプチドの回転自由度を増加させるペプチド結合により結合する2つ以上のアミノ酸残基を含有するペプチドまたはポリペプチドを指す。かかる回転自由度により、柔軟なリンカーにより結合した2つ以上の抗原結合部位がそれぞれ、より効率的に標的抗原に接近することを可能にする。

30

【0289】

例示的な柔軟なペプチド/ポリペプチドとしては、アミノ酸配列G l y - S e r、G l y - S e r - G l y - S e r、A l a - S e r、G l y - G l y - G l y - S e r、G l y 4 - S e r、(G l y 4 - S e r) 2、(G l y 4 - S e r) 3、(G l y 4 - S e r) 4、[G l y 4 - S e t] 2、G l y - A l a - G l y - S e r - G l y 4 - S e r、G l y - (G l y 4 - S e r) 2、G l y 4 - S e r - G l y、G l y - S e r - G l y 2 and G l y - S e r - G l y 2 - S e rが挙げられるが、これらに限定されない。更なる柔軟なペプチド/ポリペプチド配列が、当該技術分野において周知である。他の好適なペプチドリノードメインとしては、任意で、タバコE t c hウイルスプロテアーゼにより認識される直線状エピトープである、T E VリンカーE N L Y F Q Gが挙げられる。例示的なペプチド/ポリペプチドとしては、G S E N L Y F Q G S G、及び、A l a - (G l u - A l a - A l a - A l a - L y s) n - A l a (n = 1 ~ 5)等のヘリックス形成リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。更なるヘリックス形成ペプチド/ポリペプチド配列が、当該技術分野において周知である。いくつかの任意の実施形態において、V S I G 8断片(例えばE C D断片)が互いに結合し(多量体)、かつ/または、1つ以上のV S I G 8断片(例えばE C D断片)が、ペプチドリノード、好ま

40

50

しくは「柔軟なリンカー」配列により、免疫グロブリンまたはその断片、特に、免疫グロブリン重鎖またはその断片等の異種ポリペプチドに結合する。リンカー配列は、V S I G 8断片及び異種ポリペプチド（免疫グロブリンポリペプチドまたはそのドメイン等）の効果的な配置を可能にすることで、両方の部位、及びそのドメインの機能活性を可能にする等である。ポリペプチド融合体を上手く提示することにより、細胞の活性を制御して、T細胞増殖を誘発もしくは阻害するか、または、特定の部位に対する免疫応答の開始もしくは阻害のいずれかを行うことができる。このことは、T細胞を培養してそれを増殖し、T細胞を本発明に従った融合ポリペプチド、またはそれを発現する細胞と接触させ、その後、融合ポリペプチドがT細胞増殖を促進するか阻害するかを評価する連続ステップを含む *in vitro* アッセイを含む、本明細書の以下で記載する適切なアッセイで決定することができる。

10

【0290】

本明細書で使用する場合、「異種ポリペプチド及びV S I G 8ポリペプチドの効果的な配置」という表現、または他の類似の表現は、V S I G 8ドメイン及び異種ポリペプチドドメインが、免疫または他の標的細胞（例えば、癌細胞または他のV S I G 8発現細胞）と相互作用し、免疫反応を開始もしくは阻害するか、または細胞の成長を阻害もしくは刺激することができるように、これらの部位のドメインが配置されることを意味することを意図している。

【0291】

V S I G 8 - I g 融合タンパク質に関して、リンカー配列は、F_cドメインとV S I G 8ドメインを効果的に配置して、各ドメインを機能的に活性化させるのもまた可能にするのが好ましい。ある特定の実施形態において、F_cドメインは効果的に配置され、適切な融合タンパク質複合体の形成、及び/または補体系の免疫細胞またはタンパク質上のF_c受容体との相互作用による、オプソニン作用、細胞溶解、肥満細胞・好塩基球及び好酸球の脱顆粒、及びF_c受容体依存性の他のプロセスを含む、F_cが仲立ちする効果の刺激；補体経路の活性化；並びに、融合タンパク質複合体の *in vivo* 半減期の向上を可能にする。

20

【0292】

リンカー配列は、本発明に従った融合タンパク質と共に上で論じている。リンカー配列を任意で使用して、生物学的に活性なポリペプチドの2つ以上のV S I G 8ポリペプチドを結合し、所望の機能活性を有する一本鎖分子を生成することができる。いくつかの好ましい実施形態においては、リンカー配列は、約5～20個のアミノ酸、より好ましくは約7または8～約16個のアミノ酸を含む。リンカー配列は、V S I G 8ポリペプチド、及びこれに結合した部位（例えば、1つの望ましくない構造の中のエフェクター分子）を保持しないように柔軟であるのが好ましい。リンカー配列を使用して、例えば、融合分子から認識部位を離間することができる。具体的には、ペプチドリンカー配列を、生物学的に活性なV S I G 8ポリペプチドとエフェクター分子の間に配置して、例えばこれらを化学的に架橋し、分子の柔軟性をもたらすことができる。いくつかの実施形態において、リンカーは主として、小さい側鎖を有するアミノ酸（グリシン、アラニン及びセリン等）を含み、柔軟性を提供する。リンカー配列の約80または90%、またはそれ以上が、グリシン、アラニンまたはセリン残基、特にグリシン及びセリン残基を含むのが好ましい。他の好適なリンカー配列としては、抗体可変領域を互いに上手く結合するために使用されている柔軟なリンカー設計が挙げられる（Whitlow, M. et al., (1991)

30

40

Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 97 - 105を参照のこと）。いくつかの実施例では、エフェクター分子をV S I G 8分子に共有結合するために、リンカーのアミノ配列は、V S I G 8ポリペプチドのC末端残基からエフェクター分子のN末端残基まで、好適な距離を置くことができる。好適なリンカー配列は、実験により速やかに同定することができる。加えて、リンカー配列の好適なサイズと配列は、融合ポリペプチドの予測サイズ及び形状に基づく、既知のコンピュータモデリング技術によってもまた決定することができる。

50

他のリンカー配列は、本発明に従った融合タンパク質と共に上で論じている。

【0293】

本明細書に記載したポリペプチドは、任意で互いに結合した2～20個のV S I G 8 E C Dポリペプチド断片を含む。任意で、断片には、V S I G 8ポリペプチドの断片ではないポリペプチドを任意で含む、異種リンカーが介在する。

【0294】

任意で、リンカーは、5～50個のアミノ酸残基、より好ましくは5～25個のアミノ酸残基を含むペプチドである。任意で、リンカーは、4～12個のグリシン、セリン及び/またはアラニン残基を含むか、これから本質的になるか、またはこれからなる。

【0295】

二量体化、多量体化及び標的化ドメイン

本明細書にて開示したV S I G 8融合タンパク質は、任意で、2つ以上の融合タンパク質を二量体化、オリゴマー化または多量体化するために機能する、二量体化または多量体化またはオリゴマー化ドメインを含有し、これらの融合タンパク質は、同じであっても異なってもよい(ヘテロ多量体またはホモ多量体)。例えば、V S I G 8融合タンパク質を、別のV S I G 8融合タンパク質または別の部位、例えば、別の共刺激融合タンパク質に結合してよい。融合タンパク質を二量体化または多量体化するために機能するドメインは個別のドメインとすることもでき、あるいは、融合タンパク質の他のドメイン(V S I G 8ポリペプチド、第2のポリペプチド、またはペプチド/ポリペプチドリノドメイン)の1つの中に含有することもできる。

【0296】

二量体化または多量体化は、二量体化または多量体化ドメインを介して、2つの融合タンパク質の間、または3つ以上の融合タンパク質の中に生じることができる。あるいは、融合タンパク質の二量体化または多量体化は、化学架橋により生じることができる。形成した二量体または多量体は、ホモ二量体/ホモ多量体、またはヘテロ二量体/ヘテロ多量体であることができる。V S I G 8融合ポリペプチド内の第2のポリペプチド「パートナー」は、任意の免疫グロブリン(I g)タンパク質またはその一部、好ましくは、F c領域、または、パピローマウイルスE 7遺伝子産物、黒色腫関連抗原(p 9 7)及びH I Vエンベロープタンパク質(g p 1 2 0)等の、生物学的もしくは化学的に活性なタンパク質の一部を含むがこれらに限定されない、本明細書に記載した1つ以上の他のタンパク質、タンパク質断片またはペプチドからなってもよい。「パートナー」は任意で、本明細書に記載した可溶性二量体/多量体、及び/または1つ以上の他の生物活性を提供するために選択される。

【0297】

「二量体化ドメイン」は、少なくとも2つのアミノ酸残基、または少なくとも2つの(同一もしくは異なるアミノ酸配列を有し得る)ペプチドもしくはポリペプチドの会合により形成される。ペプチドまたはポリペプチドは、共有及び/または非共有会合により相互作用してよい。任意の二量体化ドメインは、パートナー融合タンパク質のシステインと分子間ジスルフィド結合を形成できる、少なくとも1つのシステインを含有する。二量体化ドメインは、ジスルフィド結合をパートナー融合タンパク質間で形成することができるように、1つ以上のシステイン残基を含有することができる。一実施形態では、二量体化ドメインは、1、2、また3～約10個のシステイン残基を含有する。更なる実施形態において、二量体化ドメインは、免疫グロブリンのヒンジ領域である。

【0298】

更なる例示的な二量体化ドメインは、任意の当該技術分野において既知であることができ、コイルドコイル、酸パッチ、ジンクフィンガー、カルシウムハンド、C H 1 - C L対、米国特許第5, 8 2 1, 3 3 3号に記載されている、改変「ノブ」及び/もしくは「突出部」を有する「界面」、(例えば、j u n及び/またはf o sからの)ロイシンジッパー(米国特許第5, 9 3 2, 4 4 8号)、並びに/または酵母菌転写活性化因子G C N 4、S H 2(s r c 相同性2)、S H 3(s r c 相同性3)(V i d a l, e t a l, B

10

20

30

40

50

biochemistry, 43, 7336-44 ((2004)), ホスホチロシン結合 (PTB) (Zhou, et al, Nature, 378: 584-592 (1995)), WW (Sudol, Prog. Biochys. Mol Biol., 65: 113-132 (1996)) PDZ (Kim, et al, Nature, 378: 85-88 (1995); Komau, et al, Science, 269. 1737-1740 (1995)) 14-3-3、WD40 (Hu5 et al., / Biol Chem., 273: 33489-33494 (1998)) EH、Lim、イソロイシンジッパー、受容体二量体対 (例えばインターロイキン-8受容体 (IL-8R); 並びに LFA-I 及び GPIIb/IIIa 等のインテグリンヘテロ二量体)、またはこれらの二量体化領域、二量体リガンドポリペプチド (例えば、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、インターロイキン-8 (IL-8)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、VEGF-C、VEGF-D、PDGFメンバー)、並びに、脳由来の神経栄養因子 (BDNF) (Arakawa, et al., J Biol. Chem., 269(45): 27833-27839 (1994) 及び Radziejewski, et al, Biochem., 32(48): 1350 (1993)) が挙げられるが、これらに限定されず、また、親和性が変化したこれらのドメインの変異体とすることもできる。ポリペプチド対は、酵母菌ツーハイブリッドスクリーンを含む、当該技術分野において公知の方法により同定することができる。酵母菌 ツーハイブリッドスクリーンは、米国特許第 5, 283, 173 号及び 6, 562, 576 号に記載されている。相互作用するドメイン対間の親和性は、Katahira, et al., / Biol Chem, 277, 9242-9246 (2002)) に記載されているものを含む、当該技術分野において既知の方法を使用して測定することができる。あるいは、例えば WO 01/00814 に記載されている方法を使用して、ヘテロ二量体化に関してペプチド配列のライブラリーをスクリーニングすることができる。タンパク質-タンパク質の相互作用の有用な方法は、米国特許第 6, 790, 624 号にも記載されている。

【0299】

本明細書において言及される「多量体化ドメイン」または「オリゴマー化ドメイン」とは、3つ以上のペプチドまたはポリペプチドを、共有及び/または非共有結合を介して互いに相互作用させるドメインである。好適な多量体化またはオリゴマー化ドメインとしては、コイルドコイルドメインが挙げられるが、これに限定されない。コイルドコイルとは、通常は、7つのアミノ酸 (7塩基の繰り返し) または 11個のアミノ酸 (11塩基の繰り返し) の配列内に存在する、3~4残基離間した、主に疎水性残基の連続パターンを有するペプチド配列であり、これらがアセンブルし (折りたたまれて)、ヘリックスの多量体バンドルを形成する。3~4残基離間した、いくつかの不規則な分布を含む配列を有するコイルドコイルもまた、企図される。疎水性残基は特に、疎水性アミノ酸の Val、He、Leu、Met、Tyr、Phe 及び Trp である。「主に疎水性の」とは、少なくとも 50% の残基が、前述の疎水性アミノ酸から選択されなければならないことを意味する。

【0300】

コイルドコイルドメインは、ラミニンに由来してもよい。細胞外間隙において、ヘテロ三量体のコイルドコイルタンパク質であるラミニンは、基底膜の形成に重要な役割を果たす。多機能性オリゴマー構造が、ラミニン形成のために必要であるのは明白である。コイルドコイルドメインは、3つ (TSP-1 及び TSP-2) もしくは 5つ (TSP-3、TSP-4 及び TSP-5) の鎖が接続しているトロンボスポンジンから、または、平行の 5本鎖コイルドコイル (Malashkevich, et al., Science, 274: 761-765 (1996)) の中で折りたたまれる COMP (COMPcc) (Guo, et al., EMBO J, 1998, 17: 5265-5272) に由来してもよい。他のタンパク質に由来するコイルドコイルドメイン、及びポリペプチドの多量体化を仲立ちするドメインの更なる非限定的例が、当該技術分野において既知であり、例えば血管拡張薬刺激リンタンパク質 (VASP) ドメイン、マトリリン-1 (CMP)、

10

20

30

40

50

ウイルス性融合ペプチド、可溶性NSF（N-エチルマレイミド感受性因子）付着タンパク質受容体（SNARE）複合体、ロイシンリッチリピート、ある特定のtRNAシンセターゼが、開示した融合タンパク質での使用に好適である。

【0301】

別の実施形態において、VSI G 8ポリペプチド、融合タンパク質またはこれらの断片を誘発して、抗体等の第2の多価ポリペプチドに結合することにより、多量体を形成することができる。VSI G 8ポリペプチド、融合タンパク質、またはこれらの断片を多量体化するために使用するのに好適な抗体としては、IgM抗体、及び架橋した多価IgG、IgA、IgD、またはIgE複合体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0302】

二量体化または多量体化は、上述のものを含む二量体化または多量体化を介して、2つの融合タンパク質間で、または3つ以上の融合タンパク質の中で生じることができる。あるいは、融合タンパク質の二量体化または多量体化は、化学架橋により生じることができる。融合タンパク質二量体は、ホモ二量体またはヘテロ二量体であることができる。融合タンパク質多量体は、ホモ多量体またはヘテロ多量体であることができる。

【0303】

本明細書にて開示する融合タンパク質二量体は、式II：

N - R 1 - R 2 - R 3 - C

N - R 4 - R 5 - R 6 - C、を有するか、あるいは、式III：

N - R 1 - R 2 - R 3 - C

C - R 4 - R 5 - R 6 - Nを有し、式中、式IIで提供される二量体の融合タンパク質は、平行に配向しているものと規定され、式IIIで提供される二量体の融合タンパク質は、逆平行に配向しているものと規定される。平行及び逆平行二量体はそれぞれ、シス及びトランス二量体ともまた呼ばれる。「N」と「C」はそれぞれ、融合タンパク質のN及びC末端を表す。融合タンパク質の成分「R1」、「R2」及び「R3」は、式Iに関して上述のとおりである。式IIと式IIIの両方に関して、「R4」はVSI G 8ポリペプチドまたは第2のポリペプチドであり、「R5」は任意のペプチド/ポリペプチドリンカードメインであり、「R6」はVSI G 8ポリペプチドまたは第2のポリペプチドであり、ここで、「R4」が第2のポリペプチドである場合、「R6」はVSI G 8ポリペプチドであり、「R4」がVSI G 8ポリペプチドである場合、「R6」は第2のポリペプチドである。一実施形態では、「R1」はVSI G 8ポリペプチドであり、「R4」もまたVSI G 8ポリペプチドであり、かつ、「R3」及び「R6」は共に第2のポリペプチドである。

【0304】

式IIの融合タンパク質二量体は、「R1」=「R4」、「R2」=「R5」、かつ「R3」=「R6」である場合にホモ二量体と定義される。同様に、式IIIの融合タンパク質二量体は、「R1」=「R6」、「R2」=「R5」、及び「R3」=「R4」である場合にホモ二量体と定義される。これらの条件がいかなる理由によっても満たされない場合に、融合タンパク質二量体はヘテロ二量体と定義される。例えば、ヘテロ二量体は、これらの条件を満たす（即ち、式IIの二量体に関して、「R1」及び「R4」は共にVSI G 8ポリペプチドであり、「R2」及び「R5」は共にペプチド/ポリペプチドリンカードメインであり、かつ、「R3」及び「R6」は共に第2のポリペプチドである）ドメイン配向を含有してよいが、これらのドメインの1つ以上の種は同一ではない。例えば、「R3」及び「R6」が共にVSI G 8ポリペプチドであってよいが、あるポリペプチドは野生型VSI G 8アミノ酸配列を含有してよく、一方で、他のポリペプチドは変異型VSI G 8ポリペプチドであってよい。例示的な変異VSI G 8ポリペプチドは、標的細胞への結合が増減し、免疫細胞での活性が増大し、半減期または安定性が増減するように改変されたVSI G 8ポリペプチドである。ポリペプチドリンカードメインの一部として、免疫グロブリンのCH1またはCL領域のいずれかを含有する融合タンパク質の二量体は、ヘテロ二量体を形成することが好ましく、ここで、二量体の1つの融合タンパク質は

10

20

30

40

50

C H 1 領域を含有し、二量体の他の融合タンパク質はC L 領域を含有する。

【0305】

融合タンパク質を使用して、多量体を形成することもまた可能である。二量体と同様に、多量体は平行多量体であってよく、ここにおいては、多量体の全ての融合タンパク質がN及びC末端に対して同一方向に配置されている。多量体は逆平行多量体であってよく、ここにおいては、多量体の融合タンパク質は代わりに、N及びC末端に対して反対方向に配置されている。多量体（平行または逆平行）は、ホモ多量体またはヘテロ多量体のいずれかであることができる。融合タンパク質は任意で二量体形態で作製され、より好ましくは、融合は、2つ（またはそれ以上の）タンパク質、タンパク質の一部、及び/またはペプチドに対応するポリヌクレオチド配列を結合することにより、結合した、または融合したタンパク質が、結合したポリヌクレオチド配列に関する細胞により作製されるように、後述するように遺伝子レベルで行われる。かかる融合タンパク質の調製についての記述は、米国特許第5,851,795号(Linsley et al, .)に記載されており、これは非限定的例のみとして、本明細書に全体が記載されているかのように参照として本明細書に組み込まれている。

10

標的化ドメイン

【0306】

V S I G 8 ポリペプチド及び融合タンパク質は、標的化ドメインを含有し、体内の特定の部位に分子を標的化することができる。任意の標的化ドメインが、炎症領域に分子を標的化する。例示的な標的化ドメインは、I L 17、I L - 4、I L - 6、I L - 12、I L - 21、I L - 22、I L - 23、M I F、T N F - a、及びT N F - 、並びにこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない、炎症組織、または炎症性サイトカインに対して特異的な抗体またはその抗原結合断片である。多発性硬化症等の神経疾患の場合、標的化ドメインは分子を、C N S に対して標的化し得るか、または血管上皮にてV C A M - I に結合し得る。追加の標的化ドメインは、炎症性分子に対して特異的なペプチドアプタマーであることができる。別の実施形態において、V S I G 8 融合タンパク質は、免疫細胞（例えばT細胞）の表面上に提示されるポリペプチドに対して特異的な結合パートナーを含むことができる。更に別の実施形態では、標的化ドメインは、活性化免疫細胞を特異的に標的とする。標的化される任意の免疫細胞としては、T h 0、T h 1、T h 17、T h 2 及びT h 2 2 T細胞、I L - I 、T N F - 、T G F - 、I F N - 、I L - 17、I L - 6、I L - 23、I L - 22、I L - 21、及びM M P を含むがこれらに限定されない炎症性分子を分泌する他の細胞、または、他の細胞にこれらの炎症性分子を分泌させる他の細胞並びにT r e g が挙げられる。例えば、T r e g に対する標的化ドメインは、C D 25 に特異的に結合してよい。

20

30

【0307】

本発明に従ったV S I G 8 ポリペプチドまたは融合タンパク質内で任意で結合、またはこの中に含有され得る、他の標的化部位または異種ポリペプチドは、本発明に従った例示的な融合タンパク質の合成と共に上で論じられている。

【0308】

上記の変化は、任意の変化の単なる解説を意図するものであり、いかなる方法においても限定を行うことを意図するものではない。更に、上記説明は説明目的のために提供され、単一の仮説により束縛されることを望まない。

40

【0309】

基の付加

本発明に従ったタンパク質が直鎖分子である場合、化学修飾を受けやすい、または化学修飾に好適な直鎖分子の種々の箇所において、種々の官能基を配置することが可能である。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったタンパク質の直鎖形態の末端に、官能基を付加することができる。いくつかの実施形態において、官能基は、安定性の改善、（細胞膜及び/または組織バリアを経由する）貫通、組織の局在性、効力、クリアランスの低下、毒性の低下、選択性の改善、細胞ポンプによる排除に対する耐性の改善を含むがこ

50

れらに限定されない1つ以上の特徴に関するタンパク質の活性を改善する。便宜上、または、理論に束縛されるものではなく、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った組成物中に含有される配列の1つの遊離N末端は、組成物のN末端と称され、配列の遊離C末端は、組成物のC末端とみなされる。配列のC末端もしくはN末端のいずれか、または両方はそれぞれ、カルボン酸官能基またはアミン官能基に結合することができる。

【0310】

好適な官能基の非限定的例は、Green and Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, (1991)に記載されており、その教示は参照により本明細書に組み込まれる。好ましい保護基は、例えば、活性成分の親水性を低下させ、親油性を増加させることにより、結合した活性成分の細胞内への運搬を促進するものであり、例えば、「細胞膜をまたぐ運搬のための部位」である。

10

【0311】

これらの部位は任意で、そして好ましくは、細胞内で加水分解または酵素のいずれかにより *in vivo* で切断することができる (Ditter et al., / . Pharm Sci. 57: 783 (1968); Ditter et al., J. Pharm. Sci. 57: 828 (1968); Ditter et al., / . Pharm. Sci. 58: 557 (1969); King et al., Biochemistry 26: 2294 (1987); Lindberg et al., Drug Metabolism and Disposition 17: 311 (1989); 及び Tunek et al., Biochem. Pharm. 37: 3867 (1988), Anderson et al., Arch. Biochem. Biophys. 239: 538 (1985) and Singhal et al., FASEB J. 1: 220 (1987))。

20

【0312】

ヒドロキシル保護基としては、エステル、カーボネート及びカルバメート保護基が挙げられる。アミン保護基としては、上でN末端保護基について記載したように、アルコキシ及びアリアルオキシカルボニル基が挙げられる。カルボン酸保護基としては、上でC末端保護基について記載したように、脂肪族、ベンジル及びアリアルエステルが挙げられる。一実施形態では、本発明の組成物中の、1つ以上のグルタミン酸またはアスパラギン酸残基の側鎖内のカルボン酸基は、好ましくはメチル、エチル、ベンジルまたは置換ベンジルエステル、より好ましくはベンジルエステルにより保護される。

30

【0313】

N末端保護基の非限定的実例としては、アシル基(-CO-R1)及びアルコキシカルボニルまたはアリアルオキシカルボニル基(-CO-O-R1)が挙げられ、式中、R1は脂肪族、置換脂肪族、ベンジル、置換ベンジル、芳香族または置換芳香族基である。アシル基の具体例としては、アセチル、(エチル)-CO-、n-プロピル-CO-、イソプロピル-CO-、n-ブチル-CO-、sec-ブチル-CO-、t-ブチル-CO-、ヘキシル、ラウロイル、パルミトイル、ミリストイル、ステアリル、オレオイル、フェニル-CO-、置換フェニル-CO-、ベンジル-CO-、及び(置換ベンジル)-CO-が挙げられるが、これらに限定されない。アルコキシカルボニル及びアリアルオキシカルボニル基の例としては、CH₃-O-CO-、(エチル)-O-CO-、n-プロピル-O-CO-、イソプロピル-O-CO-、n-ブチル-O-CO-、sec-ブチル-O-CO-、t-ブチル-O-CO-、フェニル-O-CO-、置換フェニル-O-CO-、及びベンジル-O-CO-、(置換ベンジル)-O-CO-、アダマンタン、ナフタレン(naphthalen)、ミリストレイル、トルエン(toluen)、ピフェニル、シンナモイル、ニトロベンゾイル(nitrobenzoy)、トルオイル、フロイル、ベンゾイル、シクロヘキサン、ノルボルナン、またはZ-カプロン(caproic)が挙げられる。Nアシル化を促進するために、分子のN末端に、1~4個のグリシン残基が存在することができる。

40

50

【0314】

例えば、アミド（即ち、C末端のヒドロキシル基が -NH₂、-NHR₂ 及び -NR₂R₃ で置換されている）、またはエステル（即ち、C末端のヒドロキシル基が -OR₂ で置換されている）を含むがこれらに限定されない基により、化合物のC末端のカルボキシル基を保護することができる。R₂ 及び R₃ は任意で、独立して脂肪族、置換脂肪族、ベンジル、置換ベンジル、アリールまたは置換アリール基である。加えて、窒素原子と共に、R₂ 及び R₃ は任意で、窒素、酸素、または硫黄等の、約0～2個の更なるヘテロ原子を有するC₄～C₈複素環を形成することができる。好適な複素環の好適な非限定例としては、ピペリジニル、ピロリジニル、モルホリノ、チオモルホリノまたはピペラジニルが挙げられる。C末端保護基の例としては、-NH₂、-NHCH₃、-N(CH₃)₂、-NH(エチル)、-N(エチル)₂、-N(メチル)(エチル)、-NH(ベンジル)、-N(C₁-C₄アルキル)(ベンジル)、-NH(フェニル)、-N(C₁-C₄アルキル)(フェニル)、-OCH₃-O-(エチル)、-O-(n-プロピル)、-O-(n-ブチル)、-O-(イソプロピル)、-O-(sec-ブチル)、-O-(t-ブチル)、-O-ベンジル及び-O-フェニルが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0315】

ペプチド模倣部位による置換

「ペプチド模倣有機部位」を任意で、保存的及び非保存的置換の両方として、本発明の組成物中のアミノ酸残基と置換することができる。これらの部位は「非天然アミノ酸」とも呼ばれ、アミノ酸残基、アミノ酸を任意で置き換えてよいし、または、欠失したアミノ酸の代わりに、ペプチド内でスペーサー基として作用してよい。ペプチド模倣有機部位は任意で、そして好ましくは、置換されたアミノ酸に類似の立体的、電気的または構造的性質を有し、かかるペプチド模倣物を使用して必要な位置におけるアミノ酸を置換し、これらは保存的置換と考えられる。しかし、かかる類似性は必ずしも必要ではない。本発明の好ましい施形態に従うと、組成物が、本発明に従った天然タンパク質と比較して少なくとも生理学的活性を実質的に保持するように、1つ以上のペプチド模倣物が選択される。

20

【0316】

ペプチド模倣物を任意で使用して、酵素または他の分解プロセスによる、ペプチドの分解を阻害してよい。ペプチド模倣物は任意で、そして好ましくは、有機合成技術により作製することができる。好適なペプチド模倣物の非限定例としては、対応するLアミノ酸のDアミノ酸、テトラゾール(Zabrocki et al., / . Am. Chem. Soc. 110: 5875 - 5880 (1988)); アミド結合のアイソスター(Jones et al., Tetrahedron Lett. 29: 3853 - 3856 (1988)); LL-3-アミノ-2-プロペニドン-6-カルボン酸(LL-Acp)(Kemp et al., J. Org. Chem. 50: 5834 - 5838 (1985))が挙げられる。同様の類似体は、Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 5081 - 5082 (1988)、並びにKemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 5057 - 5060 (1988)、Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 4935 - 4938 (1988)及びKemp et al., / . Org. Chem. 54: 109 - 115 (1987)に示されている。好適で例示的な他のペプチド模倣物は、Nagai and Sato, Tetrahedron Lett. 26: 647 - 650 (1985); Di Maio et al., / . Chem. Soc. Perkin Trans., 1687 (1985); Kahn et al., Tetrahedron Lett. 30: 2317 (1989); Olson et al., / . Am. Chem. Soc. 112: 323 - 333 (1990); 及びGarvey et al., J. Org. Chem. 56: 436 (1990)に示されている。更に好適な例示的ペプチド模倣物としては、ヒドロキシ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン3-カルボキシレート(Miyake et al., / . Takeda Res. Labs 43: 53 - 76 (1989)); 1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボキシレ

30

40

50

ート (Kazmierski et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 2275-2283 (1991)); ヒスチジンイソキノロンカルボン酸 (HIC) (Zechel et al., Int. J. Pep. Protein Res. 43 (1991)); (2S, S)-メチル-フェニルアラニン、(2S, 3R)-メチル-フェニルアラニン、(2R, 3S)-メチル-フェニルアラニン及び(2R, 3R)-メチル-フェニルアラニン (Kazmierski and Hruby, Tetrahedron Lett. (1991)) が挙げられる。

【0317】

例示的、実例的で非限定的な非天然アミノ酸としては、アミノ酸 (3及び2)、ホモアミノ酸、環状アミノ酸、芳香族アミノ酸、Pro及びPyr誘導体、3置換アラニン誘導体、グリシン誘導体、環置換Phe及びTyr誘導体、直鎖コアアミノ酸またはジアミノ酸が挙げられる。これらは、Sigma-Aldrich (USA) 等の種々の供給者から入手可能である。

10

【0318】

タンパク質の化学修飾

本発明では、少なくともいくつかの実施形態に従い、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったタンパク質の任意の部分を任意で化学修飾、即ち、官能基の付加により変更してよい。例えば、天然の配列に現れる側鎖のアミノ酸残基を、任意で修飾してよいが、以下に記載するように、代わりに、タンパク質の他の部分を、側鎖アミノ酸残基に加えて、またはその代わりに、任意で修飾してよい。化学合成プロセスが続く場合、修飾は任意で、例えば、化学修飾したアミノ酸を付加することにより、分子の合成中に行われてもよい。しかし、既に分子内に存在する場合、アミノ酸の化学修飾 (「in situ」修飾) もまた可能である。

20

【0319】

分子の配列領域のいずれかのアミノ酸は任意で、(「化学修飾した」と概念的に考えられるペプチドにおける) 以下の例示的な種類の修飾のいずれか1つに従って修飾することができる。修飾の非限定的で例示的な種類としては、カルボキシメチル化、アシル化、リン酸化、グリコシル化または脂肪族アシル化が挙げられる。エーテル結合を任意で使用して、セリンまたはスレオニンヒドロキシル基を、糖のヒドロキシル基に結合することができる。アミド結合を任意で使用して、グルタメートまたはアスパルテートのカルボキシル基を、糖のアミノ基に結合することができる (Garg and Jeanloz, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 43, Academic Press (1985); Kunz, Ang. Chem. Int. Ed. English 26: 294-308 (1987))。アセタール及びケタール結合もまた任意で、アミノ酸と糖質の間に形成することができる。例えば遊離アミノ基 (例えばリジン) のアシル化により、脂肪酸アシル誘導体を作製することができる (Toth et al., Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Rivier and Marshall, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990))。

30

40

【0320】

本明細書で使用する場合、「化学修飾」という用語は、本発明に従ったタンパク質またはペプチドに言及する場合、アミノ酸残基のうち少なくとも1つが、プロセッシングもしくは他の翻訳後修飾といった自然プロセス、または当該技術分野において既知の化学修飾技術のいずれかにより修飾されるタンパク質またはペプチドを指す。多数の既知の修飾の例としては、アセチル化、アシル化、アミド化、ADPリボシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、メチル化、ミリストイル化、PEG化、プレニル化、リン酸化、ユビキチン化、または任意の同様のプロセスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0321】

50

他の種類の修飾としては、任意で、本明細書に全体が記載されているかのように参考として本明細書に組み込まれる、PCT国際公開特許第2006/050262号に記載されているように、タンパク質等の生物学的分子への、シクロアルカン部位の付加が挙げられる。生体分子と共に用いるためにこれらの部位を設計し、また、任意でこれらを使用して、タンパク質に種々の性質を付与してよい。

【0322】

更に、任意で、タンパク質の任意の箇所を修飾してよい。例えば、本明細書に全体が記載されているかのように参考として本明細書に組み込まれる、国際公開特許第2006/050247号に記載されているように、タンパク質のグリコシル化部位のPEG化を行ってよい。1つ以上のポリエチレングリコール(PEG)基を任意で、O結合及び/またはN結合グリコシル化に加えてよい。PEG基は任意で、分岐状または直鎖状であってよい。任意で、任意の種類の水溶性ポリマーを、グリコシルリンカーを介して、タンパク質のグリコシル化部位に結合させてよい。

10

【0323】

改変グリコシル化

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったタンパク質を修飾して、改変グリコシル化パターンを有するようにしてよい(即ち、元または天然のグリコシル化パターンから変化してよい)。本明細書で使用する場合、「改変」とは、1つ以上の炭水化物部位を欠失すること、及び/または元のタンパク質に少なくとも1つのグリコシル化部位が付加していることを意味する。タンパク質のグリコシル化は通常、N結合またはO結合のいずれかである。N結合とは、炭水化物部位をアスパラギン残基の側鎖に結合することを指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン、及びアスパラギン-X-スレオニン(Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である)は、炭水化物部位がアスパラギン側鎖に、酵素により結合させるための認識配列である。したがって、ポリペプチド内にこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在することにより、潜在的なグリコシル化部位が作製される。O結合グリコシル化とは、糖類であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの、ヒドロキシアミノ酸(最も一般的にはセリンまたはスレオニン)への結合を意味するが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンを使用してもよい。

20

【0324】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったタンパク質への、グリコシル化部位の付加は、(N結合グリコシル化部位に関して)タンパク質のアミノ酸配列を、上述のトリペプチド配列の1つ以上を含有するように変化させることにより便利に行われる。改変はまた、(O結合グリコシル化部位に関して)元のタンパク質の配列内に1つ以上のセリンまたはスレオニン残基を付加することにより、またはこれにより置換することにより行ってもよい。タンパク質のアミノ酸配列はまた、DNAレベルで変化を導入することにより、改変することができる。

30

【0325】

タンパク質の炭水化物部位の数を増加させる別の手段は、グリコシドをタンパク質のアミノ酸残基に、化学的または酵素的に結合させることによるものである。使用する結合形態に応じて、糖を、(a)アルギニン及びヒスチジン、(b)遊離カルボキシル基、(c)システインにあるもの等の、遊離スルフヒドリル基、(d)セリン、スレオニンもしくはヒドロキシプロリンにあるもの等の、遊離ヒドロキシル基(e)フェニルアラニン、チロシンもしくはトリプトファンにあるもの等の芳香族残基、または(f)グルタミンのアミド基に結合してよい。これらの方法は、WO87/05330、及びApplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 22:259-306(1981)に記載されている。

40

【0326】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったタンパク質に存在する、任意の炭水化物部位の除去は、化学的または酵素的に行ってよい。化学的脱グリコシル化には、タンバ

50

ク質をトリフルオロメタンスルホン酸、または同等の化合物に曝露することを必要とする。この処理により、結合した糖類（N - アセチルグルコサミンまたはN - アセチルガラクトサミン）を除いて、アミノ酸配列をインタクトなままにしながら、大部分または全ての糖類の切断がもたらされる。

【0327】

化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987); 及び Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981) により説明されている。タンパク質の炭水化物部位の酵素切断は、Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987) に記載されているように、種々のエンドおよびエクソグリコシダーゼを使用することにより行うことができる。

10

【0328】

抗体をコードする核酸分子

本発明は更に、本発明に従った抗V S I G 8抗体、またはその断片もしくはコンジュゲートをコードする核酸を提供する。核酸は、全細胞中、細胞可溶化物中、または部分的に精製された、もしくは実質的に純粋な形態で存在してよい。核酸は、アルカリ性/SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動及び他の当該技術分野において周知の方法等の標準的な技術により、他の細胞成分または他の汚染物質（例えば他の細胞核酸またはタンパク質）から精製した場合に、「単離されている」か、または「実質的に純粋となっている」。F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照のこと。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った核酸は例えば、DNAまたはRNAであることができ、かつ、イントロン配列を含有しても含有しなくてもよい。好ましい実施形態では、核酸はcDNA分子である。

20

【0329】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った核酸は、標準的な分子生物学的技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマ（例えば、以下に更に詳細を記載するヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスから調製したハイブリドーマ）により発現した抗体に関して、ハイブリドーマにより作製した、抗体の軽鎖及び重鎖をコードするcDNAは、標準的なPCR増幅またはcDNAクローン作成技術により得ることができる。（例えば、ファージディスプレイ技術を使用して）入手した抗体に関して、抗体をコードする核酸をライブラリーから回収してよい。

30

【0330】

V_H及びV_LセグメントをコードするDNA断片が得られると、これらのDNA断片を更に、例えば、可変領域遺伝子を完全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子またはscFv遺伝子に転換する標準的な組み換えDNA技術により操作することができる。これらの操作において、V_LまたはV_HコーディングDNA断片は、抗体定常領域または柔軟なリンカー等の、別のタンパク質をコードする別のDNA断片に作用可能に結合する。先に規定したように、「作用可能に結合した」とは、2つのDNA断片によりコードされたアミノ酸配列がインフレームのままとなるように、2つのDNA断片が結合することを意味する。

40

【0331】

V_HコーディングDNAを、重鎖定常領域（CH1、CH2及びCH3）をコードする別のDNA分子に作用可能に結合することにより、V_H領域をコードする単離DNAを完全長重鎖遺伝子に転換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野において既知であり（例えば、Kabata, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N

50

o. 91-3242を参照)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMまたはIgD定常領域であることができるが、IgG1、IgG2またはIgG4定常領域が最も好ましい。Fab断片重鎖遺伝子に関して、VHコーディングDNAは、重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に作用可能に結合することができる。

【0332】

VLコーディングDNAを、軽鎖定常領域(CL)をコードする別のDNA分子に作用可能に結合することにより、VL領域をコードする単離DNAを完全長軽鎖遺伝子(及びFab軽鎖遺伝子)に転換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において既知であり(例えば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅により得ることができる。軽鎖定常領域は または 定常領域であることができるが、 は定常領域であるのが最も好ましい。

10

【0333】

scFv遺伝子を作製するために、VR及びVLコーディングDNA断片は、柔軟なリンカーによりVL及びVH領域が結合すると、VH及びVL配列が連続的に一本鎖タンパク質として発現できるように、柔軟なリンカーをコードする、例えば、アミノ酸配列(Gly4-Ser)3をコードする別の断片に作用可能に結合する(例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554を参照のこと)。

20

【0334】

抗VSI8モノクローナル抗体の作製

本発明に従った抗VSI8モノクローナル抗体(mAb)及び抗原結合断片は、従来のモノクローナル抗体技術、例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495の、標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む様々な技術により作製することができる。体細胞のハイブリダイゼーション方法が好ましいが、原則として、モノクローナル抗体を作製するための他の方法(例えば、Bリンパ球のウイルスまたは発癌性形質転換)を使用することができる。

30

【0335】

ハイブリドーマを産生するための好ましい動物系は、マウス系である。マウスにおけるハイブリドーマの産生は、非常によく確立された方法である。融合のために免疫付与した脾細胞の単離のための、免疫付与プロトコール及び技術は、当技術分野において既知である。融合パートナー(例えばマウス骨髄腫細胞)及び融合手順もまた、知られている。本発明のキメラまたはヒト化抗体は、上述のように調製したマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖及び軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAを、標準的な分子生物学的技術を使用して、対象のマウスハイブリドーマから得て、改変をして非マウス(例えばヒト)免疫グロブリン配列を得ることができる。例えば、キメラ抗体を作製するために、当該技術分野において公知の方法を使用して、マウス可変領域をヒト定常領域に結合することができる(例えば、米国特許第4,816,567(Cabilly et al.)を参照)。ヒト化抗体を作製するために、当該技術分野において既知の方法を使用してマウスCDR領域をヒトフレームワークに挿入することができる(例えば、米国特許第5,225,539号(Winter)及び米国特許番号第5,530,101号;同第5,585,089号;同第5,693,762号、及び同第6,180,370号(Queen et al.)を参照)。

40

50

【0336】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、抗体はヒトモノクローナル抗体である。V S I G 8 に対して向けられるかかるヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなく、ヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックまたはトランスクロモソミックマウスを使用して生成することができる。これらのトランスジェニック及びトランスクロモソミックマウスとしては、それぞれHuMAbマウス(商標)及びKMマウス(商標)として本明細書で呼ばれるマウスが挙げられ、また、合わせて「ヒトIgマウス」と本明細書では呼ばれる。HuMAbマウス(商標)(Medarex Inc.)は、内因性 μ 及び鎖遺伝子座を不活性化する標的化変異と共に、非再配列ヒト μ 及び重鎖、並びに軽鎖免疫グロブリン配列をコードする、ヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含有する(例えば、Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474) : 856 - 859を参照)。したがって、マウスは、低下したマウスIgMまたはの発現を示し、免疫付与に対応して、導入したヒト重鎖及び軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチ変更と体細胞突然変異を受けて、高親和性のヒトIgGモノクローナル抗体を生成する(上述のLonberg, N. et al. (1994); Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49 - 101; Lonberg, N. 及びHuszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65 - 93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764: 536 - 546に概説される)。HuMAbマウスRTMの調製及び使用、並びに、かかるマウスが有するゲノム改変は更に、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287 - 6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647 - 656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720 - 3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4: 117 - 123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821 - 830; Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152: 2912 - 2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579 - 591; and Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845 - 851に記載されており、これらの内容全ては、それら全体が本明細書に明確に組み込まれる。米国特許第5,545,806号;同第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,789,650号;同第5,877,397号;同第5,661,016号;同第5,814,318号;同第5,874,299号;及び同第5,770,429号;(全てLonberg及びKay);米国特許第5,545,807号(Surani et al.);国際公開第92/03918号、同第93/12227号、同第94/25585号、同第97/13852号、同第98/24884号及び同第99/45962号(及びLonberg及びKay);並びに国際公開第01/14424号(Korman et al.)を更に参照のこと。

【0337】

別の実施形態において、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったヒト抗体は、導入遺伝子及び導入染色体にヒト免疫グロブリン配列を有するマウス、例えば、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入染色体を有するマウスを使用して産生することができる。「KMマウス(商標)」と呼ばれるかかるマウスは、国際公開第02/43478号(Ishida et al.)に詳細に記載されている。

【0338】

また更に、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する他のトランスジェニック動物が当該技術分野において入手可能であり、これを使用して、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗V S I G 8抗体を産生することができる。例えば、代替のXenomous

10

20

30

40

50

e (Abgenix , Inc .) と呼ばれるトランスジェニック系を使用することができる。かかるマウスは例えば、Kucherlapati et al . の米国特許第 5 , 939 , 598 号 ; 同第 6 , 075 , 181 号 ; 同第 6 , 114 , 598 号 ; 同第 6 , 150 , 584 号、及び同第 6 , 162 , 963 号に記載されている。

【0339】

更に、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替のトランスクロモソミック動物系が当該技術分野において入手可能であり、これを使用して、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗 V S I G 8 抗体を産生することができる。例えば、「TCマウス」と呼ばれる、ヒト重鎖導入染色体及びヒト軽鎖導入染色体の両方を有するマウスを使用することができる。かかるマウスは、Tomizuka et al . (2000) Proc . Natl . Acad Sci . USA 97 : 722 - 727 に記載されている。更に、ヒト重鎖及び軽鎖導入染色体を有するウシが当該技術分野において説明されており (Kuroiwa et al . (2002) Nature Biotechnology 20 : 889 - 894)、これを使用して、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗 V S I G 8 抗体を産生することができる。

10

【0340】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用してもまた調製することができる。ヒト抗体を単離するためのかかるファージディスプレイ法が、当該技術分野において確立されている。例えば、米国特許第 5 , 223 , 409 号 ; 同第 5 , 403 , 484 号 ; 及び同第 5 , 571 , 698 号 (Ladner et al .) ; 米国特許第 5 , 427 , 908 号及び同第 5 , 580 , 717 号 (Dower et al .) ; 米国特許第 5 , 969 , 108 号及び同第 6 , 172 , 197 号 (McCafferty et al .) ; 並びに米国特許第 5 , 885 , 793 号 ; 同第 6 , 521 , 404 号 ; 同第 6 , 544 , 731 号 ; 同第 6 , 555 , 313 号 ; 同第 6 , 582 , 915 号及び同第 6 , 593 , 081 号 (Griffiths et al .) を参照のこと。

20

【0341】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったヒトモノクローナル抗体は、免疫付与によりヒト抗体応答が生み出されるようにヒト免疫細胞が再構成された S C I D マウスを使用してもまた調製することができる。かかるマウスは、例えば米国特許第 5 , 476 , 996 号及び同第 5 , 698 , 767 号 (Wilson et al .) に記載されている。

30

【0342】

ヒト I g マウスの免疫付与

いくつかの実施形態では、ヒト I g マウスを使用して、例えば Lonberg , N . et al . (1994) Nature 368 (6474) : 856 - 859 ; Fishwild , D . et al . (1996) Nature Biotechnology 14 : 845 - 851 ; 並びに国際特許第 98 / 24884 号、及び同第 01 / 14424 号に記載されているように、かかるマウスに、V S I G 8 抗原及び / もしくは組み換え V S I G 8、または V S I G 8 融合タンパク質の精製調製物または濃縮調製物を免疫付与することにより、本発明に従ったヒト抗 V S I G 8 抗体を産生する。マウスは、第 1 の注射の際に週齢 6 ~ 16 であることが好ましい。例えば、V S I G 8 抗原の精製または組み換え調製物 (5 ~ 50 µ g) を使用して、ヒト I g マウスを腹腔内で免疫付与することができる。

40

【0343】

一般に、トランスジェニックマウスは、完全フロイントアジュバント内の抗原を最初に腹腔内 (I P) で免疫付与し、続いて、不完全フロイントアジュバント内の抗原を隔週で I P 免疫付与 (最大、合計で 6 週) する際に応答する。しかし、フロイントアジュバント以外のアジュバントも効果的であることもまた、見出されている。更に、アジュバントが

50

ない状態の全細胞は、非常に免疫原性であることが見出されている。後眼窩静脈叢からの採血により得た血漿試料を用いて、免疫付与プロトコルの過程にわたって免疫応答を監視することができる。血漿を（後述のように）ELISAによりスクリーニングすることができ、抗VSI G 8ヒト免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスを融合に使用することができる。マウスに抗原を、犠牲にして脾臓を取り除く3日前に、静脈内で追加免疫することができる。各免疫付与に関して、2～3回の融合を実施することが必要な場合があることが予想された。6～24匹のマウスが通常、各抗原に対して免疫付与される。HC o 7とHC o 12株の両方を通常使用する。更に、HC o 7とHC o 12導入遺伝子の両方を合わせて、2つの異なるヒト重鎖導入遺伝子（HC o 7 / HC o 12）を有する1匹のマウスに入れることができる。あるいは、または更に、KMマウス（商標）株を使用することができる。

10

【0344】

ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

ある特定の実施形態において、本発明に従ったヒトモノクローナル抗VSI G 8抗体を産生するハイブリドーマを、脾細胞を使用して生成してよく、かつ/または、免疫付与したマウスのリンパ節細胞を単離して、マウス骨髄腫細胞株等の適切な不死化細胞株に融合することができる。得られるハイブリドーマを、抗原特異的抗体の産生のためにスクリーニングすることができる。例えば、免疫付与したマウスの脾臓リンパ球の単一の細胞懸濁液を、50%PEGを含む、P3X63-Ag8.653非分泌マウス骨髄腫細胞（ATCC, CRL 1580）の6分の1の数に融合することができる。細胞を約 2×10^5 で平底マイクロタイタープレートに配置し、続いて、20%胎児クローン血清、18%「653」調整培地、5%オリゲン（origen）（IGEN）、4mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、5mMのHEPES、0.055mMの2-メルカプトエタノール、50ユニット/mLのペニシリン、50mg/mLのストレプトマイシン、50mg/mLのゲンタマイシン、及びIX HAT（Sigma；HATは融合の24時間後に加える）を含有する選択培地で2週間インキュベーションする。約2週間後に、HATをHTで置き換えた培地内で細胞を培養することができる。次に、ヒトモノクローナルIgM及びIgG抗体用のELISAにより個々のウェルをスクリーニングすることができる。広範にわたりハイブリドーマの増殖が発生すると、培地は通常、10～14日後に観察することができる。抗体を分泌するハイブリドーマを再びプレートに配置して、もう一度スクリーニングすることができ、依然としてヒトIgGに対して陽性である場合、モノクローナル抗体を限界希釈により、少なくとも2回サブクロニングすることができる。次に、安定したサブクローンを*in vitro*で培養して、性質決定のために組織培地内で少量の抗体を生成することができる。

20

30

【0345】

ヒトモノクローナル抗体を精製するために、選択したハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製の2リットルのスピナーフラスコ内で増殖することができる。プロテインAセファロース（Pharmacia, Piscataway, N.J.）を用いた親和性クロマトグラフィーの前に、上清を濾過して濃縮することができる。純度を確保するために、溶出したIgGをゲル電気泳動と高速液体クロマトグラフィーにより確認することができる。緩衝溶液をPBSに交換することが可能であり、1.43の減衰係数を使用して、濃度をOD280で測定することができる。モノクローナル抗体を-80で分取し保管することができる。

40

【0346】

モノクローナル抗体を産生するトランスフェクト-マの生成

ある特定の実施形態において、本発明に従った抗VSI G 8抗体を、例えば、当該技術分野において周知である（例えば、Morrison, S. (1985) Science 229: 1202）組み換えDNA技術と遺伝子トランスフェクション法の組み合わせを使用して、宿主細胞トランスフェクト-マ内で産生することができる。

【0347】

50

例えば、抗体またはその抗体断片を発現するために、部分的または完全な軽鎖及び重鎖をコードするDNAを、標準的な分子生物学的技術（例えば、対象の抗体を発現するハイブリドーマを使用したPCR増幅またはcDNAクローニング）により得ることができ、遺伝子が転写及び翻訳調節配列に作用可能に結合するように、DNAを発現ベクターに挿入することができる。本文脈中、「作用可能に結合した」という用語は、ベクター内の転写及び翻訳調節配列が、抗体遺伝子の転写と翻訳を制御する意図した機能を果たすように、抗体遺伝子がベクター内にライゲーションされることを意味することを意図している。発現ベクター及び発現調節配列は、使用する発現宿主細胞と適合するように選択される。抗体の軽鎖遺伝子と抗体の重鎖遺伝子を個別のベクターに挿入することができるか、より典型的には、両方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。標準的な方法（例えば、抗体遺伝子断片及びベクター上の相補性制限酵素切断部位のライゲーション、または制限酵素切断部位が存在しない場合、平滑末端ライゲーション）により、抗体遺伝子が発現ベクターに挿入する。本明細書に記載する抗体の軽鎖及び重鎖可変領域を使用して、 V_H セグメントがベクター内の C_H セグメントに作用可能に結合し、 V_L セグメントがベクター内の C_L セグメントに作用可能に結合するように、これらを、所望のアイソタイプの重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクター挿入することにより、任意の抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を作製することができる。加えて、または代替的に、組み換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドが、抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレーム結合するように、抗体鎖遺伝子をベクター内にクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（即ち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド）であることができる。

10

20

30

40

50

【0348】

抗原に結合する抗体の性質決定

ある特定の実施形態において、本発明に従った抗VSI G 8抗体の結合特異性を、ELISA等の既知の抗体結合アッセイ技術により決定する。例示的なELISAにおいて、マイクロタイタープレートを、精製した抗原（本明細書ではVSI G 8）に、PBS中で $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ でコーティングし、PBS中の5%ウシ血清アルブミンによりブロックする。抗体の希釈液（例えば、免疫付与したマウスの血漿の希釈液）を各ウェルに加え、 37°C で1~2時間インキュベーションする。プレートをPBS/Tweenで洗浄し、続いて 37°C で1時間、アルカリホスファターゼにコンジュゲートした二次試薬（例えば、ヒト抗体に関してはヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬）によりインキュベーションする。洗浄後、プレートをpNPP基質（ $1 \text{mg}/\text{mL}$ ）で成長させ、OD $405 \sim 650$ で分析する。最も高い力価を生じるマウスを融合に使用するのが好ましい。

【0349】

上記のELISAアッセイを使用して、VSI G 8免疫原と正の反応性を示すハイブリドーマをスクリーニングすることができる。VSI G 8に高い結合力で結合するハイブリドーマをサブクローニングし、更に性質決定する。（ELISAにより）親細胞の反応性を保持する各ハイブリドーマからの1つのクローンを、 -140°C で保管した5~10個のバイアル瓶細胞バンクを作製するために、そして抗体精製のために選択することができる。

【0350】

抗VSI G 8抗体を精製するために、選択したハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製用の2リットルのスピナーフラスコ内で増殖させることができる。プロテインAセファロース（Pharmacia, Piscataway, N.J.）を用いた親和性クロマトグラフィーの前に、上清を濾過して濃縮することができる。純度を確保するために、溶出したIgGをゲル電気泳動と高速液体クロマトグラフィーにより確認することができる。緩衝溶液をPBSに交換することが可能であり、 1.43 の減衰係数を使用して、濃度をOD 280 で測定することができる。モノクローナル抗体を -80°C で分取し保管す

ることができる。

【0351】

選択した抗V S I G 8モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを決定するために、各抗体を、市販されている試薬(Pierce, Rockford, 111.)を使用してビオチン化することができる。非標識モノクローナル抗体及びビオチン化モノクローナル抗体を使用した競合調査を、上述の、V S I G 8でコーティングしたE L I S Aプレートを使用して実施することができる。ビオチン化m A bの結合を、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼプローブを使用して検出することができる。

【0352】

精製した抗体のアイソタイプ決定するために、特定のアイソタイプの抗体に特異的な試薬を使用して、アイソタイプE L I S Aを実施することができる。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを決定するために、マイクロタイタープレートのウェルを4にて、 $\mu\text{g/mL}$ の抗ヒト免疫グロブリンでコーティングすることができる。1% B S Aでブロックした後、プレートを1~2時間周囲温度にて、 $1\mu\text{g/mL}$ 未満の試験モノクローナル抗体、または精製したアイソタイプコントロールで反応させる。次にウェルを、ヒトI g G 1、またはヒトI g M特異的アルカリホスファターゼコンジュゲートプローブのいずれかと反応させることができる。プレートを、上述のように成長させ、分析する。

10

【0353】

抗V S I G 8ヒトI g Gを更に、ウェスタンブロッティングによりそれぞれV S I G 8、抗原との反応性について試験することができる。手短かに言えば、V S I G 8抗原を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することができる。

20

【0354】

電気泳動の後、分離した抗原をニトロセルロース膜に移し、10%ウシ胎児血清でブロックし、試験するモノクローナル抗体でプローブする。ヒトI g G結合を、抗ヒトI g Gアルカリホスファターゼを使用して検出ことができ、B C I P / N B T基質錠剤(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo)で進めることができる。

【0355】

代替の抗V S I G 8足場

ある特定の実施形態において、本発明は1つ以上のエピトープ結合ドメインに結合したタンパク質足場を含む抗原結合構築物に関する。かかる改変タンパク質足場は通常、ループ領域、または別様においては許容される表面領域にフォーカスされる突然変異誘発を有するランダムなライブラリーを設計することにより、及び、ファージディスプレイまたは関係する技術により、所与の標的に対して変異体を選択することにより、より得られる。少なくともいくつかの実施形態に従うと、本発明は、アンチカリン、D A R P i n、アルマジロ反復タンパク質、プロテインA、リボカリン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサス反復ドメイン、チオレドキシソ、化学規制ペプチド等を含むがこれらに限定されない、代替の足場に関する。少なくともいくつかの実施形態に従うと、本発明は、癌、自己免疫、感染症、敗血症の治療のため、または、遺伝子治療、及び*in vivo*診断の後の、望ましくない免疫活性化を阻害するための治療薬として使用する代替の足場に関する。

30

40

【0356】

少なくともいくつかの実施形態に従うと、本発明は更に、本明細書に記載する抗原結合構築物と製薬上許容できる担体を含む医薬組成物を提供する。

【0357】

本明細書で使用する場合、「タンパク質足場」という用語は、四本鎖もしくは二本鎖抗体であり得る、または抗体のFc領域のみを含み得る、または抗体の1つ以上の定常領域(この定常領域は、ヒトもしくは霊長類由来であってよいか、もしくはヒト及び霊長類定常領域の人工キメラであってよい)免疫グロブリン(Ig)足場、例えばI g G足場を含むが、これらに限定されない。かかるタンパク質足場は、例えば、タンパク質足場が完全

50

I g Gを含む場合、1つ以上の定常領域に加えて、抗原結合部位を含んでよい。かかるタンパク質足場は、他のタンパク質ドメイン、例えば、抗原結合部位（例えばエピトープ結合ドメインまたはs c F vドメインを有するタンパク質ドメイン）に結合可能である。

【0358】

「ドメイン」とは、残りのタンパク質とは無関係の、三次構造を有する折りたたまれたタンパク質構造である。通常、ドメインはタンパク質の個々の機能的性質を担っており、多くの場合、タンパク質及び/またはドメインの残りの機能を失うことなく、他のタンパク質に付加、またはこれらから除去、またはこれらに移行してよい。「単一の抗体可変領域」とは、抗体可変領域の配列特性を含む、折りたたまれたポリペプチドドメインである。それ故、単一の抗体可変領域は、完全な抗体可変領域、及び、例えば、1つ以上のループが、抗体可変領域の特徴を持たない配列により置き換えられている改変可変領域、または、NもしくはC末端が切断されたか、これらの伸長部を含む抗体可変領域、並びに、少なくとも完全長ドメインの結合活性と特異性を保持している可変領域の折りたたまれた断片を含む。

10

【0359】

「免疫グロブリンの単一可変領域」という表現とは、異なるV領域またはドメインとは独立して、抗原またはエピトープと特異的に結合する抗体可変領域（V R、V R H、V L）を意味する。免疫グロブリンの単一可変領域は、他の領域またはドメインが、単一の免疫グロブリン可変領域による抗原結合に必要とされない（即ち、免疫グロブリンの単一可変領域が、追加の可変領域とは関係なく抗原と結合する）、他の異なる可変領域または可変ドメインを有する形式（例えば、ホモまたはヘテロ多量体）で存在することができる。「ドメイン抗体」または「d A b」は、本明細書で使用する用語の、抗原に結合可能な「免疫グロブリンの単一可変領域」と同じである。免疫グロブリンの単一可変領域はヒト抗体可変領域であってよいが、（例えば、W O 0 0 / 2 9 0 0 4に記載されているように）齧歯類、テンジクザメ及びラクダ科V - H H d A b等の、他の種の単一の抗体可変領域もまた含む。ラクダ科V - H Hは、本来は軽鎖を欠いている抗体を産生する、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ及びグアナコを含む種に由来する、免疫グロブリンの単一可変領域ポリペプチドである。かかるV - H Hドメインは、当該技術分野において使用できるな標準的な技術に従ってヒト化されてよく、また、かかるドメインは依然として、本発明に従うと「ドメイン抗体」であるとみなされる。本明細書で使用する場合、V Hは、ラクダ科V - H Hドメインを含む。N A R Vは、テンジクザメを含む軟骨魚類にて同定された、別の種類の免疫グロブリンの単一可変領域である。これらのドメインは、新規の抗原受容体可変領域（一般にV（N A R）またはN A R Vと略される）としてもまた知られている。例えば、M o l . I m m u n o l . 4 4 , 6 5 6 - 6 6 5（2006）、及びU S 2 0 0 5 0 0 4 3 5 1 9 Aを参照のこと。

20

30

【0360】

「エピトープ結合ドメイン」という用語は、異なるV領域またはドメインとは独立して、抗原またはエピトープと特異的に結合するドメインを指す。これは、ドメイン抗体（d A b）、例えば、ヒト、ラクダもしくはサメ免疫グロブリンの単一可変領域であってよく、または、C T L A - 4（E v i b o d y（登録商標））；リボカリン；プロテインAのZドメイン（A f f i b o d y（登録商標）、S p A）、Aドメイン（A v i m e r（登録商標）/ M a x i b o d y（登録商標））等の、プロテインA由来の分子；G r o E I及びG r o E S等の熱ショックタンパク質；トランスフェリン（トランスボディ）；アンキリン反復タンパク質（D A R P i n（登録商標））；ペプチドアプタマー；C型レクチンドメイン（テトラネクチン）；ヒト& # 9 4 7；クリスタリン及びヒトユビキチン（アフィリン）；P D Zドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のスコーピオントキシクニッツ（s c o r p i o n t o x i n k u n i t z）型ドメイン；アルマジロ反復タンパク質、チオレドキシン及びフィブロネクチン（アドネクチン）；からなる群から選択される足場の誘導体であるドメインであってよく、これらは、天然リガンド以外のリガンドへの結合を得るために、タンパク質改変に供してある。

40

50

【0361】

抗体のCDRに対応するループを異種配列で置き換え、異なる結合特性を付与する（即ち、エビボディ (Evi body)）。更なる詳細については、Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)を参照のこと。リポカリンは、ステロイド、ピリン、レチノイド及び脂質等の疎水性小分子を運搬する細胞外タンパク質のファミリーである。これらは、操作して異なる標的抗原を結合可能な円錐型構造の開放端に多数のループを持つ固定化した二次構造を有する。アンチカリンは、サイズが160~180個のアミノ酸であり、リポカリンに由来する。更なる詳細については、Biochim Biophys Acta 1482:337-350 (2000), US7250297B1及びUS20070224633を参照のこと。アフィボディとは、操作して抗原と結合可能な、黄色ブドウ球菌のプロテインAに由来する足場である。ドメインは、約58個のアミノ酸の、3つのヘリックスバンドルからなる。ライブラリーは、表面残基をランダム化することにより生成されている。更なる詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004)及びEP1641818A1を参照のこと。アビマーは、Aドメイン足場ファミリーに由来するマルチドメインタンパク質である。約35個のアミノ酸のネイティブドメインは、規定したジスルフィド結合構造をとる。多様性が、Aドメインのファミリーにより示される自然のバリエーションをシャッフルすることによって生み出される。更なる詳細については、Nature Biotechnology 23 (12), 1556-1561 (2005)及びExpert Opinion on Investigational Drugs 16 (6), 909-917 (June 2007)を参照のこと。

10

20

【0362】

トランスフェリンは、単量体の血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンを操作して、可能な表面ループにペプチド配列を挿入することによって、異なる標的抗原と結合させることができる。操作トランスフェリン足場の例としては、トランスボディが挙げられる。更なる詳細については、J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)を参照のこと。

【0363】

設計したアンキリン反復タンパク質 (DARPin) は、内在性膜タンパク質の細胞骨格への結合を仲立ちするタンパク質ファミリーであるアンキリンに由来する。単一のアンキリン反復は、2つのヘリックス；ターンからなる33残基のモチーフである。各反復の最初のヘリックス及びターンにおける残基をランダム化によりこれら进行操作し、異なる標的抗原を結合することができる。これらの結合界面を、分子数を増やすこと（親和性成熟法）により増大することができる。更なる詳細については、J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100 (4), 1700-1705 (2003)及びJ. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)及びUS20040132028A1を参照のこと。

30

【0364】

フィブロネクチンとは、抗原に結合するように操作することができる足場である。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチンIII型 (FN3) の15反復単位のうちの10番目のドメインにおける天然アミノ酸配列の骨格からなる。サンドイッチの一端にある3つのループを操作して、アドネクチンが対象の治療標的を特異的に認識することを可能にすることができる。更なる詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005)、US20080139791、WO2005056764及びUS6818418B1を参照のこと。

40

【0365】

ペプチドアプタマーとは、一定の足場タンパク質、通常は、活性部位に挿入された制限された可変ペプチドループを含有するチオレドキシン (TrxA) からなるコンビナトリアル認識分子である。更なる詳細については、Expert Opin. Biol. Th

50

er. 5 : 783 - 797 (2005) を参照のこと。

【0366】

マイクロボディは、3～4個のシステイン架橋を含有する、長さが25～50アミノ酸の天然マイクロタンパク質に由来し、マイクロタンパク質の例としては、Kalata BI及びコノトキシン及びノッチン(knottin)が挙げられる。マイクロタンパク質は、操作して、マイクロタンパク質の全体のフォールドに影響を与えることなく最大25個のアミノ酸を含めることが可能なループを有する。操作したノッチンドメインの更なる詳細については、WO2008098796を参照のこと。

【0367】

他のエピトープ結合領域としては、Non - Antibody Scaffolds from Handbook of Therapeutic Antibodies (2007, edited by Stefan Dubel)の第7章、及びProtein Science 15 : 14 - 27 (2006)に概説されるヒトクリスタリン及びヒトユビキチン(アフィリン)、ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメイン、Ras結合タンパク質AF-6のPDZドメイン、サソリ毒素(カリブドトキシン(charybdotoxin))、C型レクチンドメイン(テトラネクチン)を含む、異なる標的抗原結合特性を操作するための足場として使用されているタンパク質が挙げられる。本発明のエピトープ結合ドメインは、これらの代替的タンパク質ドメインのいずれかに由来することができる。

10

【0368】

コンジュゲートまたは免疫複合体

本発明は、エクトドメイン、またはその一部もしくは変異体を含む、VSI G8抗原及びその可溶性部分を含む、免疫療法で使用するためのVSI G8抗原のコンジュゲートを包含する。例えば、本発明は、VSI G8抗原のECDが免疫グロブリンまたはその断片に結合したコンジュゲートを包含する。本発明は、免疫刺激等のVSI G8抗原活性を促進または阻害するためのコンジュゲートの使用、並びに、本明細書に記載される移植、自己免疫及び癌発症の治療におけるコンジュゲートの使用を企図する。

20

【0369】

他の態様においては、本発明は、例えば癌を治療するために使用する、抗体(または、(多くは細胞毒性の)ペイロード薬剤に結合した一本鎖可変断片(scfv)等の抗体または抗体断片)からなる抗体薬物複合体(ADC)を特長とする。抗体は、ADCを標的癌細胞に結合させる。多くの場合、ADCは次に、細胞により内在化され、薬剤が細胞内で放出される。標的化によって、副作用はより低くなり、より広い治療域がもたらされる。親水性リンカー(例えばPEG4Mal)は、薬剤がMDR(多剤耐性)トランスポーターを介して、耐性のある癌細胞から送られることを防止するのに役立つ。

30

【0370】

別の態様では、本発明は、細胞毒素、薬剤(例えば免疫抑制剤)または放射性毒等の治療薬にコンジュゲートした抗VSI G8抗体またはその断片を含む免疫複合体を特長とする。かかるコンジュゲートは、本明細書において「免疫複合体」と呼ばれる。1種以上の細胞毒素を含む免疫複合体は、「免疫毒素」と呼ばれる。細胞毒素または細胞毒性剤としては、細胞に有害な(例えば細胞を殺傷する)任意の作用物質が挙げられる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド(tenoposide)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピューロマイシン、並びにこれらの類似体または同族体が挙げられる。治療薬としては、例えば、代謝拮抗薬(例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシルダカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパクロランブシル(thioepa chlorambuci

40

50

1)、メルファラン、カルマスティン(BSNU)及びロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド(cyclotriphosphamide)、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC及びシスジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えばダウノルピシン(以前のダウノマイシン)及びドキシソルピシン)、抗生物質(例えばダクチノマイシン(以前のアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン(AMC))、並びに有糸分裂阻害剤(例えばビンクリスチン及びビンブラスチン)もまた挙げられる。

【0371】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体にコンジュゲート可能な治療用細胞毒素の他の好ましい例としては、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、メイタンシン及びオーリスタチン、並びにこれらの誘導体が挙げられる。カリケアマイシン抗体コンジュゲートの例は、市販されている(Myloctarg(商標)Wyeth)。

10

【0372】

当該技術分野において入手可能なリンカー技術を使用して、細胞毒素を本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体にコンジュゲートすることができる。細胞毒素を抗体にコンジュゲートするために使用されているリンカーの種類例としては、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド及びペプチド含有リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、リソソーム分画内で低pHにより切断を受けやすい、またはプロテアーゼ(カテプシン(例えばカテプシンB、C、D)等の、腫瘍組織内で優先的に発現するプロテアーゼ等)により切断されやすいリンカーを選択することができる。細胞毒素の種類、リンカー、及び治療薬を抗体にコンジュゲートする方法についての更なる考察については、Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail, P. A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3: 207-212; Allen, T. M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Invest. Drugs 3: 1089-1091; Senter, P. D. and Springer, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264もまた参照のこと。

20

30

【0373】

本発明の抗体を放射性同位体にコンジュゲートして、放射性免疫複合体とも呼ばれる細胞毒性放射性医薬品を作製することもできる。診断または治療用途のための抗体にコンジュゲート可能な放射性同位元素の例としては、ヨウ素131、インジウム111、イットリウム90及びルテチウム177が挙げられるが、これらに限定されない。放射性免疫複合体(radioimmunconjugate)の調製方法は、当該技術分野において確立されている。Zevalin(登録商標)(Biogen IDEC)及びBexxar(登録商標)(Corixa Pharmaceuticals)を含む放射性免疫複合体が市販されており、類似の方法を使用して、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体を用いながら放射性免疫複合体を調製することができる。

40

【0374】

本明細書にて開示した抗体もしくはVSI G8融合タンパク質、または本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったコンジュゲートを使用して所与の生体応答を改変することができ、薬剤部位は標準の化学的治療薬に限定されるものとして解釈されるべきではない。例えば、薬剤部位は所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってよい。かかるタンパク質としては、例えば、酵素的に活性な毒素もしくはその活性断片、例えばアブリン、リシンA、シュードモナスエキソトキシン、もしくはジフテリア毒素；腫瘍壊死因子もしくはインターフェロン等のタンパク質；または生体応答調節剤、例えばリンホカイン、インターロイキン-1(「IL-1」)、インターロイキン-2(「IL-2」)、インターロイキン-6(「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺

50

激因子(「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)、もしくは他の増殖因子を挙げよう。

【0375】

かかる治療用部位を抗体にコンジュゲートする技術は周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、及びThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)を参照のこと。

10

20

【0376】

二重特異性分子

少なくともいくつかの実施形態に従うと、本発明は、多重特異性抗VSI G8抗体もまた包含する。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。別の態様では、本発明は、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗VSI G8抗体またはその断片を含む二重特異性分子を特長とする。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体、またはその抗原結合部を、別の機能分子(例えば別のペプチドまたはタンパク質(例えば、受容体に対する別の抗体またはリガンド))に誘導体化、または結合させて、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を生成することができる。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗体を実際に、1つより多い別の機能分子に誘導体化または結合して、3つ以上の異なる結合部位及び/または標的分子に結合する多重特異性分子を生成してよく、かかる多重特異性分子もまた、本明細書で使用する場合には「二重特異性分子」という用語に包含されることが意図される。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った二重特異性分子を作製するために、二重特異性分子が得られるように、抗体を、別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣物等の1つ以上の他の結合分子に、(例えば化学結合、遺伝子融合、非共有結合または別の方法で)機能的に結合することができる。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体の結合特異性の1つはVSI G8に対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体はVSI G8の2つの異なるエピトープに結合してよい。二重特異性抗体を使用して、VSI G8を発現する細胞に細胞毒性剤を局在化させてもよい。二重特異性抗体は完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

30

40

【0377】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った二重特異性抗体は、異なる構造の2つの標的と同時に結合可能な抗体である。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った

50

二重特異性抗体 (b s A b) と二重特異性抗体断片 (b s F a b) は、B細胞抗原またはエピトープに特異的に結合する少なくとも1つのアーム、及び、標的可能なコンジュゲートに特異的に結合する少なくとも1つの別のアームを有する。

【0378】

少なくともいくつかの実施形態に従うと、本発明は融合抗体タンパク質もまた包含し、このタンパク質は組み換えにより作製された、同一または異なる特異性を有する、2つ以上の異なる一本鎖抗体または抗体断片が結合した抗原結合分子である。分子操作を使用して、種々の二重特異的融合抗体タンパク質を作製することができる。一形態において、二重特異的融合抗体タンパク質は、例えば、ある抗原に対する1つの結合部位を有するセント (s e n t) と、第2の抗原に対する1つの結合部位を有する F a b 断片からなる、一価のものである。別の形態において、二重特異的融合抗体タンパク質は、例えば、ある抗原に対する2つの結合部位を有する I g G と、第2の抗原に対する2つの結合部位を有する2つの s c F v からなる二価のものである。

10

【0379】

本発明は、「オクトパス抗体」(例えば、U S 2 0 0 6 / 0 0 2 5 5 7 6 A 1 を参照のこと)、並びに、V S I G 8、及び別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用 F A b」または「D A F」(例えば、U S 2 0 0 8 / 0 0 6 9 8 2 0 を参照のこと)を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作抗体もまた更に包含する。

【0380】

したがって、本発明は、V S I G 8 に対する少なくとも1つの第1の結合特異性と、第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性を含む二重特異性分子を含む。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、第2の標的エピトープは F c 受容体、例えばヒト F c R I (C D 6 4) またはヒト F c 受容体 (C D 8 9) である。したがって、本発明は、それぞれ、F c R、F c R または F c s R 発現エフェクター細胞 (例えば単球、マクロファージまたは多形核細胞 (P M N)) と、V S I G 8 を発現する標的細胞の両方に結合可能な二重特異性分子を含む。これらの二重特異性分子は、V S I G 8 発現細胞をエフェクター細胞に標的化し、V S I G 8 発現細胞のファゴサイトーシス、抗体依存性細胞傷害 (A D C C)、サイトカイン放出、またはスーパーオキシドアニオンの生成等の、F c 受容体が仲立ちするエフェクター細胞活性を誘発する。

20

【0381】

二重特異性分子が多重特異性である本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、分子は更に、抗 F c 結合特異性に加えて、第3の結合特異性を含むことができる。一実施形態では、第3の結合特異性は、抗増大因子 (E F) 部分、例えば、細胞毒性活性に関与する表面タンパク質に結合することにより、標的細胞に対する免疫応答を増大させる分子である。

30

【0382】

「抗増大因子部分」は、所与の分子 (例えば抗原または受容体) に結合することにより、F c 受容体または標的細胞抗原に対する結合決定基の影響の増大をもたらす抗体、機能的抗体断片またはリガンドであることができる。「抗増大因子部分」は、F c 受容体または標的細胞抗原と結合することができる。あるいは、抗増大因子部分は、第1及び第2の結合特異性が結合する実体とは異なる実体に結合することができる。例えば、抗増大因子部分は、(例えば、C D 2、C D 3、C D 8、C D 2 8、C D 4、C D 4 0、I C A M - 1、または、標的細胞に対する免疫応答の増大をもたらす他の免疫細胞を介して) 細胞毒性 T 細胞と結合することができる。

40

【0383】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、二重特異性分子は、例えば F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、または一本鎖 F v を含む、少なくとも1つの抗体またはその抗体断片における結合特異性を含む。抗体は、内容が明示的に参考として組み込まれる米国特許第 4, 946, 778 号 (L a d n e r e t a l .) に記載されている F v または一本鎖構築物等の、軽鎖もしくは重鎖二量体、またはその任意の最小の断片で

50

あってもよい。

【0384】

一実施形態では、Fey受容体に対する結合特異性はモノクローナル抗体によりもたらされ、この結合はヒト免疫グロブリンG (IgG)により遮断されない。本明細書で使用する場合、「IgG受容体」という用語は、染色体1に位置する8つの鎖遺伝子のいずれかを意味する。これらの遺伝子は、3つのFey受容体クラス、すなわちFcRI (CD64)、FcRII (CD32)、及びFcRIII (CD16)に分類される、合計で12個の膜貫通または可溶性受容体アイソフォームをコードする。一つの好ましい実施形態において、Fc受容体はヒト高親和性FcRIである。ヒトFcRIは72kDaの分子であり、単量体IgGに対して高親和性を示す。ある特定の好ましい抗Fcモノクローナル抗体の産生及び特性決定は、国際公開第88/00052号、及び米国特許第4,954,617号(Fanger et al.)に記載されており、これらの教示は完全に、本明細書に参照として組み込まれる。これらの抗体は、受容体のFey結合部位とは異なる位置においてFcRI、FcRIIまたはFcRIIIのエピトープに結合するため、これらの結合は生理学的レベルのIgGによっては実質的に遮断されない。本発明にて有用な特定の抗FcRI抗体は、mAb22、mAb32、mAb44、mAb62及びmAb197である。mAb32を産生するハイブリドーマは、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関から入手可能であり、ATCCアクセッション番号はHB9469である。他の実施形態では、抗Fey受容体抗体は、モノクローナル抗体22(H22)のヒト化形態である。H22抗体の産生及び特性決定は、Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol. 155(10): 4996-5002、及び国際公開第94/10332号に記載されている。H22抗体を産生する細胞株は、呼称HA022CLIの元でアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関に保管されており、アクセッション番号CRL11177を有する。

10

20

【0385】

更に別の好ましい実施形態において、Fc受容体に対する結合特異性は、ヒトIgA受容体、例えばFc受容体(FcRI (CD89))に結合する抗体により付与され、この結合は、ヒト免疫グロブリンA (IgA)により遮断されないことが好ましい。「IgA受容体」という用語は、染色体19に位置する1つの遺伝子(FcRI)の遺伝子産物を含むことを目的としている。この遺伝子は、55~10kDaの、選択的スプライシングを受けたいくつかの膜貫通アイソフォームをコードすることが知られている。FcRI (CD89)は単球/マクロファージ、エオシン好性顆粒球及び好中球性顆粒球で構造的に発現するが、非エフェクター細胞集団では発現しない。FcRIはIgA1とIgA2の両方に対して中程度の親和性(約 $5 \times 10^{-7} M^{-1}$)を有し、この親和性は、G-CSFまたはGM-CSF等のサイトカインに曝露すると増大する(Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440)。IgAリガンド結合ドメインの外側のFcRIと結合する、A3、A59、A62及びA77として同定される4つのFcRI特異的モノクローナル抗体が記載されている(Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148: 1764)。

30

40

【0386】

FcRI及びFcRIIが、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った二重特異性分子で用いるのに好ましいトリガー受容体であるが、この理由は、これらが(1)主に免疫エフェクター細胞、例えば単球、PMN、マクロファージ及び樹状細胞で発現し、(2)高レベル(例えば、細胞1個あたりで5,000~100,000個)で発現し、(3)細胞毒性活性(例えば(ADCC)、ファゴサイトーシス)のメディエーターであり、(4)自身を標的化する自己抗原を含む抗原の、向上した抗原提示を仲立ちするからである。

【0387】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従っ

50

た二重特異性分子で使用可能な他の抗体はマウス、キメラ及びヒト化モノクローナル抗体である。

【0388】

本発明の二重特異性分子は、当該技術分野において既知の方法を使用して、構成要素である結合特異性（例えば抗FcR及び抗VSIg8結合特異性）をコンジュゲートすることにより調製可能である。例えば、各二重特異性分子の結合特異性を個別に生成した後、互いにコンジュゲートすることが可能である。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、種々のカップリングまたは架橋剤を共有的コンジュゲーションに使用可能である。架橋剤の例としては、プロテインA、カルボジイミド、N-サクシニミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(OPDM)、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、及びスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン(cyclohexane)-1-カルボン酸エステル(スルホSMCC)が挙げられる(例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M A et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照のこと)。他の方法としては、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83、及びGlennie et al. (1987) J. Immunol. 139:2367-2375に記載されているものが挙げられる。好ましい架橋剤は、SATA及びスルホSMCCであり、共にPierce Chemical Co. (Rockford, Il.) から入手可能である。結合部位が抗体である場合、これらは2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介してコンジュゲートすることができる。特に好ましい実施形態において、ヒンジ領域を修飾して、コンジュゲートの前に、奇数個(好ましくは1個)のスルフヒドリル残基を含有させてよい。

10

20

【0389】

あるいは、両方の結合特異性を同じベクターにコードして、同じ宿主細胞内で発現させてアセンブルすることができる。二重特異性分子がmAbxmAb、mAbxFab、Fabx F(ab')₂またはリガンドxFab融合タンパク質である場合において、本方法が特に有用である。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った二重特異性分子は、1つの一本鎖抗体と1つの結合決定基を含む一本鎖分子、または2つの結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子であることができる。二重特異性分子は少なくとも2個の一本鎖分子を含んでよい。二重特異性分子の調製方法は、例えば米国特許第5,260,203号;同第5,455,030号;同第4,881,175号;同第5,132,405号;同第5,091,513号;同第5,476,786号;同第5,013,653号;同第5,258,498号;及び同第5,482,858号に記載されている。

30

【0390】

多重特異性抗体の作製技術としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の、組み換えによる同時発現(Milstein and Cuello, Nature 305:537(1983), WO93/08829、及びTraunecker et al., EMBO J. 10:3655(1991)を参照)、及び「ノブ-ホール」操作(例えば米国特許第5,731,168号を参照)が挙げられるが、これらに限定されない。多重特異的抗体は、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するための静電ステアリング効果の操作(WO2009/089004A1);制御したFab-アーム交換(Labrijn et al., PNAS 110(13):5145-50(2013)を参照);2つ以上の抗体または断片の架橋(例えば米国特許第4,676,980号とBrennan et al., Science, 229:81(1985)を参照);ロイシンジッパーを使用した二重特異的抗体の産生(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)を参照);二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術の使用(例えば

40

50

、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)を参照); 及び、一本鎖Fv (sFv) 二量体の使用 (例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994)を参照); 及び、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されている三重特異性抗体の調製によってもまた作製可能である。

【0391】

二重特異性分子の、それらの特異的標的への結合は、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、FACS分析、バイオアッセイ (例えば増殖抑制)、またはウェスタンブロットアッセイにより確認することが可能である。これらのアッセイはそれぞれ、通常は、対象の複合体に特異的な標識試薬 (例えば抗体) を用いることにより対象の特定のタンパク質 - 抗体複合体の存在を検出する。例えば、抗体 - FcR複合体を認識し、これに特異的に結合する酵素結合抗体、または抗体断片等を使用して、FcR - 抗体複合体を検出することができる。あるいは、種々の他のイムノアッセイのいずれかを使用して複合体を検出することができる。例えば、抗体を放射性標識して、ラジオイムノアッセイ (RIA) で使用することができる (例えば、本明細書に参考として組み込まれるWeintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照のこと)。放射性同位体は、カウンターもしくはシンチレーションカウンターを使用するかかる方法により、またはオートラジオグラフィーにより検出することができる。

10

20

【0392】

抗体及びその医薬組成物の使用

腫瘍増殖と成長、及び/または腫瘍細胞の枯渇に重要な分子経路を阻害することを目的とする腫瘍標的療法とは異なり、癌免疫治療法は、患者自身の免疫系を刺激して癌細胞を取り除き、長く生き残った腫瘍を破壊することを目的としている。種々のアプローチを癌免疫治療法で使用することが可能であり、これらの中には、腫瘍特異的T細胞応答を誘発するための治療用癌ワクチン、及び、免疫抑制経路を取り除くための免疫活性抗体 (即ち、阻害性受容体のアンタゴニスト = 免疫チェックポイント) がある。

30

【0393】

標的療法、または従来 of 抗癌治療法における臨床応答は、癌細胞が耐性をつけ、腫瘍の再発が生じるので一過性となりがちである。しかし、過去数年間における癌免疫治療法の臨床的使用は、この種類の治療法は長く持続する臨床応答を有していることを示しており、長期間にわたる生存に劇的な影響を示している。しかし、応答が長期間にわたるものであっても、(多数の患者が応答するが、応答が一過性である従来 of 療法、または標的療法とは対象的に) 少数の患者しか応答しない。

【0394】

腫瘍が臨床的に検出されるときまでに、免疫耐性及び免疫抑制性質を獲得し、種々のメカニズム及び種々の免疫細胞を介して免疫抑制性腫瘍微小環境を生成することにより、免疫防御系が既にかいくぐられている。したがって、癌免疫治療法において、臨床的効果のために治療法を組み合わせることが必要であることがますます明確になりつつある。

40

【0395】

組み合わせのアプローチが必要であり、免疫療法の恩恵を受ける患者の数を増加させることが予想されており、また、応答する癌の数と種類が拡大することで、現在は、単剤療法として免疫チェックポイントの遮断に有効性を示している初期の発症を十分に超えるチェックポイント剤に対する潜在的な癌の発症が拡大する。免疫賦活アプローチを組み合わせることは、転帰を最大化し、単一のアプローチに対する大部分の腫瘍の耐性メカニズムを克服することを意味する。したがって、非免疫原性と従来考えられている腫瘍も同様に免疫原性となる可能性が高く、また、患者の抗腫瘍免疫応答を増大させるように設計され

50

た免疫原性治療薬を同時投与することにより、免疫療法に応答することができる。可能性のあるプライミング剤を本明細書の以下において詳述する。

【0396】

劇的に増大した併用療法の効果について、根底にある科学的理論的根拠では、単剤療法としての免疫チェックポイントの遮断が、経路が遮断された場合に「開放」される、予め存在する強力な抗腫瘍免疫応答が存在する場合にのみ、腫瘍の退行を誘発することが主張されている。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、V S I G 8 特異的抗体、抗体断片、コンジュゲート、及びこれらを含む組成物が、併用療法の癌免疫治療法において、あらゆる種類の癌の治療に使用される。

【0397】

本明細書で使用する場合、「治療」という用語は、治療的処理、及び予防 (p r o p h y l a c t i c) または予防 (p r e v e n t a t i v e) 用手段の両方を意味し、この実施例においては、癌の治療に関係する。しかし、後述もするように、抗体と医薬組成物の使用はまた、感染症、敗血症、及び/もしくは自己免疫性状態の治療、並びに/または、遺伝子治療の後での望ましくない免疫活性化の阻害に対しても提供される。治療が必要な対象としては、癌を既に患っている対象、及び、癌が予防される対象が挙げられる。したがって、本明細書において治療される哺乳類は、癌を有すると診断されていてもよいし、または、癌に罹りやすい、もしくは癌になりやすくてよい。本明細書で使用する場合、「治療すること」という用語は、有害作用の予防、開始の遅延、治療、逆転、弱毒化、緩和、最小化、停止、または、上述の癌性の病気、疾患もしくは状態の認識可能な症状の安定化を意味する。治療には、上述した癌の管理もまた含む。「管理する」とは、病気の重症度を低下させること、病状の発現の頻度を低下させること、かかる症状の発現期間を低下させること、かかる症状の発現の重症度を低下させること、癌細胞の成長または増殖を遅延/低下させること、少なくとも1つの症状の進行を遅延させること、少なくとも1つの測定可能な物理的パラメーターを緩和すること等を意味する。例えば、免疫活性化抗 V S I G 8 抗体は、標的細胞、例えば癌、感染または病原体細胞に対する T 細胞または N K もしくはサイトカイン免疫を促進する筈であり、それによって、病状に関与する細胞を枯渇させることにより癌または感染症を治療する。逆に、免疫阻害性抗 V S I G 8 抗体は、T 細胞もしくは N K 活性、及び/または自己免疫、炎症またはアレルギー状態等のいくつかの免疫疾患の疾患病理学に関与する炎症性サイトカインの分泌を低下させる筈であり、また、それによって、かかる状態に関係し得る疾患の病理学及び組織破壊 (例えば、関節リウマチ状態に係る関節破壊) を治療または緩和する。

【0398】

治療目的の「哺乳類」とは、ヒト、飼育動物及び家畜、及び動物園、スポーツまたはペット動物例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ等を含む、哺乳類として分類される任意の動物を意味する。哺乳類はヒトであることが好ましい。哺乳類は、本明細書で上述した病気、疾患または状態の1つ以上を有すると診断されたヒト、あるいは少なくとも1種の癌に罹りやすいヒトであることが好ましい。

【0399】

「治療的有効量」という用語は、哺乳類の病気または疾患を治療するのに効果的な、本発明に従った作用物質の量を意味する。

【0400】

本発明の治療薬は、対象に単独で、または製薬上許容できる担体と混合した場合、医薬組成物の一部として提供することができる。

【0401】

本明細書に記載した抗 V S I G 8 抗体、断片、そのコンジュゲート、もしくは V S I G 8 融合タンパク質、及び/または、少なくとも本発明のいくつかの実施形態に従った、これらを含む医薬組成物はまた、併用療法で投与することができる、即ち、他の強化作用物質及び/または他の治療法と組み合わせることができる。少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書にて開示した抗 V S I G 8 抗体または V S I G 8 融合タンパク質は (

10

20

30

40

50

例えば <http://www.cancer.gov/cancertopics>に見出すことが可能なように) 当該技術分野において周知の標準的なケア用癌治療のいずれかと組み合わせて使用することができる。

【0402】

例えば、併用療法は、本明細書に記載した少なくとも1種の他の治療用もしくは免疫制御剤、その他の化合物もしくは免疫療法、または免疫刺激法と共に、抗V S I G 8抗体、断片、そのコンジュゲート、及び/またはこれらを含む医薬組成物を含むことができる。

【0403】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、抗V S I G 8抗体と組み合わせて使用可能な治療薬は、抗腫瘍応答を増強する強化剤である。

10

【0404】

本明細書にて開示した抗V S I G 8免疫刺激抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、癌免疫治療法の強化剤と組み合わせるために、種々の方法が利用可能である。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体は、主に、内因性抗腫瘍応答を増大するのに適合した強化剤、例えば放射線治療、凍結治療、抗腫瘍免疫応答を増強する従来/通常の化学療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標的療法、抗血管新生療法、T r e g及びM D S C等の免疫抑制細胞を標的化する治療薬、免疫刺激性抗体、サイトカイン療法、治療用癌ワクチン、養子細胞移入と組み合わせて使用される。

【0405】

いくつかの化学療法または抗癌用の従来薬剤と組み合わせて使用する背景にある科学的理論的根拠は、大部分の化学療法化合物の細胞毒性作用の結果としての癌細胞死が、増強された抗原提示と抗腫瘍免疫応答(即ち、免疫原性細胞死)に繋がる増加した量の腫瘍抗原をもたらす得、抗V S I G 8抗体を用いた強力な効果をもたらすということである(Zitvogel et al, 2008, The journal of clinical investigation, vol. 118, pages 1991-2001; Galluzzi et al, 2012, Nature Reviews - Drug discovery, Volume 11, pages 215-233)。腫瘍細胞死を介して抗腫瘍応答を増強し得る他の併用療法は、放射線治療、凍結治療、手術、及びホルモン除去である。これらの癌治療はそれぞれ、宿主内に腫瘍抗原の源を作り出す。

20

【0406】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、抗癌活性を有することを示すビスホスホネート、特にアミノビスホスホネート(A B P)と組み合わせて使用する。

30

【0407】

A B Pに関係する活性のいくつかは、先天性免疫と適応免疫の接点にまたがるヒトT細胞に存在し、強力な抗腫瘍活性を有する。

【0408】

標的療法は、腫瘍細胞の免疫原性死を誘発することにより、または、免疫エフェクター機構を利用することにより、腫瘍特異的免疫応答もまた刺激することができる(Galluzzi et al, 2012, Nature Reviews - Drug discovery, Volume 11, pages 215-233)。

40

【0409】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従い、癌治療のために、抗V S I G 8抗体と組み合わせて作用物質として使用する標的療法を、本明細書に記載する。

【0410】

内因性抗腫瘍応答もまた増大させる他の癌免疫療法もまた、養子T細胞療法、治療用癌ワクチン、免疫抑制低下細胞及びその機能、サイトカイン療法、または免疫刺激性抗体等の免疫エフェクター機構を増強させることにより、本明細書にて開示した抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質の効果を強化することができる。

【0411】

50

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、制御性T細胞(T r e g)及び骨髄由来免疫抑制細胞(M D S C)等の、治療薬が標的とする制御免疫抑制細胞と組み合わせて使用する。一般に使用される多数の化学療法は、T r e gの非特異的標的化を行い、T r e gまたはM D S Cの数、または免疫抑制活性を低減させる(F a c c i a b e n e A . e t a l 2012 Cancer Res ; 72 (9) 2162 - 71 ; B y r n e W L . e t a l 2011 , Cancer Res . 71 : 691520 ; G a b r i l o v i c h D I . a n d N a g a r a j S , Nature Reviews 2009 Volume 9 , pages 162 - 174)。これに関し、いくつかの化学療法薬剤を用いたメトロノーム型治療法は、制御性細胞を調節することにより、免疫抑制効果ではなく免疫刺激をもたらす。したがって、本発明の少なくとも一部の実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、シクロホスファミド、ゲムシタピン、マイトキサントロン、フルダラビン、フルダラビン、ドセタキセル、パクリタキセル、サリドマイド及びサリドマイド誘導体から選択されるがこれら限定されない薬剤と組み合わせて使用する。

10

【0412】

更に、本発明の少なくとも一部の実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、1) T r e g細胞表面受容体(抗C D 25 m A b、ダクリズマブ、バシリキシマブ等)の認識により、T r e gを直接標的化する枯渇もしくは殺傷抗体、または、2) デニレウキンジフチトクス(d e n i l e u k i n d i f t i t o x) (O n t a k) (ヒトI L - 2とジフテリア毒素の融合タンパク質)、もしくはL M B - 2 (C D 25に対するs c F vとシュードモナス毒素の融合)等のリガンドに向けられる毒素、並びに、3) C T L A 4、P D - 1、O X 4 0及びG I T R等のT r e g細胞表面受容体を標的とする抗体、または4) 前に特定した他のN K受容体を標的化する抗体、小分子もしくは融合タンパク質を含む新規のT r e gを特異的に標的とする作用物質と組み合わせて使用する。

20

【0413】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、以下で記載するT L R (T o l l様受容体)アゴニスト; エクトヌクレオチダーゼ阻害剤、またはA 2 Aアデノシン受容体の阻害剤等の、アデノシン経路と干渉する作用物質; フレソリムマブ(f r e s o l i m u m a b)、レーデリムマブ(l e r d e l i m u m a b)、メテリムマブ、トラベデルセン、L Y 2 1 5 7 2 9 9、L Y 2 1 0 9 7 6等のT G F - 阻害剤; C C R 4 / C C L 2 / C C L 2 2経路等のケモカイン受容体阻害剤を含む、腫瘍組織へのT r e g動員の遮断薬を含む、T r e gの誘発、及び/または機能を攪乱する選択肢のいずれかと組み合わせて使用する。

30

【0414】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、以下で記載する、I D O (インドールアミン - 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ)阻害剤等の、免疫抑制活性を発揮するサイトカイン及び酵素の阻害剤; I L - 1 0、I L - 3 5、I L - 4及びI L - 1 3等の免疫抑制性微小環境を促進する抗炎症性サイトカインの阻害剤; T r e gを減少させ、D Cの分化を支えるベパシズマブ(登録商標)を含む、免疫抑制性腫瘍微小環境を阻害するための選択肢のいずれかと組み合わせて使用する。

40

【0415】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、以下で記載する、ビタミンD 3、またはビタミンA代謝産物(レチノイン酸、全トランスレチノイン酸(A T R A))による抑制機能を有しない成熟骨髄細胞への分化を促進すること; C O X 2阻害剤、シルデナフィル等のホスホジエステラーゼ5阻害剤、ニトロアスピリン等のR O S阻害剤によ

50

るM D S C抑制活性の阻害を含むM D S C（骨髄由来の抑制性細胞）を標的とする選択肢のいずれかと組み合わせて使用する。

【0416】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、免疫刺激性抗体、または抗腫瘍免疫応答を強化する他の作用物質と組み合わせて使用する（Pardoll J Exp Med. 2012; 209(2): 201-209）。免疫刺激性抗体は、免疫機能を直接制御すること、即ち、他の阻害標的を遮断するか、または免疫刺激性タンパク質を増強することにより抗腫瘍免疫を促進する。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体を、イピリムマブ、トレメリムマブ（tremelimumab）等の、抗CTLA4 mAbを含む免疫チェックポイントを標的とするアンタゴニスト抗体；ニボルマブ、BMS-936558 / MDX-1106 / ONO-4538、AMP224、CT-011、MK-3475等の抗PD-1、BMS-936559 / MDX-1105、MED14736、RG-7446 / MPDL3280A等の抗PDL-1アンタゴニスト；IMP-321、抗TIM-3、抗BTLA、抗B7-H4、抗B7-H3、抗VISTA等の抗LAG-3；CP-870, 893、ルカツムマブ（lucatumumab）、ダセツズマブ等の、抗CD40 mAbを含む免疫活性化タンパク質を標的化するアゴニスト抗体；BMS-663513、ウレルマブ（urelumab）、PF-05082566等の抗CD137 mAb；抗OX40等の抗OX40 mAb；TRX518等の抗GITR mAb；CDX-1127等の抗CD27 mAb；及び抗ICOS mAbと組み合わせて使用する。

10

20

【0417】

サイトカインは、免疫系の細胞が互いに連絡して、標的抗原に対して協調して堅強、かつ自己に限定された応答を生成することを可能にする、分子メッセンジャーである。サイトカインベースの治療法は、患者自身の免疫系を刺激して癌を拒絶する直接的な試みを具体化している。癌を撲滅するために免疫系を利用することに対する、過去20年間にわたる関心の増加は、サイトカインを特性決定し、その広大なシグナル伝達ネットワークを利用して癌治療を進展させるための大きな努力に付随してきた。サイトカインは、腫瘍部位にて免疫エフェクター細胞とストローマ細胞を直接刺激し、細胞毒性エフェクター細胞による腫瘍細胞の認識を向上させる。多数の動物腫瘍モデル研究では、サイトカインは広範な抗腫瘍活性を有し、この活性は、癌治療に対する多数のサイトカインベースのアプローチに転用されていることが示されている（Lee and Margolin 2011, Cancers 3(4): 3856-93）。多数のサイトカインが、とりわけIL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18及びIL-21、IL-23、IL-27、GM-CSF、IFN（インターフェロン）、IFN、及びIFNを含む、癌免疫治療法の抗腫瘍免疫応答を強化する作用物質として前臨床または臨床開発に存在する。

30

【0418】

いくつかのサイトカインは癌治療に認可されており、より多くのサイトカインが開発中である。しかし、治療効果は多くの場合、深刻な副作用、及び不十分な薬物動態学的性質により妨害される。したがって、抗体-サイトカイン融合分子（免疫サイトカイン）、ポリエチレングリコールへの化学的複合体化（PEG化）、自己全腫瘍細胞でのサイトカインのトランスジェニック発現、DNAワクチンへのサイトカイン遺伝子の組み込み、サイトカイン遺伝子を送達するための組み換えウイルスベクター等を含む、薬学動態、並びにその有効性及び/または毒性を改善するために、サイトカインの全身投与に加えて、治療用サイトカインの送達と、その腫瘍部位への局在化に種々の方法を使用することができる。免疫サイトカインの場合、腫瘍特異的抗体または抗体断片へのサイトカインの融合が、標的化した送達、またそれ故、向上した有効性及び薬学動態、並びに副作用の減少を可能にする。

40

【0419】

50

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、上述のとおり、I L - 2、I L - 7、I L - 12、I L - 15、I L - 17、I L - 18及びI L - 21、I L - 23、I L - 27、G M - C S F、I F N（インターフェロン）、I F N - 2 b、I F N、I F N等のサイトカインを含むサイトカインを、抗腫瘍免疫応答を強化する作用物質として使用することを伴うサイトカイン療法、並びに、送達のための異なる方法と組み合わせる。

【0420】

癌ワクチンを使用して、既存の癌を治療する（治療的）、または特定のハイリスクの個体において癌の進行を防止する（予防的）。治療用癌ワクチンは、T細胞のプライミングの改善、及び抗原提示の改善を可能にし、抗腫瘍免疫応答を強化するための治療薬として使用することができる（Mel l m a n I . e t a l . , 2 0 1 1 , N a t u r e , 4 8 0 : 2 2 - 2 9 ; S c h l o m J , 2 0 1 2 , J N a t l C a n c e r I n s t ; 1 0 4 : 5 9 9 - 6 1 3）。

10

【0421】

治療用癌ワクチンのいくつかの種類が、前臨床状態、及び臨床開発中である。これらとしては、例えば以下のものが挙げられる。

1) 手術中に取り除かれた癌細胞を治療して免疫原性を向上させ、患者に注入して腫瘍細胞内で抗原に対する免疫応答を誘発する全腫瘍細胞ワクチン。腫瘍細胞ワクチンは自己性、即ち、患者自身の腫瘍、または、所与の腫瘍型における、通常2つまたは3つの、確立及び特性決定されたヒト腫瘍細胞株を含有する同種異系（G V A Xワクチンプラットフォーム等）であることができる。

20

2) 通常はタンパク質またはペプチドである腫瘍抗原（またはいくつかの腫瘍抗原の組み合わせ）を、（場合により、アジュバント、及び/または、G M - C S F等の、樹状細胞の免疫制御剤もしくは誘引剤と共に）投与して免疫系を追加免疫する腫瘍抗原ワクチン。腫瘍抗原はある特定の種類の癌に特異的であってよいが、これらは特定の患者に対して作製されるものではない。

3) ベクターベースの腫瘍抗原ワクチン及びD N Aワクチンを、抗原を安定して提供し、抗腫瘍免疫応答を刺激するための方法として使用することができる。

30

【0422】

腫瘍抗原をコードするベクターを（場合により、G M - C S F等の炎症誘発剤または他の誘引剤と共に）患者に注射し、i n v i v oで細胞に取り込ませて特異的抗原を作製し、次いで所望の免疫応答を誘発する。ベクターを使用して、一度に2つ以上の腫瘍抗原を送達し、免疫応答を増大させてよい。更に、組み換えウイルス、細菌または酵母菌ベクターが自身の免疫応答を引き起こす筈であり、これもまた、全体の免疫応答を増強し得る。

【0423】

4) 優先的に癌細胞に感染する条件複製単純ヘルペスウイルスの腫瘍内注射を伴う、O n c o V e x / T - V E C等の腫瘍崩壊ウイルスワクチン。G M - C S Fも発現するように組み換えされたウイルスは、細胞溶解を引き起こす癌細胞内で複製可能であり、新しいウイルスと腫瘍抗原のアレイを放出し、プロセス中でG M - C S Fを分泌する。したがって、かかる腫瘍崩壊ウイルスワクチンは腫瘍微小環境における、抗腫瘍免疫応答を刺激するD Cの機能を向上させる。

40

【0424】

5) 樹状細胞ワクチン（P a l u c k a a n d B a n c h e r e a u , 2 1 0 2 , N a t . R e v . C a n c e r , 1 2 (4) : 2 6 5 - 2 7 7）：樹状細胞（D C）は腫瘍細胞を貪食し、腫瘍特異的T細胞に腫瘍抗原を提示する。このアプローチにおいて、D Cを癌患者から単離し、腫瘍特異的T細胞を提示するようにプライミングする。この目的のために、いくつかの方法を使用することができる。D Cを腫瘍細胞または溶解物と共に加え、D Cを腫瘍抗原のタンパク質またはペプチドと共に加え、腫瘍抗原をD C標的化m

50

Abに結合する。DCを(GM-CSF等の)刺激因子の存在下で処理し、*ex vivo*で活性化及び成熟させ、次に、癌細胞に対する免疫応答を誘発するために、患者内に再び注入する。照射により(GM-CSF等の)刺激サイトカインを分泌するよう改変した全腫瘍細胞を患者に注入することにより、樹状細胞を*in vivo*でプライミングすることもできる。単球を用いて、同様のアプローチを実施することができる。進行した前立腺癌の治療に対して認可されている治療用癌ワクチンであるSipuleucel-T(Provenge)は、樹状細胞ワクチンの例である。

【0425】

したがって、本発明の少なくとも一部の実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗VSI G8抗体またはVSI G8融合タンパク質を、治療用癌ワクチンと組み合わせる。かかる治療用癌ワクチンの非限定例としては、上述のとおり、全腫瘍細胞ワクチン、腫瘍抗原ワクチン、ベクター系ワクチン、腫瘍崩壊ウイルスワクチン、樹状細胞ワクチンが挙げられる。

10

【0426】

癌免疫治療法の1つのアプローチは、養子T細胞療法または養子細胞移入(ACT)に基づき、これは、天然の自己腫瘍特異的T細胞の*ex vivo*での同定及び膨張を伴い、これを次に、癌患者の中に養子移入する(Restifo et al, 2013, Cancer Immunol. Immunother. 62(4): 727-36 (2013) Epub Dec 4 2012)。 *ex vivo*での膨張の後、患者に注入し直した細胞を腫瘍に集め、腫瘍の破壊に仲立ちさせることができる。この養子移入の前に、宿主は放射線照射及び/または化学療法により免疫枯渇させることができる。リンパ球の枯渇、養子細胞移入及び(IL-2等の)T細胞増殖因子を組み合わせることにより、腫瘍を持つ患者における腫瘍の根絶期間を延ばすことができる。より新規のアプローチは、通常の末梢血T細胞を*ex vivo*で遺伝子組み換えし、腫瘍関連抗原に対する特異性を付与することを伴う。例えば、特に良好な抗腫瘍応答を有するT細胞のTCRのクローンをウイルス発現ベクターに挿入して使用し、治療する患者の自己T細胞に感染させることができる。別の選択肢は、T-bodyとしても知られる、実質的にキメラ免疫グロブリン-TCR分子であるキメラ抗原受容体(CAR)を使用することである。CARは抗体のような特異性を有し、標的細胞の表面(細胞外の標的結合モジュール)上で、MHCに限定されない構造を認識し、T細胞を活性化可能なTCR細胞内領域にグラフトされる(Restifo et al Cancer Immunol. Immunother. 62(4): 727-36 (2013) Epub Dec 4 2012; 及びShi et al, Nature 493: 111-115 2013)。

20

30

【0427】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書にて開示した癌免疫治療法の抗VSI G8抗体またはVSI G8融合タンパク質を、上述の遺伝子組み換えT細胞を含む養子細胞移入と組み合わせる。抗腫瘍免疫応答を強化する。

【0428】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った、VSI G8特異的抗体、並びに/または代替の足場並びに/もしくは多重特異的及び二重特異性分子並びに免疫複合体、これらを含む組成物を、1種以上の他の治療薬と共に同時投与することができ、この他の投与は、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った組成物と共に、または相乗的に、癌を治療または予防するように作用する。VSI G8に関係する治療薬、及び1種以上の他の治療薬を、いずれかの順序で、または同時に投与することができる。他の治療薬は例えば、細胞毒性剤、放射性毒性剤、または免疫抑制剤である。組成物は(免疫複合体として)作用物質に結合可能であるか、または作用物質とは個別に投与することが可能である。後者(個別投与)の場合、組成物は作用物質の前、後もしくは作用物質と同時に投与することができ、または、他の既知の治療薬(例えば、放射線等の抗癌治療)と共に同時投与することができる。かかる治療薬としてはとりわけ、それ自体だけでは患者に対して毒性または順毒性の量でのみ効果的な、ドキソルピシン(アドリアマイシン)、シスプラチン

40

50

ブレオマイシンサルフェート、カルマスチン、クロラムブシル、及びシクロホスファミドヒドロキシ尿素等の抗新生物薬が含まれる。シスプラチンは4週間毎に、1回あたり100mg/用量で静脈内投与し、アドリアマイシンは21日毎に、1回あたり60~75mg/mLの用量で静脈内投与する。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったヒト抗V S I G 8抗体、またはその抗原結合断片及び/もしくは代替の足場を化学療法剤と同時投与することは、異なるメカニズムにより作用し、ヒト腫瘍細胞に対して細胞毒性効果をもたらす2つの抗癌剤をもたらす。かかる同時投与は、薬剤耐性の発生、または、抗体と非反応性となる腫瘍細胞における抗原性の変化に起因する問題を解決する。別の実施形態において、例えば、対象をサイトカインで治療することにより、対象を更に、F e yまたはF e y受容体の発現または活性を制御、例えば向上または阻害する作用物質で治療することができる。多重特異性分子を用いる治療の間に投与するのに好ましいサイトカインとしては、顆粒球コロニー刺激因子(G - C S F)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(G M - C S F)、インターフェロン (I F N -)、及び腫瘍壊死因子(T F またはT F P)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0429】

標的特異的エフェクター細胞、例えば、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った組成物(例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異性分子)に結合したエフェクター細胞もまた、治療薬として使用することができる。標的化のためのエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球または単球等のヒト白血球であることができる。他の細胞としては、好酸球、ナチュラルキラー細胞、及び他のI g GまたはI g A受容体を有する細胞が挙げられる。所望により、エフェクター細胞は治療する対象から得ることができる。標的特異的エフェクター細胞を、生理学的に許容できる溶液中における細胞の懸濁液として投与することができる。投与する細胞の数は、 $10^8 \sim 10^9$ 個台とすることができるが、治療目的に応じて変化する。一般に、量は、標的細胞(例えば、V S I G 8タンパク質を発現する腫瘍細胞)で局在化し、例えばファゴサイトーシス等により細胞の殺傷に影響を及ぼすのに十分である。投与経路もまた変化するすることができる。

【0430】

標的特異的エフェクター細胞を用いる治療法を、標的化細胞を除去するための他の技術と組み合わせて実施することができる。例えば、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った組成物(例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異性分子)、並びに/またはこれらの組成物を有するエフェクター細胞を用いる抗腫瘍治療法を、化学療法と組み合わせて使用することができる。

【0431】

更に、組み合わせの免疫療法を使用して、2つの異なる細胞毒性エフェクター集団を、腫瘍細胞の排除に動員してよい。例えば、抗F c R Iまたは抗C D 3に結合した抗V S I G 8抗体を、I g GまたはI g A受容体特異的結合と組み合わせで使用してよい。

【0432】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った二重特異的及び多重特異性分子もまた使用して、例えば細胞表面上で受容体をキャッピング及び除去することにより、エフェクター細胞でのF c RまたはF c Rの量を制御することができる。抗F c受容体の混合物もまた、この目的のために使用することができる。

【0433】

補体を結合するI g G 1、I g G - 2、もしくはI g G - 3またはI g Mのかかる部分等の補体結合部位を有する、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った治療用組成物(例えば、ヒト抗体、代替の足場多重特異的及び二重特異性分子、並びに免疫複合体)もまた、補体の存在下にて使用することができる。一実施形態では、標的細胞を含む細胞の母集団の、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った結合剤と適切なエフェクター細胞によるe x v i v o処理は、補体または血清含有補体を加えることにより補うことができる。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った結合剤でコーティングした標的細胞のファゴサイトーシスは、補体タンパク質を結合することにより向上することがで

きる。別の実施形態において、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異的及び二重特異性分子）でコーティングした標的細胞はまた、補体により溶解することができる。更に他の実施形態において、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った組成物は、補体を活性化しない。

【0434】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った治療用組成物（例えばヒト抗体、代替の足場多重特異的及び二重特異性分子、並びに免疫複合体）はまた、補体と共に投与することが可能である。

【0435】

したがって、本発明の少なくとも一部の実施形態によれば、ヒト抗体、多重特異的または二重特異性分子、及び血清または補体を含む組成物が存在する。補体がヒト抗体、多重特異的または二重特異性分子に近接して位置しているという点で、これらのこれらの組成物は有利である。あるいは、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったヒト抗体、多重特異的または二重特異性分子、及び補体または血清を個別に投与することができる。

10

【0436】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った、本明細書にて開示した抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質の「治療的に有効な用量」とは、病徴の重症度の低下、病徴を有しない期間の頻度と長さの増加、寿命の増加、病気の寛解、または、病気の苦しみに起因する障害もしくは能力低下の予防もしくは減少をもたらすのが好ましい。例えば、V S I G 8陽性腫瘍の治療に関して、「治療的に有効な用量」とは、未治療の対象と比較して、細胞増殖または腫瘍増殖を少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、更により好ましくは少なくとも約60%、そして更により好ましくは少なくとも約80%阻害するのが好ましい。腫瘍増殖を阻害する化合物の能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系で計算することができる。

20

【0437】

あるいは、組成物のこの特性は、化合物の阻害能力を調べることにより評価することができ、アッセイによるかかる *in vitro*での阻害は、当業者に既知である。治療に有効な量の治療用化合物は、腫瘍サイズを減少させるか、別様においては対象における症状を緩和することができる。

【0438】

当業者は、対象のサイズ、対象の症状の重症度、及び、選択した特定の組成物または投与経路等の因子に基づいて治療の有効量を決定することができる。

30

【0439】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った抗V S I G 8抗体を、中和抗体として使用することができる。中和抗体(N a b)は、特異的抗原と結合、及び中和または阻害することにより、例えば、細胞またはウイルス上で受容体を遮断し、ウイルスの宿主細胞への結合を阻害することにより、生物学的影響を阻害することができる抗体である。N A bは、活性に必要な重要な表面分子を遮断するか、または、標的細胞上の受容体への作用物質の結合を干渉するかのいずれかにより、作用物質の生物学作用を部分的に、または完全に消滅させる。

40

【0440】

本明細書で使用する場合、「治療薬」とは、モノクローナル及び/もしくはポリクローナル抗体、並びに/または抗原結合断片、並びに/またはこれらを含むコンジュゲート、並びに/または、本明細書で列挙する癌の治療に使用される、V S I G 8ポリペプチドもしくはそのエピトープのいずれか1つに特異的に結合する抗原結合部位を含むこれらの代替足場のいずれか1つである。

【0441】

本発明の更なる態様に従うと、治療薬を使用して、癌細胞に向けられるもの等の、T細胞活性の病理学的阻害を防止することができる。

【0442】

50

本発明の更なる態様に従うと、治療薬を使用して、例えばT細胞増殖及びサイトカイン分泌により明らかとなることのできるT細胞の活性化を阻害することができる。

【0443】

したがって、本発明の追加の態様によると、癌の治療または免疫刺激の促進を必要とする対象に、有効量の治療薬のいずれか1つ、並びに/または治療薬のいずれか1つを含み、また更に製薬上許容できる希釈剤もしくは担体を含む医薬組成物を投与することにより、本明細書で列挙する癌の治療方法、及び/または対象のV S I G 8ポリペプチドが仲立ちする免疫刺激を促進する方法を提供することができる。

【0444】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った治療薬または医薬組成物を、他の化合物または免疫療法と組み合わせて投与してもよい。例えば、併用療法は、腫瘍ワクチン、養子T細胞治療、T r e g 枯渇、抗体（例えばペバシズマブ、エルビタックス）、ペプチド、ペプチボディ、小分子、細胞毒性及び細胞増殖抑制剤（例えばパクリタキセル、シスプラチン、ビノレルピン、ドセタキセル、ゲムシタピン、テモゾロマイド、イリノテカン、5 F U、カルボプラチン）等の化学療法剤、インターフェロン及びインターロイキン等の免疫調節剤、免疫刺激性抗体、成長ホルモンまたは他のサイトカイン、葉酸、ビタミン、ミネラル、アロマトラーゼ阻害剤、R N A i、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤等を含むがこれらに限定されない、少なくとも1つの他の治療薬もしくは免疫制御剤、または免疫刺激法と組み合わせた、本発明の化合物を含むことができる。

【0445】

少なくともいくつかの実施形態に従うと、免疫細胞、好ましくはT細胞を、i n v i v oまたはe x v i v oで治療薬と接触させ、免疫応答を制御することができる。治療薬と接触させるT細胞は、/及び/ T細胞受容体を含むT細胞受容体を発現する、任意の細胞であることができる。T細胞は、C D 4とC D 5もまた発現するT細胞サブセットを含む、C D 3を発現する全ての細胞を含む。T細胞としては、ナイーブ細胞とメモリー細胞、及びC T L等のエフェクター細胞の両方が挙げられる。T細胞はまた、T h 1、T e 1、T h 2、T h 2、T h 3、T h 1 7、T h 2 2、T r e g、及びT r 1細胞等の細胞も含む。T細胞はまた、N K T細胞、及びT細胞系統の類似の固有のクラスも含む。

【0446】

V S I G 8遮断を標準的な癌治療と組み合わせてもよい。V S I G 8遮断を、化学療法レジメンと効果的に組み合わせてもよい。これらの場合において、投与される化学療法レジメンの用量を減少させることが可能であり得る。かかる組み合わせの例は、後期の腎細胞癌の治療のためにテムシロリムスと組み合わせる、本明細書にて開示する抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質である。かかる組み合わせの別の例は、後期の腎細胞癌を治療するためにインターロイキン-2 (I L - 2)と組み合わせた、及び、イピリムマブまたはB M S - 9 3 6 5 5 8と組み合わせた、本明細書にて開示した抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合タンパク質である。V S I G 8遮断と化学療法を組み合わせる使用背後にある科学的な理論的根拠は、大部分の化学療法化合物の細胞毒性作用の結果としての細胞死が、抗原提示経路における腫瘍抗原の量の増加をもたらす筈であるということである。細胞死によるV S I G 8の遮断と相乗効果をもたらさう他の併用療法は、放射線治療、凍結治療、手術、及びホルモン除去である。更なる免疫制御剤分子を用いる、他の更なる併用療法は、免疫系の刺激に相乗的に寄与し、癌を根絶する。これらの手順はそれぞれ、宿主内に腫瘍抗原の源を作製する。血管新生阻害剤をV S I G 8遮断と組み合わせてもよい。血管新生阻害は、腫瘍抗原を宿主の抗原提示経路に供給し得る細胞の死をもたらす。

【0447】

V S I G 8遮断抗体を、F c またはF e y受容体発現エフェクター細胞を腫瘍細胞に標的化する二重特異性抗体と組み合わせてもまた使用することができる（例えば、米国特許第5,922,845号及び同第5,837,243号を参照）。二重特異性抗体を使

10

20

30

40

50

用して、2つの個別の抗原を標的化することができる。例えば、抗Fc受容体/抗腫瘍抗原（例えば、Her-2/neu）二重特異性抗体を使用して、マクロファージを腫瘍部位を標的としている。この標的化は、腫瘍特異的応答をより効率的に活性化し得る。これらの応答におけるT細胞アームを、VSI G 8遮断を使用して補完する。あるいは、腫瘍抗原、及び樹状細胞特異的細胞表面マーカーに結合する二重特異性抗体を使用して、抗原をDCに直接送達してよい。

【0448】

腫瘍は、非常に多様なメカニズムにより宿主免疫監視機構を回避する。これらのメカニズムの多くは、腫瘍により発現され、免疫抑制性であるタンパク質の不活性化により克服され得る。これらとしてはとりわけ、TGF- β (Kehrl, J. et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050)、IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200)、及びFasリガンド (Hahne, M. et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365)が挙げられる。これらの要素のそれぞれに対する抗体を抗VSI G 8と組み合わせて使用し、免疫抑制剤の影響を弱め、宿主による腫瘍への免疫応答を付与してよい。

10

【0449】

宿主の免疫応答性を活性化するために使用され得る他の抗体を、抗VSI G 8と組み合わせて使用することができる。これらは、DC機能と抗原提示を活性化する、樹状細胞表面の分子を含む。抗CD40抗体は、効果的にT細胞ヘルパー活性の代わりとなることができ (Ridge, J. et al. (1998) *Nature* 393: 474-478)、VSI G 8抗体と組み合わせて使用することができる (Ito, N. et al. (2000) *Immunobiology* 201(5) 527-40)。OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169)、4-1BB (Melerio, I. et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997))、及びICOS (Hutloff, A. et al. (1999) *Nature* 397: 262-266)等の、T細胞共刺激分子に対する抗体、並びに、CTLA-4 (例えば米国特許第5,811,097号、イピリムマブ (ipilimumab)) またはBTLA (Watanabe, N. et al. (2003) *Nat Immunol* 4: 670-9)、B7-H4 (Sica, G. L. et al. (2003) *Immunity* 18: 849-61)、PD-1等の陰性共刺激分子の活性を遮断する抗体を活性化することによってもまた、T細胞の活性化の量の増加をもたらしてよい。

20

30

【0450】

骨髄移植は現在、造血由来の種々の腫瘍を治療するために使用されている。移植片対宿主病はこの治療の結果であるが、移植片対腫瘍応答からは治療的效果が得られる場合がある。VSI G 8遮断を使用して、ドナーから移植した腫瘍特異的T細胞の効果を増加させることができる。腫瘍に対する抗原特異的T細胞を産生するために、抗原特異的T細胞のex vivo活性化及び膨張、並びに、これらの細胞のレシピエントへの養子移入を伴ういくつかの実験的治療プロトコールもまた存在する (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51)。これらの方法を使用して、CMV等の病原体に対するT細胞応答を活性化してもよい。抗VSI G 8抗体の存在下におけるex vivo活性化は、養子移入したT細胞の頻度及び活性を増加させることが予想され得る。

40

【0451】

任意で、VSI G 8に対する抗体を、癌細胞、(組み換えタンパク質、ペプチド及び糖質分子を含む)精製腫瘍抗原、細胞、免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子をトランスフェクションした細胞等の免疫原と組み合わせて使用することができる (He et al (2004) *J. Immunol.* 173: 4919-28)。使用可能な腫瘍ワクチンの非限定例としては、大腸癌の治療用のMUC1のペプチド、卵巣癌の治療のための

50

MUC-1/CEA/TRICOMのペプチド、または、サイトカインGM-CSF（以下で更に論じる）を発現するようにトランスフェクションした腫瘍細胞が挙げられる。

【0452】

ヒトにおいては、腫瘍の中には、RCC等の、免疫原性であることが示されているものがある。VSI G8遮断によりT細胞活性化の閾値を上げることにより、宿主の腫瘍応答を活性化することを予測し得ることが予想される。VSI G8遮断は、免疫付与プロトコールと組み合わせた際に最も効果的なようである。腫瘍に対するワクチン接種のための多くの実験的方法が考案されてきている（例えば、Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738を参照、Restifo, N. and Szabolc, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita, V. et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Editionもまた参照のこと）。これらの方法の1つにおいて、自己または同種異系腫瘍細胞を使用してワクチンを調製する。これらの細胞ワクチンは、腫瘍細胞を形質導入してGM-CSFを発現した場合に最も効果的であることが示されている。GM-CSFは、腫瘍免疫付与のための抗原提示の強力な活性化因子であることが示されている。

10

20

【0453】

自己免疫疾患の治療のための、抗VSI G8抗体またはVSI G8融合タンパク質、及びそれらを含む医薬組成物の使用

少なくともいくつかの実施形態に従うと、VSI G8刺激治療薬として機能する、本明細書に記載したVSI G8抗体、断片、これらのコンジュゲート、もしくはVSI G8融合タンパク質、及び/またはこれを含む医薬組成物を任意で、免疫系関連疾患を治療するために使用してよい。

【0454】

任意で、免疫系関連状態は、免疫関連状態、本明細書で列挙した自己免疫疾患、移植拒絶反応及び移植片対宿主病、並びに/または、VSI G8が仲立ちする免疫刺激の遮断もしくは促進、本明細書で列挙する免疫関連疾患、並びに/または（免疫刺激を促進もしくは阻害する）免疫療法を含む。

30

【0455】

任意で、免疫状態は自己免疫疾患、移植拒絶反応、または移植片対宿主病から選択される。任意で、治療は、免疫関連状態を治療するのに有用な他の成分と組み合わせる。

【0456】

したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った作用物質を使用した多発性硬化症の治療を、例えば、任意で本明細書に記載した多発性硬化症を治療するための、任意の既知の治療薬または方法と組み合わせてよい。

40

【0457】

したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った作用物質を使用した関節リウマチの治療を、例えば、任意で本明細書に記載した関節リウマチを治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせてよい。したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った作用物質を使用したIBDの治療を、例えば、任意で本明細書に記載したIBDを治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせてよい。

【0458】

したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った作用物質を使用した乾癬の治療を、例えば、任意で本明細書に記載した乾癬を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせてよい。

50

【0459】

したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った作用物質を使用したI型糖尿病の治療を、例えば、任意で本明細書に記載したI型糖尿病 (t y p e 1 d i a b e t e s) を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせよう。

【0460】

したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った作用物質を使用したぶどう膜炎の治療を、例えば、任意で本明細書に記載したぶどう膜炎を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせよう。

【0461】

したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った作用物質を使用したシェーグレン症候群の治療を、例えば、任意で本明細書に記載したシェーグレン症候群を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせよう。

10

【0462】

したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った作用物質を使用した全身性エリテマトーデスの治療を、例えば、任意で本明細書に記載した全身性エリテマトーデスを治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせよう。

【0463】

上述の治療法においては、上述の自己免疫または炎症状態の1つを有する対象に、本明細書にて開示した炎症阻害性抗V S I G 8抗体もしくはV S I G 8融合タンパク質、または本発明に従った抗原結合断片を投与することが好ましく、本明細書にて開示した抗体またはV S I G 8融合タンパク質は、V S I G 8が仲立ちする免疫に対する少なくとも1つの影響を模倣するかまたはそれを刺激し、例えば、細胞傷害性T細胞もしくはNK活性、及び/または病理に関係する炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、例えば、T細胞寛容、または免疫抑制の延長を引き起こすT r e gを誘発することにより、病徴を予防または緩和し、潜在的に病気の寛解の延長をもたらす。

20

【0464】

本明細書で列挙する、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った治療薬及び/またはこれを含む医薬組成物を、例えば、同種 (a l i o) もしくは異種移植の急性もしくは慢性拒絶、または炎症性もしくは自己免疫疾患を治療もしくは予防するために、または寛容を誘発するために、単独の活性成分として、または、免疫制御レジメンもしくは他の抗炎症薬中の他の薬剤と共に投与しよう。

30

【0465】

感染症を治療するための抗体またはV S I G 8融合タンパク質、及び医薬組成物の使用
少なくともいくつかの実施形態に従い、V S I G 8遮断治療薬として機能する、本明細書に記載したV S I G 8抗体、断片、これらのコンジュゲート、またはV S I G 8融合タンパク質及び/もしくは医薬組成物を任意で、感染症を治療するために使用しよう。

【0466】

慢性的な感染症は多くの場合、ウイルス特異的T細胞応答の機能障害の程度を変化させることを特徴とし、この欠陥が、宿主が残存する病原体を取り除くことができない主な理由である。機能的エフェクターT細胞が最初、感染症の初期段階に生成されるが、それらは、外来抗原への持続的な曝露の結果、慢性的な感染症の過程において機能を徐々に喪失し、T細胞の疲弊を生じさせる。疲弊したT細胞は、高レベルの複数の同時阻害受容体、例えばC T L A - 4、P D - 1、及びL A G 3を発現する (C r a w f o r d e t a l . , C u r r O p i n I m m u n o l . 2 0 0 9 ; 2 1 : 1 7 9 - 1 8 6 ; K a u f m a n n e t a l . , J I m m u n o l 2 0 0 9 ; 1 8 2 : 5 8 9 1 - 5 8 9 7 , S h a r p e e t a l . , N a t I m m u n o l 2 0 0 7 ; 8 : 2 3 9 - 2 4 5) 。疲弊したT細胞によるP D - 1の過剰発現が、H I V、H C V及びH B Vを含む慢性的なウイルス感染に苦しむ患者において臨床的に観察された (C r a w f o r d e t a l . , C u r r O p i n I m m u n o l 2 0 0 9 ; 2 1 : 1 7 9 - 1 8 6 ; K a u f m a n n e t a l . , J I m m u n o l 2 0 0 9 ; 1 8 2 : 5 8 9 1 -

40

50

5897, Sharpe et al., Nat Immunol 2007; 8: 239-245)。他のウイルス、細菌、及び寄生生物を含む更なる病原体におけるこの経路について、いくつかの調査が行われている (Hofmeyer et al., J Biomed Biotechnol. Vol 2011, Art. ID 451694, Bhadra et al., Proc Natl. Acad Sci. 2011; 108(22): 9196-201)。例えば、PD-1経路は、標準的な盲腸結紮穿孔法により誘発される敗血症モデルを使用して、細菌感染の制御に關与することが示された。ノックアウトマウスにPD-1が存在しないことで、このモデルが敗血症による死から保護された (Huang et al., PNAS 2009: 106; 6303-6308)。

10

【0467】

PD-1またはCTLA-4等の同時阻害経路を遮断することにより、T細胞の疲弊を逆転させることができ (Rivas et al., J Immunol. 2009; 183: 4284-91; Golden-Mason et al., J Virol. 2009; 83: 9122-30; Hofmeyer et al., J Biomed Biotechnol. Vol 2011, Art. ID 451694)、これにより、抗ウイルス性免疫機能の回復が可能となる。ウイルス感染を治療するための、同時阻害を遮断する治療的可能性は、PD-1/PD-L1経路を遮断することにより幅広く研究され、このことは、アカゲザル (Valu et al., Nature 2009; 458: 206-210)における急性及び慢性サル免疫不全ウイルス (SRV) 感染症を含む、いくつかの感染症動物モデル、並びに、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) (Barber et al., Nature. 2006; 439: 682-7)、及びS/JL/Jマウスのタイラマウス脳脊髄炎ウイルス (TMEV) モデル (Duncan and Miller PLoS One. 2011; 6: e18548)等を含む慢性ウイルス感染症のマウスモデルにおいて効果的であることが示された。これらのモデルにおいて、PD-1/PD-L1遮断は抗ウイルス性応答を向上させ、残っているウイルスの除去を促進した。加えて、PD-1/PD-L1遮断は、血漿中の特異的抗ウイルス抗体の産生を増加させることにより明らかとなったように液性免疫を増加させ、これは、改善した細胞応答と組み合わせ、血漿中のウイルス量を減少させ、生存を増加させる。

20

30

【0468】

本明細書で使用する場合、「感染症及び/または感染病」及び/または「感染症」という用語は、同じ意味で用いられ、個別の宿主生物内における病原性生物学的作用物質の存在及び/または成長により引き起こされる、任意の疾患、病気及び/または状態を含む。本明細書で使用する場合、「感染症」という用語は、臨床的に明白な疾患 (即ち、病気の特徴的な医学的徴候及び/もしくは症状) を示し、かつ/またはその経過の大部分もしくは全てが無症候 (asymptomatic) である、上述の疾患、病気及び/または状態を含む。本明細書で使用する場合、「感染症」という用語は、増殖とサイトカイン産生の低下により明らかとなる障害を有する機能性を特徴とする、T細胞表現型の疲弊をもたらす外来抗原の残存により引き起こされる疾患、病気及び/または状態もまた含む。本明細書で使用する場合、「感染症及び/または感染病」及び/または「感染症」という用語は、以下に記載する、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染及び/または寄生生物感染により引き起こされる感染症、感染病及び/または感染状態のいずれかを更に含む。

40

【0469】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従い、本明細書で列挙する治療薬、及び/またはこれを含む医薬組成物と、感染症を治療するのに効果的な既知の治療薬の組み合わせの使用を提供する。

【0470】

本明細書で列挙する治療薬、及び/またはこれを含む医薬組成物を、任意で本明細書に記載した、細菌感染症の治療に使用する1種以上の追加の治療薬と組み合わせ投与する

50

ことができる。

【0471】

本明細書で引用する治療薬、及び/またはこれを含む医薬組成物を、任意で本明細書に記載した、ウイルス感染症の治療に使用する1種以上の追加の治療薬と組み合わせて投与することができる。本明細書で列挙する治療薬、及び/またはこれを含む医薬組成物を、任意で本明細書に記載した、真菌感染症の治療に使用する1種以上の追加の治療薬と組み合わせて投与することができる。

【0472】

上述の治療法においては、上述の感染状態の1つを患う対象に、本明細書にて開示した免疫活性抗V S I G 8抗体もしくはV S I G 8融合タンパク質、または本発明に従った抗原結合断片を投与するのが好ましく、本明細書にて開示したこの抗体またはV S I G 8融合タンパク質は、V S I G 8が仲立ちする少なくとも1つの免疫への効果(例えば、細胞傷害性T細胞もしくはNK活性の阻害効果、及び/または炎症性サイトカイン産生の阻害効果)に拮抗するか、または、T r e gでのV S I G 8の刺激効果を阻害することにより、感染した細胞または病原体の枯渇または殺傷を促進し、潜在的に、対象の免疫細胞による病原体または感染細胞の殺傷の向上に基づき、病気の寛解をもたらす。

10

【0473】

敗血症の治療のための、抗V S I G 8抗体またはV S I G 8融合(F U S O N)タンパク質、及びそれらを含む医薬組成物の使用

少なくともいくつかの実施形態に従い、V S I G 8遮断治療薬として機能する、本明細書に記載したV S I G 8抗体、断片、これらのコンジュゲート、及び/または医薬組成物を任意で、敗血症を治療するために使用してよい。

20

【0474】

敗血症は潜在的に生命を脅かす、感染症の合併症である。敗血症は、感染症に対する最初の宿主応答が不適切に増幅され、制御不全となった場合に進行する複雑な臨床的症候群を示し、宿主にとって有害となる。敗血症における最初の超炎症性段階(「サイトカインストーム」)の後に、免疫抑制状態が続く(H o t c h k i s s e t a l 2 0 1 3 L a n c e t I n f e c t . D i s . 1 3 : 2 6 0 - 2 6 8)。「免疫麻痺」とも呼ばれる、免疫障害のこの後の段階では、一次感染、H S V及びサイトメガロウイルス等のウイルスの再活性化、並びに、多くの場合は免疫応答性患者にはとりわけ毒性でない生命体による、新しい二次感染の進行の除去が行われなことが明らかとなる。今日の敗血症患者の圧倒的多数は、最初の超炎症性発作から生き延びて、ただ次の数日~数週間にわたり、敗血症が誘発する複数の臓器機能不全に対する包括的ケアユニットにいることとなる。敗血症が誘発する免疫抑制は、これらの脆弱な患者において支配的な免疫不全としてますます認識されている。一次感染後の病原体の除去障害、及び/または二次感染への罹りやすさは、敗血症に関係する高い罹患率及び死亡率の原因となる。

30

【0475】

阻害タンパク質の上方制御が、敗血症の免疫抑制に存在する臨床メカニズムの1つとして最近明らかになってきた。例えば、P D - 1 / P D L - 1経路は、敗血症の転帰の因子を決定し、抗菌性免疫応答による効果と損傷の繊細なバランスを制御しているようである。実験モデルにおける敗血症の間に、腹腔マクロファージと血液単球がP D - 1の量を著しく増加させ、このことは、細胞機能障害の進行と関係していた(H u a n g e t a l 2 0 0 9 P N A S 1 0 6 : 6 3 0 3 - 6 3 0 8)。同様に、敗血症性ショックの患者において、末梢T細胞におけるP D - 1、及び単球におけるP D L - 1の発現が劇的に上方制御された(Z h a n g e t a l 2 0 1 1 C r i t . C a r e 1 5 : R 7 0)。最近の動物研究では、抗-P D 1または抗P D L 1抗体による、P D - 1 / P D L - 1経路の遮断は、敗血症における生残を向上させたことが示されている(B r a h m a m d a m e t a l 2 0 1 0 J . L e u k o c . B i o l . 8 8 : 2 3 3 - 2 4 0 ; Z h a n g e t a l 2 0 1 0 C r i t i c a l C a r e 1 4 : R 2 2 0 ; C h a n g e t a l 2 0 1 3 C r i t i c a l C a r e 1 7 : R 8 5)。

40

50

同様に、抗CTLA4抗体によるCTLA-4の遮断は、敗血症における生存を向上させた(Inoue et al 2011 Shock 36:38-44; Chang et al 2013 Critical Care 17:R85)。合わせると、これらの所見は、負の共刺激分子を含む阻害タンパク質の遮断は、敗血症の有害作用を防止するための潜在的な治療的アプローチであることを示唆している(Goyert and Silver, J Leuk. Biol., 88(2):225-226, 2010)。

【0476】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書で列挙する治療薬、及び/またはこれを含む医薬組成物と、敗血症を治療するのに効果的な既知の治療薬の組み合わせの使用を提供する。

10

【0477】

敗血症患者における免疫系の通常存在する活性及び抑制アームの繊細なバランスの回復は、不均衡さの正確な性質、即ち、感染症に対応する病原性生命体、その位置、感染開始から経過した時間、及び個体の他のパラメーターに依存し得る。したがって、ツールの正確な選択は、各個体患者の特定の免疫状態または欠陥に大きく依存し得、異なる作用物質の組み合わせを必要とする場合がある。

【0478】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書で列挙する治療薬及び/またはこれを含む医薬組成物の組み合わせの使用を提供し、これを、敗血症の標準的なケアまたは新規の治療と、敗血症の最初の超炎症性段階におけるサイトカインストームを遮断する治療法と、及び/または敗血症が誘発する免疫抑制段階を克服するための免疫活性効果を有する治療法と、組み合わせることができる。

20

【0479】

敗血症の標準的ケア治療の組み合わせが、「International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock」(Dellinger et al 2013 Intensive Care Med 39:165-228)により推奨されており、それらのいくつかを以下に記載する。

【0480】

起こりうる全ての病原体(細菌及び/または真菌)に対して活性を有する、広範囲に使用される抗体(治療は敗血症が診断された際に開始するが、特定の抗原は同定されていない)の例としては、セフォタキシム(Claforan(登録商標))、チカルシリン及びクラバン酸(Timentin(登録商標))、ピペラシリン及びタゾバクタム(Zosyn(登録商標))、イミペネム及びシラスタチン(Primaxin(登録商標))、メロペネム(Merrem(登録商標))、クリンダマイシン(Cleocin)、メトロニダゾール(Flagyl(登録商標))、セフトリアキソン(Rocephin(登録商標))、シプロフロキサシン(Cipro(登録商標))、セフェピム(Maxipime(登録商標))、レボフロキサシン(Levaquin(登録商標))、バンコマイシン、または一覧の薬剤の任意の組み合わせが挙げられる。

30

40

【0481】

血管収縮薬の例としては、ノルエピネフィリン、ドーパミン、エピネフィリン、バソプレシンが挙げられる。

【0482】

ステロイドの例としては、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、またはフルドコルチゾンが挙げられ、静脈内または他の筋肉収縮性治療の例としては、心筋障害を有する敗血症患者用のドブタミンが挙げられる。

【0483】

ドロトレコギン(drotrecogin alfa)(活性化)(DrotAA)等の組み換えヒト活性化プロテインC(rhAPC)。

50

【0484】

阻害剤は、加えて局所及び全身の炎症を低減する。

【0485】

ピルベート、サクシネート、または高用量のインスリン置換等の代謝介入。

【0486】

敗血症の新規の潜在的治療法との組み合わせ：

s P L A 2 - I I A (L Y 3 1 5 9 2 0 N A / S - 5 9 2 0 等) の選択的阻害剤。理論的根拠：炎症の最中に放出される I I A 群分泌ホスホリパーゼ A 2 (s P L A 2 - I I A) は重度の敗血症で増加し、血漿量は生存と逆相関の関係にある。

【0487】

リン脂質エマルション (G R 2 7 0 7 7 3 等) 。理論的根拠：前臨床、及び e x v i v o 研究は、リポタンパク質は内毒素と結合して中和することを示し、実験動物研究は、リポタンパク質が投与された際の敗血症死からの防御を示す。内毒素の中和は、リポタンパク質粒子内のリン脂質の量と相関している。

【0488】

抗 T N F - 抗体：理論的根拠：腫瘍壊死因子 (T N F -) は、敗血症抗 C D 1 4 抗体 (I C 1 4 等) で観察される病態生理学的徴候及び症状の多くを誘発する。理論的根拠：C D 1 4 等の上流認識分子は、病因において重要な役割を果たす。細菌細胞壁成分は骨髄細胞上の C D 1 4 及びコレセプターに結合し、細胞活性化、及び炎症性メディエーターの産生をもたらす。抗 C D 1 4 モノクローナル抗体 (I C 1 4) は、内毒素血症の動物及びヒトモデルにおいて、リポ多糖体が誘発する応答を低下させることが示されている。

【0489】

T o l l 様受容体 (T L R) の阻害剤、及びこれらの下流シグナル伝達経路。理論的根拠：感染微生物は、その表面に非常に保存された巨大分子 (例えばリポ多糖体、ペプチドグリカン) を示す。これらの巨大分子が免疫細胞の表面上のパターン認識受容体 (T o l l 様受容体 [T L R] と呼ばれる) により認識されると、宿主の免疫応答が開始される。これは、敗血症の特徴である過剰な全身性炎症反応の原因となり得る。いくつかの T L R の阻害は、特に、グラム陰性菌の外膜リポ多糖体または内毒素の受容体である T L R 4 における潜在的な治療として評価されている。T L R 4 発現と経路を標的する種々の薬剤が、敗血症の治療可能性を有している (W i t t e b o l e e t a l 2 0 1 0 M e d i a t o r s o f I n f l a m m a t i o n V o l 1 0 記事 I D 5 6 8 3 9 6) 。それらの中には、T L R 4、可溶性 T L R 4、スタチン (R o s u v a s t a t i n (登録商標) 、 S i m v a s t a t i n (登録商標) 等) 、ケタミン、ニコチン類似体、エリトラン (E 5 5 6 4) 、レサトルピド (T A K 2 4 2) を標的化する抗体が挙げられる。加えて、クロロキン等の他の T L R のアンタゴニスト、中和抗体 (抗 T L R - 2) による T L R - 2 の阻害も挙げられる。

【0490】

S O C S 1 (サイトカイン分泌抑制剤) 、タラクトフェリン (T a l a c t o f e r r i n) 即ち組み換えヒトラクトフェリンにおける作用におけるランソプラゾール。理論的根拠：ラクトフェリンは、分泌物と免疫細胞に見出される、抗感染性及び抗炎症性性質を有する糖タンパク質である。ヒトラクトフェリンの組み換え形態であるタラクトフェリンは類似の性質を有し、胃腸粘膜バリアの完全性を維持するのに重要な役割を果たす。タラクトフェリンは、敗血症の動物モデルにおいて、及び、重度の敗血症を患う患者の臨床試験において有効性を示した (G u n t u p a l l i e t a l C r i t C a r e M e d . 2 0 1 3 ; 4 1 (3) : 7 0 6 - 7 1 6) 。

【0491】

乳脂肪小球 E G F 第 V I I I 因子 (M F G - E 8) : アポトーシス細胞と食細胞の架橋分子であり、アポトーシス細胞のファゴサイトーシスを促進する。

【0492】

ニコチン及び類似体等の、「コリン作動性抗炎症性経路」のアゴニスト。理論的根拠：

10

20

30

40

50

迷走神経を刺激することにより、サイトカイン、即ち免疫系メディエーターの産生を減少させ、炎症を遮断する。「炎症性反射」と呼ばれる、この神経「回路」は、マクロファージに発現するニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha 7$ サブユニット($\alpha 7 n A C h R$)上の神経末端部から放出されるアセチルコリンの特定の作用(「コリン作動性抗炎症性経路」と呼ばれるメカニズム)を通して行われる。迷走神経刺激または薬理的 $\alpha 7$ アゴニストを介するこの経路の活性化により、全身性炎症、ショック、及び敗血症の複数のモデルにおける組織損傷が防止される(Matsuda et al 2012 J Nippon Med Sch. 79:4-18; Huston 2012 Surg. Infect. 13:187-193)。

【0493】

インフラマソーム経路を標的化する治療薬。理論的根拠：インフラマソーム経路は敗血症における炎症反応に大きく寄与し、決定的な構成成分が、局在化した炎症から悪化した超炎症性宿主応答への移行の誘導を担う(Cinel and Opal 2009 Crit. Care Med. 37:291-304; Matsuda et al 2012 J Nippon Med Sch. 79:4-18)。

【0494】

幹細胞治療法。理論的根拠：間葉幹細胞(MSC)は、損傷した組織を収容する、常在幹細胞を活性化する、パラクリンシグナルを分泌して全身及び局所炎症応答を制限する、免疫細胞を有益に制御する、脅かされた組織におけるアポトーシスを減少させて血管新生を刺激することにより組織の治癒を促進する、及び直接の抗菌活性を示す能力により複数の有益な性質を示す。これらの効果は、敗血症動物モデルにおける臓器機能不全の低下と生残の改善と関係しており、MSCが治療用添加剤として有用であり得るという証拠をもたらした(Wannemuehler et al 2012 J. Surg. Res. 173:113-26)。

【0495】

本明細書にて開示した抗VSI G8抗体またはVSI G8融合タンパク質の、免疫活性抗体、サイトカイン療法、免疫調節剤等の他の免疫調節剤との組み合わせ。かかる作用物質は、特に、(先天性及び/または獲得性に関わらない)免疫防御が、例えば敗血症が誘発する超炎症性及び免疫抑制状態において低下する条件において、免疫応答性の増加をもたらす。宿主免疫を増強する治療薬による、敗血症が誘発する免疫抑制状態の逆転は、免疫抑制が記録された患者において、二次感染の発生を低下させ、転帰を改善し得る(Hotchkiss et al 2013 Lancet Infect. Dis. 13:260-268; Payen et al 2013 Crit Care. 17:118)。

【0496】

免疫活性抗体は、免疫機能を直接制御する、即ち、他の阻害タンパク質を遮断することにより、または共刺激タンパク質を増強することにより免疫応答を促進する。敗血症の実験モデルは、阻害タンパク質(PD-1、PDL-1またはCTLA-4等)の抗体遮断による免疫活性が、敗血症における生存を向上したことを示しており(Brahmamdham et al 2010 J. Leukoc. Biol. 88:233-240; Zhang et al 2010 Critical Care 14:R220; Chang et al 2013 Critical Care 17:R85; Inoue et al 2011 Shock 36:38-44)、かかる免疫活性剤が、敗血症が誘発する免疫抑制の有害作用を防止するための潜在的な治療法であることを示している(Goyert and Silver I Leuk. Biol. 88(2):225-226, 2010)。免疫活性抗体としては、以下が挙げられる。1) 阻害免疫チェックポイントを標的とするアンタゴニスト抗体としては、抗CTLA4 mAb(イピリムマブ、トレメリムマブ等)、抗PD-1(ニボルマブ、BMS-936558/M DX-1106/ONO-4538、AMP224、CT-011、ランブロジルマブ(lambrozilumab)、MK-3475等)、抗PDL-1アンタゴニスト(BM

10

20

30

40

50

S - 936559 / MDX - 1105、MEDI4736、RG - 7446 / MPDL3280A等)、抗LAG - 3 (IMP - 321等)、抗TIM - 3、抗BTLA、抗B7 - H4、抗B7 - H3、抗VISTAが挙げられる。2) 免疫活性タンパク質を増強するアゴニスト抗体としては、抗CD40 mAb (CP - 870, 893、ルカツムマブ (lucatumumab)、ダセツズマブ等)、抗CD137 mAb (BMS - 663513、ウレルマブ (urelumab)、PF - 05082566等)、抗OX40 mAb (抗OX40等)、抗GITR mAb (TRX518等)、抗CD27 mAb (CDX - 1127等)、及び抗ICOS mAbが挙げられる。

【0497】

免疫エフェクター細胞を直接刺激し、免疫応答を向上させるサイトカイン：IL - 2、IL - 7、IL - 12、IL - 15、IL - 17、IL - 18及びIL - 21、IL - 23、IL - 27、GM - CSF、IFN (インターフェロン)、IFNを、敗血症治療用の抗GEN抗体と組み合わせて使用することができる。理論的根拠：サイトカインベースの治療法は、患者自身の免疫系を刺激する直接的な試みを体現している。敗血症の実験モデルは、IL - 7及びIL - 15等のサイトカインの投与が、T細胞の生存能を促進し、敗血症における改善した生存をもたらすことを示した (Unsing er et al 2010 J. Immunol. 184 : 3768 - 3779 ; In oue et al 2010 J. Immunol. 184 : 1401 - 1409)。インターフェロン (TPN) は、敗血症が誘発する in vitroでの単球の免疫抑制状態を逆転させる。in vivo研究は、IFN は、ヒトにおいて in vivoで免疫抑制状態を部分的に逆転させることを示した。IFN と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF) は、敗血症を患う患者の、ex vivoで刺激した白血球の免疫適合性を回復させる (Mouktaroudi et al Crit Care . 2010 ; 14 : P17 ; Leentjens et al Am J Res pir Crit Care Med Vol 186 , pp 838 - 845 , 2012)。

【0498】

チモシン 1等の免疫調節剤。理論的根拠：チモシン 1 (T 1) は、先天性及び獲得免疫系の両方において内因性レギュレーターとして機能する、天然の胸腺ペプチドである。これは、B型肝炎及びC型肝炎、ある特定の癌等のウイルス感染を含む免疫不全関連疾患を治療するために、及びワクチン強化のために、世界中で使用されている。とりわけ、免疫調節剤研究における細菌の進展は、敗血症患者におけるT 1治療の有益な効果を示している (Wu et al . Critical Care 2013 , 17 : R8)。

【0499】

上述の敗血症治療法において、毒性感染症のために敗血症を患う、または敗血症の進行のリスクを有する対象、例えば、抗生物質または他の薬剤に耐性を有する対象は、本明細書にて開示する免疫刺激性抗VSI G8抗体もしくはVSI G8融合タンパク質、または本発明に従った抗原結合断片が投与されるのが好ましく、本明細書にて開示したこの抗体またはVSI G8融合タンパク質は、VSI G8が仲立ちする少なくとも1つの免疫への効果、例えば、細胞傷害性T細胞もしくはNK活性の阻害効果、及び/または炎症性サイトカイン産生の阻害効果に拮抗するか、またはTreg上のVSI G8の刺激効果を阻害することにより、枯渇を促進、または感染細胞もしくは病原体を殺傷し、潜在的に、対象の内因性免疫細胞による病原体または感染細胞の殺傷の向上に基づき、病気の寛解をもたらす。敗血症は速やかに臓器不全をもたらし得るため、本実施形態においては、インタクトな抗体ではなく、Fab等の抗VSI G8抗体断片を投与するのが、インタクトな抗体よりも敗血症及び感染部位に素早く到達し得るので有益であり得る。(かかる治療レジメンにおいて、抗体半減期は、場合によってはこの病気の急速な罹患のために、さほど問題とはならない場合がある。)

【0500】

10

20

30

40

50

遺伝子または細胞治療または移植後の、望ましくない免疫活性化を低下させるための、抗 V S I G 8 抗体または V S I G 融合タンパク質、及びそれらを含む医薬組成物の使用。

本明細書で使用する場合、「遺伝子治療」という用語は、任意の種類、ベクターが仲立ちする遺伝子治療、遺伝子導入、ウイルスが仲立ちする遺伝子導入を包含する。

【0501】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、V S I G 8 を標的とし、免疫応答にて阻害活性を有する、本明細書に記載した V S I G 8 抗体、断片、これらのコンジュゲート、及び/または医薬組成物を、種々の遺伝子病の治療に使用する遺伝子治療の後の、望ましくない免疫活性化を低下させるための治療薬として使用することができる。1つの仮説に束縛されるものではないが、かかる抗体は免疫応答において V S I G 8 様の阻害活性を有し、かつ/または、任意で病原性 T 細胞及び/もしくは NK 細胞の阻害により、V S I G 8 免疫阻害活性を増強する。

10

【0502】

遺伝子病の治療のための遺伝子治療産物は、現在臨床試験中である。最近の研究では、遺伝子治療ベクターを使用した、いくつかの遺伝子病における治療の成功が記録されている。遺伝子治療法は、3つの重要な要素、すなわち移される遺伝子、遺伝子が導入される標的組織、及び、遺伝子を標的組織に入れるのを容易にするために用いられるベクター（遺伝子送達賦形剤）を特徴とする。圧倒的多数の遺伝子治療臨床試験は、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、偽型ウイルス及び単純ヘルペスウイルスを含むウイルスベクターを、非常に効率的な送達賦形剤として利用している。しかし、ヒト免疫系と、遺伝子治療ベクターの全ての構成要素との相互作用は、長続きする治療効果に対して大きな制限の1つを示すようである。ヒトでの研究は、ウイルスベクターに対する宿主免疫応答の可能性は高いことを示している。細胞毒性細胞による、中和抗体の形成及び/または形質導入細胞の破壊をもたらすウイルス、または導入遺伝子産物そのものへのかかる免疫応答は、治療効果を非常に妨害する可能性がある (Seregini and Amalfitano 2010 Viruses 2:2013; Mingozi and High 2013 Blood 122:23; Masate et al 2013 Discov Med. 15:379)。したがって、免疫応答を回避して、トランスジェニック治療用タンパク質の長期間にわたる発現を促進する方法の開発は、クリニックにおいて遺伝子治療を成功させるための、主な課題の1つとなっている。

20

30

【0503】

ウイルスベクターによりコードされるトランスジェニックタンパク質に対する免疫応答に影響を及ぼす因子としては、投与経路、ベクター用量、トランスジェニックタンパク質の免疫原性、宿主の炎症状態、及びキャプシドの血清型が挙げられる。これらの因子は、先天性免疫、サイトカイン産生、APC成熟、抗原提示を誘発し、最終的に、機能性エフェクターに対するナイーブ T リンパ球をプライミングすることにより免疫原性に影響を及ぼすと考えられている (Mingozi and High 2013 Blood 122:23)。したがって、まさにこれらのメカニズムを干渉することにより免疫活性化を低下させる着想は、短期間の免疫抑制を誘発し、ベクター投与に続く初期の免疫プライミングを回避し、長期間の寛容を促進するという目的をもって理論的に現れた。

40

【0504】

遺伝子治療の後、特に、複数の注射の後の、望ましくない免疫活性化を阻害する方法として、ベクター送達時に、免疫応答の2つの重複しないチェックポイントを標的とすることによる免疫制御治療を、動物モデルで試験した。マウスまたはサルの肺の中に注入したアデノウイルスベクターによる、ベクターが仲立ちする免疫応答の研究では、抗 CD 40 L 抗体による一過性の処置が、アデノウイルスが誘発する免疫応答の抑制をもたらし、結果的に動物にアデノウイルスベクターを再投与することができることが示された。この抗

50

体による手短な治療は、免疫機能の長期間にわたる効果をもたらし及び、Abの効果がもはや大きなものでなくなったときを超えて、アデノウイルス特異的な体液性応答の阻害を延ばし、この共刺激経路の遮断を、遺伝子導入ベクターの投与を可能にする免疫調節レジメンとしての治療可能性として示している (Scaria et al. 1997 Gene Ther. 4: 611; Chirmule et al. 2000 J. Virol. 74: 3345)。他の研究では、一次ベクター投与の前後にCTLA4-Igと抗CD40L Abを同時投与することにより、これらの作用物質の免疫抑制効果がもはや存在しなくなった後でも、ベクターに対する免疫応答が低下し、長期間にわたる、アデノウイルスが仲立ちする遺伝子発現が延び、アデノウイルスが仲立ちする二次遺伝子導入を可能にすることが示され、このことは、一過性の免疫抑制治療と共に、持続性アデノウイルスが仲立ちする二次遺伝子導入を得ることが可能になり得ることを示している (Kay et al. 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 4686)。別の研究では、CTLA4-Igと抗CD40L Abを同様に投与することで、各遺伝子導入の最中に治療が行われたことを条件として、ベクターに対する中和抗体の形成が妨げられ、遺伝子導入の発現を可能にした (Lorain et al. 2008 Molecular Therapy 16: 541)。更に、単回投与でも、CTLA4-Igをマウスに投与することで、早い時点で免疫応答の抑制、及び導入遺伝子発現の延長をもたらされた (Adriouch et al. 2011 Front. Microbiol. 2: 199)。しかし、CTLA4-Igのみでは、導入遺伝子産物に対する免疫応答を恒久的に取り除くには不十分であった。CTLA4-Igと、PD-L1またはPDL-2の2つのチェックポイントを標的とする組み合わせ治療により、恐らく、免疫調節の、2つの重複しないメカニズムを標的とすることにより、後の時点で導入遺伝子寛容の相乗的改善をもたらされ、長期にわたる導入遺伝子の持続と発現が得られた (Adriouch et al. 2011 Front. Microbiol. 2: 199)。

10

20

【0505】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従うと、本明細書に記載する可溶性VSIg8タンパク質及び/またはタンパク質をコードする核酸配列を単独で、または、他の免疫調節剤と組み合わせ、もしくは、遺伝子治療に対する免疫応答の制限を克服するように試験された方法及びアプローチのいずれかと組み合わせ、遺伝子治療の後の望ましくない免疫活性化を低下させるために使用することができる。

30

【0506】

現在のアプローチとしては、送達ベクターに対する抗体を有する患者を除外すること、高用量のベクターを投与すること、空のキャプシドを使用して、後のベクター形質導入を可能にする抗ベクター抗体を吸着すること、反復血漿交換(血漿分離交換法)サイクルにより免疫グロブリンを吸着し、抗ベクター抗体の力価を低下させることが挙げられる。

【0507】

これらの制限を克服することを試みる新規のアプローチは、大きく2つのカテゴリー、すなわちAdベクターそのものの選択的改変と、宿主の先行免疫調節に分けることができる (Seregin and Amalfitano 2010 Viruses 2: 2013)。第1のカテゴリーは、(1)特定の阻害剤またはリガンドのAd-キャプシド表示；(2)Adベクターキャプシド部位全体の共有結合修飾；(3)組織特異的プロモーターと局所局所投与の使用；(4)ゲノム改変抗体の使用；及び(5)キメラまたは代替の血清型抗体の開発等の、いくつかの革新的な方法を含む。

40

【0508】

第2のカテゴリーの方法としては、免疫抑制剤または特定の化合物を使用して、ウイルスベクターにより誘発されることが知られている重要な免疫経路を遮断することが挙げられる。免疫抑制剤は前臨床試験で試験されており、転写ベクター及び導入遺伝子産物に対する免疫応答の防止または根絶に有効性を示している。これらは、シクロスポリンA；シクロホスファミド；FK506等の一般的な免疫抑制剤、デキサメタゾン等の糖質コルチ

50

コイドまたはステロイド、TLR9アンタゴニストオリゴヌクレオチドであるODN-2088等のTLR9遮断薬、抗TNF-抗体またはTNFR-Ig抗体、Erk、及び他のシグナル伝達阻害剤(U0126等)を有するTNF-遮断薬を含む。臨床設定において、糖質コルチコイドの投与を用いて、重傷の血友病B患者に対してヒト第IX因子導入遺伝子を発現する、アデノウイルス随伴ウイルス(AAV)ベクターを肝臓に遺伝子導入する際に、ウイルス性キャプシドに向けてのT細胞応答を鈍らせることに成功している(Nathwani et al 2011 N. Engl. J. Med. 365: 2357)。

【0509】

宿主を「全体的に」、そして非特異的に免疫抑制する傾向にある薬剤を利用する以前のアプローチとは対照的に、一層選択的な免疫抑制アプローチが開発されている。これらには、CD40とCD154、ICOSとICOSL、CD28とCD80またはCD86(CTLA4-Igを含む)、NKG2DとNKG2Dリガンド、LFA-1とICAM、LFA-3とCD2、4-1BBと4-1BBL、OX40とOX40L、GITRとGITRL等の、陽性の共刺激相互作用の遮断をもたらす作用物質、並びに、CTLA-4、PD-1、BTLA、LAG-3、TIM-1、TEVI-3、KIR等の陰性共刺激受容体、並びに、B7-H4とB7-H3に対する受容体を刺激する作用物質の使用が含まれる。これらのいくつかは、前臨床、または臨床移植研究で利用されている(Pilat et al 2011 Sem. Immunol. 23: 293)。

【0510】

上述の遺伝子もしくは細胞治療、または移植適応症(transplant indication)の治療において、細胞もしくは遺伝子治療、または移植組織もしくは臓器を有する、またはこれらを受ける予定の対象には、本明細書にて開示した炎症阻害性抗VSIg8抗体もしくはVSIg8融合タンパク質、または本発明に従った抗原結合断片が投与されるのが好ましく、本明細書にて開示する抗体またはVSIg8融合タンパク質は、VSIg8が仲立ちする少なくとも1つの免疫への効果、例えば、細胞傷害性T細胞もしくはNK活性への阻害効果、及び/または炎症性サイトカインの産生における阻害効果、またはTregでの刺激効果を増強する、刺激する、または模倣することにより、治療で使用する細胞もしくは遺伝子に対する宿主免疫応答、または、移植細胞、臓器もしくは組織に対する好ましくない免疫応答を予防または低下させる。治療は、移植または注入した細胞、組織または臓器に対する免疫寛容の延長を誘発するのが好ましい。場合によっては、例えば、免疫細胞を含有する移植細胞、組織、または臓器の場合、本明細書にて開示した免疫阻害性抗VSIg8抗体もしくはVSIg8融合タンパク質、または抗原結合断片を、免疫細胞を寛容化し、潜在的に望ましくない免疫応答もしくはGVHD免疫反応を防止するために、注入もしくは移植の前に細胞、組織もしくは臓器と、かつ/または潜在的に移植レシピエントの免疫細胞と接触させてよい。

【0511】

医薬組成物

他の態様においては、本発明は、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った治療薬の1つまたはそれらの組み合わせを含有する組成物、例えば医薬組成物を提供する。したがって、本発明は、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った治療に有効な量の治療薬を含む医薬組成物を特長とする。

【0512】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った医薬組成物は更に、癌(ここで、癌は非転移性、侵襲性または転移性である)治療のため、かつ/または本明細書で引用した免疫関連疾患、感染症及び/または敗血症の治療のために使用するのが好ましい。

【0513】

「治療」とは、治療的処置と、予防(prophylactic)または予防(preventative)方法の両方を指す。治療が必要な対象としては、既に疾患を患う対象、及び、疾患が予防されるべき対象が挙げられる。したがって、本明細書において治療

10

20

30

40

50

される哺乳類は、疾患を有すると診断されてよいか、または、疾患に罹りやすい、もしくはなりやすくてよい。治療目的の「哺乳類」とは、ヒト、飼育動物及び家畜、及び動物園、スポーツまたはペット動物例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ等を含む、哺乳類として分類される任意の動物を意味する。哺乳類はヒトであることが好ましい。

【0514】

「治療的有効量」という用語は、哺乳類の病気または疾患を治療するのに効果的な、本発明に従った作用物質の量を意味する。

【0515】

本発明の治療薬を、単独で、または、製薬上許容できる担体と混合した医薬組成物の一部として対象に提供することができる。

10

【0516】

投与をレシピエント患者が許容することができる場合、組成物は、「製薬上許容できる担体」とであると言われる。本明細書で使用する場合、「製薬上許容できる担体」としては、生理学的に適合する任意の、全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤等が挙げられる。担体は、(例えば注射または注入による)静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与に好適であることが好ましい。

【0517】

かかる組成物としては、滅菌水、緩衝生理食塩水(例えば、Tris-HCl、アセテート、ホスフェート)、pH剤及びイオン強化剤、及び洗剤及び可溶化剤(例えばポリソルベート20、ポリソルベート80)等の、任意で酸化防止剤(例えばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、防腐剤(例えばチメロサル(Thimersol)、ベンジルアルコール)、並びに増量物質(例えばラクトース、マンニトール)等の添加剤が挙げられる。以下に詳述するように、非水溶媒または賦形剤もまた、使用してよい。

20

【0518】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った医薬組成物で用いられ得る好適な水性及び非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、及びそれらの好適な混合物、植物油(オリーブ油等)、及び、オレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルが挙げられる。好適な流動性は、例えばレシチン等のコーティング材料の使用により、分散液の場合には必要な粒径の維持により、及び界面活性剤の使用により維持される。投与経路に応じて、活性化化合物、即ち、V S I G 8タンパク質または二重特異的分子のいずれか1つと特異的に結合する、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、及び抗原結合断片、並びにこれらを含むコンジュゲート、並びに/または代替の足場を、材料でコーティングして、この化合物を、酸の作用、及び、化合物を不活性化し得る他の自然条件から保護してよい。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った薬学的化合物は、1種以上の製薬上許容できる塩を含んでよい。「薬剤として許容される塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持し、好ましくない任意の毒性効果を付与しない塩を指す(例えば、Berger, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。そのような塩の例としては、酸付加塩及び塩基添加塩が挙げられる。酸付加塩としては、無毒性無機酸(例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸等)に由来するもの、並びに、無毒性有機酸(例えば脂肪族モノ及びジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族及び芳香族スルホン酸等)に由来するものが挙げられる。塩基添加塩としては、アルカリ土類金属(例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等)由来のもの、及び、無毒性有機アミン(例えばN, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン等)に由来するものが挙げられる。

30

40

【0519】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った医薬組成物は、製薬上許容できる抗酸化剤を含んでもよい。製薬上許容できる酸化防止剤の例としては、(1)例えばアスコル

50

ビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等の、水溶性酸化防止剤；（２）例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロール等の、油溶性酸化防止剤；及び（３）クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸等の、金属キレート剤が挙げられる。

【０５２０】

これらの組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤等のアジュバントを含有してよい。微生物が存在することを防止することが、上述の滅菌手順、及び、種々の抗菌及び抗カビ剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等を含めることの両方により確保されてよい。組成物中に糖類、塩化ナトリウム等の等張剤が含まれることも望ましい場合がある。加えて、注射可能な薬剤処方での吸収を長引かせることは、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチン等の、吸収遅延剤を含有することによりもたらされる。

10

【０５２１】

製薬上許容できる担体としては、無菌注射可能な溶液または分散液の即時調製のための、滅菌水溶液または分散液、及び滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質のためのかかる媒体及び作用物質の使用は、当該技術分野において公知である。任意の従来の媒体または作用物質が活性化化合物と非適合である場合を除き、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った医薬組成物中でこれらを使用することが企図される。補助的活性化化合物もまた、組成物に組み込むことができる。

20

【０５２２】

治療用組成物は通常、製造及び保管条件下で滅菌され、安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または、高濃度の用量に適した、他の整った構成として配合することができる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、並びにこれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒とすることができる。例えば、レシチン等のコーティング剤を使用することにより、分散液の場合は必要な粒径を維持することにより、そして、界面活性剤を使用することにより、適切な流動性を維持することができる。多くの場合、組成物内に等張剤、例えば糖類、ポリアルコール（マンニトール、ソルビトール等）、または塩化ナトリウムを含めるのが好ましい。組成物内に、吸収を遅らせる作用物質、例えばモノステアレート塩及びゼラチンを含めることにより、注射可能な組成物の吸収を遅らせることができる。必要に応じて上に挙げた成分の１つまたは組み合わせと共に、適切な溶媒中に、必要な量の活性化化合物を入れ、それに続く滅菌精密濾過により無菌注射可能な溶液を調製することができる。通常、基本分散媒と、上に列挙した必要な他の成分を含有する滅菌賦形剤に活性化化合物を入れることにより分散液を調製する。無菌注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め滅菌濾過したその溶液から、活性成分の粉末に加えて追加の所望の成分を得る、真空乾燥及びフリーズドライ（凍結乾燥）である。

30

【０５２３】

必要に応じて上に挙げた成分の１つまたは組み合わせと共に、適切な溶媒中に、必要な量の活性化化合物を入れ、続いて滅菌精密濾過することにより、無菌注射可能な溶液を調製することができる。通常、基本分散媒と、上に列挙した必要な他の成分を含有する滅菌賦形剤に活性化化合物を入れることにより分散液を調製する。無菌注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め滅菌濾過したその溶液から、活性成分の粉末に加えて追加の所望の成分を得る、真空乾燥及びフリーズドライ（凍結乾燥）である。

40

【０５２４】

本発明の組成物は、当該技術分野において公知の種々の方法の１つ以上を使用して、１つ以上の投与経路により投与することができる。当業者により理解されるように、経路及

50

び/または投与方法は、所望の結果に応じて変化する。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った治療薬の好ましい投与経路としては、血管内送達（例えば注射もしくは注入）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、経口、経腸、直腸、肺（例えば吸入）、経鼻、局所（経皮、頬及び舌下を含む）、膀胱内、硝子体内、腹腔内、腔内、脳送達（例えば脳室内、脳内、及び対流増加送達）、CNS（例えば髄腔内、脊柱外、及び脊髄内）もしくは非経口（皮下、筋肉内、静脈内及び皮内を含む）送達、経粘膜（例えば舌下投与）、インプラントを介した投与、または、他の非経口投与経路（例えば、注射もしくは注入による）、または当該技術分野において公知の他の送達経路及び/もしくは投与形態が挙げられる。「非経口的投与」という表現は、本明細書で使用する場合、通常注射による、また、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心腔内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内注射及び注入が挙げられるが、これらに限定されない、経腸及び局所投与以外の投与形態を意味する。特定の実施形態では、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従ったタンパク質、治療薬または医薬組成物を、腹腔内または静脈内投与することができる。

【0525】

あるいは、本明細書にて開示したV S I G 8特異的抗体またはV S I G 8融合タンパク質を、局所、表皮または粘膜投与経路、例えば経鼻、経口、腔、直腸、舌下または局所等の非経口経路を介して投与することができる。

【0526】

活性化化合物を、迅速な放出から化合物を保護する担体、例えば、インプラント、経皮貼付剤及びマイクロカプセル化送達系を含む制御放出配合物と共に調製することができる。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸等の生分解性・生体適合性ポリマーを使用することができる。かかる配合物の多くの調製方法が特許権を有している、または当業者に一般的に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照のこと。

【0527】

治療用組成物を当該技術分野において公知の医療デバイスを用いて投与することができる。例えば、好ましい実施形態では、本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った治療用組成物を、米国特許第5,399,163号；同第5,383,851号；同第5,312,335号；同第5,064,413号；同第4,941,880号；同第4,790,824号；または同第4,596,556号に記載されているデバイス等の、針状皮下注射デバイスを用いて投与することができる。本発明において有用な周知のインプラント及びモジュールの例としては、米国特許第4,487,603号（制御した速度において投薬を分配する、埋込型マイクロ注入ポンプについて開示している）；同第4,486,194号（皮膚を通して薬剤を投与するための治療用デバイスについて開示している）；同第4,447,233号（正確な注入速度にて投薬を送達するための、投薬注入ポンプについて開示している）；同第4,447,224号（連続薬物送達用の、速度を変更可能な埋込型注入装置について開示している）；同第4,439,196号（複数チャンバ区画を有する浸透性薬物送達システムについて開示している）；及び、同第4,475,196号（浸透性薬物送達システムについて開示している）が挙げられる。これらの特許は、参考として本明細書に組み込まれる。多くの他のかかるインプラント、送達系及びモジュールが、当業者に知られている。

【0528】

ある特定の実施形態において、*in vivo*での適切な分配を確実に行うように抗V S I G 8抗体を配合することができる。例えば、血液脳関門(BBB)は、多くの高親水性化合物を除外する。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った治療用化合物が（所望する場合）確実にBBBを超えるようにするため、治療用化合物を例えばリポソームに配合することができる。リポソームの製造方法については、例えば米国特許第4,52

10

20

30

40

50

2, 811号; 同第5, 374, 548号; 及び同第5, 399, 331号を参照のこと。リポソームは、特定の細胞または臓器内に選択的に輸送される1つ以上の部位を含んでよく、よって、標的化薬物送達を向上させる(例えば、V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685を参照のこと)。例示的な標的化部位としては、葉酸塩またはビオチン(例えば米国特許第5, 416, 016号(Low et al.)を参照のこと); マンノシド(Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); 抗体(P. G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); 界面活性剤プロテインA受容体(Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); pl 20 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090)が挙げられる。K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J. J. Killion; 及びI. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273もまた参照のこと。

【0529】

更に他の実施形態では、本発明の免疫複合体を使用して、かかる化合物を本明細書にて開示した抗体またはV S I G 8融合タンパク質に結合することにより、V S I G 8細胞表面受容体を有する細胞に対して化合物(例えば治療薬、標識、細胞毒素、放射性毒、免疫抑制剤等)を標的化することができる。したがって、本発明は、V S I G 8を発現する細胞を(例えば、放射性同位体、蛍光性化合物、酵素または酵素補因子等の検出可能な標識を用いて) *ex vivo* または *in vivo* で局在化させる方法もまた提供する。あるいは、免疫複合体を使用して、V S I G 8抗原に細胞毒素または放射性毒を標的化することにより、V S I G 8細胞表面受容体を有する細胞を殺傷することができる。

【0530】

本明細書で使用する場合、「製薬上許容できる担体」としては、任意の全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤、並びに生理学的に適合するものが挙げられる。担体は、(例えば注射または注入による)静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与に好適であることが好ましい。投与経路に応じて、活性化合物、即ち、V S I G 8抗原のエクトドメインを含有する可溶性ポリペプチドコンジュゲート、抗体、免疫複合体、代替の足場、及び/または二重特異的分子を、材料でコーティングして、この化合物を、酸の作用、及び、化合物を不活性化し得る他の自然条件から保護してよい。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った薬学的化合物は、1種以上の製薬上許容できる塩を含んでよい。「薬剤として許容される塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持し、好ましくない任意の毒性効果を付与しない塩を意味する(例えば、Berge, S. M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19)。このような塩類の例としては、酸付加塩及び塩基添加塩が挙げられる。酸付加塩としては、無毒性無機酸(例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸等)に由来するもの、並びに、無毒性有機酸(脂肪族モノ及びジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族及び芳香族スルホン酸等)に由来するものが挙げられる。塩基添加塩としては、アルカリ土類金属(例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等)由来のもの、及び、無毒性有機アミン(例えばN, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン等)に由来するものが挙げられる。

【0531】

本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った医薬組成物は、製薬上許容できる抗酸化剤を含んでもよい。製薬上許容できる酸化防止剤の例としては、(1)アスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等の水溶性酸化防止剤; (2)アスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソ-

10

20

30

40

50

ル（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、
- トコフェロール等の油溶性酸化防止剤；及び（3）クエン酸、エチレンジアミン四酢
酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸等の金属キレート剤が挙げられる。本発
明の少なくともいくつかの実施形態に従った組成物で用いられ得る好適な水性及び非水性
担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリ
コール、ポリエチレングリコール等）、及びそれらの好適な混合物、植物油（オリーブ油
等）、及び、オレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルが挙げられる。好適な流動性
は、例えばレシチン等のコーティング材料の使用により、分散液の場合には必要な粒径の
維持により、及び界面活性剤の使用により維持される。

【0532】

これらの組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤等のアジュバントを含有し
てよい。微生物が存在することを防止することが、上述の滅菌手順、及び、種々の抗菌及
び抗カビ剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等を含めること
の両方により確保されてよい。組成物中に糖類、塩化ナトリウム等の等張剤が含まれるこ
とも望ましい場合がある。加えて、注射可能な薬剤処方での吸収を長引かせることは、モノ
ステアリン酸アルミニウム及びゼラチン等の、吸収遅延剤を含有することによりもたらさ
れる。

【0533】

製薬上許容できる担体としては、無菌注射可能な溶液または分散液の即時調製のための
、滅菌水溶液または分散液、及び滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質のためのか
かる媒体及び作用物質の使用は、当該技術分野において公知である。任意の従来の媒体ま
たは作用物質が活性化合物と非適合である場合を除き、本発明の少なくともいくつかの実
施形態に従った医薬組成物中でこれらを使用することが企図される。補助的活性化合物も
また、組成物に組み込むことができる。

【0534】

治療用組成物は通常、製造及び保管条件下で滅菌され、安定していなければならない。
組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または、高濃度の用量に適した、
他の整った構造として配合することができる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオー
ル（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）
、並びにこれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒とすることができる。例えば
、レシチン等のコーティング剤を使用することにより、分散液の場合は必要な粒径を維持
することにより、そして、界面活性剤を使用することにより、適切な流動性を維持するこ
とができる。多くの場合、組成物内に等張剤、例えば糖類、ポリアルコール（マンニト
ール、ソルビトール等）、または塩化ナトリウムを含めるのが好ましい。組成物内に、吸収
を遅らせる作用物質、例えばモノステアレート塩及びゼラチンを含めることにより、注射
可能な組成物の吸収を遅らせることができる。必要に応じて上に挙げた成分の1つまたは
組み合わせと共に、適切な溶媒中に、必要な量の活性化合物を入れ、それに続く滅菌精密
濾過により、無菌注射可能な溶液を調製することができる。通常、基本分散媒と、上に
列挙した必要な他の成分を含有する滅菌賦形剤に活性化合物を入れることにより分散液を
調製する。無菌注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、
予め滅菌濾過したその溶液から、活性成分の粉末に加えて追加の所望の成分を得る、真空
乾燥及びフリーズドライ（凍結乾燥）である。

【0535】

必要に応じて上に挙げた成分の1つまたは組み合わせと共に、適切な溶媒中に、必要な
量の活性化合物を入れ、続いて滅菌精密濾過することにより、無菌注射可能な溶液を調
製することができる。通常、基本分散媒と、上に列挙した必要な他の成分を含有する滅菌
賦形剤に活性化合物を入れることにより分散液を調製する。無菌注射可能な溶液を調製す
るための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め滅菌濾過したその溶液から、活性成
分の粉末に加えて追加の所望の成分を得る、真空乾燥及びフリーズドライ（凍結乾燥）で
ある。

10

20

30

40

50

【0536】

単一用量剤形を作製するために担体物質と組み合わせることができる有効成分の量は、治療されている対象、及び特定の投与方法に応じて変化する。単一用量剤形を作製するために担体物質と組み合わせることができる有効成分の量は通常、治療効果を生み出す組成物の量である。通常、100%中、この量は、製薬上許容できる担体と組み合わせた有効成分の約0.01%～約99%、好ましくは有効成分の約0.1%～約70%、最も好ましくは約1%～約30%の範囲となる。

【0537】

投薬レジメンを調節して、所望の最適の応答（例えば治療的応答）をもたらすようにする。例えば、1回のボラスを投与してよく、数回に分けた用量を時間の経過とともに投与してよく、または、治療状況の緊急性により用量を比例的に増減させてもよい。投与しやすく均一な用量の投薬単位形態に非経口組成物を調製することは、特に有利である。本明細書で用いる投薬単位形態とは、治療される対象にとって単位用量として好適な、物理的に分離した単位を意味する。各単位は、必要な医薬担体と共に所望の治療効果を生み出すように計算された活性化合物の所定の量を含む。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った投薬単位形態の規格は、(a)活性化合物の固有の特徴と、達成される特定の治療効果、及び(b)個体における過敏症を治療するためにかかる活性化合物を調合するのに、当該技術分野に内在する制限により決定され、それらに直接依存する。

10

【0538】

本明細書にて開示する抗体またはV S I G 8融合タンパク質の投与に関して、用量は体重あたり約0.0001～100mg/kg、より一般的には0.01～5mg/kgの範囲となる。例えば、用量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重、もしくは10mg/kg体重、または1～10mg/kgの範囲内とすることができる。例示的な治療レジメンは、週に1回、2週に1回、3週に1回、4週に1回、月に1回、3ヶ月に1回、または3～6ヶ月に1回の投与を必要とする。本発明の少なくともいくつかの実施形態に従った、本明細書にて開示した抗体またはV S I G 8融合タンパク質の好ましい投薬レジメンとしては、静脈内投与による1mg/kg体重または3mg/kg体重が挙げられ、本明細書にて開示した抗体またはV S I G 8融合タンパク質には、以下の投与スケジュール：(i)6回の用量を4週毎、次いで3ヶ月毎；(ii)3週毎；(iii)3mg/kg体重で1回、続いて3週毎に1mg/kg

20

30

【0539】

いくつかの方法においては、異なる結合特異性を有する2種以上のモノクローナル抗体を同時に投与し、この場合、本明細書にて開示した、投与される各抗体またはV S I G 8融合タンパク質の用量は、示した範囲内に収まる。本明細書にて開示した抗体またはV S I G 8融合タンパク質は通常、複数の機会に投与される。一回用量の間隔は例えば、毎日、週に1回、月に1回、3ヶ月毎、または年に1回とすることができる。抗体の血中濃度を測定して、患者内の抗原を標的化することによって示されるように、間隔は不規則とすることもまた可能である。いくつかの方法においては、用量を調節して、約1～1000μg/mL、またいくつかの方法においては約25～300マイクログラム/mLの血漿抗体濃度を達成する。

40

【0540】

あるいは、治療薬を持続放出性配合物として投与することができ、その場合、より頻度の低い投与が必要となる。用量及び頻度は、患者の治療薬の半減期に応じて変化する。一般に、ヒト抗体が最長の半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体、及び非ヒト抗体が続く。融合タンパク質の半減期は幅広く変化し得る。投与の用量及び頻度は、治療が予防的または治療的であるかによって変化し得る。予防用途において、長期間にわたり、比較的low頻度の間隔で比較的少ない用量を投与する。全余命期間に治療を受け続ける患者もいる。治療用において、病気の進行が減少または停止するまで、かつ好ましくは、患者が病気の症状の部分的または完全な回復を示すまで、比較的短い間隔で、比較的多くの用量が場合

50

によって必要である。その後、患者に予防レジメンを投与することができる。

【0541】

患者にとって毒性とならずに、特定の患者、組成物、及び投与方法に対する所望の治療用応答を得るのに効果的な有効成分の量を得るために、本発明の医薬組成物中の有効成分の実際の用量レベルを変化させてよい。選択した用量レベルは、用いられる本発明の特定の化合物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与時期、用いている特定の化合物の排泄速度、治療期間、用いる特定の組成物と組み合わせて使用する他の薬剤、化合物及び/または材料、治療されている患者の年齢、性別、体重、状態、総体的な健康及び以前の病歴、並びに医療当業者に既知の同様の要因を含む種々の薬物動態学的因子に応じて変化する。

【0542】

以下の条項に、本発明の実施形態を更に記載する。

【0543】

第1項。VISTAとV-R(VSIG8)の相互作用を刺激する、またはそれに拮抗する化合物。

【0544】

第2項。VSI G 8と特異的に結合する抗体または抗体断片である、第1項に記載の化合物。

【0545】

第3項。アゴニスト抗VSI G 8抗体または抗体断片である、第1項に記載の化合物。

【0546】

第4項。アンタゴニスト抗VSI G 8抗体または抗体断片である、第1項に記載の化合物。

【0547】

第5項。ヒト化、ヒト、霊長類化、またはキメラ抗VSI G 8抗体または抗体断片である、第2、3、または4項に記載の化合物。

【0548】

第6項。ヒトIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4定常領域、またはその断片を含み、任意で、突然変異誘発してFcRまたは補体結合を取り除いた、第5項に記載の抗体。

【0549】

第7項。IgG1またはIgG3定常領域またはその一部を含み、任意で、突然変異誘発してFcRまたは補体結合を向上させた、第5項に記載の抗体。

【0550】

第8項。Fab、Fab'、scFvまたはFab2である、上に記載の項のいずれかに記載の化合物。

【0551】

第9項。T細胞免疫での抑制効果を誘発するVSI G 8の細胞外領域を含むポリペプチド、その断片、または、VSI G 8の細胞外領域、もしくは配列番号1、2、もしくは3に対して少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する前記VSI G 8ポリペプチドの誘導体の少なくとも1つのコピーを含む、第1項に記載の化合物。

【0552】

第10項。ヒト、非ヒト霊長類またはマウスVSI G 8の細胞外領域全体を含む少なくとも1つのポリペプチドを含む、第9項に記載の化合物。

【0553】

第11項。融合タンパク質である、第9または10項に記載の化合物。

【0554】

第12項。Ig融合タンパク質である、第11項に記載の化合物。

【0555】

10

20

30

40

50

第13項。ヒトIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4定常領域、またはその断片を含み、任意で、突然変異誘発してFcRまたは補体結合を取り除いた、第12項に記載の化合物。

【0556】

第14項。IgG1またはIgG3定常領域またはその一部を含み、任意で、突然変異誘発してFcRまたは補体結合を向上させた、第12項に記載の化合物。

【0557】

第15項。水溶性ポリマーに結合して血清半減期が増加した、第1～14項のいずれか一項に記載の化合物。

【0558】

第16項。PEG化した、第15項に記載の化合物。

【0559】

第17項。VISTAとVSI G8を含む単離した複合体。

【0560】

第18項。前記VISTA及び/またはVSI G8はオリゴマーのまたは多量体である、第17項に記載の複合体。

【0561】

第19項。VISTAまたはVSI G8を発現する組み換え細胞から成る、第17項または第18項に記載の複合体。

【0562】

第20項。第17、18、または19項に記載の複合体から成る、単離した細胞膜。

【0563】

第21項。第17、18、または19項に記載のVISTA-VSI G8複合体に特異的に結合する抗体または抗体断片。

【0564】

第22項。ヒト、ヒト化、霊長類化またはキメラである、第21項に記載の抗体または抗体断片。

【0565】

第23項。Fab、Fab'、scFvまたはFab2である、第21または22項に記載の抗体断片。

【0566】

第24項。小分子である、第1項に記載のアゴニストまたはアンタゴニスト化合物。

【0567】

第25項。ヒト定常領域、例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4定常領域、またはそれらの変異体を含み、任意で1つ以上の欠失したドメインを含有する第1～24項のいずれかに記載の抗体または抗原結合断片。

【0568】

第26項。Fcエフェクター機能及び/もしくはグリコシル化を増減する少なくとも1つの変異、並びに/またはIgG4 Fabアーム交換を調節もしくはなくす変異を含有するヒト定常領域を含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【0569】

第27項。前記エフェクター機能はFcR結合、ADCC活性、CDC活性、脱顆粒、ファゴサイトーシス、及びサイトカイン放出を含む、第26項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【0570】

第28項。Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab')、F(ab)、FvまたはscFv断片、及び、任意で少なくとも1週、2週、3週、または1ヶ月のin vivo半減期を有する最小認識単位からなる群から選択される、上に記載の項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

20

30

40

50

【0571】

第29項。別の部位、例えば治療用部位、検出可能部位、または *in vivo* 半減期を変更する（増減する）部位に結合した、上の項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【0572】

第30項。薬剤、放射性核種、フルオロフォア、酵素、毒素、もしくは化学療法剤から選択される治療薬；及び/または、放射性同位体、金属キレーター、酵素、蛍光性化合物、生物発光化合物もしくは化学発光化合物から選択される検出可能なマーカーに結合した、上の項のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【0573】

第31項。いかなる他の部位にも結合していない、上の項のいずれかに記載の抗体もしくはその抗原結合断片、または V S I G 8 融合タンパク質。

10

【0574】

第32項。前記抗体または抗原結合断片が、別の抗体もしくは抗原結合断片、または融合タンパク質、例えば、NK及び/またはT細胞受容体、例えば、NK細胞活性を刺激する、もしくはそれに拮抗する、または、NK細胞が仲立ちする細胞枯渇を阻害するNK細胞受容体、または、NK細胞が仲立ちする細胞枯渇を促進もしくは活性化するNK細胞受容体に結合した、上の項のいずれかに記載の抗体もしくはその抗原結合断片、または V S I G 8 融合タンパク質。

20

【0575】

第33項。前記阻害性NK細胞受容体が、K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2 / 3、K I R 2 D L 4、K I R 2 D L 5 A、K I R 2 D L 5 B、K I R 3 D L 1、K I R 3 D L 2、K I R 3 D L 3、L I L R B 1、N K G 2 A、N K G 2 C、N K G 2 E 及び L I L R B 5 からなる群から選択される、第32項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、または V S I G 8 融合タンパク質。そして、前記NK活性化受容体は、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K p 4 6、N K G 2 D、K I R 2 D S 4 C D 2、C D 1 6、C D 6 9、D N A X 付属品分子 - 1 (D N A M - 1)、2 B 4、N K 1 . 1；キラー免疫グロブリン (I g) 様活性化受容体 (K A R)；I L T / L I R；N K R P - 1、C D 6 9；C D 9 4 / N K G 2 C 及び C D 9 4 / N K G 2 E ヘテロ二量体、N K G 2 D ホモ二量体 K I R 2 D S 及び K I R 3 D S からなる群から選択される。

30

【0576】

第34項。本明細書にて開示した結合親和性法のいずれかで決定すると、500 nMを超えない結合親和性 (K_D)、例えば、本明細書にて開示した結合親和性法のいずれかにより測定すると、例えば約 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} M以下の結合親和性 (K_D) でヒト、霊長類またはマウス V S I G 8 と結合する、上に記載の項のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片。

【0577】

第35項。抗体または抗原結合断片が、免疫、または1種以上の免疫細胞において、V S I G 8 と V I S T A の相互作用により誘発される少なくとも1つの効果を(1)増強する、刺激する、もしくは模倣する、または(2)阻害する、拮抗する、もしくは遮断するのいずれかである、上に記載の項のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または V S I G 8 融合タンパク質。

40

【0578】

第36項。免疫に対して以下の免疫活性効果のうち少なくとも1つの任意の組み合わせの誘発を仲立ちし、前記抗体または抗原結合断片が、(i) ~ (x x v i i i) のうちの1つ以上の逆の効果を誘発し得ることを条件とする、上の項のいずれかに記載のアンタゴニスト抗体もしくは抗原結合断片、または V S I G 8 融合タンパク質：(i) 免疫応答の増加、(i i) T細胞の活性化の増加、(i i i) 細胞傷害性T細胞活性の増加、(i v) NK細胞活性の増加、(v) T細胞抑制の緩和、(v i) 炎症性サイトカイン分泌の増加、(v i i) I L - 2 分泌の増加、(v i i i) インターフェロン 産生の増加、(

50

i x) T h 1 応答の増加、(x) T h 2 応答の低下、(x i) 細胞数、及び/もしくは制御性 T 細胞 (T r e g)、骨髓由来免疫抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現単球の少なくとも1つの活性の低下もしくは除去、(x i i) 制御性細胞活性、及び/もしくは骨髓由来免疫抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現単球の1つ以上の活性の低下、(x i i i) M 2 マクロファージの減少もしくは除去、(x i v) M 2 マクロファージ腫瘍形成活性の低下、(x v) N 2 好中球の減少もしくは除去、(x v i) N 2 好中球の腫瘍形成活性の低下、(x v i i) T 細胞の活性化阻害の低下、(x v i i i) C T L 活性化阻害の低下、(x i x) N K 細胞活性化阻害の低下、(x x) T 細胞疲弊の逆転、(x x i) T 細胞応答の増加、(x x i i) 細胞毒性細胞の活性の増加、(x x i i i) 抗原特異的メモリー応答の刺激、(x x i v) 癌細胞のアポトーシスもしくは溶解の誘発、(x x v) 癌細胞における細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の刺激、(x x v i) 癌細胞の直接殺傷の誘発、(x x v i i) T h 1 7 活性の増加、並びに/または(x x v i i i) 補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の誘発の少なくとも1つの任意の組み合わせを、前期抗体または抗原結合断片が、(i) ~ (x x v i i i)。

10

【0579】

第37項。以下の免疫阻害効果のうちの少なくとも1つの任意の組み合わせの誘発を仲立ちし、前記抗体または抗原結合断片が、(i) ~ (x x v i i i) のうちの1つ以上の逆の効果を誘発し得ることを条件とする、上の項のいずれかに記載のアンタゴニスト抗体もしくは抗原結合断片、またはV S I G 8 融合タンパク質：(i) 免疫応答の低下、(i i) T 細胞の活性化の低下、(i i i) 細胞傷害性 T 細胞活性の低下、(i v) ナチュラルキラー (N K) 細胞活性の低下、(v) T 細胞活性の低下、(v i) 炎症性サイトカイン分泌の低下、(v i i) I L - 2 分泌の低下、(v i i i) インターフェロン 産生の減少、(i x) T h 1 応答の低下、(x) T h 2 応答の低下、(x i) 細胞数及び/もしくは制御性 T 細胞の活性の増加、(x i i) 制御性細胞活性、及び/もしくは、骨髓由来免疫抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現単球の1つ以上の増加、(x i i i) 制御性細胞活性、及び/もしくは骨髓由来免疫抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現単球の1つ以上の活性の増加、(x i i i) M 2 マクロファージの増加、(x i v) M 2 マクロファージ活性の増加、(x v) N 2 好中球の増加、(x v i) N 2 好中球活性の増加、(x v i i) T 細胞の活性化阻害の増加、(x v i i i) C T L 活性化阻害の増加、(x i x) N K 細胞活性化阻害の増加、(x x) T 細胞疲弊の増加、(x x i) T 細胞応答の低下、(x x i i) 細胞毒性細胞の活性の低下、(x x i i i) 抗原特異的メモリー応答の低下、(x x i v) 細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(x x v) 細胞への細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の低下、(x x v i) 細胞の直接殺傷の減少、(x x v i i) T h 1 7 活性の低下、並びに/または(x x v i i i) 補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の低下。

20

30

【0580】

第38項。T 細胞免疫でのV S I G 8 及び/もしくはV I S T A の阻害効果を増大させ、かつ/もしくはC T L 活性を阻害し、かつ/または、阻害されたC T L 活性は、1つ以上の炎症性サイトカインの分泌低下、及び/もしくはC T L が仲立ちする標的細胞の殺傷の減少、及び/もしくはC D 4 + T 細胞の活性化の阻害、及び/もしくはC D 4 + T 細胞増殖、及び/もしくはC D 4 + T 細胞が仲立ちする細胞枯渇を含む、上に記載の項のいずれかに記載の、免疫調節抗体またはその抗原結合断片。

40

【0581】

第39項。N K 細胞活性、及び/またはN K 細胞増殖、及び/またはN K 細胞が仲立ちする細胞枯渇を阻害する、上に記載の項のいずれかに記載の免疫調節抗体もしくはその免疫調節抗原結合断片、またはV S I G 8 融合タンパク質。

【0582】

第40項。免疫においてV S I G 8 及び/またはV I S T A の1つ以上の効果を増強することにより、例えば移植した細胞、組織または臓器に対する、抗原特異的寛容、または

50

抗原特異的免疫応答の抑制の延長を促進する、上に記載の項のいずれかに記載の免疫調節抗体もしくはその免疫調節抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質。

【0583】

第41項。免疫におけるV S I G 8及び/またはV I S T Aの1つ以上の効果を促進することにより、自己抗原、アレルゲン、または炎症作用物質に対する免疫応答を促進する、阻害する上に記載の項のいずれかに記載の免疫調節抗体もしくはその免疫調節抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質。

【0584】

第42項。自己抗原、アレルゲンもしくは炎症作用物質に対する免疫応答の阻害、並びに/または炎症性疾患もしくは応答の治療、並びに/または自己免疫疾患の治療、並びに/または移植拒絶反応、及び/もしくは移植片対宿主病の低減もしくは予防で使用するための、上に記載の項のいずれかに記載の免疫調節抗体もしくはその免疫調節抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質。

10

【0585】

第43項。上の項のいずれかに記載の少なくとも1種の化合物を含む医薬組成物。

【0586】

第44項。上の項のいずれかに記載の少なくとも1種の化合物と抗原を含むワクチン組成物。

【0587】

第45項。上の項に記載の少なくとも1つの抗体もしくはその抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質を含む免疫抑制ワクチン組成物であって、前記組成物中の前記抗体もしくはその抗原結合断片は、抗原特異的T及び/もしくはB細胞免疫を抑制するか、または寛容を誘発する、前記免疫抑制ワクチン組成物。

20

【0588】

第46項。前記免疫が抑制される抗原は、ヒト抗原、腫瘍抗原、病原菌抗原、自己抗原、またはアレルゲン、例えば、ヒト抗原、細胞、もしくは対象に移植される細胞、組織、もしくは臓器の抗原、自己抗原、炎症作用物質、またはアレルゲンである、第45項に記載のワクチン組成物。

【0589】

第47項。血管内送達（例えば注射もしくは注入）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、経口、経腸、直腸、肺（例えば吸入）、経鼻、局所（経皮、頬及び舌下を含む）、膀胱内、硝子体内、腹腔内、腔内、脳送達（例えば脳室内、脳内、及び対流増加送達）、CNS（例えば髄腔内、脊柱外、及び脊髄内）もしくは非経口（皮下、筋肉内、静脈内及び皮内を含む）送達、経粘膜（例えば舌下投与）、インプラントを介した投与、または他の非経口投与経路（「非経口的投与」とは、経腸及び局所投与以外の投与形態を指す）から選択される経路による投与に好適な、第43～46項のいずれか一項に記載の組成物。

30

【0590】

第48項。少なくとも1種の他の活性剤、例えば治療薬または診断用薬、例えば他の免疫調節化合物、化学治療薬、薬剤、サイトカイン、放射性核種、及び酵素を含む、第43～47項のいずれか一項に記載の組成物。

40

【0591】

第49項。標的細胞（例えば腫瘍または感染細胞）により発現する抗原を含む、第43～47項のいずれか一項に記載の組成物。

【0592】

第50項。PD-1アゴニスト及びアンタゴニスト、PD-L1及びPD-L2抗体及び抗体断片、TLRアゴニスト、CD40アゴニストまたはアンタゴニスト、CTLA-4融合タンパク質、CD28アゴニストまたはアンタゴニスト、4-1BBアゴニストまたはアンタゴニスト、CD27またはCD70アゴニストまたはアンタゴニスト、LAG3アゴニストまたはアンタゴニスト、TIM3アゴニストまたはアンタゴニスト、TIG

50

ITアゴニストまたはアンタゴニスト、ICOSアゴニストまたはアンタゴニスト、ICOSリガンドアゴニストまたはアンタゴニストから選択される少なくとも1種の免疫調節剤を含有する他の組成物を含む、またはそれと共に使用される、第43～49項のいずれか一項に記載の組成物。

【0593】

第51項。診断もしくは治療用途のための、上に記載の項のいずれかに記載のVSI G 8またはVSI G 8 / VISTAアゴニストまたはアゴニストを含有する治療及び/もしくは診断方法、または組成物の使用であって、その方法または使用は、診断または治療を必要とする対象に、上の項のいずれかに記載の、治療上または診断上効果的な量の少なくとも1つのVSI G 8もしくはVSI G 8 / VISTAアゴニストもしくはアゴニスト、

10

【0594】

第52項。個体が、VSI G 8及び/またはVISTAが仲立ちする免疫への効果の増減に係る状態有るかどうかを検出することにおける、抗体もしくは抗原結合断片、もしくはVSI G 8融合タンパク質または組成物の診断方法及び使用であって、前記方法または使用は、個体からの組織サンプルを化合物、例えば、上に記載の項のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または組成物と接触させることと、それらへの特異的結合を検出することを含む、前記診断方法及び使用。

20

【0595】

第53項。前記病気は、癌、自己免疫疾患、または感染症からなる群から選択される、第51または52項に記載の方法または使用。

【0596】

第54項。VSI G 8の上方制御もしくは発現、及び/またはVSI G 8発現細胞の数の増加、またはVSI G 8及び/もしくはVISTA発現の下方制御、及び/またはVSI G 8及び/もしくはVISTA発現細胞の数の減少を検出する、第51～53項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0597】

第55項。個体からの組織サンプルを、第1～54項のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または組成物と接触させることを含む、個体が、免疫においてVSI G 8が仲立ちする効果の増減に係る状態を有するかどうかを検出することを含む、抗VSI G 8抗体もしくは抗原結合断片、または組成物の診断方法または使用であって、前記診断方法はin vivoで実施され、前記対象に、上に記載の項のいずれか一項に記載の免疫調節抗体もしくは抗原結合断片、または組成物を投与することと、これらへの特異的結合を検出することを含む、前記診断方法または使用。

30

【0598】

第56項。前記病気は、癌、自己免疫疾患、炎症性の状態、アレルギー状態または感染症からなる群から選択される、第55項に記載の方法または使用。

【0599】

第57項。抗VSI G 8抗体もしくは抗原結合断片、または組成物を含む診断方法または使用であって、その方法または使用は、対象の病気を診断することを含み、該病気は癌、自己免疫疾患、または感染症からなる群から選択され、前記診断方法はex vivoまたはin vivoで行われ、個体からのサンプルに、上に記載の項のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または組成物を接触させること、または個体にこれらを投与することと、上に記載の項のいずれかに記載の免疫分子または抗体の、前記対象の組織への特異的結合を検出することを含む、前記診断方法または使用。

40

【0600】

第58項。個体に、治療に有効な量の、上に記載の項のいずれか一項に記載の抗体、抗原結合断片もしくは免疫調節ポリペプチド、または医薬組成物を投与する前に、診断方法または使用を実施する、上に記載の項のいずれかに記載の診断方法または使用。

50

【0601】

第59項。治療に有効な量の、上に記載の項のいずれか一項に記載の抗体、抗原結合断片もしくは免疫調節ポリペプチド、または医薬組成物は、前記個体が、例えば、0～3のスケールにおいて少なくとも1である、病気及び/もしくはAPC細胞によるV S I G 8及び/もしくはV I S T Aの発現の増加、並びに/または、V S I G 8及び/もしくはV I S T Aを発現する病気及び/もしくはAPC細胞の数の増加を特徴とする状態を有する場合にのみ投与される、上に記載の項のいずれか一項に記載の診断方法または使用。

【0602】

第60項。V S I G 8の発現は、癌細胞、免疫浸潤またはストローマ細胞のうちの1つ以上で検出される、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

10

【0603】

第61項。抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質の診断方法または使用であって、その方法または使用は、対象から採取した組織サンプルが、V S I G 8の発現の増減を伴う免疫状態を示すかどうかを診断することを含み、(i)前記サンプルを、上に記載の項のいずれかに記載の化合物もしくは組成物、またはV S I G 8の発現を検出する核酸と接触させることと、(ii)V S I G 8の発現を検出する結合または増幅アッセイを実施することと、(iii)これらに基づき、サンプルが、V S I G 8の発現の増減と関係する免疫状態を伴う状態を有する個体からのものなのかどうかを診断することを含む、前記方法または使用。

20

【0604】

第62項。前記免疫状態は、癌、自己免疫疾患、炎症性の状態、アレルギー状態、感染症または敗血症からなる群から選択される、第61項に記載の方法または使用。

【0605】

第63項。前記抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質は、免疫における以下の免疫活性効果のうちの少なくとも1つの任意の組み合わせを仲立ちし、前記抗V S I G 8抗体または抗原結合断片が、(i)～(xxviii)のうちの1つ以上の逆の効果を誘発し得ることを条件とする、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用：(i)免疫応答の増加、(ii)T細胞の活性化の増加、(iii)細胞傷害性T細胞活性の増加、(iv)NK細胞活性の増加、(v)T細胞抑制の緩和、(vi)炎症性サイトカイン分泌の増加、(vii)IL-2分泌の増加、(viii)インターフェロン 産生の増加、(ix)Th1応答の増加、(x)Th2応答の低下、(xi)細胞数、及び/もしくは制御性T細胞(Treg)、骨髓由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の少なくとも1つの活性の低下もしくは除去、(xii)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髓由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の活性の低下、(xiii)M2マクロファージの減少もしくは除去、(xiv)M2マクロファージ腫瘍形成活性の低下、(xv)N2好中球の減少もしくは除去、(xvi)N2好中球の腫瘍形成活性の低下、(xvii)T細胞活性化阻害の低下、(xviii)CTL活性化阻害の低下、(xix)NK細胞活性化阻害の低下、(xx)T細胞疲弊の逆転、(xxi)T細胞応答の増加、(xxii)細胞毒性細胞の活性の増加、(xxiii)抗原特異的メモリー応答の刺激、(xxiv)癌細胞のアポトーシスもしくは溶解の誘発、(xxv)癌細胞における細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の刺激、(xxvi)癌細胞の直接殺傷の誘発、(xxvii)Th17活性の増加、並びに/または(xxviii)補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の誘発。

30

40

【0606】

第64項。治療及び診断を必要とする対象における、T細胞免疫もしくはナチュラルキラー(NK)免疫の促進、及び/またはTregもしくはMDSCの抑制を含み、うえの項のいずれかに記載の少なくとも1つの、治療上または診断上効果的な量の抗体、抗原結合断片、または組成物を投与することを含む、診断もしくは治療用途の、抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質を含有する組成物の治療及び

50

／もしくは診断方法、または使用であって、かかる抗体または抗原結合断片は、免疫または免疫細胞において、配列番号 1、2、または 3 のポリペプチドに少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を有する V S I G 8 ポリペプチドの、少なくとも 1 つの効果を阻害する、弱めるか遮断する、前記治療及び／もしくは診断方法、または使用。

【0607】

第 65 項。T 細胞免疫において V S I G 8 及び／または V I S T A の阻害効果を抑制する V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0608】

第 66 項。C T L 活性を促進する V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

10

【0609】

第 67 項。C T L 活性は、1 種以上の炎症性サイトカインの分泌、及び／または C T L が仲立ちする標的細胞の殺傷を含む、第 66 項に記載の方法または使用。

【0610】

第 68 項。C D 4 + T 細胞の活性化、及び／または C D 4 + T 細胞増殖、及び／または C D 4 + T 細胞が仲立ちする細胞枯渇を促進する V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0611】

第 69 項。C D 8 + T 細胞の活性化、及び／または C D 8 + T 細胞増殖、及び／または C D 8 + T 細胞が仲立ちする細胞枯渇を促進する V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

20

【0612】

第 70 項。N K 細胞活性を増強する V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0613】

第 71 項。増強された N K 細胞活性は、標的細胞の枯渇、及び／または炎症性サイトカイン放出の増加を含む、第 70 項に記載の方法または使用。

【0614】

第 72 項。T r e g 等の制御性細胞の分化、増殖及び／もしくは活性、並びに／または骨髄由来免疫抑制細胞 (M D S C) の分化、増殖、浸潤及び／もしくは活性を抑制及び／または低下させる V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

30

【0615】

第 73 項。制御性細胞 (例えば T r e g 及び M D S C) の、標的部位への浸潤を抑制及び／または低下させる V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0616】

第 74 項。前記標的部位は移植細胞、組織もしくは臓器、または自己免疫性、アレルギー性もしくは炎症性部位もしくは病変部である、第 73 項に記載の方法または使用。

40

【0617】

第 75 項。N K が仲立ちする細胞枯渇を促進する V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0618】

第 76 項。免疫における V S I G 8 及び／または V I S T A の 1 つ以上の効果を抑制することにより抗腫瘍免疫を促進する V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0619】

第 77 項。癌、敗血症もしくは感染状態、またはこれらの組み合わせの治療で用いられる V S I G アンタゴニストを使用する、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用

50

。

【0620】

第78項。治療、診断、使用を必要とする対象における、NKまたはT細胞免疫を促進することを含み、上に記載の項のいずれかに記載の、治療上または診断上効果的な量の少なくとも1つの抗体、抗原結合断片、または組成物を投与することを含む、診断もしくは治療用途の、抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質を含有する組成物の、治療及び/もしくは診断方法、または使用であって、かかる抗体または抗原結合断片は、配列番号1、2、もしくは3のアミノ酸配列を有するポリペプチド(V S I G 8)、またはこのアミノ酸配列、もしくは免疫もしくは免疫細胞上の非ヒトV S I G 8オルソログ、もしくはヒトV I S T Aと少なくとも90%の配列同一性を有する

10

【0621】

第79項。前記治療される個体が感染症を患っている、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0622】

第80項。前記感染症は、ウイルス、細菌、寄生生物、線虫、酵母菌、マイコプラズマ(mycoplasma)、真菌またはプリオンにより引き起こされる感染症である、第79項に記載の方法または使用。

20

【0623】

第81項。前記感染症は、レトロウイルス(例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1またはHIV-2等、HTLV-II、LAVまたはHTLV-II/LAV、またはHIV-IIとも呼ばれる(AIDS)、及び他の単離物、例えばHIV-LP)、ピコルナウイルス(Picomaviridae)(例えばポリオウイルス、肝炎Aウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス)、カリシウイルス(Calciviridae)(例えば胃腸炎を引き起こす株)、トガウイルス(例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス)、フラビウイルス(Flaviridae)(例えばデング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス)、コロナウイルス(例えばコロナウイルス)、ラブドウイルス(例えば水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス)、フィロウイルス(例えばエボラウイルス)、パラミクソウイルス(例えばパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス)、オルソミクソウイルス(例えばインフルエンザウイルス)、ブニヤウイルス(Bunyaviridae)(例えばハンタウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルス及びナイロウイルス)、アレナウイルス(出血熱ウイルス)、レオウイルス(例えば、レオウイルス、オルビウイルス及びロタウイルス)、ビルナウイルス、ヘパドナウイルス(B型肝炎ウイルス)、パルボウイルス(パルボウイルス)、パポーバウイルス(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス)、アデノウイルス(大部分のアデノウイルス)、ヘルペスウイルス(Herperviridae)(単純ヘルペスウイルス(HSV)1及び2、水痘・帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ヘルペスウイルス)、ボックスウイルス(天然痘ウイルス(viruses)、ワクシニアウイルス、ボックスウイルス)、及びイリドウイルス(例えばアフリカブタコレラウイルス)、未分類のウイルス(例えば、海綿状脳症の原因物質、D型肝炎の作用物質、非A型、非B型肝炎の作用物質(クラス1-内部移動、クラス2-非経口移動(即ちC型肝炎)、ノーウォーク及び関連ウイルス、並びにアストロウイルス)、並びに、重症急性呼吸器症候群ウイルス及び呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、ウエストナイル脳炎、コロナウイルス感染症、ライノウイルス感染症、インフルエンザ、デング熱、出血熱、耳の感染症、重症急性呼吸器症候群(SARS)、急性発熱咽頭炎、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、乳児性胃腸炎、伝染性単核球症、パーキットリンパ腫、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌、一次HSV-1感染症(子どもにおける歯肉口内炎、成人における扁桃炎及び咽頭炎、角結膜炎)、潜在性HSV-1感染症(口唇ヘルペス、ヘルペス)、無菌性髄膜炎、サイトメガロウイルス感染

30

40

50

症、巨細胞性封入体症、カポジ肉腫、キャッスルマン病、原発性滲出性リンパ腫、インフルエンザ、麻疹、脳炎、感染後脳脊髄炎、ムンプス、過形成性上皮障害（一般的な、扁平、足底及び肛門・性器でのいぼ、喉頭パピローマ、疣贅状表皮発育異常症）、クループ、肺炎、細気管支炎、灰白髄炎、狂犬病、細気管支炎、肺炎、風疹、先天性風疹、出血熱、水痘、デング熱、エボラ感染症、エコーウイルス感染症、EBV感染症、第五病、フィロウィルス、フラビウィルス、手足口病、帯状疱疹ウィルス（帯状疱疹）、ヒトパピローマウィルス随伴上皮障害、ラッサ熱、リンパ球性脈絡髄膜炎、パラインフルエンザウィルス感染症、パラミクソウィルス、パルボウィルスB19感染症、ピコルナウィルス、ポックスウィルス感染症、ロタウィルス下痢症、風疹、麻疹、水痘、天然痘感染症により引き起こされる、第78または79項に記載の方法または使用。

10

【0624】

第82項。前記感染症は、アメーバ、鞭毛虫、熱帯熱マラリア原虫、トキソプラズマゴンディ、繊毛虫、球虫、微孢子虫、孢子虫等の原生動物；蠕虫、線虫（回虫）、条虫（サナダムシ）、吸虫（肝蛭）、節足動物、及びプリオンとして知られている異所性タンパク質、から選択される寄生生物により引き起こされる寄生生物感染症である、第79または80項に記載の方法または使用。

【0625】

第83項。前記感染症は、敗血症、敗血症性ショック、副鼻腔炎、皮膚感染症、肺炎、気管支炎、髄膜炎、細菌性髄膜炎、尿路感染症（UCI）、細菌性胃腸炎、膿痂疹及び丹毒、丹毒、蜂窩織炎、炭疽、百日咳、ライム病、ブルセラ症、腸炎、急性腸炎、テタヌス、ジフテリア、偽膜性腸炎、ガス壊疽、急性食中毒、嫌気性蜂窩織炎、院内感染症、下痢症、乳児髄膜炎、旅行者下痢症、出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群、野兔病、消化性潰瘍、胃及び十二指腸潰瘍、在郷軍人病、ポンティアック熱、レプトスピラ症、リステリア症、皮膚病（ハンセン病）、結核、淋病、新生児眼炎、化膿性関節炎、髄膜炎等の髄膜炎菌性疾患、ウォーターハウス・フリードリヒセン症候群、シュードモナス感染症、ロッキー山紅斑熱、腸チフス型のサルモネラ症、胃腸炎及び全腸炎のサルモネラ症、細菌性赤痢、コアグラゼ陽性ブドウ球菌感染症、拡散性皮膚感染症（膿痂疹）等の局在化皮膚感染症、非常に局在化した感染症、急性感染性心内膜炎、敗血症、壊死性肺炎、毒素性ショック症候群及びブドウ球菌食中毒等の中毒症、膀胱炎、子宮内膜炎、中耳炎、連鎖球菌咽頭炎、猩紅熱、リウマチ熱、産褥熱、壊死性筋膜炎、コレラ、ペスト（腺ペスト及び肺ペストを含む）からなる群から選択される細菌により引き起こされる感染症及び/または感染病、並びに、ピロリ菌、ボレリア・ブルグドルフェリ（*Borelia burgdorferi*）、レジオネラ・ニューモフィラ、マイコバクテリア属（例えば結核菌、M・アビウム、M・イントラセルラーエ、M・カンサシ（*kansaii*）、M・ゴールドネ）、黄色ブドウ球菌、淋菌、髄膜炎菌、リステリア菌、化膿性連鎖球菌（A群連鎖球菌）、アガラスチエ連鎖球菌（*Streptococcus agalactiae*）（B群連鎖球菌）、連鎖球菌（緑色群）、エンテロコッカスフェカリス、ウシ連鎖球菌、連鎖球菌（嫌気性属）、肺炎連鎖球菌、病原性カンピロバクター属、腸球菌属、インフルエンザ菌、炭疽菌、コリネバクテリウムジフテリア、コリネバクテリウム属、豚丹毒菌、ウエルチ菌、破傷風菌、エンテロバクターアエロゲネス、クレブシエラ肺炎桿菌、パスツレラ・マルトシダ、バクテロイデス属、フゾバクテリウム属、ストレプトバチルス・モニリホルム、梅毒トレポネーマ、トレポネーマ・ペルテヌエ、レプトスピラ、及びアクチノミセスイスラエリから選択されるがこれらに限定されない最近により引き起こされる任意の感染症である、第79または80項に記載の方法または使用。

20

30

40

【0626】

第84項。前記感染症は、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、アスペルギローマ（*Aspergilloma*）、アスペルギルス、バシジオボロミコシス（*Basidiobolomycosis*）、プラストミセス症、カンジダ症、慢性肺アスペルギルス症、カエルツボカビ症、コクチジオイド真菌症、コニジオボロミコシス（*Conidiobolomycosis*）、堅黒穂病（オオムギ）、クリプトコッカス症、皮膚糸状菌、白

50

癬疹、皮膚糸状菌症、毛内糸状菌、昆虫病原糸状菌、仮性皮疽、流行性潰瘍症候群、食道カンジダ症、毛外白癬菌、真菌血症、ヒストプラズマ症、ロボ真菌症、マッソスポラシカジナ (*Massospora cicadina*)、真菌症、ミコスファエレラフラガリアエ (*Mycosphaerella fragariae*)、鼓膜真菌症、パラコクシジオイデス症、病原性真菌、ペニシリウム菌症、サウザンドカンカー病 (*Thousand cankers disease*)、白癬、ゼアスポラ (*Zea spora*)、接合菌症から選択される真菌；アカントアメーバ、アメーバ症、回虫症、鉤虫症、アニサキス症、パベシア症、パラチジウム症、アライグマ回虫、ブラストシスチス (*Blastocystosis*)、カンディルー、シャーガス病、肝吸虫症、コクリオミヤ属、球虫、チュウゴク肝臓肝蛭クリプトスポリジウム症 (*Chinese Liver Fluke Cryptosporidiosis*)、二核アメーバ症、裂頭条虫症、腎虫 (*Diocotophyme renalis*) 感染症、メジナ虫症、包虫症、象皮病、蟻虫症、肝蛭病、肥大吸虫症、フィラリア症、ランブル鞭毛虫症、顎口虫症、膜様条虫疾患、寄生虫咽喉頭炎症候群、イソスポーラ症、片山熱、リーシュマニア症、リンパ系糸状虫症、マラリア、メタゴニムス症、蠅幼虫症、オンコセルカ症、シラミ症、原発性アメーバ性髄膜脳炎、寄生虫性肺炎、肺吸虫症、疥癬、住血吸虫症、嗜眠性脳炎、糞線虫症、孤虫症、リノスポリジウム症、河川盲目症、条虫症 (囊虫症の原因)、トキシカラ症、トキシプラズマ症、旋毛虫症、トリコモナス症、鞭虫症、トリパノゾーマ症、サナダムシ感染症、クリプトコックス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・カプスラーツム、コクシジオイデス・イミチス、ブラストミセス・デルマティティディス、トラコーマクラミジア、カンジダ・アルピカンスからなる群から選択されるがこれらに限定されない寄生生物により引き起こされる感染症及び/または感染病である、第79または80項に記載の方法または使用。

10

20

【0627】

第85項。前記感染症は、B型肝炎、C型肝炎、伝染性単核球症、EBV、サイトメガロウイルス、AIDS、HIV-1、HIV-2、結核、マラリア及び住血吸虫症のいずれかにより引き起こされる、第79～84項のいずれかに記載の方法または使用。

【0628】

第86項。細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、寄生虫感染症または敗血症の治療に有用な別の治療薬を含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗VSI G 8抗体もしくは抗原結合断片、もしくは組成物、または方法もしくは使用。

30

【0629】

第87項。免疫におけるVSI G 8及び/またはVISTAの1つ以上の効果を抑制することにより、病原菌に対する免疫応答を促進する、上に記載の項のいずれかに記載の方法、組成物、抗体もしくは断片もしくはVSI G 8融合タンパク質、または使用。

【0630】

第88項。細菌感染症の治療に使用する1種以上の追加の治療薬を更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の方法、組成物、抗体もしくは断片もしくはVSI G 8融合タンパク質、または使用。

40

【0631】

第89項。前記作用物質が、アミノグリコシド、カルバペネム、セファロsporin、マクロライド、リンコサミド (*Lincosamide*)、ニトロフラン、ペニシリン、ポリペプチド、キノロン、スルホンアミド、テトラサイクリン等の抗生物質、クロファジミン、シクロセリン、シクロセリン、リファブチン、リファペンチン、ストレプトマイシンを含むがこれらに限定されない、マイコバクテリアに対する薬剤、並びに、クロラムフェニコール、ホスホマイシン、メトロニダゾール、ムピロシン、及びチニダゾール等の他の抗菌薬剤、またはこれらの組み合わせからなる群から選択される、第88項に記載の方法、組成物、抗体もしくは断片、または使用。

【0632】

第90項。ウイルス感染症の治療に使用する1種以上の追加の治療薬を更に含む、上に

50

記載の項のいずれかに記載の方法、組成物、抗体もしくは断片もしくはV S I G 8融合タンパク質、または使用。

【0633】

第91項。前記作用物質が、オセルタミビル(商標名T a m i f l u (登録商標))及びザナミビル(商標名R e l e n z a (登録商標))、Arbidol(登録商標)、アダマンタン誘導体(A m a n t a d i n e (登録商標)、R i m a n t a d i n e (登録商標))、ノイラミニダーゼ阻害剤(O s e l t a m i v i r (登録商標)、L a n i n a m i v i r (登録商標)、P e r a m i v i r (登録商標)、Z a n a m i v i r (登録商標))、プリン類似体グアニン等の、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害薬(A c c l o v i r (登録商標) / V a l a c y c l o v i r (登録商標)、G a n c i c l o v i r (登録商標) / V a l g a n c i c l o v i r (登録商標)、P e n c i c l o v i r (登録商標) / F a m c i c l o v i r (登録商標))、及びアデニン(V i d a r a b i n e (登録商標))、ピリミジン類似体、ウリジン(I d o x u r i d i n e (登録商標)、T r i f l u r i d i n e (登録商標)、E d o x u d i n e (登録商標))、チミン(B r i v u d i n e (登録商標))、シトシン(C y t a r a b i n e (登録商標))、ホスカルネット、ヌクレオチド類似体N A R T I : エンテカビル、L a m i v u d i n e (登録商標)、T e l b i v u d i n e (登録商標)、C l e v u d i n e (登録商標)、ヌクレオチド類似体 / N t R T I : A d e f o v i r (登録商標)、テノホビル、C i d o f o v i r (登録商標)等の核酸阻害剤、インターフェロン - 2 b P e g インターフェロン - 2 a ; R i b a v i r i n (登録商標) / T a r i b a v i r i n (登録商標)、ジドブジン、ラミブジン、アバカビル、ロピナビル、リトナビル、テノホビル / エムトリシタピン、エファビレンツ等の抗レトロウイルス薬剤(これらはそれぞれ、単独または種々の組み合わせで使用することができる) g p 4 1 (エンビルチド)、R a l t e g r a v i r (登録商標)、F o s a m p r e n a v i r (登録商標)、L o p i n a v i r (登録商標)及びA t a z a n a v i r (登録商標)、M e t h i s a z o n e (登録商標)、D o c o s a n o l (登録商標)、F o m i v i r s e n (登録商標)、及びT r o m a n t a d i n e (登録商標)等のプロテアーゼ阻害剤等の抗ウイルス剤からなる群から選択される、第90項に記載の方法、組成物、抗体もしくは断片もしくはV S I G 8融合タンパク質、または使用。

10

20

30

【0634】

第92項。真菌感染症の治療に使用する1種以上の追加の治療薬を更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の方法、組成物、抗体もしくは断片もしくはV S I G 8融合タンパク質、または使用。

【0635】

第93項。ポリエン抗真菌薬、イミダゾール、トリアゾール、及びチアゾール抗真菌薬、アリルアミン、エキノキャンディンまたは他の抗真菌薬等の、抗真菌薬からなる群から選択される、第92項に記載の方法、組成物、抗体もしくは断片もしくはV S I G 8融合タンパク質、または使用。

【0636】

第94項。前記治療される個体は癌を患っている、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

40

【0637】

第95項。前記癌は、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、子宮体癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、膀胱癌、肺癌、膵癌、結腸直腸癌、前立腺癌、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病、急性骨髄性白血病(A M L)、慢性骨髄性白血病、甲状腺癌、甲状腺濾胞性癌、骨髄異形成症候群(M D S)、線維肉腫及び横紋筋肉腫、奇形癌、神経芽細胞腫、膠腫、神経膠芽腫、皮膚の良性腫瘍、ケラトアカントーマ、腎癌、未分化大細胞型リンパ腫、食道癌、濾胞性樹状細胞癌腫、精嚢腫瘍、表皮癌腫、脾臓癌、膀胱癌、頭頸癌、胃癌、肝臓癌、骨肉腫、脳腫瘍、網膜癌、胆道癌、小腸癌、唾液腺癌、子宮癌、精巣癌、結合

50

組織癌、脊髄形成異常、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、鼻咽頭癌、神経内分泌癌、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、卵管癌、腹膜癌、乳頭漿液ミューラー管(müllerian)癌、悪性腹水、消化管間質腫瘍(GIST)、リ・フラウメニ症候群及びフォン・ヒッペル・リンドウ病(VHL)、原発性または転移性のいずれかの、由来が未知の癌(この癌は非転移性、侵襲性または転移性である)からなる群から選択される、第94項に記載の方法または使用。

【0638】

第96項。前記癌は、B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、甲状腺癌、甲状腺濾胞性癌、骨髄異形成症候群(MDS)、線維肉腫及び横紋筋肉腫、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、奇形癌、神経芽細胞腫、膠腫、グリア芽腫癌、ケラトアカントーマ、未分化大細胞型リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌腫、筋肉侵襲性癌、精嚢腫瘍、表皮癌腫、網膜癌、胆道癌、小腸癌、唾液腺癌、結合組織癌、脊髄形成異常、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、鼻咽頭癌、神経内分泌癌、骨髄異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道癌、卵管癌、腹膜癌、乳頭漿液ミューラー管癌、悪性腹水、消化管間質腫瘍(GIST)、リ・フラウメニ症候群及びフォン・ヒッペル・リンドウ病(VHL)、子宮体癌、乳癌(好ましくは腺管癌浸潤性腺管癌、小葉癌、粘液性腺癌、腺内及び侵襲性腺管癌、並びに硬性腺癌)、結腸腺癌(好ましくは、不十分あるいは十分に分化した侵襲性及び非侵襲性腺癌、不十分あるいは十分に分化した盲腸腺癌、十分あるいは不十分に分化した結腸腺癌のいずれか)、管状腺癌(好ましくはグレード2の上行結腸管状腺癌)、結腸腺癌(デュークスステージCI)、侵襲性腺癌、直腸腺癌(好ましくはグレード3の直腸腺癌、中程度に分化した直腸腺癌、中程度に分化した直腸粘液性腺癌)、肺癌(好ましくは、十分あるいは不十分に分化した非小細胞癌のいずれか)、扁平上皮細胞癌(好ましくは十分あるいは不十分に分化した扁平上皮細胞癌)、角化型扁平上皮細胞癌、腺癌(好ましくは不十分あるいは十分に分化した腺癌)、大型細胞腺癌、小細胞肺癌(好ましくは小細胞肺癌、より好ましくは未分化小細胞肺癌)、前立腺癌(好ましくは、グリーソングレード6~9の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度の前立腺上皮内腫瘍形成、未分化癌種のいずれか)、胃腺癌(好ましくは中程度に分化した胃腺癌)、卵巣癌腫(好ましくは、嚢胞腺癌、漿液乳頭嚢胞性癌腫、漿液乳頭嚢胞性癌腫、侵襲的漿液乳頭癌種のいずれか)、脳腫瘍(好ましくは星状膠細胞腫、グレード2の星状膠細胞腫でない場合に、好ましくはグレード4の星状膠細胞腫、多形性膠芽腫のいずれか)、腎臓癌(好ましくは明細胞の腎細胞癌)、肝癌(好ましくは肝細胞癌のいずれか、好ましくは低グレードの肝細胞癌種、ファイブロラメラ肝細胞癌)、リンパ腫(好ましくは、ホジキンリンパ腫、及び高~低グレードの非ホジキンリンパ腫のいずれかであり、また、癌が脳腫瘍である場合、グレード2の星状膠細胞腫ではなく、癌が非ホジキンリンパ腫である場合、大型細胞非ホジキンリンパ腫ではない癌は非転移性、侵襲性または転移性である)から選択される、第94項に記載の方法または使用。

【0639】

第97項。V S I G 8及び/またはV I S T Aタンパク質のレベルが、通常の細胞サンプルと比較して増加している、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0640】

第98項。前記治療される個体は癌を患っており、腫瘍部位に含まれる前記癌または他の細胞は、V S I G 8及び/もしくはV I S T Aタンパク質を発現しないか、または、通常より高いレベルでV S I G 8及び/もしくはタンパク質を発現しない、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0641】

第99項。前記治療される対象は癌を患っており、病気の細胞、A P C、造血細胞、N K細胞、単球、樹状細胞、好中球、単球、または病気の部位の他の免疫細胞(例えば骨髄サプレッサー細胞)は、V S I G 8及び/またはV I S T Aタンパク質を発現する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0642】

10

20

30

40

50

第100項。抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片、または組成物による治療を含み、治療法は、放射線治療、凍結治療、抗体治療、化学療法、光線力学的治療、手術、ホルモン除去、または従来薬剤との併用療法の1つ以上を含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質、もしくは組成物、または方法もしくは使用。

【0643】

第101項。抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質、または組成物、並びに細胞毒性薬、腫瘍ワクチン、抗体、ペプチド類、ペプチボディ、小分子、化学療法剤、細胞毒性及び細胞増殖抑制、免疫調節剤、インターフェロン、インターロイキン、免疫刺激性成長ホルモン、サイトカイン、ビタミン、ミネラル、アロマターゼ阻害剤、RNAi、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、及びプロテアソーム阻害剤からなる群から選択される別の治療薬による治療を含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくは組成物、または方法もしくは使用。

10

【0644】

第102項。抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片、または組成物、及び、治療効果を得るための1種以上の強化剤と共に同時にまたは連続的に対象に投与される別の治療薬もしくは造影剤による治療を含み、前記1種以上の強化剤は、放射線治療、従来/通常の抗癌剤強化抗腫瘍免疫応答、抗腫瘍免疫応答を強化する標的療法、免疫抑制細胞Treg及び/またはM D S Cを標的化する治療薬、免疫刺激性抗体、サイトカイン療法、養子細胞移入からなる群から選択される、上に記載の項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質、もしくは組成物、または方法もしくは使用。

20

【0645】

第103項。前記従来/通常の抗癌剤は、白金ベースの化合物、抗癌活性を有する抗生物質、アントラサイクリン、アントラセンジオン、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗有糸分裂剤、タキサン、タキソイド、微小管阻害剤、ピンカアルカロイド、葉酸塩アンタゴニスト、トポイソメラーゼ阻害剤、抗エストロゲン薬、抗アンドロゲン薬、アロマターゼ阻害剤、G n R h類似体、5レダクターゼ阻害剤、ビスホスホネート(b i p h o s p h o n a t e)から選択される、上に記載の項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

30

【0646】

第104項。白金ベースの化合物(オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン等)、抗癌活性を有する抗生物質(ダクチノマイシン、プレオマイシン、マイトマイシン-C、ミトラマイシン等)、及びアントラサイクリン(ドキシソルピシン、ダウノルピシン、エピルピシン、イダルピシン等)、アントラセンジオン(マイトキサントロン等)、アルキル化剤(ダカルバジン、メルファラン、シクロホスファミド、テモゾロミド、クロラムブシル、ブスルファン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア等)、代謝拮抗薬(フルオロウラシル、ラルチトレキシド(r a l t i t r e x e d)、ゲムシタピン、シトシンアラビノシド、ヒドロキシ尿素等)及び葉酸塩アンタゴニスト(メトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、ペメトレキセド等)、抗有糸分裂剤(ポロキナーゼ阻害剤等)及び微小管阻害剤(タキサン等)及びタキソイド(パクリタキセル、ドセタキセル等)、ピンカアルカロイド(ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、ピノレルピン等)、トポイソメラーゼ阻害剤(エトポシド、テニポシド、アムサクリン、トポテカン、イリノテカン、カンプトテシン等)、抗エストロゲン薬(タモキシフェン、フルベストラント、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロキシフェン、ヨードキシフェン(i o d o x y f e n e)等)、抗アンドロゲン薬(ピカルタミド、フルタミド、ニルタミド及び酢酸シプロテロン等)、プロゲステゲン(酢酸メゲストロール)、アロマターゼ阻害剤(アナストロゾール、レトロゾール、ボロゾール、エクセメスタン)を含む細胞増殖抑制、G n R H類似体(リュープロレリン、ゴセレリン、プセレリン、デガレリクス等)、フ

40

50

ィナスチリド等の5 レダクターゼ阻害剤を更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくは組成物、もしくは方法もしくは使用、または、V S I G 8融合タンパク質。

【0647】

第105項。白金ベースの化合物を更に含む、項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

【0648】

第106項。ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤(ポリノスタット、ロミデブシン、パノピノスタット、ベリノスタット、モセチノスタット、アベキシノスタット(a b e x i n o s t a t)、エンチノスタット、レスミノスタット(r e s m i n o s t a t)、ギビノスタット(g i v i n o s t a t)、キシノスタット(q u i s i n o s t a t)、酪酸ナトリウム等)、プロテアソーム阻害剤(ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、ジスルフィラム等)、mTOR経路阻害剤(テムシロリムス、ラパマイシン、エベロリムス等)、PI3K阻害剤(ペリフォシン(perifosine)、CAL101、PX-866、IPI-145、BAY 80-6946等)、B-raf阻害剤(ベムラフェニブ、ソラフェニブ等)、JAK2阻害剤(レスタウルチニブ、バクリチニブ等)、チロシンキナーゼ阻害物質(TKI)(エルロチニブ、イマチニブ、スニチニブ、ラパチニブ、ゲフィチニブ、ソラフェニブ、ニロチニブ、トセラニブ(t o c e r a n i b)、ボスチニブ、ネラチニブ、パタラニブ、レゴラフェニブ、カボザンチニブ等)、他のプロテインキナーゼ阻害剤(クリゾチニブ等)、セリン/スレオニンキナーゼ阻害剤(例えば、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤等のRas/Rafシグナル伝達阻害剤)、セリンプロテアーゼ阻害剤(例えばマトリプターゼ、ヘプシン、ウロキナーゼ)、細胞内シグナル伝達阻害剤(チピファルニブ、ペリホシン等)、MEK及び/またはAKTキナーゼを介する細胞シグナル伝達阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤(AZD1152、PH739358、VX-680、MLN8054、R763、MP235、MP529、VX-528、AX39459等)、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤(CDK2及び/またはCDK4阻害剤)、Bcl-2、Bcl-XLを含む生残シグナル伝達タンパク質阻害剤(ABT-737等)、HSP90阻害剤、治療用モノクローナル抗体(セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ等の抗EGFR mAb、トラスツズマブ、ベルツズマブ等の抗ERBB2 mAb、リツキシマブ、オフアツムマブ、ベルツズマブ等の抗CD20 mAb、及び、アレムツズマブ、ラベツズマブ、アダカツムマブ、オレゴボマブ、オナルツブマブ等の、他の腫瘍抗原を標的とするmAb等)、TRAIL経路アゴニスト(ドゥラネルミン(可溶性rhTRAIL)、アボマブ、マバツムマブ、レクサツムマブ、コナツムマブ、ティガツズマブ等)、抗体断片、二重特異的抗体及び二重特異的T細胞エンゲージャー(BiTE)(カツマキシマブ、ブリナツモマブ等)、抗体薬剤コンジュゲート(ADC)及び他の免疫複合体(イブリツモマブチウキセタン(triuxetan)、トシツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、クリバツズマブテトラキセタン、ペムツモマブ、トラスツズマブエムタンシン等)、抗血管由来治療薬(ベバシズマブ、エタラチズマブ、ポロシキシマブ、ラムシルマブ、アフリベルセプト、ソラフェニブ、スニチニブ、レゴラフェニブ、アキシチニブ、ニンテダニブ、モテサニブ、パゾパニブ、セディナリブ等)、メタロプロテイナーゼ阻害剤(マリマスタット等)、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体機能阻害剤、カテプシン活性阻害剤からなる群から選択されるがこれらに限定されない標的療法を更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

【0649】

第107項。別の治療薬は、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、ラベツズマブ、アダカツムマブ、オレゴボマブ、オナルツブマブ、アボマブ、マバツムマ

10

20

30

40

50

ブ、レクサツムマブ、コナツムマブ、ティガツズマブ、カツマキソマブ、プリナツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、プレツキシマブベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、クリバツズマブテトラキセタン、ペムツモマブ、トラスツズマブエムタンシン、ペバシズマブ、エタラチズマブ、ポロシキシマブ、ラムシルマブ、アフリベルセプトから選択される別の抗体である、第106項に記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

【0650】

第108項。腫瘍抗原、腫瘍抗原をコードする組み換えウイルス及び細菌ベクター、腫瘍抗原をコードするDNA系ワクチン、樹状細胞系ワクチンに対して標的化されたタンパク質、全腫瘍細胞ワクチン、GM-CSF、ICOS及び/またはFlt-3リガンドを発現する遺伝子改変腫瘍細胞、腫瘍崩壊ウイルスワクチンに対する免疫応答をマウントするために使用されるタンパク質またはペプチドを含む外因性癌ワクチンから選択される治療用癌ワクチンを更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

10

【0651】

第109項。以下のIL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18及びIL-21、IL-23、IL-27、GM-CSF、IFN（インターフェロン）、IFN-2b、IFN、IFN等のサイトカインの1つ以上から選択されるサイトカイン療法、及び、これらの異なる送達方法を更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

20

【0652】

第110項。患者の自己天然腫瘍特異的T細胞の拡張、またはT細胞の遺伝子組み換えによる腫瘍抗原に対する特異性の付与から選択されるex vivo治療の後に実施される養子細胞移入治療を更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片もしくはV S I G 8融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

30

【0653】

第111項。前記抗V S I G 8抗体または抗原結合断片は、以下の免疫阻害効果うちの少なくとも1つの任意の組み合わせを仲立ちする抗体または抗原結合断片を含み、前記抗V S I G 8抗体または抗原結合断片が、(i)~(xxviii)のうちの1つ以上の逆の効果誘発し得ることを条件とする、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用：(i)免疫応答の低下、(ii)T細胞の活性化の低下、(iii)細胞傷害性T細胞活性の低下、(iv)ナチュラルキラー(NK)細胞活性の低下、(v)T細胞活性の低下、(vi)炎症性サイトカイン分泌の低下、(vii)IL-2分泌の低下、(viii)インターフェロン産生の減少、(ix)Th1応答の低下、(x)Th2応答の低下、(xi)細胞数及び/もしくは制御性T細胞の活性の増加、(xii)制御性細胞活性、及び/もしくは、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストロマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の増加、(xiii)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストロマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の活性の増加、(xiv)M2マクロファージの増加、(xv)M2マクロファージ活性の増加、(xvi)N2好中球の増加、(xvii)N2好中球活性の増加、(xviii)T細胞の活性化阻害の増加、(xviiii)CTL活性化阻害の増加、(xix)NK細胞活性化阻害の増加、(xx)T細胞疲弊の増加、(xxi)T細胞応答の低下、(xxii)細胞毒性細胞の活性の低下、(xxiii)抗原特異的メモリー応答の低下、(xxiv)細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(xxv)細胞への細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の低下、(xxvi)細胞の直接殺傷の減少、(xxvii)Th17活性の低下、並びに/または(xxviii)補体依存性細胞傷害及び/もしくは

40

50

は抗体依存性細胞傷害の低下。

【0654】

第112項。治療及び/または診断を必要とする対象における、T細胞免疫もしくはナチュラルキラー(NK)免疫の抑制、及び/またはTregもしくはMDS Cの促進を含み、上の項のいずれか一項に記載の、治療上または診断上効果的な量の、少なくとも1つの抗体、抗原結合断片または組成物を投与することを含む、診断もしくは治療用途の、抗V S I G 8抗体もしくは抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質を含有する組成物の治療及び/もしくは診断方法、または使用であって、かかる抗体または抗原結合断片が、免疫または免疫細胞上の、配列番号1、2、もしくは3のアミノ酸配列を有するポリペプチド(V S I G 8)、またはオルソログの少なくとも1つの効果を刺激する、模倣する、または促進する、前記治療及び/もしくは診断方法、または使用。

10

【0655】

第113項。アレルギー、自己免疫、移植、遺伝子治療、炎症、またはこれらの組み合わせの治療用に使用される、第111または112項に記載の方法または使用。

【0656】

第114項。治療される個体は、細胞療法、遺伝子治療または移植組織もしくは臓器を有するか、それを受ける予定であり、治療は、かかる細胞療法、遺伝子治療、または移植組織もしくは臓器と関係する望ましくない免疫活性化を低下させるかまたは阻害する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

20

【0657】

第115項。前記抗体もしくはその抗原結合断片、またはV S I G 8融合タンパク質は、以下のうちの1つ以上をもたらす、前記抗V S I G 8抗体または抗原結合断片が、(i)~(x x v i i i)のうちの1つ以上の逆の効果を誘発し得ることを条件とする、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用：(i)免疫応答の低下、(i i)T細胞の活性化の低下、(i i i)細胞傷害性T細胞活性の低下、(i v)ナチュラルキラー(NK)細胞活性の低下、(v)T細胞活性の低下、(v i)炎症性サイトカイン分泌の低下、(v i i)I L - 2分泌の低下、(v i i i)インターフェロン 産生の減少、(i x)T h 1 応答の低下、(x)T h 2 応答の低下、(x i)細胞数及び/もしくは制御性T細胞の活性の増加、(x i i)制御性細胞活性、及び/もしくは、骨髄由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現単球の1つ以上の増加、(x i i i)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2 発現単球の1つ以上の活性の増加、(x i i i)M 2 マクロファージの増加、(x i v)M 2 マクロファージ活性の増加、(x v)N 2 好中球の増加、(x v i)N 2 好中球活性の増加、(x v i i)T細胞の活性化阻害の増加、(x v i i i)C T L 活性化阻害の増加、(x i x)N K 細胞活性化阻害の増加、(x x)T細胞疲弊の増加、(x x i)T細胞応答の低下、(x x i i)細胞毒性細胞の活性の低下、(x x i i i)抗原特異的メモリー応答の低下、(x x i v)細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(x x v)細胞への細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の低下、(x x v i)細胞の直接殺傷の減少、(x x v i i)T h 1 7 活性の低下、並びに/または(x x v i i i)補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の低下。

30

40

【0658】

第116項。Tまたはナチュラルキラー(NK)細胞免疫におけるV S I G 8及び/またはV I S T Aの少なくとも1つの効果を増強するか、刺激するかまたは模倣する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0659】

第117項。T細胞免疫におけるV S I G 8及び/またはV I S T Aの阻害効果を増大させる、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0660】

第118項。C T L 活性を阻害する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

50

【0661】

第119項。阻害されるCTL活性は、1つ以上の炎症性サイトカインの分泌低下、及び/またはCTLが仲立ちする標的細胞の殺傷の低下を含む、第118項に記載の方法または使用。

【0662】

第120項。CD4+ T細胞の活性化、及び/またはCD4+ T細胞増殖、及び/またはCD4+ T細胞が仲立ちする細胞枯渇を阻害する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0663】

第121項。CD8+ T細胞の活性化、及び/またはCD8+ T細胞増殖、及び/またはCD8+ T細胞が仲立ちする細胞枯渇を阻害する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

10

【0664】

第122項。NK細胞活性を阻害する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0665】

第123項。阻害されるNK細胞活性は、標的細胞の枯渇、及び/または炎症性サイトカイン放出の低下を含む、第122項に記載の方法または使用。

【0666】

第124項。T細胞(Treg)等の制御性細胞の分化、増殖及び/もしくは活性、並びに/または骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)の分化、増殖、浸潤及び/もしくは活性を促進及び/または増大させる、上に記載のいずれか一項に記載の方法または使用。

20

【0667】

第125項。TregまたはMDSC等の制御性細胞の、病気の部位への浸潤を促進及び/または増大させる、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0668】

第126項。免疫におけるVSI G 8及び/またはVISTAの効果の1つ以上を促進することにより、アレルギー性、自己免疫性または炎症性免疫応答を阻害する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0669】

第127項。免疫におけるVSI G 8及び/またはVISTAの効果の1つ以上を増強することにより、抗原特異的免疫応答の抗原特異的寛容、または抑制の延長を促進する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

30

【0670】

第128項。移植細胞、組織または臓器に対する抗原特異的免疫の寛容、または抑制の延長を誘発する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0671】

第129項。免疫におけるVSI G 8及び/またはVISTAの効果の1つ以上を促進することにより、自己抗原、アレルゲン、または炎症作用物質に対する免疫応答を阻害する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

40

【0672】

第130項。治療される個体は、細胞療法、遺伝子治療、または移植組織もしくは臓器を有するか、それを受ける予定であり、治療は、かかる細胞療法、遺伝子治療、または移植組織もしくは臓器と関係する望ましくない免疫活性化を低下させるかまたは阻害する、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【0673】

第131項。酸逆流/胸やけ、座瘡、尋常性挫瘡、アレルギー及び過敏症、アルツハイマー病、ぜんそく、アテローム性動脈硬化症及び血管閉塞性疾患、任意のアテローム性動脈硬化症、虚血性心疾患、心筋梗塞、脳卒中、末梢血管疾患または血管ステント再狭窄、自己免疫疾患、気管支炎、癌、心臓炎、白内障、腹腔動脈疾患、慢性痛、慢性前立腺炎、

50

硬変、大腸炎、結合織疾患、任意の全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、多発性筋炎、皮膚筋炎、またはシェーグレン症候群及びシェーグレン症候群等の関連する状態（本明細書では、シェーグレン症候群、一次シェーグレン症候群及び二次シェーグレン症候群、並びに、結合織疾患等のシェーグレン症候群に關係する状態または合併症、例えば関節リウマチ、全身性エリテマトーデスまたは強皮症の1つ以上を含む）、肺炎、肺線維症、間質性腎炎、腎膜周辺組織の炎症、糸球体腎炎、尿細管性アシドーシス、手根管症候群、末梢神経炎、脳神経障害、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、硬変、食道、胃、膵臓及び肝臓における炎症（肝炎を含む）、多発性筋炎、レイノー現象、血管炎、自己免疫甲状腺問題、リンパ腫、角膜疾患、クローン病、結晶性関節炎、任意の痛風、偽性痛風、ピロリン酸カルシウム沈着症、認知症、皮膚炎、糖尿病、ドライアイ、湿疹、浮腫、気腫、線維筋痛、胃腸炎、歯肉炎、糸球体腎炎、心臓疾患、肝炎、高血圧、過敏症、炎症性腸疾患、外傷及び虚血の結果を含む炎症性状態、インスリン抵抗性、間質性膀胱炎、虹彩毛様体炎、虹彩炎、関節痛、関節炎、ライム病、メタボリックシンドローム（X症候群）、多発性硬化症、筋炎、腎炎、肥満、ぶどう膜炎を含む眼疾患、骨減少症、骨粗鬆症、パーキンソン病、骨盤内炎症性疾患、歯周病、多発動脈炎、多発軟骨炎、リウマチ性多発筋痛、乾癬、再灌流傷害、リウマチ性関節炎、リウマチ疾患、関節リウマチ、変形性関節症または乾癬性関節炎、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、副鼻腔炎、「シェーグレン症候群」及びこれに伴う関連状態または合併症（シェーグレン症候群、一次シェーグレン症候群及び二次シェーグレン症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスまたは強皮症等の結合織疾患を含む、シェーグレン症候群に關係する状態、及び、肺炎、肺線維症、間質性腎炎等のシェーグレン症候群に關係する合併症の1つ以上等）、腎膜周辺組織の炎症、糸球体腎炎、尿細管性アシドーシス、手根管症候群、末梢神経炎、脳神経障害、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、硬変、食道、胃、膵臓及び肝臓における炎症（肝炎を含む）、多発性筋炎、レイノー現象、血管炎、自己免疫甲状腺問題、リンパ腫、シェーグレン症候群、刺激結腸、脊椎関節症、任意の強直性脊椎炎、反応性関節炎またはライター症候群、全身性カンジダ症、腱炎、移植拒絶反応、UTI、膣炎、血管疾患（アテローム血管疾患、血管炎、結節性多発性動脈炎、ヴェゲナー肉芽腫症、チャグ・ストラウス症候群、または血管炎を含む）から選択される炎症と關係する炎症性または自己免疫疾患または状態を治療するために使用される、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

10

20

30

【0674】

第132項。急性前ぶどう膜炎、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）、急性痛風関節炎、急性壊死性出血性白質脳炎、急性もしくは慢性副鼻腔炎、急性化膿髄膜炎（もしくは他の中枢神経系炎症性疾患）、急性の重度炎症、アジソン病、副腎炎、成人発症真性糖尿病（2型糖尿病）、成人発症特発性副甲状腺機能低下症（AOIH）、無ガンマグロブリン血症、無顆粒球症、血管炎（脈管炎、任意で大型脈管炎を含む）、任意のリウマチ性多発筋痛及び巨細胞（高安）関節炎、アレルギー状態、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、アレルギー性過敏性障害、アレルギー性神経炎、アレルギー反応、グレアタ脱毛症（alopecia greata）、全脱毛症、アルポート症候群、肺胞炎、任意のアレルギー性肺胞炎もしくは線維化性肺胞炎、アルツハイマー病、アミロイド症、筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis）（ALS；ルー・ゲーリッグ病）、好酸球関連疾患、任意の好酸球増加症、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、脈管拡張、抗体が仲立ちする腎炎、抗GBM/抗TBM腎炎、抗原-抗体複合体が仲立ちする疾患、反糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、抗リン脂質症候群（APS）、鷲口瘡、アフタ性口内炎、再生不良性貧血、不整脈、動脈硬化、動脈硬化性疾患、関節炎、任意の関節リウマチ（急性関節炎、もしくは慢性関節リウマチ、慢性関節炎プログレディエント（progredivente）、変形性関節炎等）、回虫症、アスペルギルス腫、好酸球含有肉芽腫、アスペルギルス症、精子変態（aspermiogenesis）、ぜんそく、任意の気管支ぜんそく（asthma bronchiale）、気管支ぜんそく（bronchial asthma）、もしくは自己免疫ぜんそく、血管拡張性失調症、失調性硬化症、アテローム性動脈

40

50

硬化症、自閉症、自己免疫性血管性浮腫、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性糖尿病、自己免疫性精巣炎及び卵巣炎を含む、精巣及び卵巣の自己免疫疾患、膠原病に係る自己免疫疾患、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性耳疾患、任意の自己免疫性内耳疾患（AGED）、自己免疫性甲状腺炎等の甲状腺炎を含む自己免疫性内分泌腺疾患、自己免疫性腸疾患症候群、自己免疫性腺機能不全、自己免疫性難聴、自己免疫性溶血、自己免疫性肝炎、自己免疫性肝臓病的疾患、自己免疫性高脂血症、自己免疫性免疫不全、自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性膵炎、自己免疫多腺性内分泌障害、自己免疫性I型多腺性症候群、自己免疫性網膜症、自己免疫血小板減少性紫斑病（ATP）、自己免疫性甲状腺疾患、自己免疫性蕁麻疹、自己免疫性胃腸疾患、軸索及び神経細胞ニューロパシー、バロ病、ベーチェット病、良性の家族性及び虚血再灌流傷害、良性リンパ性血管炎、バーガー病（Berger's disease）（IgA腎症）、愛鳥家肺、失明、ベック病、閉塞性細気管支炎（非移植性）対NSIP、気管支炎、気管支肺炎アスペルギルス症、プラットン症候群、水疱性類天疱瘡、カプラン症候群、心筋症、心血管局所貧血、カースルマン症候群、腹腔動脈疾患、腹腔スプルー（グルテン性腸症）、小脳退化、脳虚血、及び脈管化に伴う疾患、シャーガス病、チャネロパチー、任意の癲癇、CNSのチャネロパチー、脈絡網膜炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液疾患、慢性的活性肝炎もしくは自己免疫性の慢性的活性肝炎、慢性接触皮膚炎、慢性エオシン好性肺炎、慢性疲労症候群、慢性肝炎、慢性過敏症肺炎、慢性炎症性関節炎、慢性炎症性脱髄性多発神経障害（CIDP）、慢性難治性炎症、慢性皮膚粘膜カンジダ症、慢性ニューロパシー、任意のIgMポリニューロパシーもしくはIgMが仲立ちするニューロパシー、慢性閉塞性気道疾患、慢性肺炎症性疾患、慢性再発性多病巣性骨髄炎（CRMO）、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）もしくは亜急性甲状腺炎、チャグ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡/良性粘膜類天疱瘡、CNS炎症性疾患、CNS脈管炎、腹腔疾患、コーガン症候群、寒冷凝集素疾患、ポリープ様大腸炎、大腸炎（潰瘍性大腸炎、潰瘍性大腸炎、膠原性大腸炎等）、T細胞の湿潤と慢性的な炎症反応を伴う状態、先天性心ブロック、先天性風疹感染症、ケームス陽性貧血、冠動脈疾患、コクサッキー心筋炎、CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象）、クローン病、寒冷グロブリン血症、クッシング症候群、毛様体炎、任意の慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、虹彩毛様体炎もしくはフッチ毛様体炎、嚢胞性線維症、サイトカイン誘発毒性、聴覚障害、変性関節炎、脱髄疾患、任意の自己免疫脱髄疾患、脱髄ニューロパシー、デング熱、疱疹状皮膚炎及びアトピー性皮膚炎、接触皮膚炎を含む皮膚炎、皮膚筋炎、急性炎症性成分による皮膚疾患、デビック病（視神経脊髄炎）、糖尿病性大動脈疾患、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、拡散間質性肺線維症、拡張型心筋症、円板状ループス、白血球漏出を伴う疾患、ドレスラー症候群、デュピュイトラン拘縮、エコーウイルス感染症、アレルギー性もしくはアトピー性湿疹を含む湿疹、ラスマッセン脳炎並びに辺縁系及びノもしくは脳幹性脳炎、脳脊髄炎、任意のアレルギー性脳脊髄炎もしくは脳脊髄炎アレルギー（allergica）及び実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、動脈内膜増殖、心内膜炎、内分泌性眼症、子宮内膜症、心内膜心筋線維症、水晶体過敏性眼内炎（endophthalmitis phacoanaphylactica）、眼内炎、腸炎アレルギー（allergica）、好酸球増加-筋痛症候群、好酸球性筋膜炎（eosinophilic fasciitis）、流行性角結膜炎、後天性表皮水疱症（EBA）、上強膜、上強膜炎、エプスタイン・バーウイルス感染症、持続性隆起性紅斑、多形紅斑、らい性結節性紅斑、結節性紅斑、胎児赤芽球症、食道運動障害、本態性混合型クリオグロブリン血、篩状、エバンス症候群（Evans's syndrome）、実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、第VII因子欠乏症、農夫肺、リウマチ熱（febris rheumatica）、フェルティエ症候群、線維筋痛、線維化性肺炎、フィラリア症、焦点性分節系球体硬化（FSGS）、食中毒、前面胃萎縮（frontal, gastric atrophy）、巨細胞関節炎（時間的関節炎）、巨細胞肝炎、巨細胞多発筋痛、系球体腎炎（glomerulonephritis）、慢性もしくは急性系球体腎炎（例えば一次GN）等の、ネフローゼ症候群を有する

10

20

30

40

50

、及び有しない糸球体腎炎（GN）、グッドパスチャー症候群、痛風性関節炎、顆粒球輸血関連の症候群、リンパ腫肉芽腫症を含む肉芽腫症、多発血管炎を伴う肉芽腫症（GPA）、肉芽腫性ブドウ膜炎、グレイブス病（Grave's disease）、ギラン・バレー症候群、滴状乾癬（gutatte psoriasis）、発作性色素尿症（hemoglobinuria paroxysmatica）、ハーマン・リッチ病、橋本病、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、ヘモクロマトーシス、溶血性貧血もしくは免疫性溶血性貧血（自己免疫溶血性貧血（AIHA）、溶血性貧血を含む）、血友病A、ヘノッホ・シェンライン紫斑病、妊娠性疱疹、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症、痛覚過敏症、低ガンマグロブリン血症、性腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、特発性尿崩症、特発性顔面神経麻痺、特発性甲状腺機能低下症、特発性IgA腎症、特発性膜GNもしくは特発性膜腎症、特発性腎炎症候群、特発性肺胞線維症、特発性スプルー、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、IgEが仲立ちする疾患、任意のアナフィラキシー及びアレルギー性もしくはアトピー性鼻炎、IgG4関連硬化性疾患、限局性回腸炎（ileitis regionalis）、免疫複合腎炎、サイトカイン及びTリンパ球が仲立ちする急性及び遅延過敏症を伴う免疫応答、免疫が仲立ちするGN、免疫調節性リポタンパク質（成人もしくは急性呼吸促進症候群（ARDS）を含む）、封入体筋炎、感染性関節炎、反精子抗体による不妊症、ブドウ膜の全てもしくは一部の炎症、炎症性腸疾患（IBD）炎症性増殖過剰皮膚病、炎症性筋障害、インスリン依存性糖尿病（I型（type 1））、膵島炎、間質性膀胱炎、間質性肺疾患、間質性肺線維症、虹彩炎、虚血性再灌流疾患、関節炎、若年性関節炎、若年性皮膚筋炎、若年性糖尿病、小児性インスリン依存性真性糖尿病（IDDM）を含む若年発症性（I型）真性糖尿病、若年発症性関節リウマチ、川崎症候群、乾性角結膜炎、トリパノソーマ症（kypanosomiasis）、ランバート・イートン症候群、リーシュマニア症、らい病、白血球減少、白血球接着不全、白血球破砕性血管炎、白血球減少症、扁平苔癬、硬化性萎縮性苔癬（lichen sclerosus）、木質結膜炎、線状IgA皮膚、線状IgA疾患（LAD）、レフラ症候群、ルポイド肝炎、狼瘡（腎炎、脳炎、小児性、非腎性、腎外、円盤状、脱毛症を含む）、狼瘡（SLE）、ディセミナス（disseminatus）エリテマトーデス、ライム関節炎、ライム病、リンパ様間質肺炎、マラリア、男性及び女性自己免疫性不妊症、上顎の中程度の血管炎（川崎病及び結節性多発性動脈炎を含む）、膜様（membrano）もしくは膜質（membranous）増殖性GN（MPGN）（I型及びII型、及び急速進行性GN、膜質GN（膜質腎症）を含む）、メニエール病、髄膜炎、顕微鏡的大腸炎、顕微鏡的多発血管炎、片頭痛、微小変化の腎症、混合性結合組織病（MCTD）、伝染性単核球症、モーレン潰瘍、ミュシャ・ハーバーマン病、多発限局性運動性末梢神経炎、複数の内分泌不全、敗血症、外傷もしくは出血に続くもの等の複数の臓器障害症候群、複数の臓器障害症候群、脊椎-眼MS等の多発性硬化症（MS）、多発性硬化症、ムンプス、筋疾患、胸腺腫関連の重症筋無力症等の重症筋無力症、重症筋無力症、心筋炎、筋炎、ナルコレプシー、壊死性全腸炎、及び経壁大腸炎、及び自己免疫性炎症性腸疾患、壊死性、皮膚性もしくは過敏性血管炎、新生児性狼瘡症候群（NLE）、腎症、ネフローゼ症候群、神経学的疾患、視神経脊髄炎（デビック）、視神経脊髄炎、神経性筋強直症、好中球減少症、非癌性リンパ球増加、非肉芽腫性ブドウ膜炎、非悪性胸腺腫、眼性および眼窩炎症性疾患、眼性瘢痕性類天疱瘡、卵巣炎、交感性眼炎、オブクローヌス・ミオクローヌス症候群（OMS）、オブクローヌスもしくはオブクローヌス・ミオクローヌス症候群（OMS）、及び二次ニューロパシー、視神経炎、肉芽腫性精巣炎（orchitis granulomatosa）、変形性関節症、回帰性リウマチ、膵炎、汎血球減少、PANDAS（ストレプトコッカスに関連する小児性自己免疫神経精神病的疾患）、傍腫瘍性小脳変性症、腫瘍随伴症候群、腫瘍随伴症候群（神経系腫瘍随伴症候群を含む）、任意のランバート・イートン筋無力症候群もしくはイートン・ランバート症候群、寄生虫疾患（例えばリーシュマニア症）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、パーソンナージュ（Parsonnage）・ターナー症候群、バルボウイルス感染症、天疱瘡様水疱及び皮膚類

10

20

30

40

50

天疱瘡等の類天疱瘡、天疱瘡（尋常天疱瘡を含む）、紅斑性天疱瘡、落葉性天疱瘡、天疱瘡粘液・膜類天疱瘡、天疱瘡、消化性潰瘍、周期性麻痺、末梢神経炎、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血（貧血悪性熱）、悪性貧血、水晶体抗原性ブドウ膜炎、肺肝硬変、P O E M S症候群、結節性多発性動脈炎、I、II及びIII型多発性関節炎慢性プリマリア、多発軟骨炎（例えば、不応性もしくは再発多発軟骨炎）、多内分泌自己免疫疾患多内分泌疾患、多腺性症候群、任意の自己免疫性多腺性症候群（もしくは多腺性内分泌障害症候群）、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発ニューロパシー、多発性神経根炎アクタ、心臓切開後症候群、後部ブドウ膜炎、もしくは自己免疫性ぶどう膜炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、連鎖球菌感染後腎炎、予防接種後症候群、初老期痴呆、原発性胆汁性肝硬変、一次性甲状腺機能低下症、一次性特発性粘液水腫、一次性リンパ球増加症（モノクローナルB細胞リンパ球増加症を含む）、測定されていない重要度を有する、任意の良性単クローン性免疫グロブリン血症及び単クローン性免疫グロブリン血症（monoclonal gammopathy）、MGUS、一次性粘液水腫、一次性進行性MS（PPMS）、及び再発寛解型MS（RRMS）、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、全身性進行性硬化症、増殖性関節炎、乾癬（慢性尋常性乾癬、乾癬、乾癬性関節炎等）、肺胞タンパク症、肺浸潤好酸球増加、真正赤血球性貧血もしくは形成不全（PRCA）、赤芽球癆、化膿性もしくは非化膿性副鼻腔炎、爪の膿疱性乾癬及び乾癬、腎盂炎、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎、レイノー現象、反応性関節炎、反復流産、血圧応答の低下、灼熱痛、不応性スプルー、ライター病もしくは症候群、再発性多発軟骨炎、心筋もしくは他の組織の再灌流傷害、再灌流傷害、呼吸促迫症候群、レストレスレッグス症候群、網膜自己免疫、後腹膜線維化症、レイノー症候群、リウマチ疾患、リウマチ熱、リウマチ、関節リウマチ、リウマチ性脊椎炎、風疹ウイルス感染症、サンブタ-症候群、サルコイドーシス、住血吸虫症、シュミット症候群、SCID及びエプスタイン・パールウイルス関連疾患、強膜、強膜炎、強指症（sclerodactyl）、強皮症、任意の全身性強皮症、硬化性胆管炎、伝染性硬化症（sclerosi s di s s e m i n a t a）、硬化症（全身性硬化症等）、感覚神経聴力障害、血清陰性椎骨関節炎、シーアン症候群、シャルマン症候群、ケイ肺症、シェーグレン症候群、精子及び精巣自己免疫、蝶形骨洞副鼻腔炎、ステイヴンズ-ジョンソン症候群、スティッフマン（もしくはスティッフパーソン）症候群、亜急性細菌性心内膜炎（SBE）、亜急性皮膚エリテマトーデス、突然の聴力障害、スザック症候群、シデナム舞踏病、交感性眼炎、全身性エリテマトーデス（SLE）もしくは全身性エリテマトーデス、皮膚SLE、全身性壊死性血管炎、ANCA関連脈管炎、任意のチャグ・ストラウス血管炎もしくは症候群（CSS）、脊髄癆、高安動脈炎、末梢血管拡張、側頭動脈炎/巨細胞動脈炎、閉塞性血栓性血管炎（thromboangiiti s ubi t e r a n）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、及び、慢性もしくは急性特発性血小板減少性紫斑病（ITP）を含むITP等の自己免疫性、もしくは免疫が仲立ちする血小板減少症を含む、血小板減少症、血小板減少性紫斑病（TTP）、甲状腺中毒症、組織損傷、トロサ・ハント症候群、中毒性表皮性表皮壊死症、毒性ショック症候群、輸血反応、乳児の一過性低ガンマグロブリン血症、横断性脊髄炎、横断性脊髄炎（traverse myeliti s）、熱帯性肺好酸球増多症、結核、潰瘍性大腸炎、未分化結合織疾患（UCTD）、蕁麻疹、任意の慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性特発性蕁麻疹（慢性自己免疫性蕁麻疹）、ぶどう膜炎、前ぶどう膜炎、ブドウ膜網膜炎、弁膜炎、血管機能不全、血管炎、脊椎骨関節炎、小水疱性皮膚症、白斑、ヴェゲナー肉芽腫症（多発血管炎を伴う肉芽腫症（GPA））、骨髄異形成症候群、もしくはx結合超IgM症候群から選択される自己免疫性またはアレルギー性疾患を治療するために使用される、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0675】

第133項。多発性硬化症、乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス（SLE）；円板状エリテマトーデス、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ性血管炎、血小板減少性紫斑病、特発性血小板減少症、特発性自己免疫溶血性貧血、赤芽球癆、シェーグレン症候群、リウマチ疾患、結合織疾患、炎症性リウマチ、変

10

20

30

40

50

性リウマチ、関節外リウマチ、若年性関節リウマチ、関節炎蕁麻疹、筋肉リウマチ、慢性多発性関節炎、クリオグロブリン血症性血管炎、ANCA関連脈管炎、抗リン脂質症候群、重症筋無力症、自己免疫溶血性(haemolytica)貧血、ギラン・バレー症候群、慢性免疫多発神経障害、自己免疫甲状腺炎、インスリン依存性真性糖尿病、I型糖尿病、アジソン病、膜性腎症、グッドパスチャー疾患、自己免疫性胃炎、自己免疫性萎縮性胃炎、悪性貧血、天疱瘡、尋常天疱瘡、硬変、原発性胆汁性肝硬変、皮膚筋炎、多発性筋炎、繊維筋炎、筋硬症、腹腔動脈疾患、免疫グロブリンA腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、エバンス症候群、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、乾癬、関節症性乾癬、グレーヴス病、グレーヴス眼病、強皮症、全身性强皮症、進行性全身性强皮症、ぜんそく、アレルギー、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、一次性粘液水腫、交感性眼炎、自己免疫性ぶどう膜炎、肝炎、慢性作用肝炎、膠原病、強直性脊椎炎、肩関節周囲炎、結節性汎動脈炎、軟骨石灰化、ヴェゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、慢性蕁麻疹、水疱性皮膚疾患、類天疱瘡、アトピー性湿疹、小児期自己免疫溶血性貧血、特発性自己免疫溶血性貧血、不応性または慢性自己免疫血球減少、後天性血友病Aにおける自己免疫抗第V I I I因子抗体の成長防止、寒冷凝集素疾患、視神経脊髄炎、スティッフパーソン症候群、歯肉炎、歯周炎、腭炎、特発性心膜炎、心筋炎、血管炎、胃炎、痛風、痛風性関節炎、及び炎症性皮膚疾患、正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、筋炎、抗シンセターゼ症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、PAPA症候群、ブラウ症候群、痛風、成人及び青年スティール病、クリオピリノバシー、マック・ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群、リウマチ疾患、リウマチ性多発筋痛、混合性結合織疾患、炎症性リウマチ、変性リウマチ、関節外リウマチ、若年性関節炎、若年性関節リウマチ、全身型若年性特発性関節炎、関節炎蕁麻疹、筋肉リウマチ、慢性多発性関節炎、反応性関節炎、ライター症候群、リウマチ熱、再発性多発軟骨炎、レイノー現象、血管炎、クリオグロブリン血症性血管炎、側頭動脈炎、巨細胞動脈炎、高安動脈炎、ベーチェット病、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、自己免疫甲状腺炎、インスリン依存性真性糖尿病、I型糖尿病、アジソン病、膜性腎症、多腺性自己免疫症候群、グッドパスチャー疾患、自己免疫性胃炎、自己免疫性萎縮性胃炎、悪性貧血、天疱瘡、尋常天疱瘡、硬変、原発性胆汁性肝硬変、特発性肺胞線維症、筋炎、皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、多発性筋炎、繊維筋炎、筋硬症、腹腔動脈疾患、腹腔スプルー皮膚炎、免疫グロブリンA腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、エバンス症候群、アトピー性皮膚炎、乾癬、尋常性乾癬、関節症性乾癬、グレーヴス病、グレーヴス眼病、強皮症、全身性强皮症、進行性全身性强皮症、びまん性强皮症、限局性强皮症、クレスト症候群、ぜんそく、アレルギー性ぜんそく、アレルギー、原発性胆汁性肝硬変、線維筋痛、慢性疲労及び免疫不全症候群(CFIDS)、自己免疫性内耳疾患、高IgD症候群、シュニッツラー症候群、自己免疫性網膜症、加齢関連黄斑変性症、アテローム性動脈硬化症、慢性前立腺炎、脱毛症、円形脱毛症、全身性脱毛、全脱毛症、自己免疫血小板減少性紫斑病、特発性血小板減少性紫斑病、赤芽球癆、並びにTNF受容体関連周期性症候群(TRAPS)からなる群から選択される自己免疫疾患を治療するために使用される、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

10

20

30

40

【0676】

第134項。前記診断及び/または治療は、免疫関連状態の治療に有用な別の成分と組み合わせられる、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【0677】

第135項。前記免疫関連状態の治療に有用な他の成分は、コルチコステロイド、シクロスポリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、ラパマイシン、タクロリムス、レフウノミド(lefunomide)もしくはこれらの類似体等の免疫抑制剤；ミゾリピン；マイコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；15-デオキシスペルグアリン(deoxypergualine)もしくはその類似体；TNF-遮断剤もしくはアンタゴニスト等の生物学的製剤、もしくは、任意の炎症性サイトカインを標的化する任意の他の生物学的製剤、非ステロイド性抗炎症薬/C

50

ox - 2 阻害剤、ヒドロキシクロロキン、スルファサラゾプリン (sulphasalazopyrine)、金塩、エタネルセプト、インフリキシマブ、ミコフェノール酸モフェチル、バシリキシマブ、アタシセプト、リツキシマブ、シトキササン、インターフェロン - 1 a、インターフェロン - 1 b、酢酸ガラティラメル、ミトキサントロン塩酸塩、アナキンラ及び/もしくは他の生物学的製剤及び/もしくは静脈内免疫グロブリン (IVIG)、IFN - p - 1 a (REBIF (登録商標)、AVONEX (登録商標) 及び CINNOVEX (登録商標)) 並びに IFN - p - 1 b (BETASERON (登録商標)、EXTAVIA (登録商標)、BETAFERON (登録商標)、ZIFERON (登録商標)); ペプチドであるグラチラマー酢酸塩 (COPAXONE (登録商標)); 細胞毒性剤であるナタリズマブ (TYSABRI (登録商標))、ミトキサントロン (NOVANTRONE (登録商標))、カルシニューリン阻害剤 (例えばシクロスポリン A もしくは FK506); 免疫抑制マクロライド (例えばラパマイシン) またはその誘導體 (例えば 40 - O - (2 - ヒドロキシ) エチル - ラパマイシン、リンパ球ホーミング剤 (例えば FTY720) またはその類似体、コルチコステロイド; シクロホスファミド; アザチオプリン (azathioprene); メトトレキサート; レフルノミドもしくはその誘導體; ミゾリピン; マイコフェノール酸; ミコフェノール酸モフェチル; 15 - デオキシスベルグアリンもしくはその誘導體; 免疫抑制モノクローナル抗体 (例えば、白血球受容体に対するモノクローナル抗体、例えば MHC、CD2、CD3、CD4、CD11a/CD18、CD7、CD25、CD27、B7、CD40、CD45、CD58、CD137、ICOS、CD150 (SLAM)、OX40、4 - 1BB またはこれらのリガンド); または他の免疫調節化合物、例えば CTLA4 - Ig (アバタセプト、ORENCIA (登録商標)、ベラタセプト)、CD28 - Ig、B7 - H4 - Ig、または他の共刺激剤、または他の接着分子阻害剤、例えば mAb もしくは低分子量阻害剤 (LFA - 1 アンタゴニスト、セレクトインアンタゴニスト及び VLA - 4 アンタゴニストを含む)、または他の免疫調節剤から選択される、第 134 項に記載の方法または使用。

10

20

【0678】

第 136 項。遺伝子治療後の望ましくない免疫活性化を低減するのに有用な別の成分を含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗 VSIg8 抗体もしくは抗原結合断片もしくは VSIg8 融合タンパク質、もしくは組成物、または方法もしくは使用。

30

【0679】

第 137 項。別の治療薬または治療法と組み合わせた、抗 VSIg8 抗体もしくは抗原結合断片、または組成物による治療を含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗 VSIg8 抗体もしくは抗原結合断片もしくは VSIg8 融合タンパク質、もしくは組成物、または方法もしくは使用。

【0680】

第 138 項。細胞分裂抑制薬、シクロホスファミド、ゲムシタピン、マイトキサントロン、フルダラビン、サリドマイド、サリドマイド誘導體、COX - 2 阻害剤、Treg 細胞表面受容体の認識により、Treg を直接標的化する枯渴または殺傷抗体、抗 CD25 ダクリズマブ、バシリキシマブ、リガンドに向けられる毒素、デニロイキンディフィトックス (Ontak) - ヒト IL - 2 及びジフテリア毒素の融合タンパク質、または LMB - 2 - CD25 に対する scFv とシュードモナスエキソトキシンとの融合物、Treg 細胞表面受容体を標的化する抗体、TLR 調節物質、アデノシン経路を妨げる作用物質、エクトヌクレオチダーゼ阻害剤、または A2A アデノシン受容体の阻害剤、TGF - 阻害剤、ケモカイン受容体阻害剤、レチノイン酸、全トランスレチノイン酸 (ATRA)、ビタミン D3、ホスホジエステラーゼ 5 阻害剤、シルデナフィル、ROS 阻害剤及びニトロアスピリンから選択される、免疫抑制細胞 Treg 及び/または MDSC を標的とする治療薬を更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗 VSIg8 抗体もしくは抗原結合断片もしくは VSIg8 融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

40

【0681】

第 139 項。CTLA4、PD - 1、PDL - 1、LAG - 3、TIM - 3、BTLA

50

、 B 7 - H 4、 B 7 - H 3、 V I S T A の 1 つ以上を標的とするアンタゴニスト抗体、及び/または C D 4 0、 C D 1 3 7、 O X 4 0、 G I T R、 C D 2 7、 C D 2 8、もしくは I C O S の 1 つ以上を標的とするアゴニスト抗体から選択される別の抗体を更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原結合断片もしくは V S I G 8 融合タンパク質もしくは組成物、または方法もしくは使用。

【 0 6 8 2 】

第 1 4 0 項。治療前、治療と同時、及び/または治療後に、個体の細胞により V S I G 8 及び/または V I S T A タンパク質をアッセイすることを含む、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用。

【 0 6 8 3 】

第 1 4 1 項。治療前に病気及び/または通常の細胞により、任意で、 V S I G 8 及び/または V I S T A の発現を検出する抗体もしくは核酸を使用することにより、前記方法が、 V S I G 8 及び/または V I S T A タンパク質の発現を検出する、第 1 4 0 項に記載の方法または使用。

【 0 6 8 4 】

第 1 4 2 項。上に記載の項のいずれか一項に記載の抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原結合断片、または組成物の投与前、投与と同時、または投与後に投与され得る、別の診断または治療薬の投与または使用を更に含む、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【 0 6 8 5 】

第 1 4 3 項。別の治療薬の投与を含む、第 1 4 2 項に記載の方法または使用。

【 0 6 8 6 】

第 1 4 4 項。前記他の治療薬は薬剤、別の免疫調節化合物、放射性核種、フルオロフォア、酵素、毒素、または化学療法剤から選択され、前記検出可能な作用物質は、放射性同位体、金属キレーター、酵素、蛍光性化合物、生物発光化合物または化学発光化合物から選択される、第 1 4 3 項に記載の方法または使用。

【 0 6 8 7 】

第 1 4 5 項。NK 細胞受容体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片の投与を更に含む、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法または使用。

【 0 6 8 8 】

第 1 4 6 項。NK 細胞受容体に特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合断片は、前記 NK 細胞受容体の効果を刺激する、第 1 4 5 項に記載の方法または使用。

【 0 6 8 9 】

第 1 4 7 項。NK 細胞受容体に特異的に結合する前記抗体またはその抗原結合断片は、前記 NK 細胞受容体の効果に拮抗するか、または NK 細胞活性を阻害するものである、第 1 4 6 項に記載の方法または使用。

【 0 6 9 0 】

第 1 4 8 項。前記阻害性 NK 細胞受容体が、 K I R 2 D L 1、 K I R 2 D L 2 / 3、 K I R 2 D L 4、 K I R 2 D L 5 A、 K I R 2 D L 5 B、 K I R 3 D L 1、 K I R 3 D L 2、 K I R 3 D L 3、 L I L R B 1、 N K G 2 A、 N K G 2 C、 N K G 2 E 及び L I L R B 5 からなる群から選択される、第 1 4 7 項に記載の方法または使用。

【 0 6 9 1 】

第 1 4 9 項。前記 NK 細胞受容体は NK 細胞活性を促進するものである、第 1 4 5 項に記載の方法または使用。

【 0 6 9 2 】

第 1 5 0 項。前記 NK 細胞活性化受容体は、 N K p 3 0、 N K p 4 4、 N K p 4 6、 N K p 4 6、 N K G 2 D、 K I R 2 D S 4、 C D 2、 C D 1 6、 C D 6 9、 D N A X アクセサリー分子 - 1 (D N A M - 1)、 2 B 4、 N K 1 . 1 ; キラー免疫グロブリン (I g) 様活性化受容体 (K A R) ; I L T / L I R ; N K R P - 1、 C D 6 9 ; C D 9 4 / N K G 2 C 及び C D 9 4 / N K G 2 E ヘテロ二量体、 N K G 2 D ホモ二量体 K I R 2 D S 及

10

20

30

40

50

び K I R 3 D S からなる群から選択される、第 1 4 9 項に記載の方法または使用。

【 0 6 9 3 】

第 1 5 1 項。上に記載の項のいずれかに記載の抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原断片もしくは V S I G 8 融合タンパク質、または、上に記載の項のいずれかに記載の方法もしくは使用での使用に好適な抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原断片を選択するためのアッセイ方法であって、前記方法は、(i) 配列番号 1、2、もしくは 3 のいずれかに記載されるアミノ酸配列から選択される配列を有する V S I G 8 ポリペプチドに推定上結合する、もしくは、少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチド、この配列もしくは非ヒト V S I G 8 オルソログに結合する 1 つ以上の抗体もしくは V S I G 8 融合タンパク質、または、少なくとも 1 つの V S I G 8 エピトープを含有する、ポリペプチドの断片もしくは変異体であって、断片もしくは変異体が、該ポリペプチド、または非ヒト V S I G 8 オルソログに少なくとも 9 0 % の同一性を有する、前記断片もしくは変異体を得ることと、(i i) 前記抗体または抗原結合断片が前記 V S I G 8 ポリペプチドに特異的に結合するかどうかを決定することと、(i i) 前記抗体または抗原結合断片が、免疫における V S I G 8 の少なくとも 1 つの効果を調節(刺激する、または拮抗する)かどうかを決定することと、かつ、(i v) (i i) 及び(i i) が満たされる場合に、前記抗体を、上に記載の項のいずれかに記載の方法または使用において潜在的に有用なものとして選択することと、を含む、前記アッセイ方法。

10

【 0 6 9 4 】

第 1 5 2 項。前記抗体または抗原結合断片がヒトもしくは非ヒト霊長類抗体またはこれらの断片でない場合に、ヒト化、霊長類化またはキメラ化を更に含む、第 1 5 1 項に記載の方法。

20

【 0 6 9 5 】

第 1 5 3 項。前記抗体または抗原結合断片を誘導するのに使用する免疫原が、配列番号 1、2 及び 3 のいずれかに記載のアミノ酸配列から選択される配列を有するか、もしくは該アミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチド、もしくは非ヒト V S I G 8 オルソログもしくは非ヒト(non - human) V S I G 8 オルソログの同一領域に結合する V S I G 8 ポリペプチド、または少なくとも 1 つの V S I G 8 エピトープを含有するこれらの断片もしくは誘導体を含む、第 1 5 1 または 1 5 2 項に記載の方法。

30

【 0 6 9 6 】

第 1 5 4 項。前記抗体または抗原結合断片を誘導するのに使用する免疫原が、配列番号 1、2 及び 3 のいずれかに記載されるアミノ酸配列から選択される配列を有するか、またはそのアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチド、もしくは h V S I G 8 の非ヒトオルソログの同一領域に結合する V S I G 8 ポリペプチドを含む、第 1 5 1 ~ 1 5 3 項のいずれかに記載の方法。

【 0 6 9 7 】

第 1 5 5 項。前記抗体またはその抗原結合断片を誘導するのに使用する免疫原が、配列番号 1、2 及び 3 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するか、もしくは該アミノ酸配列を少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するポリペプチド、もしくは非ヒト V S I G 8 オルソログの同一領域に結合するポリペプチド、または、V S I G 8 ポリペプチドのいずれかの別の部分を含有しないこれらのコンジュゲートからなる、第 1 5 1 ~ 1 5 4 項のいずれかに記載の方法。

40

【 0 6 9 8 】

第 1 5 6 項。ステップ(i i i)は、前記抗 V S I G 8 抗体または抗原結合断片が、免疫における V S I G 8 及び/または V I S T A の少なくとも 1 つの効果を拮抗するかどうかを検出する、第 1 5 1 ~ 1 5 5 項のいずれかに記載の方法。

【 0 6 9 9 】

第 1 5 7 項。ステップ(i i i)は、前記抗 V S I G 8 抗体または抗原結合断片が、免疫における V S I G 8 及び/または V I S T A の少なくとも 1 つの効果を刺激するかどうか

50

かを検出する、第151～156項のいずれかに記載の方法。

【0700】

第158項。前記選択した抗体またはV S I G 8融合タンパク質は、以下の効果のうち少なくとも1つを仲立ちし、前記抗V S I G 8抗体または抗原結合断片が、(i)～(x x v i i i)のうち1つ以上の逆の効果を誘発し得ることを条件とする、第151～157項に記載の項のいずれかに記載の方法：(i)免疫応答の増加、(i i) T細胞の活性化の増加、(i i i)細胞傷害性T細胞活性の増加、(i v)NK細胞活性の増加、(v) T細胞抑制の緩和、(v i)炎症性サイトカイン分泌の増加、(v i i) I L - 2分泌の増加、(v i i i)インターフェロン 産生の増加、(i x) T h 1 応答の増加、(x) T h 2 応答の低下、(x i)細胞数、及び/もしくは制御性T細胞(T r e g)、骨髓由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2発現単球の少なくとも1つの活性の低下もしくは除去、(x i i)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髓由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2発現単球の1つ以上の活性の低下、(x i i i) M 2マクロファージの減少もしくは除去、(x i v) M 2マクロファージ腫瘍形成活性の低下、(x v) N 2好中球の減少もしくは除去、(x v i) N 2好中球の腫瘍形成活性の低下、(x v i i) T細胞の活性化阻害の低下、(x v i i i) C T L活性化阻害の低下、(x i x) NK細胞活性化阻害の低下、(x x) T細胞疲弊の逆転、(x x i) T細胞応答の増加、(x x i i)細胞毒性細胞の活性の増加、(x x i i i)抗原特異的メモリー応答の刺激、(x x i v)癌細胞のアポトーシスもしくは溶解の誘発、(x x v)癌細胞における細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の刺激、(x x v i)癌細胞の直接殺傷の誘発、(x x v i i) T h 1 7活性の増加、並びに/または(x x v i i i)補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の誘発。

10

20

【0701】

第159項。前記選択した抗体またはV S I G 8融合タンパク質は、以下の効果のうちの1つ以上を仲立ちすることが示され、前記抗V S I G 8抗体または抗原結合断片が、(i)～(x x v i i i)のうち1つ以上の逆の効果を誘発し得ることを条件とする、上に記載の項のいずれかに記載の方法：(i)免疫応答の低下、(i i) T細胞の活性化の低下、(i i i)細胞傷害性T細胞活性の低下、(i v)ナチュラルキラー(NK)細胞活性の低下、(v) T細胞活性の低下、(v i)炎症性サイトカイン分泌の低下、(v i i) I L - 2分泌の低下、(v i i i)インターフェロン 産生の減少、(i x) T h 1 応答の低下、(x) T h 2 応答の低下、(x i)細胞数及び/もしくは制御性T細胞の活性の増加、(x i i)制御性細胞活性、及び/もしくは、骨髓由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2発現単球の1つ以上の増加、(x i i i)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髓由来免疫抑制細胞(M D S C)、i M C、間葉ストローマ細胞、T I E 2発現単球の1つ以上の活性の増加、(x i v) M 2マクロファージ活性の増加、(x v) N 2好中球の増加、(x v i) N 2好中球活性の増加、(x v i i) T細胞の活性化阻害の増加、(x v i i i) C T L活性化阻害の増加、(x i x) NK細胞活性化阻害の増加、(x x) T細胞疲弊の増加、(x x i) T細胞応答の低下、(x x i i)細胞毒性細胞の活性の低下、(x x i i i)抗原特異的メモリー応答の低下、(x x i v)細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(x x v)細胞への細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の低下、(x x v i)細胞の直接殺傷の減少、(x x v i i) T h 1 7活性の低下、並びに/または(x x v i i i)補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の低下。

30

40

【0702】

第160項。前記選択した抗体またはV S I G 8融合タンパク質は、T細胞活性、NK細胞活性に対するV S I G 8及び/もしくはV I S T Aの効果、並びに/または1つ以上の炎症性サイトカインの産生を刺激する、またはそれに拮抗する、第149～159項のいずれかに記載の方法。

【0703】

第161項。前記選択した抗体またはV S I G 8融合タンパク質は、ヒトまたは齧歯類

50

V S I G 8 の、V I S T A への結合と競合することが示される、第 1 4 9 ~ 1 6 0 項のいずれかに記載の方法。

【 0 7 0 4 】

第 1 6 2 項。上に記載の項のいずれか一項に記載の免疫調節抗体もしくは抗原結合断片もしくは V S I G 8 融合タンパク質、またはこれらを含む医薬もしくは診断用組成物。

【 0 7 0 5 】

第 1 6 3 項。癌、感染症、敗血症、自己免疫、炎症、アレルギーもしくは他の免疫状態を治療もしくは診断するため、または、細胞もしくは遺伝子治療、もしくは移植した細胞、組織もしくは臓器に対する望ましくない免疫反応を抑制するための、上に記載の項のいずれか一項に記載の免疫調節抗体もしくは抗原結合断片もしくは V S I G 8 融合タンパク質、または、それらを含む医薬もしくは診断用組成物の使用。

10

【 0 7 0 6 】

第 1 6 4 項。細胞、組織または臓器の、レシピエントへの移植を含む移植治療法であって、前記細胞、組織または臓器は、前記細胞、組織または臓器を前記レシピエントに注入または移植する前に、上に記載の項のいずれか一項に記載の抗 V S I G 8 抗体もしくは抗原結合断片もしくは V S I G 8 融合タンパク質、または組成物を含む組成物を使用して *ex vivo* で治療される、前記移植治療法。

【 0 7 0 7 】

第 1 6 5 項。前記組成物は、ドナー及び/または移植レシピエントの免疫細胞を含む、第 1 6 4 項に記載の方法。

20

【 0 7 0 8 】

第 1 6 6 項。前記移植した細胞、組織または臓器は、骨髄、他のリンパ系細胞もしくは組織、または幹細胞を含む、第 1 6 4 または 1 6 5 項に記載の方法。

【 0 7 0 9 】

第 1 6 7 項。上に記載の項のいずれか一項に記載の抗 V S I G 8 抗体または抗体断片の可変重鎖及び/もしくは軽鎖領域ポリペプチドをコードする核酸、または、これを含むベクターもしくはウイルス。

【 0 7 1 0 】

第 1 6 8 項。第 1 6 7 項に記載の少なくとも 1 つの核酸またはベクターもしくはウイルスを含む、単離または組み換え細胞。

30

【 0 7 1 1 】

第 1 6 9 項。ハイブリドーマ及び組み換え細菌、酵母菌または真菌、哺乳類、昆虫、両生類、爬虫類、植物、及びトリ細胞または卵から選択される、第 1 6 8 項に記載の細胞。

【 0 7 1 2 】

第 1 7 0 項。第 1 6 9 項に記載の単離または組み換え細胞を培養することによる、抗 V S I G 8 抗体または抗体断片の作製方法。

【 0 7 1 3 】

第 1 7 1 項。前記細胞は、細菌、酵母菌、真菌、昆虫、植物、爬虫類、哺乳動物細胞またはトリの卵である、第 1 7 0 項に記載の方法。

40

【 0 7 1 4 】

第 1 7 2 項。V I S T A と V S I G 8 の相互作用を阻害するための、上に記載の項のいずれか一項に記載のアンタゴニスト化合物の、*in vitro* または *in vivo* での使用方法。

【 0 7 1 5 】

第 1 7 3 項。免疫細胞または免疫における V I S T A 及び/または V S I G 8 の抑制効果を阻害するための、上に記載の項のいずれか一項に記載のアンタゴニスト化合物の、*in vitro* または *in vivo* での使用方法。

【 0 7 1 6 】

第 1 7 4 項。T 細胞の活性化、T 細胞増殖もしくはサイトカイン産生における、または

50

骨髄樹状細胞における V I S T A 及び / または V S I G 8 の抑制効果を阻害または遮断する、第 1 7 2 または 1 7 3 項に記載の方法。

【 0 7 1 7 】

第 1 7 5 項。T 抑制 (T s u p) 細胞における V I S T A の促進効果を阻害または遮断する、第 1 7 2 または 1 7 3 項に記載の方法。

【 0 7 1 8 】

第 1 7 6 項。癌または感染症を治療するために使用される、第 1 7 2 ~ 1 7 5 項のいずれかに記載の方法。

【 0 7 1 9 】

第 1 7 7 項。前記癌は充実性腫瘍、例えば肉腫、癌腫もしくはリンパ腫、または血液癌である、第 1 7 6 項に記載の方法。

10

【 0 7 2 0 】

第 1 7 8 項。前記感染症はウイルス、細菌、原生動物、酵母菌、真菌、または寄生虫症である、第 1 7 6 項に記載の方法。

【 0 7 2 1 】

第 1 7 9 項。V I S T A と V S I G 8 の相互作用を増強するための、上に記載の項のいずれか一項に記載のアゴニスト化合物の使用法。

【 0 7 2 2 】

第 1 8 0 項。T 細胞の活性化、増殖またはサイトカイン産生における V I S T A の抑制効果を増強または促進する、第 1 7 9 項に記載の方法。

20

【 0 7 2 3 】

第 1 8 1 項。自己免疫性、アレルギー性または炎症性状態を治療するために使用される、第 1 7 8 または 1 7 9 項に記載の方法。

【 0 7 2 4 】

第 1 8 2 項。検出可能な標識に結合した、上に記載の項のいずれか一項に記載の化合物。

【 0 7 2 5 】

第 1 8 3 項。上に記載の項のいずれか一項に記載の、診断上または治療的有効量の化合物を含む診断用または治療用組成物。

【 0 7 2 6 】

第 1 8 4 項。ヒトの治療法での使用に好適な、第 1 8 3 項に記載の組成物。

30

【 0 7 2 7 】

第 1 8 5 項。静脈内、皮下または筋肉内投与可能な組成物である、第 1 8 4 項に記載の組成物。

【 0 7 2 8 】

第 1 8 6 項。P D - 1 または P D - L 1 アゴニストまたはアンタゴニストの投与を更に含む、上に記載の項のいずれか一項に記載の方法。

【 0 7 2 9 】

第 1 8 7 項。前記 P D - 1 または P D - L 1 アゴニストまたはアンタゴニストは、抗 P D - 1 抗体もしくは抗体断片、抗 P D - L 1 抗体もしくは抗体断片、一価もしくは多量体であり得る P D - L 1 ポリペプチドもしくはその断片、一価もしくは多量体であり得る P D - 1 ポリペプチドもしくはその断片、または、前述のいずれかを含む複合体もしくは融合タンパク質から選択される、第 1 8 6 項に記載の方法。

40

【 0 7 3 0 】

第 1 8 8 項。免疫細胞を、上に記載の項のいずれか一項に記載のアゴニストまたはアンタゴニスト化合物と接触させる方法。

【 0 7 3 1 】

第 1 8 9 項。前記接触した細胞をヒト対象に注入する、第 1 8 8 項に記載の方法。

【 0 7 3 2 】

第 1 9 0 項。前記対象は癌または感染症を有する、第 1 8 8 または 1 8 9 項に記載の方

50

法。

【0733】

第191項。前記対象は、炎症性、アレルギー性または自己免疫性状態を有する、第188または189項に記載の方法。

【0734】

第192項。V S I G 8を単独、またはV S I G 8と共に使用してV S I G 8 / V I S T A アゴニストまたはアンタゴニストを同定することを含むスクリーニングアッセイ。

【0735】

第193項。V S I G 8と結合し、V S I G 8 / V I S T A 相互作用を阻害する化合物を同定する結合アッセイである、第192項に記載のアッセイ。

10

【0736】

第194項。V S I G 8と結合し、V S I G 8 / V I S T A 相互作用を増強する化合物を同定する結合アッセイである、第192項に記載のアッセイ。

【0737】

第195項。T細胞免疫またはサイトカイン産生におけるV I S T A / V S I G 8 相互作用の効果を阻害する化合物をスクリーニングする機能アッセイである、第192項に記載のアッセイ。

【0738】

第196項。T細胞免疫またはサイトカイン産生におけるV I S T A / V S I G 8 相互作用の効果を増強する化合物をスクリーニングする機能アッセイである、第192～195項のアッセイ。

20

【0739】

第197項。ヒトまたは齧歯類免疫細胞を使用する、第192～196項のいずれか一項に記載のアッセイ。

【0740】

第198項。ヒトV I S T A 及び/またはヒトV S I G 8を発現するトランスジェニック動物を使用する、第192～196項のいずれか一項に記載のアッセイ。

【0741】

第199項。ハイスループットスクリーニングアッセイである、第192～198項のアッセイ。

30

【0742】

第200項。前記V S I G 8はヒト、マウス、または非ヒト霊長類V S I G 8タンパク質である、上に記載の項のいずれかに記載の化合物または方法。

【0743】

第201項。V S I G 8 E C Dの断片を含む単離ペプチドであって、前記断片は、配列番号1、2もしくは3のいずれか1つに記載されているアミノ酸配列、またはそのアミノ酸配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、もしくは99%の配列同一性を有する変異体から本質的になるかこれからなる、前記単離ペプチド。

【0744】

第202項。2～10個の前記V S I G 8 E C Dポリペプチド断片を含む、第201項に記載の単離したポリペプチド。

40

【0745】

第203項。前記断片は異種リンカーにより介在され、前記リンカーはV S I G 8ポリペプチドの断片ではない、第201または202項に記載の単離したポリペプチド。

【0746】

第204項。前記リンカーは前記断片に直接または間接的にコンジュゲートしている、第203項に記載の単離したペプチド。

【0747】

第205項。前記リンカーはアミノ酸スペーサーである、第202、203または204項に記載の単離したポリペプチド。

50

【0748】

第206項。前記アミノ酸スペーサーは、異なる断片が個々の標的に上手く結合することができるように十分な長さのアミノ酸残基である、第205項に記載の単離したペプチド。

【0749】

第207項。前記リンカーは、5～50個のアミノ酸残基、より好ましくは5～25個のアミノ酸残基を含むペプチドである、第205または206項に記載の単離したポリペプチド。

【0750】

第208項。前記リンカーは、5～15個のアミノ酸残基を含むペプチドである、第207項に記載の単離したペプチド。

10

【0751】

第209項。前記リンカーは、グリシン、セリン及び/もしくはアラニン残基を含むかもしくは基本的にこれらから構成される、または、グリシン、セリン及び/もしくはアラニン残基から主に(少なくとも残基の50、60、70または80%)構成される、第205～208項のいずれかに記載の単離したポリペプチド。

【0752】

第210項。前記リンカーは、少なくとも4～40、4～30、4～20、または4～12個のグリシン、セリン及び/またはアラニン残基を含む、第205～209のいずれかに記載の単離したペプチド。

20

【0753】

第211項。異種ポリペプチド及び/もしくは半減期延長部位に結合した、第1～210項のいずれに記載の、または、配列番号1、2もしくは3の単離したポリペプチドを含み、前記異種ポリペプチドまたは前記半減期延長部位がV S I G 8ポリペプチドの断片でないことを条件とする、融合タンパク質。

【0754】

第212項。前記単離したポリペプチド及び前記異種分子は異種リンカーにより介在され、前記リンカーは、V S I G 8ポリペプチドの断片であるポリペプチドを含まないことを条件とする、第211項に記載の融合タンパク質。

【0755】

第213項。前記リンカーは前記断片に直接または間接的にコンジュゲートしている、第212項に記載の融合タンパク質。

30

【0756】

第214項。前記リンカーはアミノ酸スペーサーである、第212項または213項に記載の融合タンパク質。

【0757】

第215項。前記アミノ酸スペーサーは、異なる断片が個々の標的に上手く結合することができるように十分な長さのアミノ酸残基である、第214項に記載の融合タンパク質。

【0758】

第216項。前記リンカーは、5～50個のアミノ酸残基、より好ましくは5～25個のアミノ酸残基を含むペプチドである、第214項または215項に記載の融合タンパク質。

40

【0759】

第217項。前記リンカーは、5～15個のアミノ酸残基を含むペプチドである、第216項に記載の融合タンパク質。

【0760】

第218項。前記リンカーは、グリシン、セリン及び/もしくはアラニン残基を含むかもしくは基本的にこれらから構成される、または、グリシン、セリン及び/もしくはアラニン残基から主に(少なくとも残基の50、60、70または80%)構成される、第2

50

14～217項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0761】

第219項。前記リンカーは、少なくとも4～40、4～30、4～20、または4～12個のグリシン、セリン及び/またはアラニン残基を含む、第214～218項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0762】

第220項。半減期延長部位を含むか更に含む、上の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0763】

第221項。前記半減期延長部位は、ポリエチレングリコール(PEG)、モノメトキシPEG(mPEG)、XTEN分子、rPEG分子、アドネクチン、血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、免疫グロブリン定常領域もしくはその断片、またはアシル基を含む、第214～220項のいずれかに記載の融合タンパク質。

10

【0764】

第222項。前記異種ポリペプチド、半減期延長部位、または他の異種分子を加えることにより、かかる前記異種ポリペプチド、半減期延長部位、または他の異種分子を有しない同一の分子と比較して、前記融合タンパク質の*in vivo*半減期が少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、またはそれ以上増加する、第214～221項のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

20

【0765】

第223項。免疫グロブリン分子またはその断片を含む、第1～222項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0766】

第224項。前記異種ポリペプチドの少なくとも1つは、重鎖及び/または軽鎖C_m及びC_mドメインを含む、ヒトまたは非ヒト免疫グロブリンFcポリペプチドまたは断片である、第214項に記載の融合タンパク質。

【0767】

第225項。前記異種ポリペプチドの少なくとも1つは、重鎖C_m及びC_mドメインを含む、ヒトまたは非ヒト免疫グロブリンFcポリペプチドまたは断片である、第214項または215項に記載の融合タンパク質。

30

【0768】

第226項。重鎖及び/または軽鎖CH₁ドメインを含む、第214～216項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0769】

第227項。重鎖及び/または軽鎖CH₁ドメインを欠いている、第214～216項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0770】

第228項。重鎖CH₁ドメインを欠いている、第214～218項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0771】

第229項。前記免疫グロブリン分子またはその断片はヒンジ領域を含む、上の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

40

【0772】

第230項。前記ヒンジ領域はインタクトなヒンジ領域である、第229項に記載の融合タンパク質。

【0773】

第231項。前記免疫グロブリン分子またはその断片は、ヒンジ領域を特徴としない、上の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0774】

第232項。ヒト免疫グロブリン分子またはその断片を含む、上に記載の項のいずれか

50

に記載の融合タンパク質。

【0775】

第233項。前記異種ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖定常領域のFc断片を含むかまたはそれからなる、上に記載の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0776】

第234項。前記異種ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域のFc断片及びヒンジ領域を含むかまたはそれらからなる、上に記載の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0777】

第235項。IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgE、IgA及びIgDからなる群から選択される免疫グロブリンアイソタイプに由来する免疫グロブリン重鎖定常領域を含む、上に記載の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

10

【0778】

第236項。ヒトIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4からなる群から選択されるヒト免疫グロブリン重鎖定常領域を含む、上に記載の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0779】

第237項。マウスIgG1、IgG2aまたはIgG2b免疫グロブリン重鎖定常領域、またはこれらの断片を含む、上に記載の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0780】

第238項。エフェクター機能及び/またはグリコシル化を変更する少なくとも1つの変異を含有する免疫グロブリンFc領域を含む、上に記載の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

20

【0781】

第239項。前記エフェクター機能は、FcR結合、補体結合、ADCC活性、CDC活性、脱顆粒、ファゴサイトーシス、及び/またはサイトカイン放出から選択される、第238項に記載の融合タンパク質。

【0782】

第240項。前記異種配列が、標的細胞に特異的に結合するか、または標的細胞に特異的に結合する別の部位を含む免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む、上の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

30

【0783】

第241項。前記標的細胞は、癌、免疫、病原菌細胞、感染細胞、免疫細胞、炎症細胞、病気の部位またはヒトレシピエントに移植される細胞である、第41項に記載の融合タンパク質。

【0784】

第242項。前記病原菌細胞は、ウイルス、バクテリア、マイコプラズマ(mycoplasma)、真菌、酵母菌または寄生生物からなる群から選択される、第241項に記載の融合タンパク質。

【0785】

第243項。前記感染細胞は、ウイルス、バクテリア、マイコプラズマ(mycoplasma)、真菌、酵母菌または寄生生物からなる群から選択される病原菌に感染している、第240項または241項に記載の融合タンパク質。

40

【0786】

第244項。前記異種ポリペプチドの少なくとも1つは、受容体、ホルモン、サイトカイン、抗原、B細胞標的、NK細胞標的、T細胞標的、TNF受容体スーパーファミリーメンバー、ヘッジホッグファミリーメンバー、受容体型チロシンキナーゼ、プロテオグリカン関連分子、TGF-スーパーファミリーメンバー、Wnt関連分子、受容体リガンド、樹状細胞標的、骨髄細胞標的、単核細胞/マクロファージ細胞標的、または血管新生標的である、上の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

50

【0787】

第245項。前記抗原は腫瘍抗原、自己抗原、アレルゲン、または病原菌抗原である、第244項に記載の融合タンパク質。

【0788】

第246項。前記少なくとも1つの異種ポリペプチドは免疫調節ポリペプチドを含む、上の項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0789】

第247項。前記T細胞標的は、2B4 / SLAMF4、IL-2 Ra、4-1BB / TNFRSF9、IL-2R、ALCAM、B7-1 / CD80、IL-4R、B7-H3、BLAME / SLAMF8、BTLA、IL-6R、CCR3、IL-7 Ra、CCR4、CXCR1 / IL-8 RA、CCR5、CCR6、IL-10 R、CCR7、IL-10 R、CCR8、IL-12 Ri、CCR9、IL-12 R2、CD2、IL-13 Ra1、IL-13、CD3、CD4、ILT2 / CD85j、ILT3 / CD85k、ILT4 / CD85d、ILT5 / CD85a、インテグリン a4 / CD49d、CD5、インテグリン aE / CD103、CD6、インテグリン aM / CD11b、CD8、インテグリン aX / CD11c、インテグリン2 / CD18、KIR / CD158、CD27 / TNFRSF7、KIR2DL1、CD28、KIR2DL3、CD30 / TNFRSF8、KIR2DL4 / CD158d、CD31 / PECAM-1、KIR2DS4、CD40リガンド / TNFSF5、LAG-3、CD43、LAIR1、CD45、LAIR2、CD83、ロイコトリエンB4 R1、CD84 / SLAMF5、NCAM-L1、CD94、NKG2A、CD97、NKG2C、CD229 / SLAMF3、NKG2D、CD2F-10 / SLAMF9、NT-4、CD69、NTB-A / SLAMF6、共通鎖 / IL-2 Ry、オステオポンチン、CRACC / SLAMF7、PD-1、CRTAM、PSGL-1、CTLA-4、RANK / TNFRSF11A、CX3CR1、CX3CL1、L-セレクチン、CXCR3、SIRP i、CXCR4、SLAM、CXCR6、TCCRAVSX-1、DNAM-1、チモポエチン、EMMPRIN / CD147、TIM-1、EphB6、TIM-2、Fas / TNFRSF6、TIM-3、Fas Ligand / TNFSF6、TIM-4、FeyRIII / CD16、TIM-6、GITR / TNFRSF18、TNFR1 / TNFRSF1A、グラニュライシン、TNFR11 / TNFRSF1B、HVE M / TNFRSF14、TRAIL R1 / TNFRSF10A、ICAM-1 / CD54、TRAIL R2 / TNFRSF10B、ICAM-2 / CD102、TRAIL R3 / TNFRSF10C、IFN-R1、TRAIL R4 / TNFRSF10D、IFN-R2、TSLP、IL-1 RI及びTSLP Rからなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

10

20

30

【0790】

第248項。前記単核細胞 / マクロファージ細胞標的は、B7-1 / CD80、ILT4 / CD85d、B7-H1、ILT5 / CD85a、共通鎖、インテグリン a4 / CD49d、BLAME / SLAMF8、インテグリン aX / CD11c、CCL6 / CD10、インテグリン2 / CD18、CD155 / PVR、インテグリン3 / CD61、CD31 / PECAM-1、ラテクシン、CD36 / SR-B3、ロイコトリエンB4 R1、CD40 / TNFRSF5、LIMPII / SR-B2、CD43、LMIR1 / CD300A、CD45、LMIR2 / CD300c、CD68、LMIR3 / CD300LF、CD84 / SLAMF5、LMIR5 / CD300LB、CD97、LMIR6 / CD300LE、CD163、LRP-1、CD2F-10 / SLAMF9、MARCO、CRACC / SLAMF7、MD-1、ECF-L、MD-2、EMMPRIN / CD147、MGL2、エンドグリン / CD105、オステオアクチピン / GPNMB、FcR1 / CD64、オステオポンチン、FcRIIB / CD32b、PD-L2、FcRIIC / CD32c、Siglec-3 / CD33、FeyRIIA / CD32a、SIGNR1 / CD209、FeyRIII / CD16、SLAM、GM-CSF

40

50

Ra、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TLR3、IFN-R1、TLR4、IFN-R2、TREM-1、IL-1RII、TREM-2、ILT2/CD85j、TREM-3、ILT3/CD85k、TREM1/TLT-1、2B4/SLAMF4、IL-10Ra、ALCAM、IL-10R、アミノペプチダーゼN/ANPEP、ILT2/CD85j、共通鎖、ILT3/CD85k、ClqR1/CD93、ILT4/CD85d、CCR1、ILT5/CD85a、CCR2、インテグリン α 4/CD49d、CCR5、インテグリン α M/CD11b、CCR8、インテグリン α X/CD11c、CD155/PVR、インテグリン β 2/CD18、CD14、インテグリン β 3/CD61、CD36/SR-B3、LAIR1、CD43、LAIR2、CD45、ロイコトリエンB4R1、CD68、LIMPII/SR-B2、CD84/SLAMF5、LMIR1/CD300A、CD97、LMIR2/CD300c、CD163、LMIR3/CD300LF、凝固第III因子/組織因子、LMIR5/CD300LB、CX3CR1、CX3CL1、LMIR6/CD300LE、CXCR4、LRP-1、CXCR6、M-CSFR、DEP-1/CD148、MD-1、DNAM-1、MD-2、EMMPRIN/CD147、MMR、エンドグリン/CD105、NCAM-L1、FcR1/CD64、PSGL-1、FcRIII/CD16、RP105、G-CSFR、L-セレクチン、GM-CSFRa、Siglec-3/CD33、HVEM/TNFRSF14、SLAM、ICAM-1/CD54、TCCR/WSX-1、ICAM-2/CD102、TREM-1、IL-6R、TREM-2、CXCR1/IL-8RA、TREM-3及びTREM1/TLT-1からなる群から選択される、第244~246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0791】

第249項。前記樹状細胞標的は、CD36/SR-B3、LOX-1/SR-E1、CD68、MARCO、CD163、SR-AI/MSR、CD5L、SREC-I、CL-P1/COLEC12、SREC-II、LIMPII/SR-B2、RP105、TLR4、TLR1、TLR5、TLR2、TLR6、TLR3、TLR9、4-1BBリガンド/TNFSF9、IL-12/IL-23p40、4-アミノ-1,8-ナフタルイミド、ILT2/CD85j、CCL21/6Ckine、ILT3/CD85k、8-オキソ-dG、ILT4/CD85d、8D6A、ILT5/CD85a、A2B5、インテグリン α 4/CD49d、Aag、インテグリン β 2/CD18、AMICA、ランゲリン、B7-2/CD86、ロイコトリエンB4R1、B7-H3、LMIR1/CD300A、BLAME/SLAMF8、LMIR2/CD300c、ClqR1/CD93、LMIR3/CD300LF、CCR6、LMIR5/CD300LB、CCR7、LMIR6/CD300LE、CD40/TNFRSF5、MAG/Siglec-4a、CD43、MCAM、CD45、MD-1、CD68、MD-2、CD83、MDL-1/CLEC5A、CD84/SLAMF5、MMR、CD97、NCAM-L1、CD2F-10/SLAMF9、オステオアクチビン/GPNMB、Chem23、PD-L2、CLEC-1、RP105、CLEC-2、Siglec-2/CD22、CRACC/SLAMF7、Siglec-3/CD33、DC-SIGN、Siglec-5、DC-SIGNR/CD299、Siglec-6、DCAR、Siglec-7、DCIR/CLEC4A、Siglec-9、DEC-205、Siglec-10、Dectin-1/CLEC7A、Siglec-F、Dectin-2/CLEC6A、SIGNR1/CD209、DEP-1/CD148、SIGNR4、DLEC、SLAM、EMMPRIN/CD147、TCCRAVSX-1、FcR1/CD64、TLR3、FcRIIB/CD32b、TREM-1、FcRIIC/CD32c、TREM-2、FcRIIA/CD32a、TREM-3、FcRIII/CD16、TREM1/TLT-1、ICAM-2/CD102及びバニロイドR1からなる群から選択される、第244~246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【0792】

第250項。前記TNF受容体スーパーファミリーメンバーは、4-1BB/TNFRSF9、NGFR/TNFRSF16、BAFFR/TNFRSF13C、オステオプロテゲリン/TNFRSF11B、BCMA/TNFRSF17、OX40/TNFRSF4、CD27/TNFRSF7、RANK/TNFRSF11A、CD30/TNFRSF8RELT/TNFRSF19L、CD40/TNFRSF5、TACI/TNFRSF13B、DcR3/TNFRSF6B、TNFRI/TNFRSF1A、DcTRAILR1/TNFRSF23、TNFRII/TNFRSF1B、DcTRAILR2/TNFRSF22、TRAILR1/TNFRSF10A、DR3/TNFRSF25、TRAILR2/TNFRSF10B、DR6/TNFRSF21、TRAILR3/TNFRSF10C、EDAR、TRAILR4/TNFRSF10D、Fas/TNFRSF6、TROY/TNFRSF19、GITR/TNFRSF18、TWEAKR/TNFRSF12、HVEM/TNFRSF14、XEDAR、リンフォトキシンR/TNFRSF3、4-1BBリガンド/TNFSF9、リンフォトキシン、APRIL/TNFSF13、リンフォトキシン/TNFSF3、BAFF/TNFSF13C、OX40リガンド/TNFSF4、CD27リガンド/TNFSF7、TL1A/TNFSF15、CD30リガンド/TNFSF8、TNF-a/TNFSF1A、CD40リガンド/TNFSF5、TNF-/TNFSF1B、EDA-A2、TRAIL/TNFSF10、Fasリガンド/TNFSF6、TRANCE/TNFSF11、GITRリガンド/TNFSF18、TWEAK/TNFSF12及びLIGHT/TNFSF14からなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0793】

第251項。前記ヘッジホッグファミリーメンバーは、パッチド及びスーズンドからなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0794】

第252項。前記受容体型チロシンキナーゼは、Ax1、FGFR4、ClqR1/CD93、FGFR5、DDR1、Flt-3、DDR2、HGF R、Dtk、IGF-IR、EGFR、IGF-II R、Eph、INSRR、EphA1、インスリンR/CD220、EphA2、M-CSFR、EphA3、Mer、EphA4、MSPR/Ron、EphA5、MUSK、EphA6、PDGFRa、EphA7、PDGFR、EphA8、Ret、EphB1、ROR1、EphB2、ROR2、EphB3、SCFR/c-kit、EphB4、Tie-1、EphB6、Tie-2、ErbB2、TrkA、ErbB3、TrkB、ErbB4、TrkC、FGFR1、VEGFR1/Flt-1、FGFR2、VEGFR2/Flk-1、FGFR3、及びVEGFR3/Flt-4からなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0795】

第253項。前記トランスフォーミング増殖因子(TGF)スーパーファミリーメンバーは、アクチビンRIA/ALK-2、GFRa-1、アクチビンRIB/ALK-4、GFRa2、アクチビンRHA、GFRa-3、アクチビンRUB、GFRa-4、ALK-1、MISRII、ALK-7、Ret、BMPRI-IA/ALK-3、TGF-betaRI/ALK-5、BMPRI-B/ALK-6、TGF-RII、BMPRII、TGF-RIIb、エンドグリン/CD105及びTGF-RIIIからなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0796】

第254項。前記Wnt関連分子は、Frizzled-1、Frizzled-8、Frizzled-2、Frizzled-9、Frizzled-3、sFRP-1、Frizzled-4、sFRP-2、Frizzled-5、sFRP-3、Friz

zled - 6、sFRP - 4、Frizzled - 7、MFRP、LRP5、LRP6、Wnt - 1、Wnt - 8a、Wnt - 3a、Wnt - 1Ob、Wnt - 4、Wnt - 11、Wnt - 5a、Wnt - 9a及びWnt - 7aからなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0797】

第255項。前記受容体リガンドは、4 - 1BBリガンド/TNFSF9、リンフォトキシン、APRIL/TNFSF13、リンフォトキシン/TNFSF3、BAFF/TNFSF13C、OX40リガンド/TNFSF4、CD27リガンド/TNFSF7、TL1A/TNFSF15、CD30リガンド/TNFSF8、TNF - a/TNFSF1A、CD40リガンド/TNFSF5、TNF^α/TNFSF1B、EDA - A2、TRAIL/TNFSF10、Fasリガンド/TNFSF6、TRANCE/TNFSF11、GITRリガンド/TNFSF18、TWEAK/TNFSF12、LIGHT/TNFSF14、アンフィレグリン、NRG1アイソフォームGGF2、ベータセルリン、NRG1アイソフォームSMDF、EGF、NRG1 - a/HRG1 - a、Epigen、NRG1 - 1/HRG1 - 1、エビジェン、TGF - α 、HB - EGF、TMEFF1/トモレグリン - 1、ニューレグリン - 3、TMEFF2、IGF - I、IGF - II、インスリン、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、アクチビンC、BMP - 2、BMP - 7、BMP - 3、BMP - 8、BMP - 3b/GDF - 10、BMP - 9、BMP - 4、BMP - 15、BMP - 5、デカペンタプレジック、BMP - 6、GDF - 1、GDF - 8、GDF - 3、GDF - 9、GDF - 5、GDF - 11、GDF - 6、GDF - 15、GDF - 7、アルテミン、ニュールツリン、GDNF、パーセフィン、TGF - β 1、TGF - β 2、TGF - β 3、LAP(TGF - β 1)、TGF - β 5、Latent TGF - β 1、Latent TGF - β 1.2、Lefty、Nodal、MIS/AMH、酸性FGF、FGF - 12、塩基性FGF、FGF - 13、FGF - 3、FGF - 16、FGF - 4、FGF - 17、FGF - 5、FGF - 19、FGF - 6、FGF - 20、FGF - 8、FGF - 21、FGF - 9、FGF - 23、FGF - 10、KGF/FGF - 7、FGF - 11、ニューロピリン - 1、PIGF、ニューロピリン - 2、PIGF - 2、PDGF、PDGF - A、VEGF、PDGF - B、VEGF - B、PDGF - C、VEGF - C、PDGF - D、VEGF - D及びPDGF - ABからなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

10

20

30

【0798】

第256項。前記腫瘍抗原は、扁平上皮細胞癌抗原1(SCCA - 1)、(PROTEIN T4 - A)、扁平上皮細胞癌抗原2(SCCA - 2)、卵巣癌腫抗原CA125(1A1 - 3B; KIAA0049)、ムチン1(腫瘍関連ムチン; 癌腫関連ムチン; 多型上皮ムチン; PEM; PEMT; EPISIALIN; 腫瘍関連上皮膜抗原; EMA; H23AG; 落花生反応性泌尿器ムチン; PUM; 及び乳癌関連抗原DF3)、CTCL腫瘍抗原se1 - 1、CTCL腫瘍抗原se14 - 3、CTCL腫瘍抗原se20 - 4、CTCL腫瘍抗原se20 - 9、CTCL腫瘍抗原se33 - 1、CTCL腫瘍抗原se37 - 2、CTCL腫瘍抗原se57 - 1、CTCL腫瘍抗原se89 - 1、前立腺特異的膜抗原、5T4癌胎児性栄養膜糖タンパク質、Orf73カボジ肉腫関連ヘルペスウイルス、MAGE - C1(癌/精巣抗原CT7)、MAGE - B1抗原(MAGE - XP抗原; DAM10)、MAGE - B2抗原(DAM6)、MAGE - 2抗原、MAGE - 4a抗原、MAGE - 4b抗原、大腸癌抗原NY - CO - 45、肺癌抗原NY - LU - 12変異体A、癌関連表面抗原、腺癌抗原ART1、腫瘍随伴性脳・精巣癌抗原(腫瘍神経細胞(onconeural)抗原MA2; 腫瘍随伴性神経細胞抗原)、神経腫瘍学的腹部抗原2(NOVA2)、肝細胞癌抗原遺伝子520、腫瘍関連抗原CO - 029、腫瘍関連抗原MAGE - X2、滑膜肉腫、Xブレークポイント2、T細胞により認識される扁平上皮細胞癌抗原、血清学的規定大腸癌抗原1、血清学的規定乳癌抗原NY - BR - 15、血清学的規定乳癌抗原NY - BR - 16、クロモグラニンA、副甲状腺分泌タンパク質

40

50

1、DUPAN - 2、CA 19 - 9、CA 72 - 4、CA 195並びにL6からなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0799】

第257項。前記B細胞標的は、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD38、CD39、CD40、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CD78、CD79a/b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD89、CD98、CD126、CD127、CDw130、CD138及びCDw150からなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0800】

第258項。前記血管新生標的は、アンジオポエチン - 1、アンジオポエチン様2、アンジオポエチン - 2、アンジオポエチン様3、アンジオポエチン - 3、アンジオポエチン様7/CDT6、アンジオポエチン - 4、Tie - 1、アンジオポエチン様1、Tie - 2、アンジオジェニン、iNOS、凝固第III因子/組織因子、nNOS、CTGF/CCN2、NOV/CCN3、DANCE、OSM、EDG - 1、Plfr、EG - VEGF/PK1、プロリフェリン、トロンボスポンジン、ROB04、エリスロポエチン、トロンボスポンジン - 1、キニノスタチン、トロンボスポンジン - 2、MFG - E8、トロンボスポンジン - 4、一酸化窒素、VG5Q、eNOS、EphA1、EphA5、EphA2、EphA6、EphA3、EphA7、EphA4、EphA8、EphB1、EphB4、EphB2、EphB6、EphB3、エフリン - A1、エフリン - A4、エフリン - A2、エフリン - A5、エフリン - A3、エフリン - B1、エフリン - B3、エフリン - B2、酸性FGF、FGF - 12、塩基性FGF、FGF - 13、FGF - 3、FGF - 16、FGF - 4、FGF - 17、FGF - 5、FGF - 19、FGF - 6、FGF - 20、FGF - 8、FGF - 21、FGF - 9、FGF - 23、FGF - 10、KGF/FGF - 7、FGF - 11、FGF R1、FGF R4、FGF R2、FGF R5、FGF R3、ニューロピリン - 1、ニューロピリン - 2、セマフォリン3A、セマフォリン6B、セマフォリン3C、セマフォリン6C、セマフォリン3E、セマフォリン6D、セマフォリン6A、セマフォリン7A、MMP、MMP - 11、MMP - 1、MMP - 12、MMP - 2、MMP - 13、MMP - 3、MMP - 14、MMP - 7、MMP - 15、MMP - 8、MMP - 16/MT3 - MMP、MMP - 9、MMP - 24/MT5 - MMP、MMP - 10、MMP - 25/MT6 - MMP、TIMP - 1、TIMP - 3、TIMP - 2、TIMP - 4、ACE、IL - 13 R1 (IL - 13) C1q R1/CD93、インテグリン4/CD49d、VE - カドヘリン、インテグリン2/CD18、CD31/PECAM - 1、KLF4、CD36/SR - B3、LYVE - 1、CD151、MCAM、CL - P1/COLEC12、ネクチン - 2/CD112、凝固第III因子/組織因子、E - セレクチン、D6、P - セレクチン、DC - SIGNR/CD299、SLAM、EMMPRIN/CD 147、Tie - 2、エンドグリン/CD105、TNF RI/TNFRSF1A、EPCR、TNF RII/TNFRSF1B、エリスロポエチンR、TRAIL R1/TNFRSF10A、ESAM、TRAIL R2/TNFRSF10B、FABP5、VCAM - 1、ICAM - 1/CD54、VEGF R2/Flk - 1、ICAM - 2/CD102、VEGF R3/Flt - 4、IL - 1 RI及びVG5Qからなる群から選択される、第244～246項のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0801】

第259項。VSI G8及び/またはVISTAの少なくとも1つの免疫阻害効果を刺激する、上に記載の項のいずれかに記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質。

【0802】

第260項。以下の効果のうちの1つ以上を仲立ちし、前記単離したまたは組み換えのVSI G8ポリペプチドまたは融合タンパク質が、(i)～(xxviii)のうちの1つ以上の逆の効果誘発し得ることを条件とする、第259項に記載の単離したポリペプ

10

20

30

40

50

チドまたは融合タンパク質：(i)免疫応答の低下、(ii)T細胞の活性化の低下、(iii)細胞傷害性T細胞活性の低下、(iv)ナチュラルキラー(NK)細胞活性の低下、(v)T細胞活性の低下、(vi)炎症性サイトカイン分泌の低下、(vii)IL-2分泌の低下、(viii)T細胞によるインターフェロン産生の減少、(ix)Th1応答の低下、(x)Th2応答の低下、(xi)細胞数及び/もしくは制御性T細胞の活性の増加、(xii)制御性細胞活性、及び/もしくは、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の増加、(xiii)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の活性の増加、(xiv)M2マクロファージの増加、(xv)M2マクロファージ活性の増加、(xvi)N2好中球の増加、(xvii)N2好中球活性の増加、(xviii)T細胞の活性化阻害の増加、(xix)CTL活性化阻害の増加、(xx)NK細胞活性化阻害の増加、(xxi)T細胞疲弊の増加、(xxii)T細胞応答の低下、(xxiii)細胞毒性細胞の活性の低下、(xxiv)抗原特異的メモリー応答の低下、(xxv)細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(xxvi)細胞への細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の低下、(xxvii)細胞の直接殺傷の減少、(xxviii)Th17活性の低下、並びに/または(xxviii)補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の低下。

10

【0803】

第261項。VSI G 8及び/またはVISTAの少なくとも1つの免疫阻害効果を刺激する、上に記載の項に記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質。

20

【0804】

第262項。以下の効果のうちの1つ以上を仲立ちし、前記単離したまたは組み換えのVSI G 8ポリペプチドまたは融合タンパク質が、(i)~(xxviii)のうちの1つ以上の逆の効果を誘発し得ることを条件とする、第261項に記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質：(i)免疫応答の増加、(ii)T細胞の活性化の増加、(iii)細胞傷害性T細胞活性の増加、(iv)NK細胞活性の増加、(v)T細胞抑制の緩和、(vi)炎症性サイトカイン分泌の増加、(vii)IL-2分泌の増加、(viii)T細胞によるインターフェロン産生の増加、(ix)Th1応答の増加、(x)Th2応答の増加、(xi)細胞数、及び/もしくは制御性T細胞(Treg)、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の少なくとも1つの活性の減少もしくは除去、(xii)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の活性の低下、(xiii)M2マクロファージの減少もしくは除去、(xiv)M2マクロファージ腫瘍形成活性の低下、(xv)N2好中球の減少もしくは除去、(xvi)N2好中球の腫瘍形成活性の低下、(xvii)T細胞活性化阻害の低下、(xviii)CTL活性化阻害の低下、(xix)NK細胞活性化阻害の低下、(xx)T細胞疲弊の逆転、(xxi)T細胞応答の増加、(xxii)細胞毒性細胞の活性の増加、(xxiii)抗原特異的メモリー応答の刺激、(xxiv)癌細胞のアポトーシスもしくは溶解の誘発、(xxv)癌細胞における細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の刺激、(xxvi)癌細胞の直接殺傷の誘発、(xxvii)Th17活性の増加、並びに/または(xxviii)補体依存性細胞傷害及び/もしくは抗体依存性細胞傷害の誘発。

30

40

【0805】

第263項。T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞におけるVSI G 8及び/もしくはVISTAの少なくとも1つの効果、または1種以上の炎症性サイトカインの産生を刺激する、またはそれに拮抗する、上の項のいずれかに記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質。

【0806】

第264項。CTL活性、CD4+ T細胞の活性化、及び/もしくはCD4+ T細胞増殖及び/もしくは細胞枯渇のうちの1つ以上、または炎症性サイトカインの分泌を阻害または促進する、上の項のいずれかに記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク

50

質。

【0807】

第265項。NK細胞活性を阻害または促進する、上の項のいずれかに記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質。

【0808】

第266項。Treg、MDS C、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の分化、増殖及び/もしくは活性、並びに/またはTreg(Treg)、MDS C、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の浸潤を阻害または促進する、上の項のいずれかに記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質。

【0809】

第267項。前記Tregは誘発可能なTregである、第266項に記載のポリペプチドまたは融合タンパク質。

【0810】

第268項。NK細胞により発現される受容体に特異的に結合する、上に記載の項に記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質。

【0811】

第269項。活性化T細胞、または樹状もしくは骨髄抑制もしくは単核細胞、または好中球細胞により発現される受容体に特異的に結合する、上に記載の項に記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質。

【0812】

第270項。上に記載の項のいずれかに記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0813】

第271項。第270項に記載の少なくとも1種のポリヌクレオチドを含む、発現ベクターまたはウイルス。

【0814】

第272項。前記細胞は、構造的に、または誘発により、DNAセグメントによりコードされるポリペプチドを発現する、第270項に記載の発現ベクター、または第271項に記載のポリヌクレオチドを含有するウイルスを含む組み換え細胞。

【0815】

第273項。第272項に記載の組み換え細胞を、前記細胞が、DNAセグメントまたは核酸によりコードされるポリペプチドを発現する条件下にて培養することと、前記ポリペプチドを回収することを含む、第200～269項のいずれかに記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質の作製方法。

【0816】

第274項。第200～269項のいずれかに記載の単離したタンパク質もしくは融合タンパク質を含む、または、配列番号1、2、3のいずれかに記載されるV S I G 8 E C Dタンパク質、第270項に記載のポリヌクレオチド、第271項に記載の発現ベクターもしくはウイルス、もしくは第272項に記載の組み換え細胞を含む医薬組成物。

【0817】

第275項。癌を患う対象の治療に使用するための、第274項に記載の医薬組成物、第200～269項のいずれかに記載の単離したポリペプチドまたは融合タンパク質、第270項に記載のポリヌクレオチド、第271項に記載の発現ベクターまたはウイルス、第272項に記載の組み換え細胞。

【0818】

第276項。癌の免疫療法で使用するための、第275項に記載の医薬組成物、癌免疫療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0819】

第277項。前記癌は、診断時、または治療前に十分な量のV S I G 8タンパク質を発

10

20

30

40

50

現しない、第275または276項に記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0820】

第278項。前記癌は、診断時、または治療前に、十分な量のV S I G 8タンパク質を発現する、第275または276項に記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0821】

第279項。前記医薬組成物、単離したポリペプチド、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクター、ウイルス、または細胞は、癌の治療に有用な治療薬と組み合わせて、治療が必要な対象に投与される、第275～278項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞を含む医薬組成物、癌免疫治療法、またはそれらの使用。

10

【0822】

第280項。以下のうちの少なくとも1つを実行するための第275～279項のいずれかに記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用：(i)免疫応答の増加、(ii)T細胞の活性化の増加、(iii)細胞傷害性T細胞活性の増加、(iv)NK細胞活性の増加、(v)Th17活性の増加、(vi)T細胞抑制の緩和、(vii)炎症性サイトカイン分泌の増加、(viii)IL-2分泌の増加、(ix)T細胞によるインターフェロン産生の増加、(x)Th1応答の増加、(xi)Th2応答の低下、(xii)制御性T細胞(Treg)、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の少なくとも1つの減少もしくは除去、(xiii)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の活性の低下、(xiv)M2マクロファージの減少もしくは除去、(xv)M2マクロファージ腫瘍形成活性の低下、(xvi)N2好中球の減少もしくは除去、(xvii)N2好中球腫瘍形成活性の低下、(xviii)T細胞の活性化阻害の低下、(xix)CTL活性化阻害の低下、(xx)NK細胞活性化阻害の低下、(xxi)T細胞疲弊の逆転、(xxii)T細胞応答の増加、(xxiii)細胞毒性細胞の活性の増加、(xxiv)抗原特異的メモリー応答の刺激、(xxv)癌細胞のアポトーシスもしくは細胞溶解の誘発、(xxvi)癌細胞における細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の刺激、(xxvii)癌細胞の直接殺傷の誘発、並びに/または(xxviii)補体依存性細胞傷害の誘発、並びに/または(xxix)抗体依存性細胞傷害の誘発。

20

30

【0823】

第281項。放射線治療、凍結治療、抗体治療、化学療法、光線力学的治療、手術、ホルモン除去、標的療法剤、癌ワクチン、または従来薬剤との併用療法の1つ以上を含む追加の治療法を投与することを更に含む、第275～280項のいずれかに記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

40

【0824】

第282項。前記治療薬または追加の治療法は、細胞毒性薬、腫瘍ワクチン、抗体、ペプチド、ペプチボディ、小分子、化学療法剤、細胞毒性及び細胞増殖抑制剤、免疫調節剤、インターフェロン、インターロイキン、免疫刺激性成長ホルモン、サイトカイン、ビタミン、ミネラル、アロマトラーゼ阻害剤、RNAi、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、並びにプロテアソーム阻害剤からなる群から選択される、第275～281項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞を含む医薬組成物、癌免疫治療法、またはそれらの使用。

【0825】

50

第283項。治療効果を得るために、1種以上の治療薬、追加の治療法または強化剤と組み合わせて、対象に同時にまたは連続的に投与される、第275～282項のいずれかに記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用であって、前記1種以上の強化剤は、放射線治療、従来/通常の抗癌剤強化抗腫瘍免疫応答、抗腫瘍免疫応答を強化する標的療法、免疫抑制細胞 T r e g 及び/または M D S C を標的化する治療薬、免疫刺激性抗体、サイトカイン療法、並びに養子細胞移入からなる群から選択される、前記医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

10

【0826】

第284項。前記従来/通常の抗癌剤は、白金ベースの化合物、抗癌活性を有する抗生物質、アントラサイクリン、アントラセンジオン、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗有糸分裂剤、タキサン、タキソイド、微小管阻害剤、ピンカアルカロイド、葉酸塩アンタゴニスト、トポイソメラーゼ阻害剤、抗エストロゲン薬、抗アンドロゲン薬、アロマターゼ阻害剤、G n R h 類似体、5 - レダクターゼ阻害剤、ビスホスホネート及び抗体からなる群から選択される、第275～283項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞を含む医薬組成物、癌免疫治療法、またはそれらの使用。

20

【0827】

第285項。前記標的療法剤は、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) 阻害剤、プロテアソーム阻害剤、m T O R 経路阻害剤、J A K 2 阻害剤、チロシンキナーゼ阻害物質 (T K I)、P I 3 K 阻害剤、プロテインキナーゼ阻害剤、セリン/スレオニンキナーゼ阻害剤、細胞内シグナル伝達阻害剤、R a s / R a f シグナル伝達阻害剤、M E K 阻害剤、A K T 阻害剤、生残シグナル伝達タンパク質阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、治療用モノクローナル抗体、T R A I L 経路アゴニスト、抗血管新生剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、カテプシン阻害剤、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体機能阻害剤、免疫複合体、抗体薬剤コンジュゲート、抗体断片、二重特異的抗体、二重特異的 T 細胞エンゲージャー (B i T E) からなる群から選択される、第275～284項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞を含む医薬組成物、癌免疫治療法、またはそれらの使用。

30

【0828】

第286項。前記抗体は、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、ラベツズマブ、アダカツムマブ、カツマキシマブ、オナルツブマブ、アボマブ、マバツムマブ、レクサツムマブ、コナツムマブ、ティガツズマブ、カツマキシマブ、プリナツモマブ、イブリツモマブチウキセタン (t r i u x e t a n)、トシツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、クリバツズマブテトラキセタン、ペムツモマブ、トラスツズマブエムタンシン、ベバシズマブ、エタラチズマブ、ポロシキシマブ、ラムシルマブ、アフリベルセプトから選択される、第275～285項のいずれかに記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞またはそれらの使用。

40

【0829】

第287項。免疫抑制細胞 T r e g 及び/または M D S C を標的とする治療薬は、細胞分裂抑制薬、シクロホスファミド、ゲムシタピン、マイトキサントロン、フルダラピン、サリドマイド、サリドマイド誘導体、C O X - 2 阻害剤、T r e g 細胞表面受容体の認識により、T r e g を直接標的とする枯渇または殺傷抗体、抗 C D 2 5 ダクリズマブ、バシリキシマブ、リガンドに向けられる毒素、デニロイキンディフィトックス (O n t a k) - ヒト I L - 2 及びジフテリア毒素の融合タンパク質、または L M B - 2 - C D 2 5 に対

50

する s c F v とシュードモナスエキソトキシンとの融合物、T r e g 細胞表面受容体を標的とする抗体、T L R 調節物質、アデノシン経路を妨げる作用物質、エクトヌクレオチダーゼ阻害剤、または A 2 A アデノシン受容体の阻害剤、T G F - 阻害剤、ケモカイン受容体阻害剤、レチノイン酸、全トランスレチノイン酸 (A T R A)、ビタミン D 3、ホスホジエステラーゼ 5 阻害剤、シルデナフィル、R O S 阻害剤及びニトロアスピリンから選択される、第 2 7 5 ~ 2 8 6 項のいずれかに記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞またはそれらの使用。

【 0 8 3 0 】

第 2 8 8 項。前記免疫刺激性抗体は、C T L A 4、P D - 1、P D L - 1、L A G - 3、T I M - 3、B T L A、B 7 - H 4、B 7 - H 3、V I S T A の 1 つ以上を標的化するアンタゴニスト抗体、及び / または C D 4 0、C D 1 3 7、O X 4 0、G I T R、C D 2 7、C D 2 8 もしくは I C O S の 1 つ以上を標的とするアゴニスト抗体から選択される、第 2 7 5 ~ 2 8 7 項のいずれかに記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞またはそれらの使用。

10

【 0 8 3 1 】

第 2 8 9 項。前記治療用癌ワクチンは、腫瘍抗原、腫瘍抗原をコードする組み換えウイルス及び細菌ベクター、腫瘍抗原をコードする D N A 系ワクチン、樹状細胞系ワクチンに対して標的化されたタンパク質、全腫瘍細胞ワクチン、G M - C S F、I C O S 及び / または F 1 t - 3 リガンドを発現する遺伝子改変腫瘍細胞、腫瘍崩壊ウイルスワクチンに対する免疫応答をマウントするために使用されるタンパク質またはペプチドを含む外因性癌ワクチンから選択される、第 2 7 5 ~ 2 8 8 項のいずれかに記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞またはそれらの使用。

20

【 0 8 3 2 】

第 2 9 0 項。前記サイトカイン療法は、サイトカイン I L - 2、I L - 7、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 7、I L - 1 8 及び I L - 2 1、I L - 2 3、I L - 2 7、G M - C S F、I F N (インターフェロン)、I F N - 2 b、I P N、I F N のうちの 1 つ以上、並びに、これらの異なる送達方法から選択される、第 2 7 5 ~ 2 8 9 項のいずれかに記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞またはそれらの使用。

30

【 0 8 3 3 】

第 2 9 1 項。前記養子細胞移入治療法は、患者の自己天然腫瘍特異的 T 細胞の拡張、または T 細胞の遺伝子組み換えによる腫瘍抗原に対する特異性の付与から選択される e x v i v o 治療の後で実施される、第 2 7 5 ~ 2 9 0 項のいずれかに記載の医薬組成物、癌免疫治療法、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞またはそれらの使用。

40

【 0 8 3 4 】

第 2 9 2 項。対象における病気の診断、または診断を補助するためのアッセイであって、前記病気は、癌、自己免疫疾患、または感染症からなる群から選択され、上に記載の項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、及び / もしくは配列番号 1、2、3 のいずれかに記載されている V S I G 8 E C D タンパク質、並びに前記対象から取り出した組織サンプルへの、前記単離したまたは融合タンパク質への特異的結合を検出するための検出器を含む、アッセイ。

【 0 8 3 5 】

第 2 9 3 項。対象の病気の診断、または診断を補助するための診断方法であって、前記病気は、癌、自己免疫疾患、または感染症からなる群から選択され、前記方法を実施するために、第 2 9 2 項に記載のアッセイを使用することを含む、前記診断方法。

50

【 0 8 3 6 】

第 2 9 4 項。対象の病気の診断、または診断を補助するための診断方法であって、前記病気は、癌、自己免疫疾患、または感染症からなる群から選択され、前記診断方法は *ex vivo* で実施され、前記対象からの組織サンプルを、第 1 ~ 2 9 3 項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、または配列番号 1、2、3 のいずれかに記載の V S I G 8 E C D と接触させることと、前記組織サンプルへの特異的結合を検出することを含む、前記診断方法。

【 0 8 3 7 】

第 2 9 5 項。対象の病気の診断、または診断を補助するための診断方法であって、該病気は癌、自己免疫疾患、または感染症からなる群から選択され、前記診断方法は *in vivo* で実施され、第 1 ~ 2 9 4 項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、または配列番号 1、2、3 のいずれかに記載の V S I G 8 E C D タンパク質を対象に投与することと、組織への特異的結合を検出することを含む、前記診断方法。

10

【 0 8 3 8 】

第 2 9 6 項。前記診断方法は、第 2 0 0 ~ 2 6 9 項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、第 2 7 0 項に記載のポリヌクレオチド、第 2 7 1 項に記載の発現ベクターもしくはウイルス、第 2 7 2 項に記載の組み換え細胞、第 2 7 4 項に記載の医薬組成物、第 2 7 5 項に記載の組み換え細胞、または、第 2 7 6 ~ 2 9 1 項のいずれかに記載のタンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物を前記対象に投与することを含む治療法または治療の前に実施される、第 2 9 3 ~ 2 9 5 項のいずれかに記載の方法、または第 2 9 2 項に記載のアッセイの使用。

20

【 0 8 3 9 】

第 2 9 7 項。病気をスクリーニングする、V S I G 8 が仲立ちする免疫抑制をスクリーニングする、病気の存在もしくは重症度を検出する、病気の予後診断を提供する、病気の進行もしくは再発、並びに治療の有効性、及び/もしくは病気、疾患もしくは状態の評価を監視する、並びに、治療及び/もしくは病気の治療、病気に対する所与の治療法の最適化を選択する、病気の治療を監視する、並びに/もしくは特定の患者もしくは亜集団の治療の適合性を予測する、または、患者もしくは亜集団における治療用生成物の適切な用量を決定するための、第 2 9 3 ~ 2 9 6 項のいずれかに記載の方法。

30

【 0 8 4 0 】

第 2 9 8 項。前記癌は、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、子宮体癌、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、膀胱癌、肺癌、膵癌、結腸直腸癌、前立腺癌、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、B 細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病、急性骨髄性白血病 (A M L)、慢性骨髄性白血病、甲状腺癌、甲状腺濾胞性癌、骨髄異形成症候群 (M D S)、線維肉腫及び横紋筋肉腫、奇形癌、神経芽細胞腫、膠腫、グリア芽腫、皮膚の良性腫瘍、ケラトアカントーマ、腎癌、未分化大細胞型リンパ腫、食道癌、濾胞性樹状細胞癌腫、精嚢腫瘍、表皮癌腫、脾臓癌、膀胱癌、頭頸癌、胃癌、肝癌、骨肉腫、脳腫瘍、網膜癌、胆道癌、小腸癌、唾液腺癌、子宮癌、精巣癌、結合組織癌、脊髄形成異常、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、鼻咽頭癌、神経内分泌癌、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、卵管癌、腹膜癌、乳頭漿液ミューラー管 (*millierian*) 癌、悪性腹水、消化管間質腫瘍 (G I S T)、リ・フラウメニ症候群及びフォン・ヒッペル・リンドウ病 (V H L)、原発性または転移性のいずれかの、由来が未知の癌 (この癌は非転移性、侵襲性または転移性である) からなる群から選択される、第 2 0 0 ~ 2 6 9 項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、第 2 7 0 項に記載のポリヌクレオチド、第 2 7 1 項に記載の発現ベクターもしくはウイルス、第 2 7 2 項に記載の組み換え細胞、第 2 7 4 項に記載の医薬組成物、第 2 7 5 項に記載の使用、または、第 2 7 6 ~ 2 9 1 項のいずれかに記載のタンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、も

40

50

しくはそれらの使用、第292項に記載のアッセイ、または第94～98項のいずれかに記載の方法。

【0841】

第299項。前記乳癌は乳癌腫であり、腺管癌、浸潤性腺管癌、小葉癌、粘液性腺癌、腺内及び侵襲性腺管癌、並びに硬性腺癌からなる群から選択される、第298項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

【0842】

第300項。前記大腸癌は、不十分あるいは十分に分化した侵襲性及び非侵襲性腺癌、不十分あるいは十分に分化した盲腸腺癌、十分あるいは不十分に分化した結腸腺癌、管状腺癌、好ましくはグレード2の上行結腸管状腺癌、結腸腺癌（デュークスステージC I）、侵襲性腺癌、直腸腺癌、好ましくはグレード3の直腸腺癌、中程度に分化した直腸腺癌、中程度に分化した直腸粘液性腺癌からなる群から選択される、第298項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

10

【0843】

第301項。前記肺癌は、十分あるいは不十分に分化した非小細胞癌、扁平上皮細胞癌、好ましくは十分あるいは不十分に分化した扁平上皮細胞癌、角化型扁平上皮細胞癌、腺癌、好ましくは不十分あるいは十分に分化した腺癌、大型細胞腺癌、小細胞肺癌、好ましくは小細胞肺癌、より好ましくは未分化小細胞肺癌からなる群から選択される、第298項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

20

【0844】

第302項。前記前立腺癌は、前立腺癌腫であり、グリーンングレード6～9の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度の前立腺上皮内腫瘍形成、未分化癌腫からなる群から選択される、第298項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

【0845】

第303項。前記胃癌は中程度に分化した胃腺癌である、第298項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

30

【0846】

第304項。前記卵巣癌は、嚢胞腺癌、漿液乳頭嚢胞性癌腫、漿液乳頭嚢胞性癌腫、侵襲的漿液乳頭癌種からなる群から選択される、第298項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

【0847】

第305項。前記脳腫瘍は、星状膠細胞腫（グレード2の星状膠細胞腫でなく、好ましくはグレード4の星状膠細胞腫であることを条件とする）、または多形性膠芽腫からなる群から選択される、第298項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

40

【0848】

第306項。前記脳腫瘍は星状膠細胞腫である、第298項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

【0849】

第307項。前記腎臓癌は明細胞の腎細胞癌である、第298項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

50

【 0 8 5 0 】

第 3 0 8 項。肝癌は肝細胞癌である、第 2 9 8 項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

【 0 8 5 1 】

第 3 0 9 項。前記肝細胞癌は低グレードの肝細胞癌種またはファイブロラメラ肝細胞癌である、第 3 0 8 項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

【 0 8 5 2 】

第 3 1 0 項。前記リンパ腫は、ホジキンリンパ腫、及び高～低グレードの非ホジキンリンパ腫からなる群から選択される、第 2 9 8 項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

10

【 0 8 5 3 】

第 3 1 1 項。B 細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、甲状腺癌、甲状腺濾胞性癌、骨髓異形成症候群 (M D S)、線維肉腫及び横紋筋肉腫、黒色腫、ブドウ膜黒色腫、奇形癌、神経芽細胞腫、膠腫、グリア芽腫癌、ケラトアカントーマ、未分化大細胞型リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌腫、筋肉侵襲性癌、精嚢腫瘍、表皮癌腫、網膜癌、胆道癌、小腸癌、唾液腺癌、結合組織癌、脊髄形成異常、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、鼻咽頭癌、神経内分泌癌、骨髓異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道癌、卵管癌、腹膜癌、乳頭漿液ミューラー管 (m i l l e r i a n) 癌、悪性腹水、消化管間質腫瘍 (G I S T)、リ・フラウメニ症候群及びフォン・ヒッペル・リンドウ病 (V H L)、子宮体癌、乳癌 (好ましくは腺管癌、浸潤性腺管癌、小葉癌、粘液性腺癌、腺内及び侵襲性腺管癌、並びに硬性腺癌のいずれか)、結腸腺癌 (好ましくは、不十分あるいは十分に分化した侵襲性及び非侵襲性腺癌、不十分あるいは十分に分化した盲腸腺癌、十分あるいは不十分に分化した結腸腺癌、管状腺癌、好ましくはグレード 2 の上行結腸管状腺癌、結腸腺癌 (デュークスステージ C I)、侵襲性腺癌のいずれか)、直腸腺癌 (好ましくはグレード 3 の直腸腺癌、中程度に分化した直腸腺癌、中程度に分化した直腸粘液性腺癌)、肺癌 (好ましくは、十分あるいは不十分に分化した非小細胞癌、扁平上皮細胞癌、好ましくは十分あるいは不十分に分化した扁平上皮細胞癌、角化型扁平上皮細胞癌、好ましくは不十分あるいは十分に分化した腺癌、大型細胞腺癌、小細胞肺癌、好ましくは小細胞肺癌、より好ましくは未分化小細胞肺癌のいずれか) 前立腺癌 (好ましくは、グリーソングレード 6 ~ 9 の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度の前立腺上皮内腫瘍形成、未分化癌種のいずれか)、胃腺癌 (好ましくは中程度に分化した胃腺癌)、卵巣癌腫 (好ましくは、嚢胞腺癌、漿液乳頭嚢胞性癌腫、漿液乳頭嚢胞性癌腫、侵襲的漿液乳頭癌種のいずれか)、脳腫瘍 (好ましくは星状膠細胞腫、グレード 2 の星状膠細胞腫でない場合に、好ましくはグレード 4 の星状膠細胞腫、多形性膠芽腫のいずれか)、腎臓癌 (好ましくは明細胞の腎細胞癌)、肝癌 (好ましくは肝細胞癌のいずれか、好ましくは低グレードの肝細胞癌種、ファイブロラメラ肝細胞癌)、リンパ腫 (好ましくはホジキンリンパ腫、及び高～低グレードの非ホジキンリンパ腫のいずれか) からなる群から選択される病気を患う対象を治療するための、第 2 9 8 項に記載の単離したタンパク質、融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、医薬組成物、アッセイまたは方法。

20

30

40

【 0 8 5 4 】

第 3 1 2 項。免疫状態を患う対象における免疫状態の治療に使用するための、第 2 7 4 項に記載の医薬組成物、第 2 0 0 ~ 2 6 9 項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、第 2 7 0 項に記載のポリヌクレオチド、第 2 7 1 項に記載の発現ベクターもしくはウイルス、または第 2 7 2 項に記載の組み換え細胞。

【 0 8 5 5 】

第 3 1 3 項。前記医薬組成物、単離したポリペプチド、融合タンパク質、ポリヌクレオ

50

チド、発現ベクター、ウイルスまたは細胞は、免疫状態の治療に有用な治療薬と組み合わせ、免疫状態の治療が必要な対象に投与される、第312項に記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0856】

第314項。免疫状態の治療を必要とする対象において免疫状態を治療するための、第312または313項に記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0857】

第315項。前記タンパク質、前記ポリヌクレオチド、前記発現ベクターもしくはウイルス、前記組み換え細胞、または前記医薬組成物は、免疫関連疾患の治療、並びに/または、遺伝子もしくは細胞療法、もしくは細胞、組織、及び/もしくは臓器の対象への移植に続く望ましくない免疫活性化の低下に使用され、免疫応答の阻害、T細胞活性の低下、NK細胞活性の低下、制御性細胞活性の増強、T細胞抑制の増強、免疫制御性細胞活性の増強、免疫寛容確立の誘発、炎症性サイトカイン分泌の低下、Th1-Th2免疫バランスの再確立、自己抗原に対する免疫メモリー応答の低下、炎症性免疫細胞の減少または除去、自己反応性免疫細胞の減少または除去の少なくとも1つが可能である、第312~314項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用

【0858】

第316項。以下のうちの少なくとも1つを実行するための、第312~315項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用：(i)免疫応答の低下、(ii)T細胞の活性化の低下、(iii)細胞傷害性T細胞活性の低下、(iv)ナチュラルキラー(NK)細胞の減少、(v)T細胞活性の低下、(vi)Th17活性の低下、(vii)炎症性サイトカイン分泌の低下、(viii)IL-2分泌の低下、(ix)T細胞によるインターフェロン産生の低下、(x)Th1応答の低下、(xi)Th2応答の低下、(xii)制御性T細胞、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の増加、(xiii)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の活性の増加、(xiv)M2マクロファージの増加、(xv)M2マクロファージ活性の増加、(xvi)N2好中球の増加、(xvii)N2好中球活性の増加、(xviii)T細胞の活性化阻害の増加、(xix)CTL活性化阻害の増加、(xx)NK細胞活性化阻害の増加、(xxi)T細胞枯渇の増加、(xxii)T細胞応答の低下、(xxiii)細胞毒性細胞の活性の低下、(xxiv)抗原特異的メモリー応答の低下、(xxv)細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(xxvi)細胞における細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の低下、(xxvii)細胞の直接殺傷の減少、並びに/または(xxviii)補体依存性細胞傷害の減少、並びに/または(xxix)抗体依存性細胞媒介細胞傷害の減少。

【0859】

第317項。前記免疫状態は自己免疫疾患、移植拒絶反応、及び移植片対宿主病からなる群から選択される、第312~316項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0860】

第318項。前記自己免疫疾患は、多発性硬化症、乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)；円板状エリテマトーデス、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ性血管炎、血小板減少性紫斑病、特発性血小板減少症、

10

20

30

40

50

特発性自己免疫溶血性貧血、赤芽球癆、シェーグレン症候群、リウマチ疾患、結合織疾患、炎症性リウマチ、変性リウマチ、関節外リウマチ、若年性関節リウマチ、関節炎蕁麻疹、筋肉リウマチ、慢性多発性関節炎、クリオグロブリン血症性血管炎、ANCA関連脈管炎、抗リン脂質症候群、重症筋無力症、自己免疫溶血性貧血、ギラン・バレー症候群、慢性免疫多発神経障害、自己免疫甲状腺炎、インスリン依存性真性糖尿病、I型糖尿病、アジソン病、膜性腎症、グッドパスチャー疾患、自己免疫性胃炎、自己免疫性萎縮性胃炎、悪性貧血(anemia)、天疱瘡、尋常天疱瘡、硬変、原発性胆汁性肝硬変、皮膚筋炎、多発性筋炎、繊維筋炎、筋硬症、腹腔動脈疾患、免疫グロブリンA腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、エバンス症候群、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、乾癬、関節症性乾癬、グレーブス病、グレーブス眼病、強皮症、全身性強皮症、進行性全身性強皮症、ぜんそく、アレルギー、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、一次性粘液水腫、交感性眼炎、自己免疫性ぶどう膜炎、肝炎、慢性作用肝炎、膠原病、強直性脊椎炎、肩関節周囲炎、結節性汎動脈炎、軟骨石灰化、ヴェゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、慢性蕁麻疹、水疱性皮膚疾患、類天疱瘡、アトピー性湿疹、水疱性類天疱瘡、瘢痕性類天疱瘡、白斑、アトピー性湿疹、湿疹、慢性蕁麻疹、自己免疫性蕁麻疹、正補体血症性蕁麻疹様血管炎、低補体血症性蕁麻疹様血管炎、自己免疫性リンパ増殖症候群、デビック病、サルコイドーシス、悪性貧血、小児期自己免疫溶血性貧血、特発性自己免疫溶血性貧血、不応性または慢性自己免疫血球減少、後天性血友病Aにおける自己免疫抗第VII因子抗体の成長防止、寒冷凝集素疾患、視神経脊髄炎、スティッフパーソン症候群、歯肉炎、歯周炎、腭炎、心筋炎、血管炎、胃炎、痛風、痛風性関節炎、及び炎症性皮膚疾患、正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、特発性心膜炎、筋炎、抗シンセターゼ症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、PAPA症候群、ブラウ症候群、痛風、成人及び青年スティール病、クリオピリノパシー、マック・ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児神経皮膚関節炎症候群、リウマチ疾患、リウマチ性多発筋痛、混合性結合織疾患、炎症性リウマチ、変性リウマチ、関節外リウマチ、若年性関節炎、若年性関節リウマチ、全身型若年性特発性関節炎、関節炎蕁麻疹、筋肉リウマチ、慢性多発性関節炎、反応性関節炎、ライター症候群、リウマチ熱、再発性多発軟骨炎、レイノー現象、血管炎、クリオグロブリン血症性血管炎、側頭動脈炎、巨細胞動脈炎、高安動脈炎、ベーチェット病、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、自己免疫甲状腺炎、インスリン依存性真性糖尿病、I型糖尿病、アジソン病、膜性腎症、多腺性自己免疫症候群、グッドパスチャー疾患、自己免疫性胃炎、自己免疫性萎縮性胃炎、悪性貧血(anemia)、天疱瘡、尋常天疱瘡、硬変、原発性胆汁性肝硬変、特発性肺胞線維症、筋炎、皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、多発性筋炎、繊維筋炎、筋硬症、腹腔動脈疾患、腹腔スプルー皮膚炎、免疫グロブリンA腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、エバンス症候群、アトピー性皮膚炎、乾癬、尋常性乾癬、関節症性乾癬、グレーブス病、グレーブス眼病、強皮症、全身性強皮症、進行性全身性強皮症、びまん性強皮症、限局性強皮症、クレスト症候群、ぜんそく、アレルギー性ぜんそく、アレルギー、原発性胆汁性肝硬変、線維筋痛、慢性疲労及び免疫不全症候群(CFIDS)、自己免疫性内耳疾患、高IgD症候群、シュニッツラー症候群、自己免疫性網膜症、加齢関連黄斑変性症、アテローム性動脈硬化症、慢性前立腺炎、脱毛症、円形脱毛症、全身性脱毛、全脱毛症、自己免疫(utoimmune)血小板減少性紫斑病、特発性血小板減少性紫斑病、赤芽球癆、並びにTNF受容体関連周期性症候群(TRAPS)からなる群から選択される、第312~316項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

10

20

30

40

【0861】

第319項。再発寛解型多発性硬化症、一次性進行性多発性硬化症、二次性進行性多発性硬化症、進行性再発型多発性硬化症、慢性進行性多発性硬化症、移行性/進行性多発性硬化症、急速悪化性多発性硬化症、臨床的に確実な多発性硬化症、Marburg変異型としても知られている悪性多発性硬化症、急性多発性硬化症、多発性硬化症関連状態、乾

50

癩性関節炎、痛風及び偽痛風、若年性特発性関節炎、スティル病、リウマチ様血管炎、関節リウマチ関連状態、円板状ループス、狼瘡性関節炎、狼瘡性間質性肺炎、狼瘡性腎炎、骨関節結核を含む全身性エリテマトーデス関連状態、抗リン脂質抗体症候群、心臓の種々の部分の炎症（心膜炎、心筋炎、及び心内膜炎等）、肺炎及び胸膜炎、胸膜炎、胸膜滲出、慢性びまん性間質性肺疾患、肺高血圧症、肺塞栓、肺出血、及び伸縮性肺症候群、ループス頭痛、ギラン・バレー症候群、無菌性髄膜炎、脱髄症候群、モノニューロパシー、多発性単神経炎、脊髄症、脳神経障害、多発神経障害、血管炎、膠原性大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病、不確定性大腸炎、血小板減少性紫斑病、特発性自己免疫溶血性貧血、赤芽球癆、クリオグロブリン血症性血管炎、ANCA関連脈管炎、抗リン脂質症候群、自己免疫溶血性貧血、ギラン・バレー症候群、慢性免疫多発神経障害、自己免疫甲状腺炎、特発性糖尿病、若年性糖尿病（diabetes）、若年発症成人型糖尿病、成人性潜在自己免疫糖尿病、妊娠糖尿病、I型糖尿病関連状態、膜性腎症、自己免疫性胃炎、尋常天疱瘡、硬変、繊維筋炎、腹腔動脈疾患、免疫グロブリンA腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、エバンス症候群、アトピー性皮膚炎、乾癬、グレーヴス眼病、全身性強皮症、ぜんそく、アレルギー、前ぶどう膜炎（または虹彩毛様体炎）、中間ぶどう膜炎（毛様体扁平部炎）、後部ブドウ膜炎（または脈絡網膜炎）、全ぶどう膜炎形態、肝炎、ヴェゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、慢性蕁麻疹、水疱性皮膚疾患、類天疱瘡、アトピー性湿疹、デビック病、小児期自己免疫溶血性貧血、不応性または慢性自己免疫血球減少、後天性血友病Aにおける自己免疫抗第V I I I因子抗体の成長防止、寒冷凝集素疾患、視神経脊髄炎、スティッフパーソン症候群、歯肉炎、歯周炎、腭炎、心筋炎、血管炎、胃炎、痛風、痛風性関節炎、並びに、乾癬、尋常性乾癬及び乾癬性紅皮症（乾癬紅皮症）を含む非膿疱性乾癬、汎発性膿疱性乾癬（von Zumbusch型膿疱性乾癬）を含む膿疱性乾癬、掌蹠膿疱症（持続性掌蹠（palmo-plana）膿疱症、Barber型膿疱性乾癬、脚の膿疱性乾癬）、環状膿疱性乾癬、連続性肢端皮膚炎、疱疹状膿痂疹、薬剤誘発性乾癬、逆性乾癬、おむつ部乾癬、脂漏性乾癬、滴状乾癬、爪乾癬、乾癬性関節炎、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹、及び座瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患、正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、抗シンセターゼ症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、PAPA症候群、ブラウ症候群、痛風、成人及び青年スティル病、クリオピリノパシー（cryopyrinopathy）、マック・ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、

10

20

30

【0862】

第320項。前記治療は、前記状態の治療に有用な別の成分と組み合わされる、第312～319項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

40

【0863】

第321項。前記免疫関連状態の治療に有用な他の成分は、免疫抑制剤（コルチコステロイド、シクロスポリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、ラパマイシン、タクロリムス、レフルノミド、もしくはこれらの類似体等）；ミゾリピン；マイコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；15-デオキシスペルグアリンもしくはその誘導体；生物学的作用物質（TNF遮断薬もしくはアンタゴニスト、もしくは、任意の炎症性サイトカインを標的化する任意の他の生物学的製剤、非ステロイド性抗炎症薬/Cox-2阻害剤、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン、金

50

塩、エタネルセプト、インフリキシマブ、ミコフェノール酸モフェチル、バシリキシマブ、アタシセプト、リツキシマブ、Cytotoxan（登録商標）（シクロホスファミド）、インターフェロン - 1 a、インターフェロン - 1 b、酢酸ガラティラメル、ミトキサントロン塩酸塩、アナキンラ及び/もしくは他の生物学的製剤及び/もしくは静脈内免疫グロブリン（IVIg）、IFN - 1 a（REBIF（登録商標）AVONEX（登録商標）及びCINNOVEX（登録商標））及びIFN - 1 b（BETASERON（登録商標）、EXTAVIA（登録商標）、BETASERON（登録商標）、ZIFERON（登録商標））等）；ペプチドであるグラチラマー酢酸塩（COPAXONE（登録商標））；細胞毒性剤でありカルシニューリン阻害剤であるナタリズマブ（TYSAERI（登録商標））、ミトキサントロン（NOVANTRONE（登録商標））；シクロスポリンA；FK506；免疫抑制性マクロライド；ラパマイシン；ラパマイシン誘導体；リンパ球ホーミング剤である40-O-（2-ヒドロキシ）エチル-ラパマイシン（FTY720）；FTY720の類似体；コルチコステロイド；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキサート；レフルノミドもしくはこの類似体；ミゾリピン；マイコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；15-デオキシスペルグアリンもしくはその誘導体；免疫抑制モノクローナル抗体、白血球受容体に対するモノクローナル抗体、MHC、CD2、CD3、CD4、CD11a/CD18、CD7、CD25、CD27、B7、CD40、CD45、CD58、CD137、ICOS、CD150（SLAM）、OX40、4-1BBもしくはこれらのリガンドに対するモノクローナル抗体；または他の免疫調節化合物、CTLA4-Ig（アバタセプト、ORENCIA（登録商標）、ベラタセプト）、CD28-Ig、B7-H4-Ig、または他の共刺激作用物質、または接着分子阻害剤、mAbもしくは低分子量阻害剤、LFA-1アンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト及びVLA-4アンタゴニスト、または別の免疫調節作用物質から選択される、第312～320項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

10

20

【0864】

第322項。感染症を患う対象における感染症の治療に使用するための、第274項に記載の医薬組成物、第200～269項のいずれかに記載の単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、第270項に記載のポリヌクレオチド、第271項に記載の発現ベクターもしくはウイルス、または第272項に記載の組み換え細胞。

30

【0865】

第323項。前記タンパク質、前記ポリヌクレオチド、前記発現ベクターもしくはウイルス、前記組み換え細胞、前記医薬組成物、または前記使用は感染症の治療に使用され、以下のうちの少なくとも1つが可能である、第322項に記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞またはそれらの使用：(i)免疫応答の増加、(ii)T細胞の活性化の増加、(iii)細胞傷害性T細胞活性の増加、(iv)NK細胞活性の増加、(v)Th17活性の増加、(vi)T細胞抑制の緩和、(vii)炎症性サイトカイン分泌の増加、(viii)IL-2分泌の増加、(ix)T細胞によるインターフェロン産生の増加、(x)Th1応答の増加、(xi)Th2応答の低下、(xii)制御性T細胞(Treg)、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の少なくとも1つの減少もしくは除去、(xiii)制御性細胞活性、及び/もしくは骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)、iMC、間葉ストローマ細胞、TIE2発現単球の1つ以上の活性の低下、(xiv)M2マクロファージの減少もしくは除去、(xv)M2マクロファージ腫瘍形成活性の低下、(xvi)N2好中球の減少、(xvii)N2好中球活性の低下、(xviii)T細胞の活性化阻害の低下、(xix)CTL活性化阻害の低下、(xx)NK細胞活性化阻害の低下、(xxi)T細胞疲弊の逆転、(xxii)T細胞応答の増加、(xxiii)細胞毒性細胞の活性の増加、(xxiv)抗原特異的メモリー応答の刺激、(xxv)癌細胞のアポトーシスもしくは細胞溶解

40

50

の誘発、(x x v i) 癌細胞における細胞毒性もしくは細胞増殖抑制効果の刺激、(x x v i i) 癌細胞の直接殺傷の誘発、並びに/または(x x v i i i) 補体依存性細胞傷害の誘発、並びに/または(x x i x) 抗体依存性細胞傷害の誘発。

【0866】

第324項。前記感染症は慢性感染症であり、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染症及び/または他の寄生生物感染症により引き起こされる病気から選択される、第321～323項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0867】

第325項。前記感染症は敗血症をもたらす、第321～324項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0868】

第326項。前記感染症は、B型肝炎、C型肝炎、伝染性単核球症、AIDS、結核、マラリア及び住血吸虫症から選択される、第321～324項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0869】

第327項。前記治療は、感染症の治療を必要とする対象において、感染症を治療するのに有用な別の成分、または、遺伝子治療後の望ましくない免疫活性化を低下させるのに有用な別の成分と組み合わせられる、第321～326項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0870】

第328項。前記他の成分は、細菌感染症、ウイルス感染症、真菌感染症、寄生虫感染症または敗血症の治療に有用な治療薬である、第321～327項のいずれかに記載の医薬組成物、単離したポリペプチドもしくは融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、またはそれらの使用。

【0871】

第329項。V S I G 8 アゴニストまたはアンタゴニスト化合物とは別個の、またはこれらとコンジュゲートしているV I S T A アゴニストまたはアンタゴニスト化合物を更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の化合物、組成物、方法または使用。

【0872】

第330項。好ましくは抗V S I G 8抗体、V S I G 8タンパク質またはV S I G 8融合タンパク質を含むV S I G 8アゴニストまたはアンタゴニスト化合物とは別個の、またはこれらとコンジュゲートしているV I S T A アゴニストまたはアンタゴニストを更に含む、上に記載の項のいずれかに記載の融合タンパク質、医薬組成物、単離したポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞、または方法もしくは使用。

【0873】

第330項。治療、好ましくはT細胞またはNK免疫の阻害における使用のための、単独で、または本明細書にて開示した他の治療薬または活性物質(特に免疫阻害剤)のいずれかと組み合わせる、例えば、自己免疫、アレルギー、炎症、移植(transplant)または敗血症の治療における、上に記載の項のいずれかに記載のV S I G 8融合タンパク質、医薬組成物、単離したポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクターもしくはウイルス、組み換え細胞の使用、または方法もしくは使用。

【実施例】

【0874】

実施例1：推定上のV I S T A受容体としての、V s i g 8の最初の同定

10

20

30

40

50

V I S T A 多量体への結合に基づく、V - Rとして同定されるV S I G 8

V I S T Aの可溶性オリゴマーまたは多量体版（即ち、組み換え蛍光性V I S T A₁₉-d e x）を使用して、R e t r o g e n i x（U K）<http://www.retrogenix.com>により作製した膜タンパク質ライブラリー（約3800個の独自の遺伝子）をスクリーニングし、ハイスループット結合アッセイにて推定上の結合パートナーを同定した。V I S T Aのオリゴマー化を促進することにより、V - RのV I S T Aへの結合を増強させるために、この可溶性リガンドを設計した。遺伝子はH E K 2 9 3細胞のアレイ内で発現し、蛍光色素が結合したリガンドを、結合パートナーを発現する細胞の検出のために使用する。

【0875】

このスクリーニング法を使用して、V I S T A₁₉-d e xを使用して、V I S T Aに対する結合パートナーとしてV S I G 8を同定した。この結果に基づいて、V S I G 8を他の結合アッセイ及び機能アッセイで評価し、このタンパク質がV I S T A受容体であるかどうかを確認した。

【0876】

抗V S I G 8モノクローナル抗体による、V I S T A - I gが仲立ちするT細胞抑制の逆転 組み換えV I S T A - I g融合タンパク質は、抗C D 3（O K T 3）が仲立ちするi n v i t r oでのT細胞増殖、及びサイトカイン産生を、用量依存的に抑制する。したがって、抗V S I G 8抗体、例えばO r i g e n eから市販されているもの（アゴニストまたはアンタゴニスト活性を有しない遮断/中和抗体）の存在下において、V I S T A - F cの抑制効果が阻害される。

【0877】

本アッセイ（a s s y）において、96ウェルプレートを、37℃で1時間、抗C D 3抗体（O K T 3）のみ、または抗C D 3とV I S T A - I gのいずれかでコーティングする。抗C D 3及びV I S T A - I gをそれぞれ、2.5及び10 u g / m Lの最終濃度にて使用する。健全なドナーの末梢血からの、20万個の精製ヒトT細胞を各ウェルに加える。

【0878】

抗V S I G 8 m A bの存在下において、2重の実験を行う。プレートを37℃で5日間インキュベーションする。5日目において、30 U Lの上清をサイトカイン（I F N - γ及びI L - 2）分析のために取り除き、25 U Lのトリチウム標識チミジンを細胞培養に加える。細胞を更に8時間培養した後で、トリチウムの組み込みにより細胞増殖を測定する。本アッセイの結果は、抗V S I G 8抗体がT細胞活性のV I S T A - I g抑制を阻害するかまたは逆転させることを明らかにする筈である。

【0879】

V S I G 8ノックアウト細胞株におけるV I S T A機能の遮断（方法1）

V S I G 8遺伝子特異的s h R N Aレンチウイルス粒子を構築し、V S I G 8遺伝子をノックダウンする（S i g m a製のM i s s i o n s h R N A粒子、T C Rライブラリー）。J u r k a t細胞に、最適化した感染多重度でs h R N Aレンチウイルス粒子を形質導入し、非特異的な遺伝子欠失を持たない標的遺伝子の、90%を超えるノックダウンを達成する。形質導入した細胞を次に、ピューロマイシン薬剤の存在下で選択する。標的遺伝子の特異性、及びノックダウンの程度を定量P C Rにより確認する。次に、V I S T A - I gの存在下または不存在下にて、細胞を抗C D 3により刺激する。C D 6 9の量をフローサイトメトリーにより評価し、72時間後に、培養血清中でE L I S AによりI L - 2の発現を測定する。

【0880】

本アッセイは、V S I G 8遺伝子がノックアウト細胞である細胞が、V I S T A - I gが仲立ちする抑制に対して不応性であることを明らかにする筈である。

【0881】

V S I G 8ノックアウト細胞株におけるV I S T A機能の遮断（方法2）

V S I G 8 遺伝子特異的 s h R N A レンチウイルス粒子を構築して、V S I G 8 をノックダウンする (M i s s i o n s h R N A 粒子、S i g m a 製の T C R ライブラリー)。健全なドナーからの T 細胞に、最適化した感染多重度で s h R N A レンチウイルス粒子を形質導入し、非特異的な遺伝子欠失を持たない標的遺伝子の、90%を超えるノックダウンを達成する。形質導入した細胞を、ピューロマイシン剤の存在下にて選択する。標的遺伝子の特異性、及びノックダウンの程度を定量 P C R により確認する。抗 C D 3 が仲立ちする T 細胞増殖アッセイを、V I S T A - I g の存在下または不存在下にて、上述のとおり実施する。次に、サイトカイン及び細胞増殖を評価する。

【0882】

本アッセイは同様に、V S I G 8 遺伝子がノックアウト細胞である細胞が、V I S T A - I g が仲立ちする抑制に対して不応性であることを明らかにする筈である。

10

【0883】

q P C R による V S I G 8 の発現の検出

V S I G 8 が V I S T A 受容体であることを更に確認するために、T 細胞による V S I G 8 の発現を検出するアッセイを行う。特に、q P C R アッセイを行い、これにて、全脾臓細胞のサンプルに対して、濃縮したヒト T 細胞の母集団中の V S I G 8 の発現を比較した。

【0884】

c D N A サンプルを、示した細胞から単離した R N A から調製した。V S I G 8 の相対的発現を、M o c k トランスフェクションした C O S 7 細胞を対照として使用し、計算した。(A) 偽または V S I G 8 トランスフェクション C O S 7 細胞のいずれかを、それぞれ陰性 (- V e) または陽性 (+ V e) 対照として使用した。V S I G 8 の発現は V S I G 8 トランスフェクション C O S 7 細胞では検出されたが、m o c k トランスフェクション C O S 7 細胞では検出されなかった。これは、q P C R アッセイにおける V S I G 8 同定の特異性を確認する。V S I G 8 の発現を、ヒト末梢血からの全ヒト脾臓 (B)、及び濃縮 C D 3 + T 細胞で検出した。

20

【0885】

V S I G 8 の相対的発現を、C t 発現式を使用して計算した。予想通り、濃縮した T 細胞の母集団は、全脾臓細胞サンプルと比較して、非常に高レベルの V S I G 8 m R N A を発現した。これらの結果を図 1 X X X に示す。

30

【0886】

実施例 2 : V S I G 8 が V I S T A 受容体であることを確認する実験

材料及び方法

V S I G 8 が V I S T A ポリペプチドに特異的に結合することを確認する実験

293 細胞を、10% F B S (H y c l o n e) を含む D M E M 中で増殖させた。V S I G 8 によるトランスフェクションの前日に、細胞をトリプシン処理し、総体積が 10 m L の 10 c m 皿に、1 : 4 で分割した。トランスフェクションの日に、293 が 60 ~ 80% コンフルエンスに到達した際に、現在の培地を取り除き、10 c m 皿を 5 m L の新鮮な培地で交換する。

【0887】

40

L i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0 (L i f e T e c h n o l o g i e s) の取扱説明書に従い、トランスフェクションを実施する。5 マイクログラムの D N A を 30 U L の L i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0 と混合し、293 細胞に加える前に 10 分間、室温でインキュベーションする。5 ~ 6 時間後に培地を交換し、10 m L の新鮮な培地を加える。

【0888】

2 日後、培地を取り除き、3 m L の P B S / 0 . 5 m M の E D T A / 0 . 0 2 % のアジドを 10 c m 皿に加える。10 分間室温でインキュベーションした。細胞をピペット処理し、単一細胞の懸濁液を作製する。細胞を遠心分離にかけ、5% F B S / 0 . 5 m M E D T A を含む P B S、及び 20 μ g / m L の V I S T A - F c (R & D S y s t e m

50

s) または E p o R - F c (R & D S y s t e m s) のいずれかを含む 0 . 0 2 % アジ化ナトリウムの中で再懸濁する。細胞を氷上で 3 0 分間インキュベーションし、緩衝液で洗浄して、上述のとおり遠心分離にかける。次に、インキュベーションして得られた細胞を、抗ヒト I g G F c - A P C を含む染色緩衝液中で、1 : 2 0 0 で再懸濁し (B i o l e g e n d)、氷上で 3 0 分間インキュベーションする。その後、次いで細胞を洗浄して遠心分離にかけ、M A C S Q u a n t 8 パラメーターフローサイトメーターにかける。

【0889】

抗 V S I G 8 血清によるブロッキングのために、1 : 2 0 ラット血清を加え、氷上で 3 0 分間インキュベーションし、次いで洗浄して、上述のとおり V I S T A - I g で染色する。

10

【0890】

抗 V I S T A 抗体で遮断するために、4 μ g / m L の M A B または 2 μ g / m L の F a b、続いて 2 0 μ g / m L の V - I g または E P O - R - I g を細胞に加える。次に、この混合物を氷上で 3 0 分間インキュベーションする。

【0891】

D N A 構築物はパイシストロニック G F P を含有する。G F P は通常、標的遺伝子に対して比例して発現するため、G F P ⁺ 細胞を分析のためにゲーティングする。

【0892】

細胞 - 細胞コンジュゲーション試験

20

A 2 0 細胞を P B S 中で一度洗浄し、続いて、P B S 中で 1×10^6 / m L にて再懸濁した。1 m L の細胞に、1 μ L の F a r - r e d または V i o l e t 染料 (L i f e T e c h n o l o g y、D M S O 中で再構築) を加えた。室温にて 2 0 分間インキュベーションした。5 分間、1 0 % F B S を含む 6 m L の H B S S を加えた。細胞を 1×10^6 / m L にて、H B S S 中で再懸濁する。

【0893】

結合のために、 1×10^5 個の F a r R e d 標識細胞 (0 . 1 m L) を、 1×10^5 個の v i o l e t 標識細胞 (0 . 1 m L) と、9 6 ウェルプレート内で組み合わせる。細胞を混合し、3 7 $^{\circ}$ C で 4 5 ~ 6 0 分間インキュベーションする。フローサイトメトリーを使用して、細胞の蛍光を読み取る (F a r - r e d シグナルについては A P C チャネル、V i o l e t シグナルについては V i o l e t 1 チャネル)。二重陽性母集団は細胞 - 細胞結合を示す。

30

【0894】

フローサイトメトリーによる V S I G 8 の発現

血液サンプルを、通常は健常であり、地域の母集団から無作為に選択された、少なくとも 1 8 歳のドナーから入手した。次に、ドナーの血液を単離チューブから 5 0 m L のコニカルピーカーに移した。

【0895】

血液 2 5 m L あたり 1 5 m L の F i c o l l 1 0 7 7 (S I G M A、1 0 7 7 1) を、血液と混合しないように注意しながら下に配置した。次に、細胞を中断無しに室温で 2 5 分間、1 2 5 0 g で遠心分離にかけた。

40

【0896】

遠心分離後、白血球を F i c o l l の界面層から単離し、血清と単離細胞を続いて、4 0 m L のハンクス緩衝塩類溶液 (H B S S) 内に希釈した。その後、細胞混合物を 4 $^{\circ}$ C で 1 0 分間、4 5 3 g (1 5 0 0 r p m) で遠心分離にかけた。

【0897】

細胞を含有する得られた遠心分離物を次に、5 0 m L の H B S S 中で再懸濁し、異なる E p p e n d o r f チューブに 5 0 0 μ L を移して計数した。 1×10^5 個の細胞を各ウェルに加え、これらを上述のとおり遠心分離にかけた。

【0898】

50

次に、細胞を10 ug/mLのウサギ抗V S I G 8 (A b c a mまたはN o v u s)、1 : 1 0 0のF c R阻害剤 (e B i o s c i e n c e)、1 . 2 5 u g / m LのヒトI g G、2 u g / m LのC D 1 6 (R & D S y s t e m s)及び、C D 1 4 B V 4 2 1、C D 2 0 P E、C D 8 P e r C P C y 5 . 5、C D 4 P E C y 7、C D 5 6 P E C y 7用のリネージマーカーを含有する100 µLのP B Sの中で再懸濁した。

【0899】

次に、細胞を前述のように4にて20分間インキュベーションし、続いて100 µLのP B Sで洗浄し、上述のとおり遠心分離にかけた。次に細胞を、ヤギ抗ウサギI g G A P Cを含有する100 µLのP B S中で、4にて15分間再懸濁し、続いて、100 µLのP B Sで洗浄し、再び上述のとおり遠心分離にかけた。

10

【0900】

次に、得られたサンプルをM i l t e n y i M A C S Q u a n tフローサイトメーターにかけた。

【0901】

R N A - s e qによるV S I G 8の発現分析

q P C Rアッセイを行い、これにて、全脾臓細胞のサンプルに対して、濃縮したヒトT細胞の母集団中のV S I G 8の発現を比較した。

【0902】

c D N Aサンプルを、示した細胞から単離したR N Aから調製した。V S I G 8の相対的発現を、M o c kトランスフェクションしたC O S 7細胞を対照として使用し、計算した。(A)偽またはV S I G 8トランスフェクションC O S 7細胞のいずれかを、それぞれ陰性 (- V e) または陽性 (+ V e) 対照として使用した。

20

【0903】

V S I G 8の発現は、V S I G 8トランスフェクションC O S 7細胞で検出されたが、m o c kトランスフェクションC O S 7細胞では検出されなかった。これは、q P C RアッセイにおけるV S I G 8同定の特異性を確認する。V S I G 8の発現を、ヒト末梢血からの全ヒト脾臓 (B)、及び濃縮C D 3 + T細胞で検出した。

【0904】

V S I G 8の相対的発現を、C t発現式を使用して計算した。予想通り、濃縮したT細胞の母集団は、全脾臓細胞サンプルと比較して、非常に高レベルのV S I G 8 m R N Aを発現した。

30

【0905】

A 2 0 / D O 1 1 1 0アッセイにおけるV S I G 8抗血清の機能的効果

細胞株の生成：完全長h V I S T A c D N Aを増幅し、B l u e S k y製のバイシストロニックベクターp E F - M C S - I R E S - Z s G r e e nのN h e I - E c o R I部位にクローニングした。メーカーの取扱説明書によりN u c l e o f e c t o rキットV (L o n z a , カタログ番号V A C A 1 0 0 3) を使用して、3つの構築物 (h V I S T A / G F P及びG F P -のみ) をA 2 0マウスB細胞株にトランスフェクションした。安定して発現する細胞を、G 4 1 8選択 (1 m g / m L) における増殖から単離した。細胞を高G F P発現に関して分類し、G 4 1 8選択 (1 . 0 m g / m L) 下にて増殖させた。G F P高発現細胞を、続いて各細胞株に関して単一細胞で分類し、クローン母集団を、G 4 1 8選択の元で増殖及び継代し作製した。得られた細胞プールを、A 2 0 - G F P (G F Pのみを発現)、並びにA 2 0 - h V I S T A (完全長ヒトV I S T A及びG F Pを発現) と命名した。

40

【0906】

培地のプロトコール：50 mLのF B S (C o r n i n g C e l l G r o , ロット番号1 0 3 2 8 3 H I)、5 mLのペニシリン/ストレプトマイシン (L o n z a , 1 7 - 6 0 2 E) 1 0 , 0 0 0 U / m L、5 mLのL - グルタミン (1 0 0 x) (G i b c o , 2 5 0 3 0 - 0 8 1)、及び5 mLのH E P E S (1 M) (F i s h e r , B P 2 9 9 - 1 0 0)、5 0 µ Mのβ-メルカプトエタノール (F i s h e r , カタログ番号0 3 4 4

50

6 - 100) を含む、混ぜ合わせた500 mLのRPMI 1640 (Corning, 10-040-CV)。各実験において、培地を新しく作成した。

【0907】

DO11.10 T細胞の単離：DO11.10 CD4 + T細胞をトランスジェニックDO11.10マウスから直接単離した。マウス(週齢6~10)を安楽死させ、脾臓を滅菌して取り除いた。2つの滅菌スライドガラスを使用して、脾臓を、5 mLの10% FBS培地内の単一細胞懸濁液に処理して入れ、453 gにて5分間、細胞を遠心分離にかけた。10 mLの10% FBS培地を加え、40 μMのセルストレナーに通して濾過し、上述のとおり遠心分離にかけた。メーカーの指示に従い、CD4 T細胞単離キットII (Miltenyi 130-095-248)を使用した陰性選択により、CD4 T細胞の単離を実施した。

10

【0908】

G418選択培地(1.0 mg/mL)中でA20-GFP及びA20-hVISTAを、これらが約 $2 \sim 3 \times 10^6$ 細胞/mLに到達するまで培養した。細胞を完全培地(complete full medium)で洗浄し、 1×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁した。細胞を10,000 radで照射した。ステップ5.3で記載の十に離細胞を遠心分離にかけ、10% FBS培地中で 2×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁し、適切なウェルに50 μLを加えた。

【0909】

50 μLの完全培地中の4倍濃度の対照またはVSI G8ラット血清をA20細胞に加え、室温で45分間インキュベーションした。血清の最終希釈は1:200であった。50 μLの一次DO11.10 T細胞を、10% FBS培地内で 2×10^6 細胞/mLの濃度で適切なウェルに加えた。最終的に、OVAペプチド(ISQ; ISQAVHAHAHA EINEAGR, Peptides International, カタログ番号POV-3636-PI)を10% FBS培地内で4倍濃度に希釈し、50 μLをA20及びDO11.10細胞に加え、所望の最終濃度に到達させた。ovaペプチドは、図の一覧で注記している場合を除き、12.5 ng/mLの最終濃度となった。

20

【0910】

細胞を3日間37 °C及び5% CO₂でインキュベーションした。3日目に、96ウェルプレートを上述のとおり遠心分離にかけ、後述のようにCD25の発現をアッセイした。96ウェルU底プレートを453 gで5分間遠心分離にかけ、血清を取り除いた(IFN またはIL-2分析に関しては、セクション5で使用)。細胞を200 μLの染色緩衝液(Mg²⁺及びCa²⁺を含まない、1x HBSS中の5% FBS)で洗浄し、再び遠心分離にかけた。以下の抗体：CD25-APC 1:200 (Biolegend カタログ番号102034)及びマウスFcR結合阻害剤1:200 (eBioscience カタログ番号120-003-855)を含有する50 μLの染色緩衝液中で細胞を再懸濁した。暗所で、氷上で20分間インキュベーションした。150 μLの染色緩衝液を加え、上述のとおり遠心分離にかけた。200 μLの染色緩衝液で細胞を洗浄して再び遠心分離にかけ、1% BSAを含む100 μLのPBS中で細胞を再懸濁した。

30

【0911】

Miltenyi MACSQuant 8パラメーターフローサイトメーターにサンプルを供し、CD4⁺ T細胞母集団におけるCD25の発現について、FlowJo 9.7.5を使用して分析した。一連の数の中心傾向を規定する統計量である幾何平均蛍光強度(MFI)を、治療を比較する規定の統計量として使用した。

40

【0912】

結果

本実験の結果は、VSI G8は、以下で提供する上述の材料及び方法に記載されているとおりに影響を受けるVISTA受容体であることを証明している。これらの実験は、VSI G8がVISTA受容体であることを確認する更なる証拠を提供する。

【0913】

50

特に、これらの実験は、VISTA-Igキメラタンパク質が、特異的で抗体可逆的な方法で、VSI G 8を過剰発現する細胞を結合可能であることを示し、VSI G 8 mRNA及びタンパク質発現分析は、VSI G 8はリンパ球により発現し、推定上のVISTA受容体について予想されたとおりに、NK及びCD8⁺ T細胞で最も高く発現したことを明らかにし、また、機能アッセイは、VSI G 8に特異的な抗血清は、VISTAが仲立ちするT細胞応答の抑制を逆転させたことを示した。これらを合わせると、これらの結果は、VSI G 8は機能的な結合パートナー、即ちVISTAに対する受容体であるという発明者らの仮説を確かなものとしている。

【0914】

結合結果

ヒトVSI G 8 IRES GFPまたはPD1 IRES GFPをそれぞれ293細胞にトランスフェクションし、続いて、これらの細胞をVISTA-Ig(R&D)、EpoR-Ig(R&D)、VISTA-Ig十九量体、またはhIX-5(INX製のVISTA-IgG1)で染色した。フローサイトメトリーにより、GFP陽性細胞にて結合をアッセイした。

【0915】

図8に示すとおり、VISTA-Ig(R&D)及びVISTA十九量体は共に、VSI G 8を過剰発現する細胞をしっかりと染色したが、PD1過剰発現細胞への結合についての目印は示されていない(図8を参照)。また、hIX-5及びEpoR-Igは、VSI G 8またはPD1を過剰発現する細胞のいずれかの結合についても徴候を示していない(図8を参照)。これらの結果は、VISTAポリペプチドは、予測したVISTA受容体について予想されたとおりに、VSI G - 8に特異的に結合することを確認している。より具体的には、図8は、VISTA融合タンパク質が、VSI G 8を過剰発現する293細胞に特異的に結合することを示す。これらの結合実験において、IRES GFPバイシストロニックベクターを含有するVSI G 8またはPD1のいずれかを、293細胞にトランスフェクションした。GFP陽性細胞をゲーティングし、以下の融合タンパク質、すなわちVISTA-Ig(R&D Systems)、EpoR-Ig(R&D Systems)、hIX-5(INX VISTA-Ig)、及びVISTA十九量体(INX VISTA多量体)に関して、フローサイトメトリーにより結合を評価した。抗IgG二次抗体を使用して、融合タンパク質を検出した。

【0916】

図8の実験に示すように、VISTA融合タンパク質は、VSI G 8を過剰発現する293細胞に特異的に結合する。これらの実験において、IRES GFPバイシストロニックベクターを含有するVSI G 8またはPD1のいずれかを、293細胞にトランスフェクションした。GFP陽性細胞をゲーティングし、以下の融合タンパク質、すなわちVISTA-Ig(R&D Systems)、EpoR-Ig(R&D Systems)、hIX-5(INX VISTA-Ig)、及びVISTA十九量体(INX VISTA多量体)について、フローサイトメトリーにより結合をアッセイした。二次抗IgGを使用して、融合タンパク質を検出した。

【0917】

VISTA-IgとVSI G 8との相互作用の特異性を更に試験するために、図9に示す、VSI G 8及びVISTAに対して、VISTA-IgとVSI G 8との相互作用を遮断する抗体の能力を比較する実験を行った。これらの実験では、293細胞を図8に示すようにトランスフェクションし、VISTA-Igで染色した(A及びBについてはR&D systems、CについてはVISTA十九量体)。VSI G 8を免疫付与したラットまたは対照ラットからの血清を使用して、相互作用を潜在的に遮断した(A、C)。加えて、VISTA抗体(mAb)及びFab(Fab)をまた、対照抗体と比較しての、相互作用を遮断する能力について試験した(B、C)。

【0918】

図9の実験から確認できるように、対照ラットではなくVSI G 8で免疫付与したラッ

10

20

30

40

50

トの抗血清の存在下において、結合は非常に低下し、このことは、V I S T A - I g と V S I G 8 との特異的相互作用を示している (図 9 A)。更に、複数の抗 V I S T A 抗体及び F a b もまた、V I S T A と V S I G 8 との相互作用を特異的に遮断することができた (図 9 B)。更に、V I S T A 十九量体についても同様の研究を行った際、V I S T A 結合の逆転がまた観察された (図 9 C)。

【 0 9 1 9 】

マウスとヒト V S I G 8 は 8 6 % の相同性であるので、ヒト V I S T A - I g がマウス V S I G 8 に、同様に優先的に結合するかどうかを確認するための実験を実施した。これらの実験は図 1 0 に含まれる。これらの実験では、2 9 3 細胞をマウス V S I G 8 または P D 1 でトランスフェクションし、上述のとおり、ヒト V I S T A - I g (R & D s y s t e m s) で染色した。図 1 0 の結果は、V I S T A - I g が、マウス V S I G 8 を過剰発現する細胞への結合能力が低いことを示す。m V S I G 8 群からの G F P 陽性細胞の小集団が、P D 1 対照群と比較して V I S T A - I g により結合された。特に、V I S T A - I g と m V S I G 8 の間には少量の結合が見られたが、V I S T A - I g と P D 1 との間に結合は観察されなかった (図 1 0)。

10

【 0 9 2 0 】

図 1 1 に示す追加の実験を実施し、V I S T A と V S I G 8 の結合をアッセイした。これらの実験では異なる系、即ち細胞 - 細胞コンジュゲーションアッセイを使用して、V I S T A を過剰発現する細胞が V S I G 8 を過剰発現する細胞に結合するかどうかを検出した。P D L 1 と P D 1 を陽性対照として使用し、V S I G 8 - V S I G 8 を陰性対照として使用した。これらの実験では A 2 0 細胞を使用し、これを V I S T A 、V S I G 8 、P D - L 1 または P D 1 でトランスフェクションした後、蛍光染料で標識した。これらのトランスフェクト細胞を共に培養し、フローサイトメトリーにより、細胞のコンジュゲーション、または互いの細胞母集団の結合について確認した。二重陽性細胞は、コンジュゲーションの程度を示す。V S I G 8 / V S I G 8 を陰性対照として使用し、P D 1 / P D - L 1 を陽性対照として使用した。このシステムを使用することで予想されたように、V I S T A と V S I G 8 の結合は、陰性対照サンプルとの結合よりも高いレベルを示した。しかし、コンジュゲートした細胞の割合 (%) に基づくと、P D - L 1 と P D 1 に見られるほど、相互作用は強力ではなかった。

20

【 0 9 2 1 】

図 1 2 及び 1 3 に示す追加の実験を行い、フローサイトメトリー (V S I G 8 タンパク質の発現を検出するため)、及び R N A s e q (V S I G 8 m R N A 発現を検出するため) を使用することにより、特異的細胞による V S I G 8 の発現をアッセイした。これらの実験を、2 種類の市販されている抗体を使用して実施した。

30

【 0 9 2 2 】

図 1 2 の実験において、V S I G 8 に対する抗体は、C D 8 + T 細胞と N K 細胞に結合したことが示された。これらの実験では、単離して、2 種類の市販されている (即ち、A b c a m 及び N O V U S から販売されている) 抗 V S I G 8 抗体で染色したヒト P M B C を使用した。C D 1 4 、C D 4 、C D 8 及び C D 5 6 のリネージ株を使用して、抗 V S I G 8 抗体に結合した異なる免疫細胞集団を同定した。これらの実験の結果、特にヒト P M B C の染色パターンは、C D 8 + T 細胞集団と C D 5 6 + N K 細胞集団における堅強な発現を示した。C D 1 4 + 単球と C D 4 + T 細胞は、抗体分析により陽性に染色しなかった。具体的には、図 1 2 に示すように、V S I G 8 に対する抗体は、C D 8 + T 細胞と N K 細胞に特異的に結合した。

40

【 0 9 2 3 】

図 1 3 に示す、発明者らにより行われた追加の実験を実施して、他の単離した P M B C 母集団による R N A - s e q を使用して、V S I G 8 m R N A 発現を検出した。実験では、ヒト P M B C を、V S I G 8 の R N A - s e q 分析のより測定した m R N A のフローサイトメトリー発現により単離した。この技術を使用することで、C D 4 + T 細胞と C D 8 + T 細胞において伝達暗号を検出したが、C D 2 0 + B 細胞または C D 1 4 +

50

単球においては検出しなかった。加えて、Jurkat T細胞株を同様に、mRNA発現について確認した。図13の結果は、VSI G8 mRNAがヒトCD4⁺及びCD8⁺ T細胞で発現することを示した。

【0924】

発明者らは追加の実験を行い、VISTAの生物活性におけるVSI G8/VISTA結合相互作用の機能的効果を評価した。本出願で開示するように、VISTAはT細胞応答を抑制することが示された。図14に含まれるこれらの実験は、VISTAがVSI G8を介してT細胞にシグナル伝達し、T細胞の活性化を抑制する決定的な証拠をもたらした。これらの実験では、GFP(対照)またはVISTA+GFPのいずれかを発現するA20細胞を、ISQペプチドの存在下においてDO11.10 T細胞でインキュベーションした。72時間の時点で、CD25の発現によりT細胞の活性化を測定した。

10

【0925】

これらの実験では、ヒトVISTAを過剰発現するA20細胞を、これらの細胞が*in vitro*でマウスT細胞応答を抑制することが可能であるので使用した。具体的に、実験においては、これらのA20細胞にISQペプチドをパルスする。ISQペプチドに対して特異的なDO11.10 CD4⁺ T細胞をマウスの脾臓から単離し、パルスしたA20細胞と共にインキュベーションする。72時間後、T細胞の活性化状態をCD25の発現により測定する。本システムにおいて、A20細胞におけるVISTAの過剰発現は、DO11.10 T細胞応答の抑制をもたらす。

【0926】

抗VISTA抗体は抑制を逆転させることが可能である(データは示さず)。この系を使用して、我々は、VSI G8抗血清を追加することで、VISTAが仲立ちする抑制も同様に逆転または阻害するのかどうかを試験した。示すように、対照血清はVISTAの抑制を逆転させなかった。対照的に、VSI G8抗血清を追加することで、増強されたT細胞応答が得られた。この結果は更に、VISTAとVSI G8の結合は機能的効果を有する、即ち、この結合相互作用は、VISTAが関係する生物活性(特にその、T細胞応答における阻害効果)を誘発し得、VISTAアンタゴニストを使用して、免疫におけるVISTAの阻害効果(即ち、T細胞応答におけるVISTAの阻害効果)を阻害できることを確認する。図14の結果は、VSI G8がVISTA受容体であり、VISTAはVSI G8を介してT細胞にシグナル伝達し、抑制シグナルを誘発することを実証する。

20

30

【0927】

VSI G8マウスに関する他の表現型データは、VSI G8とVISTAの更なる機能的関係の二次的証拠を提供する。予備分析が、VSI G8ノックアウトマウスに関して存在する(<http://www.mousephenotype.org/>)。T細胞とNK T細胞区画についての変化を含めて、いくつかのパラメーターには、WT及びVSI G8 KOマウスとの間に統計的に差があることが発見された。変化は以下のリンク:
<http://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:3642995#section-associations>で確認することができる。

【0928】

実施例3: A20機能アッセイ

本実施例は更に、同じVSI G8発現A20系(B細胞)におけるVSI G8の機能を評価する。一般に、アッセイは以下のステップを含む:

2または24時間の、A20-VSI G8細胞の処理

【0929】

1. Ig処理: 1つの群はEpoR-Igにより、他方はVISTA-Igにより

【0930】

2. 活性化

・PMA(10 ng/mL)/イオノマイシン(0.5 µg/mL)

・LPS(10 µg/mL)

40

50

・ a C D 4 0 (1 0 μ g / m L) / I L - 4 (1 0 n g / m L)

・ 未処理

【 0 9 3 1 】

3 . 読出し :

i . 細胞のカウント

i i . フロー (C D 8 6 、 C D 2 5 、 C D 6 9 、 P D 1 、 M H C - I I - 1 A)

i i i . サイトカイン (L u m i n e x 、 3 2 - p l e x)

i v . R N A S e q

【 0 9 3 2 】

この機能アッセイで使用する詳細の方法及び材料を以下で説明する。

10

【 0 9 3 3 】

材料及び方法

電気穿孔法により DNA を A 2 0 にトランスフェクションすることにより、A 2 0 - h V S I G 8 細胞株を作製する。ネオマイシンを用いて細胞を選択し、続いて、G F P + 細胞を分類する (安定したプール) 。細胞をラット抗 V S I G 8 血清で染色することによりヒト V S I G 8 タンパク質の発現を確認する。

【 0 9 3 4 】

1 0 0 万個の A 2 0 細胞の半分を、E p o R - I g または V I S T A - I g と共に 2 4 ウェルプレートに播種する。細胞の活性化の 4 種類の計画使用する : 1 - P M A (1 0 n g / m L) / イオノマイシン (0 . 5 μ g / m L) 、 2 - L P S (1 0 μ g / m L) 、 3 - 抗 C D 4 0 (1 0 μ g / m L) / I L - 4 (1 0 n g / m L) 、 4 - 未処理。細胞を別々の 2 回の時点 (インキュベーションの 2 時間及び 2 4 時間) で回収する。分析は、細胞の計数、フローサイトメーター (C D 8 6 、 P D 1 、 M H C - I I - 1 A) 、上清のタンパク質分析 (L u m i n e x) 、遺伝子発現分析 (R N A s e q) を含む。

20

【 0 9 3 5 】

結果

2 4 時間、P M A / イオノマイシン処理を使用して、かつ、L P S または抗 C D 4 0 / I L - 4 を使用したさほど強くない強度で、A 2 0 - h V I S G 8 細胞を活性化した。本実験の結果が図 1 5 に含まれる。V I S T A - I g によりこれらの細胞を処理する際に、活性化を伴い、及び活性化を伴わずに、P D 1 が上方制御されることが確認できる。加えて、A 2 0 - G F P の対照を使用して、P D 1 の上方制御が特異的、即ち、V I S T A / V S I G 8 結合相互作用の結果であることを確認する。

30

【 0 9 3 6 】

本出願で引用する参考文献

以下の参考文献を本出願で引用する。これらの参考文献の内容、及び本出願で引用した他の全ての参考文献は、それら全体が参照により組み込まれる。

1 Dong , C . , J u e d e s , A . E . , T e m a n n , U . A . , S h r e s t a , S . , A l l i s o n , J . P . , R u d d l e , N . H . a n d F l a v e l l , R . A . , I C O S c o - s t i m u l a t o r y r e c e p t o r i s e s s e n t i a l f o r T - c e l l a c t i v a t i o n a n d f u n c t i o n . N a t u r e 2 0 0 1 . 4 0 9 : 9 7 - 1 0 1 .

40

2 S u h , W . K . , G a j e w s k a , B . U . , O k a d a , H . , G r o n s k i , M . A . , B e r t r a m , E . M . , D a w i c k i , W . , D u n c a n , G . S . , B u k c z y n s k i , J . , P l y t e , S . , E l i a , A . , W a k e h a m , A . , I t i e , A . , C h u n g , S . , D a C o s t a , J . , A r y a , S . , H o r a n , T . , C a m p b e l l , P . , G a i d a , K . , O h a s h i , P . S . , W a t t s , T . H . , Y o s h i n a g a , S . K . , B r a y , M . R . , J o r d a n a , M . a n d M a k , T . W . , T h e B 7 f a m i l y m e m b e r B 7 - H 3 p r e f e r e n t i a l l y d o w n - r e g u l a t e s T h e l p e r t y p e 1 - m e d i a t e d i m m u n e r e s p o n s e

50

s. *Nat Immunol* 2003.4:899-906.

3 Borriello, F., Sethna, M. P., Boyd, S. D., Schweitzer, A. N., Tivol, E. A., Jacoby, D., Strom, T. B., Simpson, E. M., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H., B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1997.6:303-313.

4 Chambers, C. A., Sullivan, T. J. and Allison, J. P., Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* 1997.7:885-895.

10

5 Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H. and Mak, T. W., Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* 1995.270:985-988.

6 Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A. and Sharpe, A. H., Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995.3:541-547.

20

7 Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T., Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999.11:141-151.

30

8 Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., Koulmanda, M., Freeman, G. J., Sayegh, M. H. and Sharpe, A. H., Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006.203:883-895.

9 Ortler, S., Leder, C., Mittelbronn, M., Zozulya, A. L., Knolle, P. A., Chen, L., Kroner, A. and Wiendl, H., B7-H1 restricts neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: implications for the lesion pathogenesis of multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2008.38:1734-1744.

40

10 Zhu, G., Augustine, M. M., Azuma, T., Luo, L., Yao, S., Anand, S., Rietz, A. C., Huang, J., Xu, H., Flies, A. S., Flies, S. J., Tamada, K., Colonna, M., van Deursen, J. M. and Chen, L., B7-H4-deficient mice display augmented neutrop

50

- hil-mediated innate immunity. *Blood* 2009. 113:1759-1767.
- 11 Chen, Y., Wang, Q., Shi, B., Xu, P., Hu, Z., Bai, L. and Zhang, X., Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well as supernatants of PD-L1(+) cell lines. *Cytokine* 2011.
- 12 Greenwald, R. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H., The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005. 23:515-548. 10
- 13 Zhu, Y., Yao, S., Iliopoulou, B. P., Han, X., Augustine, M. M., Xu, H., Phennicie, R. T., Flies, S. J., Broadwater, M., Ruff, W., Taube, J. M., Zheng, L., Luo, L., Zhu, G., Chen, J. and Chen, L., B7-H5 costimulates human T cells via CD28H. *Nat Commun* 2013. 4:2043.
- 14 Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E. and Levin, S. D., The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor Nkp30 in humans. *J Exp Med* 2009. 206:1495-1503. 20
- 15 Wang, L., Rubinstein, R., Lines, J. L., Wasik, A., Ahonen, C., Guo, Y., Lu, L. F., Gondek, D., Wang, Y., Fava, R. A., Fiser, A., Almo, S. and Noelle, R. J., VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J Exp Med* 2011. 208:577-592. 30
- 16 Lines, J. L., Sempere, L. F., Wang, L., Panttazi, E., Mak, J., O'Connell, S., Ceeraz, S., Suriawinata, A. A., Yan, S., Ernstoff, M. S. and Noelle, R. J., VISTA is an immune checkpoint regulator for human T cells. *in revision (Cancer Research)*.
- 17 LeMercier, I., Lines, J. L., Sargent, P., Li, J., Noelle, R. J. and Wang, L., VISTA regulates the development of protective anti-tumor immunity. *in revision (Cancer Research)*. 40
- 18 Wolchok, J. D., Kluger, H., Callahan, M. K., Postow, M. A., Rizvi, N. A., Lesokhin, A. M., Segal, N. H., Ariyan, C. E., Gordon, R. A., Reed, K., Burke, M. M., Caldwell, A., Kronenberg, S. A., Agunwamba, B. U., Zhang, X., Lowy, I., Inzunza, H. D., Feely, W., Horak, C. E., Hong, Q., Korman, A. J., Wigginton, J. M., Gupta, A. and Sznol, M., 50

- Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013.369:122-133.
- 19 Iliopoulos, D., Kavousanaki, M., Ioannou, M., Boumpas, D. and Verginis, P., The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21. *Eur J Immunol* 2011.41:1754-1763.
- 20 Ansari, M. J., Salama, A. D., Chitnis, T., Smith, R. N., Yagita, H., Akiba, H., Yamazaki, T., Azuma, M., Iwai, H., Houry, S. J., Auchincloss, H., Jr. and Sayegh, M. H., The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 2003.198:63-69.
- 21 Bertisias, G. K., Nakou, M., Choulaki, C., Raptopoulou, A., Papadimitraki, E., Goulielmos, G., Kritikos, H., Sidiropoulos, P., Tzardi, M., Kardassis, D., Mamalaki, C. and Boumpas, D. T., Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009.60:207-218.
- 22 Prokunina, L., Castillejo-Lopez, C., Oberg, F., Gunnarsson, I., Berg, L., Magnusson, V., Brookes, A. J., Tentler, D., Kristjansdottir, H., Grondal, G., Bolstad, A. I., Svenungsson, E., Lundberg, I., Sturfelt, G., Jonsson, A., Truedsson, L., Lima, G., Alcocer-Varela, J., Jonsson, R., Gyllenstein, U. B., Harley, J. B., Alarcón-Segovia, D., Steinsson, K. and Alarcón-Riquelme, M. E., A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002.32:666-669.
- 23 Ozkaynak, E., Wang, L., Goodearl, A., McDonald, K., Qin, S., O'Keefe, T., Duong, T., Smith, T., Gutierrez-Ramos, J. C., Rottman, J. B., Coyle, A. J. and Hancock, W. W., Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *J Immunol* 2002.169:6546-6553.
- 24 Watson, M. P., George, A. J. and Larkin, D. F., Differential effects of costimulatory pathway modulation on corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006.47:3417-3422.
- 25 Podojil, J. R., Liu, L. N., Marshall, S. A., Chiang, M. Y., Goings, G. E., Chen, L., Langerman, S. and Miller, S. D., B7-H4 Ig inhibits mou

- se and human T-cell function and treats EAE via IL-10/Treg-dependent mechanisms. *J Autoimmun* 2013.44:71-81.
- 26 Sica, G.L., Choi, I.H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S.D., Tamura, H., Chapoval, A.I., Flies, D.B., Bajorath, J. and Chen, L., B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* 2003.18:849-861.
- 27 Wang, X., Hao, J., Metzger, D.L., Mui, A., Ao, Z., Verchere, C.B., Chen, L., Ou, D. and Warnock, G.L., B7-H4 induces donor-specific tolerance in mouse islet allografts. *Cell Transplant* 2012.21:99-111. 10
- 28 Yamaura, K., Watanabe, T., Boenisch, O., Yung, M., Yang, S., Magee, C.N., Padera, R., Datta, S., Schatton, T., Kamimura, Y., Azuma, M. and Najafian, N., In vivo function of immune inhibitory molecule B7-H4 in alloimmune responses. *Am J Transplant* 2010.10:2355-2362. 20
- 29 Yi, K.H. and Chen, L., Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol Rev* 2009.229:145-151.
- 30 Wang, X., Hao, J., Metzger, D.L., Ao, Z., Chen, L., Ou, D., Verchere, C.B., Mui, A. and Warnock, G.L., B7-H4 Treatment of T Cells Inhibits ERK, JNK, p38, and AKT Activation. *PLoS One* 2012.7:e28232.
- 31 Terawaki, S., Tanaka, Y., Nagakura, T., Hayashi, T., Shibayama, S., Muroi, K., Okazaki, T., Mikami, B., Garboczi, D.N., Honjo, T. and Minato, N., Specific and high-affinity binding of tetramerized PD-L1 extracellular domain to PD-1-expressing cells: possible application to enhance T cell function. *Int Immunol* 2007.19:881-890. 30
- 32 Sedy, J.R., Gavrieli, M., Potter, K.G., Hurchla, M.A., Lindsley, R.C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Murphy, T.L. and Murphy, K.M., B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 2005.6:90-98. 40
- 33 Parisi, S., Battista, M., Musto, A., Navarra, A., Tarantino, C. and Russo, T., A regulatory loop involving *Dies1* and *miR-125a* controls BMP4 signaling in mouse embryonic stem cells. *FASEB J* 2012.26:3957-3968.
- 34 Youngnak, P., Kozono, Y., Kozono, H., Iwai, 50

- H., Otsuki, N., Jin, H., Omura, K., Yagita, H., Pardoll, D.M., Chen, L. and Azuma, M., Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003. 307: 672 - 677.
- 35 Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H. and Freeman, G.J., Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the b7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007. 27: 111 - 122. 10
- 36 Sharpe, A.H. and Freeman, G.J., The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002. 2: 116 - 126.
- 37 Bartel P.L. et al. (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, D.A. Hartley, Ed., Oxford University Press, Oxford; pp 153 - 179. 20
- 38 Beranger F. et al. (1997) Getting more from the two-hybrid system: N-terminal fusions to LexA are efficient and sensitive baits for two-hybrid studies. *NAR* 25: 2035 - 36.
- 39 Formstecher E. et al. (2005) Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res.* 15: 37684.
- 40 Fromont-Racine M., Rain J.C., and Legrain P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* 16: 277 - 82. 30
- 41 Rain J.C. et al. (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409: 211 - 15.
- 42 Vojtek A. and Hollenberg S.M. (1995) Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol.* 255: 33142.
- 43 Wojcik J., Boneca I.G., and Legrain P. (2002) Prediction, assessment and validation of protein interaction maps in bacteria. *J. Mol. Biol.* 323: 763 - 70. 40

【0937】

V S I G 8 配列

配列番号1: ヒトV S I G 8 ポリペプチド配列

1 mrvggafhll lvclspalls avringdgqe vlylaegdnv rlgcpyvldp edygpngldi
 61 ewmqvnsdpa hhrenvflsy qdkrinhgsl phlqqrvrfa asdpsqydas inlmnlqvsvd
 121 tatyecrvkk ttmatrkviv tvqarpavpm cwteghmtyg ndvvlkcyas ggsqplsykw
 181 akisghhppy ragsytsqhs yhselsyqes fhssinqgln ngdlvlkdis raddglyqct
 241 vannvgysvc vvevkvsdsr rigviigivl gslalgccla vgiwglvccc cggsgaggar

50

301 gafgynggg vgggacgdl seiredavap gckasgrgsr vthllgyptq nvsrslrrky
 361 apppcggped valapctaaa aceagpspvy vkvksaepad caegpvqckn gllv

配列番号 2 : ハツカネズミ V S I G 8 ポリペプチド配列

1 mgvrgalhll lvclspalls avringdgqe vmylaegdnv rlgcpylldp edlgtnsldi
 61 ewmqvnseps hrenvfltyq dkrihgnlp hlqqrvrfaa sdpsqydasi nlmnlqvsdt
 121 atyecrvkkt tmatrkvivt vqarpavpmc wteghmskgn dvvlkcfang gsqlsykwa
 181 kisghshpyr agayhsqhsf hselsyqesf hstinqglgn gdlllkgina dddglyqctv
 241 anhvgysscv vevkvsdsqr vgmivgavlg slmlaclal giwglliccc ggggaggarg
 301 afgyvgggv gggacgdla eirvdaeapg ckasgrgsrv thllgyptqn vsrslrrkya
 361 pppcggpedv alvprtasas ceagpspvyi kvksaepadc adcaqveqrs ckdgliv

10

//

配列番号 3 : カニクイザル V S I G 8 ポリペプチド配列

1 mgvvggafhll lvclspalls avringdgqe vlylaegdnv rlgcpyvldp edygpngldi
 61 ewmqvnsdpa hhrenvflsy qdkrinhgnl phlqqrvrfa asdpsqydasi inlmnlqvsvd
 121 tatyecrvkk tmatrkviv tvqarpavpm cwteghmthg ndvvlkcyang gsqlsykw
 181 akisghhypy ragsytsqhs yhselsyqes fhssinqlgn ngdlvlkdis raddglyqct
 241 vannvgysscv vevkvsdsr rigviigail gsllalgcla vgiwglvccc cggsgaggar
 301 gafgynggg vgggacgdl seiredavap gckasgrgsr vthllgyptq nvsrslrrky
 361 apppcggpen valapctaaa aceagpspvy vkvksaepad caegpvqckn gllv

20

//

配列番号 4 : ヒト V S I G 8 核酸配列

1 agacggagga aacaccgagc ctagagacat gagagtggga ggagcattcc accttctact
 61 cgtgtgctg agcccagcac tgctgtctgc tgtgcggatc aacggggatg gacaggaggt
 121 cctgtacctg gcagaagggt ataattgtgag gctgggctgc ccctacctcc tggaccctga
 181 ggactatggt cccaatgggc tggacatcga gtggatgcag gtcaactcag accccgccc
 241 ccaccgagag aacgtgttcc ttagttacca ggacaagagg atcaacctatg gcagccttcc
 301 ccatctgcag cagaggggtcc gctttgcagc ctacagacca agccagtacg atgcctccat
 361 caacctcatg aacctgcagg tatctgatac agccacttat gaggccggg tgaagaagac
 421 caccatggcc acccgaagg tcatgtcac tgtccaagca cgacctgcag tgccatgtg
 481 ctggacagag ggccacatga cataatggcaa cgatgtggtg ctgaagtgtc atgccagtgg
 541 gggctcccag cccctctcct acaagtgggc caagatcagt gggcaccatt acccctatcg
 601 agctgggtct tacacctccc agcacagcta ccaactcagag ctgtcctacc aggagtccct
 661 ccacagctcc ataaaccaag gcctgaacaa tggggacctg gtgttgaagg atatctccag
 721 agcagatgat gggctgtatc agtgcacagt ggccaacaac gtgggctaca gtgtttgtgt
 781 ggtggagggtg aaggctctcag actcccggcg tataggcgtg atcatcggca tctctctggg
 841 ctctctgctc gcgctgggct gcctggccgt aggcattctgg gggctcgtct gctgctgctg
 901 cgggggctcc ggggctggcg gcgcccggcg tgccttcggc tacggcaacg gcggcgggggt
 961 cggcggaggg gcctgcggcg acttggctag tgagatcaga gaggacgccg tggcggccgg
 1021 gtgcaaggcc agcgggcgcg gcagccgct caccacctc ctggggtacc cgacgcagaa
 1081 cgtcagccgc tccctgcgcc gcaagtacgc gcctcccc tgcggcggcc ccgaggacgt
 1141 ggccctggcg ccctgcaccg ccgcccggcg ctgcgaagcg ggccctccc cggctctacgt
 1201 caaggtcaag agcgcggagc cggctgactg cggcggggg ccggtgcagt gcaagaacgg
 1261 cctcttgggt tgagcgcgcg cgccgggccc ggctgcgccc cagccaggag gagggcgagg
 1321 ggctctctgt ctgcagctgg ggacacgtcg gggctgggga cgacctcgtc cgccccaggc
 1381 tgccaggcgg ctgggggtga aggcatttcc ctaaggaaat gcgtagggag gcagagc

30

40

配列番号 5 : ハツカネズミ V S I G 8 核酸配列

1 gactcattgc atcttctcgc caccggggc agtgtctggg ccctccgctc cccctccctc
 61 cacctgcccc tccaccac caccaccagc ccaactggagc ccagctcagg cggaggaaag
 121 accaagccta gagacatggg agttcgagga gcactccatc ttctacttgt gtgcctgagc
 181 ccagcactgt tctctgctgt aaggatcaac ggggatggcc aggaggtcat gtacctggca

50

241 gaaggtgaca atgtgaggct aggctgtccc tacctcctgg atcctgagga tttgggtacc
 301 aacagtctgg acattgagtg gatgcaagtc aactcagagc cctcacacag ggagaatggt
 361 tttcttactt atcaagacaa gaggataggc catggcaacc tccccatct gcagcagagg
 421 gtccgcttg cagcctcaga cccagccag tacgatgcct ccatcaacct catgaacctg
 481 caggtatctg acacagcaac ctatgagtgc cgggtgaaga agaccacat gccaccagg
 541 aaggtcattg tcactgtcca agcacgtcct gcggtgccca tgtgtggac ggaaggccac
 601 atgtcaaagg gcaacgatgt ggtgctgaag tgctttgcca acggaggctc tcagcccctc
 661 tcctacaagt gggccaagat cagtgggcac agtcaccct accgagctgg ggcttaccac
 721 tcacagcaca gcttccactc tgagctttct taccaagagt cattccacag caccatcaac
 781 caaggcctgg gcaacggaga cctgctgttg aaggcatca acgcagacga cgatgggctg
 841 tatcagtgca cagtggccaa ccatgtgggc tacagcgtct gtgtggtaga ggtgaaagtc
 901 tcagactccc agcgagtagg catgatcgtt ggagcagtgc tgggctcttt gctcatgctg
 961 gcctgcctgg cactaggcat ctgggggctc atctgctgct gctgaggagg cggcggggcc
 1021 ggtggtgccc gaggtgcctt cggctacggg gtcggcggcg gggcggcg aggggcctgc
 1081 ggcgacttg ctagtgagat cagagtggac gccgaggcgc ccgggtgtaa ggccagcggg
 1141 cgcgagcacc gcgtcaccca cctcctgggg taccggcgc agaacgtcag ccgctccagg
 1201 cgccgcaagt acgcgcctcc gccctgcggc ggccccgagc acgtggccct agtgcctccg
 1261 accgcctccg cctcctgcga agcgggtccc tccccgtct acatcaaggc caagagcgcg
 1321 gagccggccg actgcccga ctgtgccag gtcgagcagc gctcgtgcaa ggacggcctc
 1381 ttagtgtgag cgcacagcac cgggctgctc cccggctggg aggtggttcg ggggctctct
 1441 gcccgcagct ggggacaggt tcgggcccagc agacctggct ctctcattgg ccacctagcg
 1501 gtggtaaagga aatttccctc tgagaagcca agccgggcag accctcctcc cctgtagtgg
 1561 gaggagaggc gggggagaca gaaaacagtt cagagctctc cctcacccct ggtttccagg
 1621 gagaggaagg gagaggagag ctgtcggtat cccagaaccg cagaggtaca acccagatgt
 1681 cccagccaa ggcgagggcc cccagccct gggtaggtgg atgtcagggc tgaattgctc
 1741 tgtgtgtgag atctgagctc caaggcaaca gtgttagcac aataaagaaa cttaaagact
 1801 gg

10

20

配列番号6：ヒトVISTA(代替名：B7-H5; B7H5; DD1; GI24; P2135; SISP1)アミノ酸配列

1 mgvptaleag swrwgsllfa lflaaslgpv aafkvatpys lyvcpegqnv tltrllgpv
 61 dkghdvtfyk twyrssrgev qtcserpir nltfqlhllh hgghqaants hdlarhgle
 121 sasdhgnfs itmrltllid sglycclvve irhhhseherv hgamelqvqt gkdapsncvv
 181 ypsssqdsen itaaalatga civgilclpl illlvykqrq aasnrraqel vrmdsniqgi
 241 enpgfeaspp aqgipeakvr hplsyvaqrq psesgrhlls epstplsppg pgdvffpsld
 301 pvpdspnfev i

30

配列番号7：ハツカネズミVISTAアミノ酸配列

1 mgvpavpeas sprwgtllla iflaasrglv aafkvttpps lyvcpegqna tltrilgpv
 61 skghdvtiyk twylssrgev qmckehrpri nftlqlhllh gshlkanash dppqkhglel
 121 asdhgnfsi tlrnvtprds glycclviel knhhpeqrfy gsmelqvqag kgsstcmas
 181 neqdsdsita aalatgaciv gilclplill lvykqrqvas hrraqelvrmsntqgienp
 241 gfettppfq gmpeaktrpp lsyvaqrqps esgryllsdp stplspppgd vffpsldpvp
 301 dspnseai

40

配列番号8：ハツカネズミVISTAアミノ酸配列

1 mgvpavpeas sprwgtllla iflaasrglv aafkvttpps lyvcpegqna tltrilgpv
 61 skghdvtiyk twylssrgev qmckehrpri nftlqlhllh gshlkanash dppqkhglel
 121 asdhgnfsi tlrnvtprds glycclviel knhhpeqrfy gsmelqvqag kgsstcmas
 181 neqdsdsita aalatgaciv gilclplill lvykqrqvas hrraqelvrmsntqgien
 241 pgfettppfq gmpeaktrpp lsyvaqrqps esgryllsdp stplspppgd dvffpsldpv
 301 pdsnseai

配列番号9：ヒトVISTA(代替名：B7-H5; B7H5; DD1; GI24; P

50

P 2 1 3 5 ; S I S P 1) 核酸配列

1 gggggcgggt gcctggagca cggcgcctggg gccgcccgc ggcctcactc gctcgcactc
 61 agtcgcggga ggcttccccg cgccggccgc gtcccggccg ctccccggca ccagaagttc
 121 ctctgcgct cggacggcga catgggcgtc cccacggccc tggaggccgg cagctggcgc
 181 tgggatccc tgctcttcgc tctcttctg gctgcgtccc taggtccggt ggcagccttc
 241 aaggctgcca cgccgtattc cctgtatgtc tgtcccagg ggcagaacgt caccctcacc
 301 tgcaggctct tgggccctgt ggacaaaggg cacgatgtga ccttctacaa gacgtggtac
 361 cgcagctcga ggggcgaggt gcagacctgc tcagagcgcc ggcccatccg caacctcacg
 421 ttccaggacc ttcacctgca ccatggaggc caccaggctg ccaacaccag ccacgacctg
 481 gctcagcgcc acgggctgga gtcggcctcc gaccaccatg gcaacttctc catcaccatg 10
 541 cgcaacctga ccctgctgga tagcggcctc tactgctgcc tggtggtgga gatcaggcac
 601 caccactcgg agcacagggt ccatggtgcc atggagctgc aggtgcagac aggcaaagat
 661 gcaccatcca actgtgtggt gtaccatcc tcctcccagg atagtgaana catcacggct
 721 gcagccctgg ctacgggtgc ctgcatcgtg ggaatcctct gcctccccct catcctgctc
 781 ctggcttaca agcaaaggca ggcagcctcc aaccgccgtg cccaggagct ggtgcggatg
 841 gacagcaaca ttcaagggat tgaanaacccc ggcttgaag cctcaccacc tggccagggg
 901 ataccggagg ccaaagtcag gcaccccctg tcctatgtgg cccagcggca gccttctgag
 961 tctgggcggc atctgctttc ggagcccagc acccccctgt ctctccagg ccccgagac
 1021 gtcttcttcc catccctgga ccctgtccct gactctcaa actttgagg catctagccc
 1081 agctggggga cagtgggctg ttgtggctgg gctcggggca ggtgcatctg agccagggct 20
 1141 ggctctgtga gtggcctcct tggcctcggc cctggttccc tccctcctgc tctgggctca
 1201 gatactgtga catcccagaa gccagcccc tcaacccctc tggatgtac atgggatgc
 1261 tggacggctc agccccgtt ccaaggattt tggggtgctg agattctccc ctagagacct
 1321 gaaattcacc agctacagat gccaaatgac ttacatctta agaagtctca gaacgtccag
 1381 cccttcagca gctctcgttc tgagacatga gccttgggat gtggcagcat cagtgggaca
 1441 agatggacac tgggccaccc tcccaggcac cagacacagg gcacggtgga gagacttctc
 1501 ccccgtaggc gccttggctc ccccgttttg cccgaggctg ctcttctgtc agacttctc
 1561 tttgtaccac agtggctctg gggccaggcc tgcctgcca ctggccatcg ccaccttccc
 1621 cagctgcctc ctaccagcag ttctctgaa gatctgtcaa caggtaagt caatctgggg
 1681 ctccactgc ctgcatcca gtcccagag ctgtgtggtc ccgaaacggg aagtacatat 30
 1741 tggggcatgg tggcctccgt gagcaaatgg tgtcttgggc aatctgagg caggacagat
 1801 gttgcccac ccactggaga tggctctgag ggaggtaggt gggcccttct ggggaaggta
 1861 gtggagagg gcacctgcc cccgccctcc ccatccccta ctcccactgc tcagcgggg
 1921 ccatgcaag ggtgccacac aatgtctgt ccacctggg aacttctga gtatgaagcg
 1981 gtagctatt aaaaactaca tggggaaca ggtgcaaac ctggagatgg attgtaagag
 2041 ccagtttaa tctgactct gctgtcctc cccaccccc accttccact ccatacaatc
 2101 tggccctggt ggagtcttcg ctccagagcc attcggccag gtgcgggtga tgttcccatc
 2161 tctgcttgt gggcatgcc tggctttgtt ttatacaca taggcaagg gagtctctg
 2221 tggaaattgt attgaaggat tttaaagcag gggaggagag tagggggcat ctctgtacac
 2281 tctgggggta aaacaggga ggagtgct gagcatggg acaggtagg tgggctggg 40
 2341 cagaccccc gtagcgttta gcaggatgg ggccccagg actgtggaga gcatagtcca
 2401 gcctgggcat ttgtctccta gcagcctaca ctggctctgc tgagctgggc ctgggtgctg
 2461 aaagccagga ttgggggcta ggcgggaaga tgttcgcca attgcttggg ggggtggggg
 2521 gatggaaaag gggagcacc ctaggctgcc tggcagcagt gagccctggg cctgtggcta
 2581 cagccaggga accccacctg gacacatgg cctgcttcta agccccag ttaggcccac
 2641 aggaatggtc cactgagggc ctctgctct gcctgggctg ggccaggggc tttgaggaga
 2701 gggtaaacat agggccggag atggggctga cactcgagt ggccagaata tggccaaacc
 2761 ccggcttctc cctgttccc aggcagagg gggctccttc tttgttccc tctggtcacc
 2821 acaatgcttg atgccagctg ccataggaag agggctgctg ctggccatgg tggcacacac
 2881 ctgtcctccc agcactttgc agggctgagg tggaggacc gcttaagccc aggtgttcaa 50

2941 ggctgctgtg agctgtgttc gagccactac actccagcct ggggacggag caaaactttg
3001 cctcaaaaca aat t t t aaaa agaaagaaag aaggaaagag ggtatgtttt tcacaattca
3061 tgggggcctg catggcagga gtggggacag gacacctgct gt t cctggag t cgaaggaca
3121 agcccacagc ccagattccg gt t c t c c c a a c t c a g g a a g a g c a t g c c c t g c c c t c t g g g g
3181 aggctggcct ggccccagcc ct c a g c t g c t g a c c t t g a g g c a g a g a c a a c t t c t a a g a a t
3241 t t g g c t g c c a g a c c c c a g g c c t g g c t g c t g c t g t g t g g a g a g g g a g g c g g c c c g c a g c a g
3301 aacagccacc gcacttcctc ct c a g c t t c c t c t g g t g c g g c c c t g c c c t c t c t t c t g g
3361 acccttttac aactgaacgc atctgggctt cg t g g t t t c c t g t t t t c a g c g a a a t t t a c t
3421 ctgagctccc agttccatct tcatccatgg ccacaggccc tgcctacaac gcactaggga
3481 cgtccctccc t g c t g c t g c t g g g g a g g g g c a g g c t g c t g g a g c c c c t c t g a g t t g c c c
3541 gggatggtag tgctctgat gccagccctg gtggctgtgg gctgggggtgc atgggagagc
3601 tgggtgcgag aacatggcgc ctccaggggg cgggaggagc actaggggt ggggcaggag
3661 gctcctggag cgctggattc gtggcacagt ctgaggccct gagagggaaa tccatgcttt
3721 taagaactaa ttcatgttta ggagatcaat caggaattag gggccatctt acctatctcc
3781 tgacattcac agtttaatag agacttcctg cctttattcc ctcccaggga gaggctgaag
3841 gaatggaatt gaaagcacca t t t g g a g g g t t t g c t g a c a c a g c g g g g a c t g c t c a g c a c
3901 tccctaaaaa cacacatgg aggccactgg tgactgtctgg tgggcaggct ggccctgcct
3961 gggggagtcc gtggcgatgg gcgctgggggt ggaggtgcag gagccccagg acctgctttt
4021 caaaagactt ctgcctgacc agagctcca ctacatgcag tggcccaggg cagaggggct
4081 gatacatggc c t t t t t c a g g g g t g c t c c t c g c g g g g t g g a c t t g g g a g t g t g c a g t g g g
4141 acagggggct gcaggggtcc t g c c a c c a c c g a g c a c c a a c t t g g c c c c t g g g t c c t g c c
4201 tcatgaa t g a g g c t t c c c c a g g g c t g g c t g a c t g t g c t g g g g g c t g g g t t a a c g t t t t
4261 ct c a g g g a a c c a c a a t g c a c g a a a g a g g a a c t g g g g t g c t a a c c a g g a t g c t g g g a a c a
4321 aaggcctctt gaagcccagc cacagcccag ctgagcatga ggcccagccc atagacggca
4381 caggccacct ggcccat t c c t g g g c a t t c c c t g c t t t g c a t t g c t g c t t c t c t t c a c c c
4441 catggaggct atgtcacct aactatcctg gaatgtgttg agagggattc tgaatgatca
4501 atatagcttg gtgagacagt gccgagatag atagccatgt ctgccttggg cacgggagag
4561 ggaagtggca gcatgcatgc t g t t t c t t g g c c t t t c t g t t a g a a t a c t t g g t g c t t t c c
4621 aacacacttt cacatgtgtt gtaactgtt tgatccacc ccttccctga aaatcctggg
4681 aggttttatt gctgccattt aacacagagg gcaatagagg ttctgaaagg tctgtgtctt
4741 gtcaaaacaa gtaaacggtg gaactacgac taaa

10

20

30

//

配列番号10：ヒトVISTA(代替名：B7-H5；B7H5；DD1；GI24；PP2135；SISP1)コード核酸配列

1 ctgcccgcg t g a g c c g c c t c g g g a c g g a g c c a t g c g g c g c t g g g c c t g g g c c g c g g t c g
61 t g g t c c c c c t c g g g c c g c a g c t c g t g c t c c t c g g g g g c g t c g g g g c c c g g c g g g a g g c a c
121 a g a g g a c g c a g c a g c c t g g c c a g c g c g c g c a g a t c c c c c c a a c g c c a c c g c c a g c g c t c c t
181 c c c g c g a g g g g c t g c c c g a g g c c c c a a g c c a t c c c a g g c c t c a g g a c c t g a g t t c t c c g
241 a c g c c c a c a t g a c a t g g c t g a a c t t t g t c c g g c g c c g g a c g a c g g c g c c t t a a g g a a g c
301 g g t g c g g a a g c a g g g a c a a g a a g c c g c g g g a t c t c t t c g g t c c c c a g g a c c t c c a g g t g
361 c a g a a g t g a c c g c g g a g a c t c t g c t t c a c g a g t t t c a g g a g c t g c t g a a a g a g g c c a c g g
421 a g c g c c g g t t c t c a g g g c t t c t g a c c c g c t g c t g c c c a g g g g c g g g c t g c g g g c t g g
481 t g g g c g a g g c c t t t c a c t g c c g g c t g c a g g t c c c c g c c g g t g g a c a a g c g g a c g c t g g
541 t g g a g c t g c a t g g t t t c c a g g c t c c t g c t g c c c a a g g t g c c t t c c t g c g a g g c t c c g g t c
601 t g a g c c t g g c c t c g g g t c g g t t c a c g g c c c c g t g t c c g g c a t c t t c c a g t t c t c t g c c a
661 g t c t g c a c g t g g a c c a c a g t g a g c t g c a g g g c a a g g c c c g g c t g c g g g c c c g g g a c g t g g
721 t g t g t g t t c t c a t c t g t a t t g a g t c c c t g t g c c a g c g c c a c a c g t g c c t g a g g c c g t c t
781 c a g g c c t g g a g a g c a a c a g c a g g g t c t t c a c g c t a c a g g t g c a g g g g c t g c t g c a g c t g c
841 a g g c t g g a c a g t a c g c t t c t g t g t t g t g g a c a a t g g c t c c g g g g c c g t c c t c a c c a t c c
901 a g g c g g g c t c c a g c t t c t c c g g g c t g c t c c t g g g c a c g t g a g g c g c c c a g g g g g c t g g

40

50

961 cgaggagctg ccgccgatc ccggggacc cctactgat gcccggtggtc accacaataa
 1021 agagccctcc accctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

//

配列番号 11 : ハツカネズミ VISTA コード核酸配列

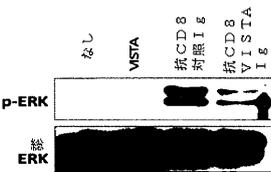
1 ctgcccgcg tgcgcccct cgggacggag ccatgcccgc ctgggcctgg gccgcggtcg
 61 tggccccct cgggccgcag ctctgtctcc tcgggggctg cggggcccgg cgggaggcac
 121 agaggacgca gcagcctggc cagcgcgcag atcccccaa gccaccgcc agcgcgtcct
 181 cccgcgagg gctgcccgag gcccccaagc catcccaggc ctacggacct gagttctccg
 241 acgcccacat gacatggctg aactttgtcc ggcggccgga cgacggcgcc ttaaggaagc
 301 ggtgcggaag cagggacaag aagccgcggg atctcttcgg tccccagga cctccaggtg
 361 cagaagtgac cgcggagact ctgcttcacg agtttcagga gctgctgaaa gaggccacgg
 421 agcgcgggtt ctacggcctt ctggaccgcc tgcctgcccc gggggcgggc ctgcccgtgg
 481 tgggcgaggc ctttactgct cggctgcagg gtccccgcc ggtaggacaag cggacgctgg
 541 tggagctgca tggtttccag gctcctgctg ccaagggtgc ctctctgcga ggctccggtc
 601 tgagcctggc ctccgggtcgg ttacagggccc ccgtgtccgg catcttccag ttctctgcca
 661 gctctgcagt ggaccacagt gagctgcagg gcaaggcccc gctgcggggc cgggacgtgg
 721 tgtgtgttct catctgtatt gagtccctgt gccagcgcca cacgtgcctg gaggccgtct
 781 caggcctgga gagcaacagc agggctctca cgctacaggg gcaggggctg ctgcagctgc
 841 aggcctggaca gtacgcttct gtgtttgtgg acaatggctc cggggccgtc ctaccatcc
 901 aggcgggctc cagcttctcc gggctgctcc tgggcacgtg agggcgccca ggggggctgg
 961 cgaggagctg ccgccgatc ccggggacc cctactgat gcccggtggtc accacaataa
 1021 agagccctcc accctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

10

20

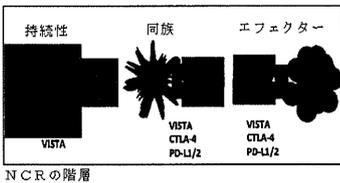
//

【 図 1 】

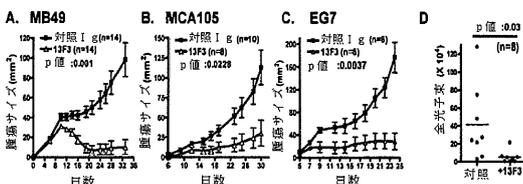


VISTAはTCRが誘発する初期のT細胞の活性化を阻害する。T細胞を単離し、αCD3⁺/−対照I gまたはVISTA-I gとともに10日間培養した。総ERK、及びホスホERK (phosphor-ERK) を検出した。

【 図 2 】

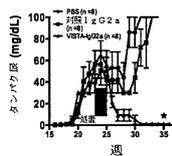


【 図 3 】



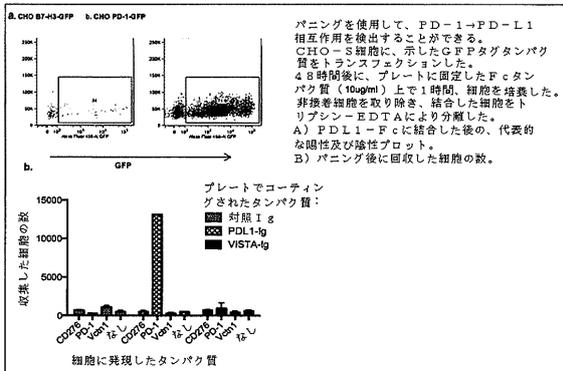
マウスを、A. MB49、B. MCA105、もしくはC. EG7腫瘍細胞を皮下投与、またはD. ID8シシフェラーゼ腫瘍細胞を腹腔内投与するかのいずれかで播種し、1日目から開始して隔日で、VISTA mab 13F3 (300 μg) で処置した。皮下の腫瘍増殖を監視した。ID8シシフェラーゼ腫瘍に関して、Xenogen IVISを使用して30日目にマウスを撮像した。

【 図 4 】



mVISTA-I gG2aによる治療効果は、SLEモデルにおける腎臓の損傷を抑制させ、生存を延ばす。NZBWF1マウスを、週毎24から25日、150 μgの対照I gG2a、または150 μgのmVISTA-I gG2aにより、治療を3日毎に行った。腎臓の重さをタンパク質濃度で毎週監視した。グループあたり6匹の動物の平均±標準偏差としてデータを示し、これは3つの実験を代表するものである。対照I gG2aとmVISTA-I gG2aとの統計的有意性: p = 0.0156 (対応のないマン-ホイットニー検定)。VISTAで処理したマウス6匹のうち5匹が生存したのに対し、PBSまたはI gG2aで処理したマウスの生存はゼロだった。

【 図 5 】



パニングを使用して、PD-1→PD-L1相互作用を検出することができる。CHO-S細胞に、示したGFPタグタンパク質をトランスフェクションした。48時間後に、プレートに固定したFcタンパク質 (10 μg/ml) 上で1時間、細胞を培養した。非接着細胞を取り除き、結合した細胞をトリプシン-EDTAにより分離した。A) PD-L1-Fcに結合した後の、代表的な陽性及び陰性プロット。B) パニング後に回収した細胞の数。

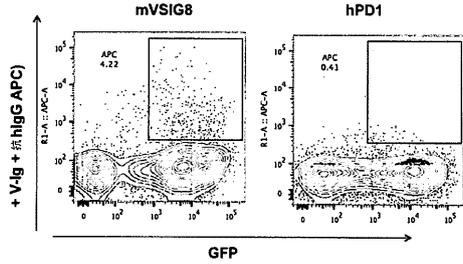
プレートでコーティングされたタンパク質:
 ■ 対照I g
 ■ PD-L1-Ig
 ■ VISTA-Ig

回収した細胞の数

細胞に発現したタンパク質

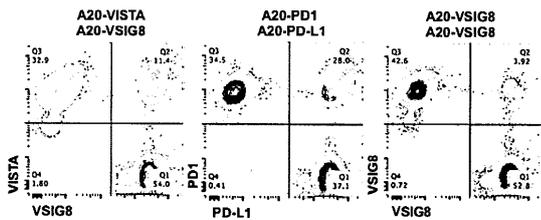
【 図 1 0 】

マウスとヒトVSIG8は86%の相同性であるため、ヒトVISTA-IgがマウスVSIG8に優先的に結合可能かどうかを確認したかった。293細胞をマウスVSIG8またはPD1でトランスフェクションし、上記のようにヒトVISTA-Ig (R&D systems) で染色した。VISTA-IgとmVSIG8の間には少量の結合も認められたが、VISTA-IgとPD1の間には結合は観察することができなかった(図8)。



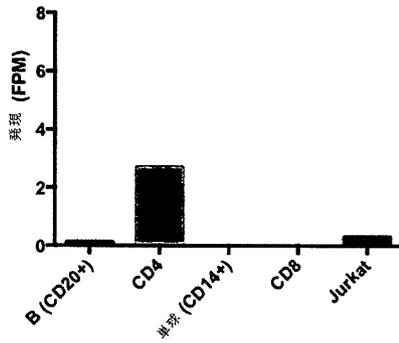
VISTA-Igが、マウスVSIG8を過剰発現する細胞に結合する能力が低いことを示す。293細胞をマウスVSIG8またはPD1でトランスフェクションし、VISTA-Igで染色した。mVSIG8群からのGFP陽性細胞の小集団が、PD1対照群と比較してVISTA-Igにより結合された。

【 図 1 1 】



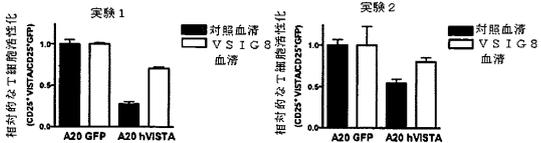
VISTAを過剰発現する細胞がVSIG8を過剰発現する細胞にコンジュゲートする。A20細胞をVISTA、VSIG8、PD-L1またはPD1でトランスフェクションし、蛍光染料で標識した。細胞を共に培養し、フローサイトメトリーにより細胞のコンジュゲーション、即ち各細胞集団の結合を確認した。二重陽性細胞は、コンジュゲーションの程度を示す。VSIG8/VSIG8を陰性対照として使用し、PD1/PD-L1を陽性対照として使用した。

【 図 1 3 】



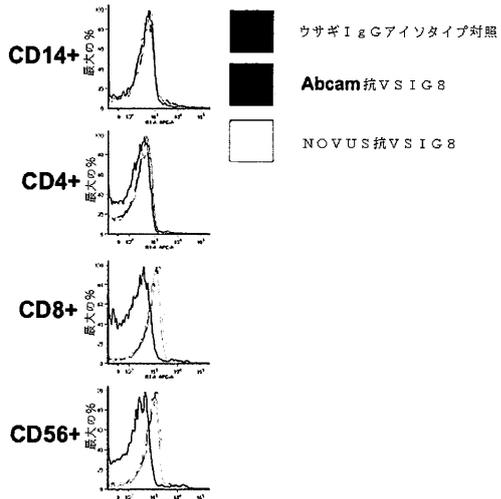
VSIG8 mRNAはヒトCD4及びCD8 T細胞内で発現する。ヒトPBMCをフローサイトメトリーにより単離し、mRNAの発現を、VSIG8のRNA配列分析により決定した。

【 図 1 4 】



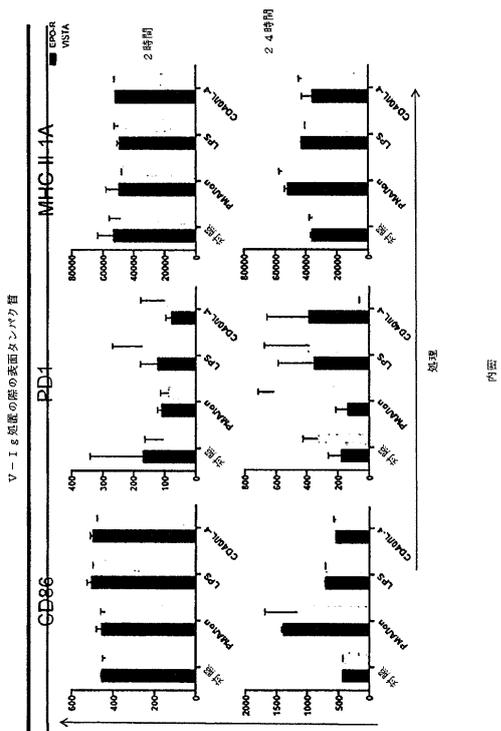
VISTAがVSIG8を介してT細胞にシグナル伝達し、T細胞の活性化を抑制する。GFP (対照) またはVISTA+GFPのいずれかを発現するA20細胞を、ISQペプチドの存在下においてDO11.10 T細胞とともにインキュベーションした。72時間の時点で、CD25の発現によりT細胞の活性化を測定した。

【 図 1 2 】



VSIG8に対する抗体は、CD8 T細胞とNK細胞に結合することができる。ヒトPBMCを単離し、市販されている2つの独自の抗VSIG8抗体 (Abcam and NOVUS) で染色した。CD14、CD4、CD8及びCD56のリネージ標を使用して、種々の免疫学的集団を同定した。

【 図 1 5 】



【 図 1 6 - 1 】

V S I G 8 遺伝子化学種のオルソログ

名称/遺伝子 ID	説明	位置	別名	標動物
391123 VSI G8 ID: 391123	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Homo sapiens (ヒト)]	染色体1、NC_000001.11 (159854316..159862657、補体)		
289236 Vsig8 ID: 289236	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Rattus norvegicus (ノルウェーラット)]	染色体13、NC_005112.4 (90943255..90951443)	RGD1562464	
100683194 VSI G8 ID: 100683194	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Canis lupus familiaris (イヌ)]	染色体38、NC_006620.3 (22278668..22285444)		
745370 VSI G8 ID: 745370	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Pan troglodytes (チンパンジー)]	染色体1、NC_006468.3 (138192369..138199518、補体)		
106835742 VSI G8 ID: 106835742	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Equus asinus (ロバ)]			
106500502 VSI G8 ID: 106500502	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Apteryx australis mantelli]			
105996481 Vsig8 ID: 105996481	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Dipodomys ordii (オズカンガルーラット)]			
105862695 VSI G8 ID: 105862695	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Microcebus murinus (グレーマウスツツネザル)]			

【 図 1 6 - 3 】

名称/遺伝子 ID	説明	位置	別名	標動物
104993556 VSI G8 ID: 104993556	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Meleagris gallopavo (シチメンチョウ)]	染色体27、NC_016037.2 (1041082..1049762、補体)		
104914434 Vsig8 ID: 104914434	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Fukomys damarensis (ダマラランドデバネズミ)]			
104831387 VSI G8 ID: 104831387	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Haliaeetus leucoccephalus (ハクトウワシ)]			
104660417 VSI G8 ID: 104660417	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Rhinopithecus roxellana (ゴールデンモンキー)]			
V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Balaenica regulorum gibbericeps (東アフリカホオジロカンムリヅル)]				
104627215 VSI G8 ID: 104627215	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Phaethon lepturus (シラオネツタイチョウ)]			
104570070 VSI G8 ID: 104570070	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Tinamus guttatus (ノドジロシギダチョウ)]			
104559501 VSI G8 ID: 104559501	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Colinus striatus (チャイロネズミドリ)]			
104522716 VSI G8 ID: 104522716	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Caprimulgus carolinensis (チャクワイルヨウガカ)]			
104388494 VSI G8 ID: 104388494	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Chaetura pelagica (セントツマツバメ)]			

【 図 1 6 - 2 】

名称/遺伝子 ID	説明	位置	別名	標動物
105824470 VSI G8 ID: 105824470	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Propithecus coquereli (コケレルシファカ)]			
105532289 VSI G8 ID: 105532289	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Mandrillus leucophaeus (ドリル)]			
105522631 VSI G8 ID: 105522631	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Colobus angolensis palliatus]			
105498150 VSI G8 ID: 105498150	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Macaca nemestrina (ブタオマカク)]			
105414216 VSI G8 ID: 105414216	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Aquila chrysaetos canadensis]			
105086534 VSI G8 ID: 105086534	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Camelus dromedarius (ヒトコブラクダ)]			
105069585 VSI G8 ID: 105069585	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Camelus bactrianus (ブタコブラクダ)]			
104993556 VSI G8 ID: 104993556	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Bison (バイソン)]			

【 図 1 6 - 4 】

名称/遺伝子 ID	説明	位置	別名	標動物
104336212 VSI G8 ID: 104336212	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Opisthocomus hoazin]			
104282688 VSI G8 ID: 104282688	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Charadrius vociferus (ブタオビチドリ)]			
104254214 VSI G8 ID: 104254214	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Gavia stellata (アビ)]			
104160964 VSI G8 ID: 104160964	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Carliama cristata (アカノガンモドキ)]			
104139612 VSI G8 ID: 104139612	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Struthio camelus australis]			
104066229 VSI G8 ID: 104066229	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Cuculus canorus (カウコウ)]			
104012584 VSI G8 ID: 104012584	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Nipponia nippon (トキ)]			
103900558 VSI G8 ID: 103900558	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Aptenodytes forsteri (コウテイペンギン)]			
103740244 VSI G8 ID: 103740244	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Nannospalax gallii (Upper Gallilecメグラデバネズミ)]			
103672119 VSI G8 ID: 103672119	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Ursus maritimus (ホッキョクグマ)]	NW_007907182.1 (1184725..1200182)		
103587965 VSI G8 ID: 103587965	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Galeopterus variegatus (マレーヒヨケサル)]	NW_007726617.1 (326539..336095)		
103551145 VSI G8 ID: 103551145	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Equus przewalskii (セウコノウマ)]	NW_007673580.1 (620537..641725)		
103530519 VSI G8 ID: 103530519	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Calypte anna (アンナハチドリ)]	NW_007620349.1 (322046..323617)		
103530519 VSI G8 ID: 103530519	V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Eptesicus fuscus (オオグビワコウモリ)]	NW_007370750.1		

【 図 1 6 - 5 】

103297579
VSIg8
ID: 103297579

007247700.1
(1014686..1033263)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
103225863
VSIg8
ID: 103225863
NDメイン含有8
[Chlorocebus
sabaeus(ミド
リザル)] 染色体20、
NC_023661.1
(4091971..4098947)

選択項目 V-set
及び免疫
103202762
VSIg8
ID: 103202762
グロブリン
ドメイン含有8
[Orycteropus
 afer afer]
NW_006921780.1
(4091773..4099612、
補体)

選択項目 V-set
及び免疫
103120227
VSIg8
ID: 103120227
グロブリン
ドメイン含有8
[Erinaceus
 europaeus
(ヨーロッパ
バハリ
ネズミ)] NW_006804405.1
(1013441..1018794、
補体)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
103075747
VSIg8
ID: 103075747
ドメイン含有8
[Lepotes vexillifer
(ヨウスコウカ
ワイルカ)] NW_006788182.1
(195993..203589)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
103019621
VSIg8
ID: 103019621
ドメイン含有8
[Balaeoptera
 acutorostrata
 scammon]
NW_006725754.1
(2675383..2683360)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
102979316
VSIg8
ID: 102979316
ドメイン含有8
[Physeter
 calodon(マッコ
ウジラ)] NW_006724380.1
(118120..126348、
補体)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
102964438
VSIg8
ドメイン含有8
補体) NW_006711884.1
(1767019..1785253、
補体)

【 図 1 6 - 6 】

ID: 102964438

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
102929783
VSIg8
ID: 102929783
ドメイン含有8
[Chelonia mydas
(アオウ
ミガメ)] NW_006654175.1
(571930..579597)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
102927561
VSIg8
ID: 102927561
ドメイン含有8
[Peromyscus
 maniculatus
 bairdii(プレーリ
ーシロアシネズミ)] NW_006501506.1
(1068834..1076639、
補体)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
102886859
VSIg8
ID: 102886859
ドメイン含有8
[Pteropus alecto
(クロオオ
コウモリ)] NW_006443119.1
(3929174..3936521)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
102869101
VSIg8
ID: 102869101
ドメイン含有8
[Elephantulus
 edwardii
(ケープゾ
ウトガリネズミ)] NW_006399918.1
(4633616..4640782、
補体)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
102827385
VSIg8
ID: 102827385
ドメイン含有8
[Chrysochloris
 asiatica(ケープ
キンモグラ)] NW_006408560.1
(19577995..19585089、
補体)

選択項目 V-set及び
免疫グロブリン
102762102
VSIg8
ID: 102762102
ドメイン含有8
[Myotis davidii]
V-set
及び免疫グロ
ブリンドメイ
ン含有8
[Leptonychotes
 waddellii
(ウエッデル
アザラシ)] NW_006282378.1
(789664..806961) MDA_GLEAN10006609

選択項目 V-set
及び免疫グロ
ブリンドメイ
ン含有8
[Myotis davidii]
V-set
及び免疫グロ
ブリンドメイ
ン含有8
[Leptonychotes
 waddellii
(ウエッデル
アザラシ)] NW_006385546.1
(197273..205042)

【 図 1 6 - 7 】

102566476
VSIg8
ID: 102566476
V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
[Alligator
 mississippiensis
(アメリカア
リゲーター)]

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102541524
VSIg8
ID: 102541524
[Vicugna pacos
(アルパカ)] NW_005882922.1
(1545618..155891、
補体)

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102523890
VSIg8
ID: 102523890
[Camelus ferus
(野生フタコブラ
グダ)]

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102487146
VSIg8
ID: 102487146
[Tupaia
 chinensis
(チュウゴ
クツパイ)] TREES_T100018313

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102458738
VSIg8
ID: 102458738
[Pelodiscus
 sinensis
(チュウゴカ
スッポン)]

V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
[Myotis lucifugus
(トビロホオ
ヒゲコウモリ)]

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102411293
VSIg8
ID: 102411293
[Bubalus
 bubalis(スイギュウ)] NW_005784982.1
(2237442..2246379、
補体)

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102386603
VSIg8
ID: 102386603
[Alligator
 sinensis(ヨウスコウ
アリゲーター)] NW_005816895.1

【 図 1 6 - 8 】

102319092
VSIg8
ID: 102319092
V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
[Pantholops
 hodgsonii(チルー)] (31217..39393、
補体)

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102265975
VSIg8
ID: 102265975
[Bos mutus]
V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102249971
VSIg8
ID: 102249971
[Myotis
 brandtii(ブランドホオ
ヒゲコウモリ)] M91_03138

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102171473
VSIg8
ID: 102171473
[Capra
 hircus(ヤキ)] 染色体3、
NC_022295.1
(9249628..9255910)

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102123183
VSIg8
ID: 102123183
[Macaca
 fascicularis(カニク
イザル)] 染色体1、
NC_022272.1
(91813231..91839949)

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
102108474
VSIg8
ID: 102108474
[Pseudopodoces humilis
(ヒメサバクガラス)]

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
101990206
VSIg8
ID: 101990206
[Microtus
 ochrogaster(プレーリ
ーハタネズミ)]

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
101969069
VSIg8
ID: 101969069
[Citiodomys
 tridecemlineatus
(ジュウサンセン
ジリス)]

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
101951393
VSIg8
ID: 101951393
[Chrysemys (892706..900683)
 picta(ニシキガメ)] NW_007281607.1

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
101911659
VSIg8
ID: 101911659
[Falco
 peregrinus(ハヤブサ)]

選択項目 V-set及び免疫
グロブリンド
メイン含有8
101827428
VSIg8
ID: 101827428
[Mesocricetus auratus
(ゴールデンハムスター)]

【 図 1 6 - 9 】

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8
 101697042[┐] Vsig8 [Heterocephalus glaber (ハダカデバネズミ)]
 ID: 101697042

VSIG8 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8
 101674224 ハダカデバネズミ [Mustela putorius furo(ドメスティックフェレット)]

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Echinops telifali (スモールマダガスカルヘッジホッグ) (small Madagascar hedgehog)]
 101663482[┐] VSIG8
 ID: 101663482

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Condylyura cristata(ホシバナモグラ)]
 101627866[┐] VSIG8
 ID: 101627866

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Jaculus jaculus (レッサールエジプトビネズミ) (lesser Egyptian jerboa)]
 101605862[┐] Vsig8
 ID: 101605862

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Octodon degus (デグー)]
 101565541[┐] Vsig8
 ID: 101565541

V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Ochotona princeps (アメリカナキウサギ)]
 ID: 101527572

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Ceratothreum simum (ミナミシロサイ) (southern white rhinoceros)] VSIG8
 101387103[┐] LOC101387103
 ID: 101387103

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Odobenus rosmarus divergens (太平洋セイウチ) (Pacific walrus)]
 101377134[┐] VSIG8
 ID: 101377134

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Tursiops truncatus (ハンドウイルカ)] NW_004198036.1 (171624..179822)
 101332961[┐] VSIG8
 ID: 101332961

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Orcinus orca (シャチ)]
 101270104[┐] VSIG8
 ID: 101270104

【 図 1 6 - 1 0 】

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Ovis aries (ヒツジ)] 染色体1、NC_019458.1 (109195314..109203023、補体)
 101123344[┐] Vsig8
 ID: 101123344

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Felis catus (ドメスティックネコ)] 染色体F1、NC_018739.2 (65520231..65526427)
 101098428[┐] VSIG8
 ID: 101098428

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Papio anubis(アヌビスヒビ)] 染色体1、NC_018152.1 (133753171..133757411、補体)
 101009472[┐] VSIG8
 ID: 101009472

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Pan paniscus(ビグミーチンパンジー)] 染色体1、NC_027868.1 (139126959..139134922、補体)
 100971651[┐] VSIG8
 ID: 100971651

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Otomelur garnettii (コミミガラゴ)]
 100955994[┐] VSIG8
 ID: 100955994

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Sarcophilus harrisii (タスマニアデビル)]
 100916557[┐] VSIG8
 ID: 100916557

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Cricetulus griseus(チャイニーズハムスター)] NW_003613783.1 (1044024..1050052) 179_006491
 100771377[┐] Vsig8
 ID: 100771377

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Cavia porcellus(ドメスティックモルモット)]
 100727929[┐] Vsig8
 ID: 100727929

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Loxodonta africana(アフリカサバンナゾウ) (African savanna elephant)]
 100672638[┐] VSIG8
 ID: 100672638

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Nomascus leucogenys(キタホオジロテナガザル)] 染色体12、NC_019827.1 (42590722..42597668)
 100584000[┐] VSIG8
 ID: 100584000

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Anolis carolinensis (グリーンアノール)]
 100562394[┐] vsig8
 ID: 100562394

【 図 1 6 - 1 1 】

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Sus scrofa (ブタ)] 染色体4、NC_010446.4 (98638510..98646086)
 100514765[┐] VSIG8
 ID: 100514765

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Ailuropoda melanoleuca (ジャイアントパンダ)]
 100466626[┐] VSIG8
 ID: 100466626

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Pongo abelii (スマトラオランウータン)] 染色体1、NC_012591.1 (91524072..91532197)
 100444780[┐] VSIG8
 ID: 100444780

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8種 [Macaca mulatta (アカゲザル)] 染色体1、NC_007858.1 (138468417..138477576、補体)
 100423832[┐] LOC100423832
 ID: 100423832

V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Callithrix jacchus (シロミミマーモセット)] 染色体18、NC_013913.1 (13411498..13416017、補体)
 100403027

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Oryctolagus cuniculus(ウサギ)] 染色体13、NC_013681.1 (33263970..33274518)
 100346033[┐] VSIG8
 ID: 100346033

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Ornithorhynchus anatinus (カモノハシ)] NW_001699398.1 (10996..16291、補体)
 100090563[┐] VSIG8
 ID: 100090563

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Equus caballus (ウマ)] 染色体5、NC_009148.2 (37662328..37669027)
 100053565[┐] VSIG8
 ID: 100053565

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Monodelphis domestica (ハイイロジネズミオポッサム) (gray short-tailed opossum)] 染色体2、NC_008802.1 (166113517..166123267)
 100023434[┐] VSIG8
 ID: 100023434

選択項目 V-set及び免疫グロブリンドメイン含有8 [Trichechus manatus latirostris (フロリダマナティール)]
 101357103[┐] LOC101357103
 ID: 101357103

【配列表】

2018505911000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/64146																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395, C07K 16/46, A61K 38/16 (2016.01) CPC - C07K 2319/03, C07K 16/28, C07K 14/70503, A61K 39/3955 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) IPC(8) - A61K 39/395, C07K 16/46, A61K 38/16 (2016.01) CPC - C07K 2319/03, C07K 16/28, C07K 14/70503, A61K 39/3955 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/134.1, 424/85.7 Keyword Search; search terms below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, VISTA, VSIG8, VISTA-R, VISTA receptor, ECD, extracellular domain, Hippo pathway, T cell, agonist, antagonist ligand, interaction, multimer, oligomer, isolated complex, antibody development, binding protein, binding partner, FcR																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y — A</td> <td>US 2014/0056890 A1 (GURNEY et al.) 27 February 2014 (27.02.2014) para [0008], [0013], [0087], [0090], [0128], [0133], [0134], SEQ ID NO: 13</td> <td>38 — 39-40 — 1-11, 37</td> </tr> <tr> <td>Y — A</td> <td>US 5,478,925 A (WALLACH et al.) 26 December 1995 (26.12.1995) col 1 ln 63, col 2 ln 31, col 3 ln 33 US 2013/0177557 A1 (NOELLE et al.) 11 July 2013 (11.07.2013) Claim 53, para [0199], [0200]</td> <td>39-40 — 1-11, 37</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>LINES et al. VISTA is a Novel Broad-Spectrum Negative Checkpoint Regulator for Cancer Immunotherapy. 30 June 2014 (30.06.2014), Volume 2, Issue 6 pp 510-517. Figure 1.</td> <td>1-11, 37</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WANG et al. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. 07 March 2011 (07.03.2011) Volume 208 Issue 3 pp 577-592, page 588 col 2 para 3-4</td> <td>1-11, 37</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Fleis et al. Co-inhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4+ T cell mediated immunity. J Clin Invest. (1 May 2014) vol 124, no 5, pp1968-1975, pg 1969, para 2-3</td> <td>1-11, 37</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y — A	US 2014/0056890 A1 (GURNEY et al.) 27 February 2014 (27.02.2014) para [0008], [0013], [0087], [0090], [0128], [0133], [0134], SEQ ID NO: 13	38 — 39-40 — 1-11, 37	Y — A	US 5,478,925 A (WALLACH et al.) 26 December 1995 (26.12.1995) col 1 ln 63, col 2 ln 31, col 3 ln 33 US 2013/0177557 A1 (NOELLE et al.) 11 July 2013 (11.07.2013) Claim 53, para [0199], [0200]	39-40 — 1-11, 37	A	LINES et al. VISTA is a Novel Broad-Spectrum Negative Checkpoint Regulator for Cancer Immunotherapy. 30 June 2014 (30.06.2014), Volume 2, Issue 6 pp 510-517. Figure 1.	1-11, 37	A	WANG et al. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. 07 March 2011 (07.03.2011) Volume 208 Issue 3 pp 577-592, page 588 col 2 para 3-4	1-11, 37	A	Fleis et al. Co-inhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4+ T cell mediated immunity. J Clin Invest. (1 May 2014) vol 124, no 5, pp1968-1975, pg 1969, para 2-3	1-11, 37
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X — Y — A	US 2014/0056890 A1 (GURNEY et al.) 27 February 2014 (27.02.2014) para [0008], [0013], [0087], [0090], [0128], [0133], [0134], SEQ ID NO: 13	38 — 39-40 — 1-11, 37																		
Y — A	US 5,478,925 A (WALLACH et al.) 26 December 1995 (26.12.1995) col 1 ln 63, col 2 ln 31, col 3 ln 33 US 2013/0177557 A1 (NOELLE et al.) 11 July 2013 (11.07.2013) Claim 53, para [0199], [0200]	39-40 — 1-11, 37																		
A	LINES et al. VISTA is a Novel Broad-Spectrum Negative Checkpoint Regulator for Cancer Immunotherapy. 30 June 2014 (30.06.2014), Volume 2, Issue 6 pp 510-517. Figure 1.	1-11, 37																		
A	WANG et al. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. 07 March 2011 (07.03.2011) Volume 208 Issue 3 pp 577-592, page 588 col 2 para 3-4	1-11, 37																		
A	Fleis et al. Co-inhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4+ T cell mediated immunity. J Clin Invest. (1 May 2014) vol 124, no 5, pp1968-1975, pg 1969, para 2-3	1-11, 37																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																				
* 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 "I" 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 29 January 2016 (29.01.2016)		Date of mailing of the international search report 19 FEB 2016																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US 15/64146

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 12-38 and 41-51
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 モロイ, マイケル

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03748, エンフィールド, マーステン・レーン 11, ユニット 35

(72) 発明者 グオ, ヤリン

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03755, ハノーバー, キャンプ・ブルック・コモン 41

(72) 発明者 ロスシュタイン, ジェイ

アメリカ合衆国バーモント州05055, ノーウィッチ, エルム・ストリート 18

(72) 発明者 ローゼンツヴァイク, マイケル

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02116, ボストン, ファイエット・ストリート 20, アパートメント 2

Fターム(参考) 2G045 AA25

4B063 QA07 QQ08 QR48

4C084 AA17 BA01 BA02 BA22 CA53 DA45 NA14 ZB07 ZB11 ZB13

ZB26 ZB32

4C085 AA13 BB11 BB36 BB44 DD62 EE01

4H045 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA22 FA74