

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7118332号
(P7118332)

(45)発行日 令和4年8月16日(2022.8.16)

(24)登録日 令和4年8月5日(2022.8.5)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
請求項の数 21 (全212頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-552406(P2020-552406)	(73)特許権者	522176919
(86)(22)出願日	平成31年3月29日(2019.3.29)		ハミングバード・バイオサイエンス・ブ
(65)公表番号	特表2021-511818(P2021-511818		ライベート・リミテッド
	A)		シンガポール国シンガポール 1 1 7 5
(43)公表日	令和3年5月13日(2021.5.13)		8 6 , シンガポール・サイエンス・パー
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/058036		ク 2 , ジ・アリエス , ナンバー 0 4 - 0
(87)国際公開番号	WO2019/185879		1 / 1 1
(87)国際公開日	令和1年10月3日(2019.10.3)	(74)代理人	100118902
審査請求日	令和3年2月12日(2021.2.12)		弁理士 山本 修
(31)優先権主張番号	PCT/EP2018/058258	(74)代理人	100106208
(32)優先日	平成30年3月29日(2018.3.29)		弁理士 宮前 徹
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100196508
			弁理士 松尾 淳一
(31)優先権主張番号	1814562.3	(74)代理人	100187540
(32)優先日	平成30年9月7日(2018.9.7)		弁理士 國枝 由紀子
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 V I S T A 抗原結合性分子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

V I S T A に結合し、V I S T A 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗原結合性分子であって、

(i) 以下の C D R :

配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 2 9 5 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、抗原結合性分子。

【請求項 2】

配列番号 2 8 9 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 2 9 7 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域

を含む、請求項 1 に記載の抗原結合性分子。

【請求項 3】

以下のフレームワーク領域（FR）：

配列番号 63 のアミノ酸配列を有する HC - FR 1

配列番号 292 のアミノ酸配列を有する HC - FR 2

配列番号 293 のアミノ酸配列を有する HC - FR 3

配列番号 281 のアミノ酸配列を有する HC - FR 4

を組み込んだ VH 領域を含む、請求項 1 または 2 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4】

以下のフレームワーク領域（FR）：

配列番号 288 のアミノ酸配列を有する LC - FR 1

配列番号 298 のアミノ酸配列を有する LC - FR 2

配列番号 284 のアミノ酸配列を有する LC - FR 3

配列番号 47 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4

を組み込んだ VL 領域を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 5】

IgG4 の重鎖定常配列を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 6】

配列番号 211 の軽鎖定常配列を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 7】

(i) 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、および (ii) VISTA 以外の抗原に結合することが可能な抗原結合性分子を含む、抗原結合性分子。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子を含む、キメラ抗原受容体（CAR）。

【請求項 9】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、もしくは請求項 8 に記載の CAR をコードする、1 つの核酸または複数の核酸。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の 1 つの核酸または複数の核酸を含む、1 つの発現ベクターまたは複数の発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、請求項 8 に記載の CAR、請求項 9 に記載の 1 つの核酸もしくは複数の核酸、または請求項 10 に記載の 1 つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクターを含む、細胞。

【請求項 12】

請求項 9 に記載の 1 つの核酸もしくは複数の核酸、または請求項 10 に記載の 1 つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクターを含む細胞を、抗原結合性分子もしくは CAR の、核酸（複数可）または発現ベクター（複数可）からの発現に適する条件下で培養するステップを含む方法。

【請求項 13】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、請求項 8 に記載の CAR、請求項 9 に記載の 1 つの核酸もしくは複数の核酸、請求項 10 に記載の 1 つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、または請求項 11 に記載の細胞を含む、組成物。

【請求項 14】

VISTA 以外の免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤をさらに含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

がんまたは感染性疾患を処置するまたは防止する方法における使用のための医薬の製造

10

20

30

40

50

における、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、請求項 8 に記載の C A R、請求項 9 に記載の 1 つの核酸もしくは複数の核酸、請求項 10 に記載の 1 つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、請求項 11 に記載の細胞、または請求項 13 もしくは請求項 14 に記載の組成物の使用。

【請求項 16】

がんが、V I S T A を発現する細胞を含むがん、V I S T A を発現する細胞の浸潤を含むがん、V I S T A を発現するがん細胞を含むがん、血液がん、白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、B 細胞リンパ腫、T 細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、中皮腫、充実性腫瘍、肺がん、非小細胞肺癌、胃がん、胃癌、結腸直腸がん、結腸直腸癌、結腸直腸腺癌、子宮がん、子宮体内膜癌、乳がん、トリプルネガティブ浸潤性乳癌、肝がん、肝細胞癌、膵がん、膵管腺癌、甲状腺がん、胸腺腫、皮膚がん、黒色腫、皮膚黒色腫、腎がん、腎細胞癌、乳頭状腎細胞癌、頭頸部がん、頭頸部扁平上皮がん (S C C H N)、卵巣がん、卵巣癌、卵巣漿液性嚢胞腺癌、前立腺がん、および/または前立腺腺癌から選択される、請求項 15 に記載の使用。

10

【請求項 17】

方法が、V I S T A 以外の免疫チェックポイント阻害剤により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤の投与をさらに含む、請求項 15 または請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

V I S T A に結合した、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子を含む *i n v i t r o* 複合体。

20

【請求項 19】

V I S T A を含有するか、またはこれを含有することが疑われる試料を、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子と *i n v i t r o* において接触させるステップと、抗原結合性分子の、V I S T A との複合体の形成を検出するステップとを含む、V I S T A を検出するための方法。

【請求項 20】

対象を、V I S T A ターゲティング剤による処置のために選択または層別化するための組成物であって、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子を含む、前記組成物。

30

【請求項 21】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子を含む、*i n v i t r o* における診断または予後診断剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、それらの内容および要素が、参照によりそれらの全体において、全ての目的のために本明細書に組み込まれる、2018年3月29日に出願された、P C T / E P 2 0 1 8 / 0 5 8 2 5 8、2018年9月7日に出願された、G B 1 8 1 4 5 6 2 . 3、2018年11月5日に出願された、U S 1 6 / 1 8 0 , 9 4 9 からの優先権を主張する。

40

発明の分野

本発明は、分子生物学の分野に関し、より具体的には、抗体技術の分野に関する。本発明はまた、医学的な処置および予防の方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

免疫応答の、骨髄由来抑制細胞 (M D S C) 媒介性抑制は、複数の充実性腫瘍およびリンパ腫において同定されている。M D S C は、進行性結腸直腸がんにおいて上昇する (T o o r ら、F r o n t I m m u n o l .、2016、7 : 5 6 0)。M D S C はまた、乳がんにおいても観察され、M D S C の、末梢血中の百分率は、後期乳がんを伴う患者において増大する (M a r k o w i t z ら、B r e a s t C a n c e r R e s T r e a

50

t .、2013年7月、140(1):13~21)。MDS Cの存在度はまた、充実性腫瘍における予後不良とも相関する(Charoentongら、Cell Rep .、2017年1月3日、18(1):248~262)。

【0003】

MDS Cは、反応性酸素分子種、一酸化窒素、およびアルギナーゼの産生を含む、複数の機構を介して、T細胞に対する抑制を及ぼす。これらは、最終的に、DC、NK、およびT細胞の活性の抑制、ならびに腫瘍負荷の増大をもたらす(Umanskyら、Vaccines(Basel)(2016)、4(4):36)。MDS Cはまた、血管新生、浸潤、増殖、および転移を促進する、マトリックスメタロプロテイナーゼ、VEGF、bFGF、TGF-、およびS100A8/A9などの可溶性因子の産生を介して、腫瘍の発生および転移にも寄与する。

10

【0004】

主に、MDS C上で発現される免疫チェックポイント分子である、V-type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation(VISTA)のターゲティングは、エフェクター免疫細胞機能に対するMDS C媒介性抑制を除去するための、魅力的な治療戦略である。

【0005】

WO2017/137830A1は、例えば、段落[00221]において、抗VISTA抗体であるVSTB112の可変領域を含むことが開示される、抗VISTA抗体であるVSTB174を開示する。段落[00362]は、VSTB123が、VSTB174の可変領域を含むことを開示する。段落[0417]および図42Aにおける、WO2017/137830A1の実施例25は、mIgG2a抗体であるVSTB123が、MB49腫瘍モデルにおいて、腫瘍増殖を阻害することが可能であったことを開示する。段落[0418]および図42Aは、これに対して、VSTB124(IgG2a LALAフォーマットで提供される、同じ抗体である；段落[0408]を参照されたい)が、腫瘍増殖を阻害しなかったことを開示する。これらの結果に基づき、段落[0419]における実施例25は、抗VISTA抗体による処置に関する有効性は、活性のFcを要求しようと結論づける。したがって、図47において概略的に表された、抗VISTA抗体について提起される機構作用(段落[0053]における、図47に対するキャプションを参照されたい)は、NK細胞により発現されるFcRIIIの、Fc媒介性エンゲージメントを伴う。

20

30

【0006】

ハムスターモノクローナル抗VISTA抗体であるmAb13F3は、Le Mercierら、Cancer Res.(2014)、74(7):1933~44において、B16OVAおよびB16-BL6黒色腫モデルにおける腫瘍増殖を阻害することが開示されている。1942頁、左~右段にわたる段落は、VISTA mAbの免疫原性およびFcR結合活性が、最適な標的の中和およびこれに対する治療有効性を達成するための、極めて重要な制限因子でありうることに付いて教示する。

【発明の概要】

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

第1の態様では、本発明は、Fc媒介性機能に依存せずに、VISTAに結合し、VISTA媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗原結合性分子、任意選択で、単離抗原結合性分子を提供する。

【0008】

また、VISTAに結合し、VISTA媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗原結合性分子、任意選択で、単離抗原結合性分子も提供され、ここで、抗原結合性分子は、Fc媒介性抗体エフェクター機能を誘導することが可能ではない。

【0009】

50

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）を誘導することが可能ではなく、かつ/または抗体依存性細胞媒介性食作用（ADCP）を誘導することが可能ではなく、かつ/または補体依存性細胞傷害作用（CDC）を誘導することが可能ではない。

【0010】

また、VISTAに結合し、VISTA媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗原結合性分子、任意選択で、単離抗原結合性分子も提供され、ここで、抗原結合性分子は、Fc受容体に結合せず、かつ/または抗原結合性分子は、C1qに結合しない。

【0011】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Ig様V型ドメイン内で、VISTAに結合することが可能である。

10

【0012】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号6のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるポリペプチドに結合することが可能である。

【0013】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号31のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるポリペプチドに結合することが可能である。

【0014】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTA（例えば、実施例8に記載される、エピトープビニング解析により決定される）への結合について、IGN175Aと競合しない。

20

【0015】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号275のアミノ酸配列からなるペプチドに結合することが可能ではない。

【0016】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下のCDR:

配列番号305のアミノ酸配列を有するHC-CDR1

配列番号306のアミノ酸配列を有するHC-CDR2

配列番号307のアミノ酸配列を有するHC-CDR3

を組み込んだ重鎖可変(VH)領域; および

(ii) 以下のCDR:

配列番号41のアミノ酸配列を有するLC-CDR1

配列番号308のアミノ酸配列を有するLC-CDR2

配列番号43のアミノ酸配列を有するLC-CDR3

を組み込んだ軽鎖可変(VL)領域を含む。

30

【0017】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下のCDR:

配列番号244のアミノ酸配列を有するHC-CDR1

配列番号34のアミノ酸配列を有するHC-CDR2

配列番号35のアミノ酸配列を有するHC-CDR3

を組み込んだ重鎖可変(VH)領域; および

(ii) 以下のCDR:

配列番号41のアミノ酸配列を有するLC-CDR1

配列番号245のアミノ酸配列を有するLC-CDR2

配列番号43のアミノ酸配列を有するLC-CDR3

を組み込んだ軽鎖可変(VL)領域を含む。

40

【0018】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

50

- (i) 以下の C D R :
- 配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1
 - 配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2
 - 配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3
- を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および
- (i i) 以下の C D R :
- 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1
 - 配列番号 3 0 9 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2
 - 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3
- を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域を含む。 10
- 【 0 0 1 9 】
- 一部の実施形態では、抗原結合性分子は、
- (i) 以下の C D R :
- 配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1
 - 配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2
 - 配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3
- を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および
- (i i) 以下の C D R :
- 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1
 - 配列番号 2 9 5 または配列番号 3 0 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2
 - 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3
- を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域を含む。 20
- 【 0 0 2 0 】
- 一部の実施形態では、抗原結合性分子は、
- (i) 以下の C D R :
- 配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1
 - 配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2
 - 配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3
- を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および
- (i i) 以下の C D R :
- 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1
 - 配列番号 2 9 5 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2
 - 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3
- を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域を含む。 30
- 【 0 0 2 1 】
- 一部の実施形態では、抗原結合性分子は、
- (i) 以下の C D R :
- 配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1
 - 配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2
 - 配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3
- を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および
- (i i) 以下の C D R :
- 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1
 - 配列番号 3 0 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2
 - 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3
- を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域を含む。 40
- 【 0 0 2 2 】
- 一部の実施形態では、抗原結合性分子は、
- (i) 以下の C D R :
- 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1
- 50

配列番号 277 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2
 配列番号 278 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3
 を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 41 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 42 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 43 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0023】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 33 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 286 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 278 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 41 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 42 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 43 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0024】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 290 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 291 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 278 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 41 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 42 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 43 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0025】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 290 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 291 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 278 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 41 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 300 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 43 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0026】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 33 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 34 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 35 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

10

20

30

40

50

を組み込んだ重鎖可変（VH）領域；および

（ii）以下のCDR：

配列番号41のアミノ酸配列を有するLC - CDR1

配列番号42のアミノ酸配列を有するLC - CDR2

配列番号43のアミノ酸配列を有するLC - CDR3

を組み込んだ軽鎖可変（VL）領域を含む。

【0027】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

（i）以下のCDR：

配列番号33のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号34のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号35のアミノ酸配列を有するHC - CDR3

を組み込んだ重鎖可変（VH）領域；および

（ii）以下のCDR：

配列番号41のアミノ酸配列を有するLC - CDR1

配列番号67のアミノ酸配列を有するLC - CDR2

配列番号43のアミノ酸配列を有するLC - CDR3

を組み込んだ軽鎖可変（VL）領域を含む。

【0028】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

（i）以下のCDR：

配列番号53のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号34のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号35のアミノ酸配列を有するHC - CDR3

を組み込んだ重鎖可変（VH）領域；および

（ii）以下のCDR：

配列番号41のアミノ酸配列を有するLC - CDR1

配列番号58のアミノ酸配列を有するLC - CDR2

配列番号43のアミノ酸配列を有するLC - CDR3

を組み込んだ軽鎖可変（VL）領域を含む。

【0029】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

（i）以下のCDR：

配列番号72のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号73のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号74のアミノ酸配列を有するHC - CDR3

を組み込んだ重鎖可変（VH）領域；および

（ii）以下のCDR：

配列番号80のアミノ酸配列を有するLC - CDR1

配列番号81のアミノ酸配列を有するLC - CDR2

配列番号82のアミノ酸配列を有するLC - CDR3

を組み込んだ軽鎖可変（VL）領域を含む。

【0030】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

（i）以下のCDR：

配列番号88のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号89のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号90のアミノ酸配列を有するHC - CDR3

を組み込んだ重鎖可変（VH）領域；および

（ii）以下のCDR：

10

20

30

40

50

配列番号 96 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 97 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 98 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0031】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 88 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 89 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 90 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 137 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 138 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 139 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0032】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 33 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 107 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 108 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

または HC - CDR 1、HC - CDR 2、もしくは HC - CDR 3 のうちの 1 つもしくは

複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された

、これらの変異体を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 114 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 67 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 115 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0033】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 120 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 121 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 122 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 127 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 128 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 129 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0034】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 144 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 145 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 146 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

10

20

30

40

50

配列番号 151 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1
 配列番号 152 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2
 配列番号 153 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3
 を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0035】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 158 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 159 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 160 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 165 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 152 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 153 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0036】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 169 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 170 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 171 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 177 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 179 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0037】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 72 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 184 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 246 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 247 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 190 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0038】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 72 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 184 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 185 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 189 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

10

20

30

40

50

配列番号 190 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3 を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0039】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 72 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 184 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 195 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 197 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 190 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0040】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 以下の CDR :

配列番号 72 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 184 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 200 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 203 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 190 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域を含む。

【0041】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

配列番号 289 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VH 領域 ; および

配列番号 310 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VL 領域 ;

または

配列番号 289 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VH 領域 ; および

配列番号 294、配列番号 297 または配列番号 299 のうちの 1 つのアミノ酸配列に対する、少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VL 領域 ;

または

配列番号 289 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VH 領域 ; および

配列番号 294 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VL 領域 ;

または

配列番号 289 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VH 領域 ; および

配列番号 297 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VL 領域 ;

または

配列番号 289 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VH 領域 ; および

10

20

30

40

50

配列番号 299 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 289 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 301 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 289 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 302 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 289 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 303 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 276 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 282 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 285 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 287 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

配列番号 32 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 40 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 52 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 57 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 62 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 66 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 48 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 50 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 87 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 95 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含む V L 領域 ;

または

配列番号 106 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 113 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

または

配列番号 143 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 150 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

10

または

配列番号 157 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 164 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

または

配列番号 71 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 79 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

20

または

配列番号 102 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 104 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

または

配列番号 119 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 126 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

30

または

配列番号 183 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 188 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

または

配列番号 194 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 196 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

40

または

配列番号 199 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 202 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

または

配列番号 133 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域 ; および

配列番号 136 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域 ;

50

ノ酸配列を含むV L領域；

または

配列番号168のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV H領域；および

配列番号176のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むV L領域を含む。

【0042】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ヒトV I S T A、ならびにマウスV I S T AおよびカニクイザルV I S T Aのうちの1つまたは複数に結合することが可能である。

【0043】

また、(i)本発明に従う抗原結合性分子、および(ii)V I S T A以外の抗原に結合することが可能な抗原結合性分子を含む抗原結合性分子、任意選択で、単離抗原結合性分子も提供される。

【0044】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、細胞表面において、V I S T Aを発現する細胞に結合することが可能である。

【0045】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、V I S T Aと、V I S T Aの結合パートナーとの相互作用を阻害することが可能である。

【0046】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、V I S T A媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。

【0047】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、エフェクター免疫細胞の増殖、および/またはこれらによるサイトカイン産生を増大させることが可能である。

【0048】

また、本発明に従う抗原結合性分子を含むキメラ抗原受容体(C A R)も提供される。

【0049】

また、本発明に従う、抗原結合性分子またはC A Rをコードする、1つの核酸または複数の核酸、任意選択で、単離核酸も提供される。

【0050】

また、本発明に従う、1つの核酸または複数の核酸を含む、1つの発現ベクターまたは複数の発現ベクターも提供される。

【0051】

また、本発明に従う、抗原結合性分子、C A R、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクターを含む細胞も提供される。

【0052】

また、本発明に従う、1つの核酸もしくは複数の核酸、または1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクターを含む細胞を、抗原結合性分子またはC A Rの、核酸(複数可)または発現ベクター(複数可)からの発現に適する条件下で培養するステップを含む方法も提供される。

【0053】

また、本発明に従う抗原結合性分子、C A R、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、または細胞を含む組成物も提供される。

【0054】

一部の実施形態では、組成物は、V I S T A以外の免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤をさらに含み、任意選択で、V I S T A以外の免疫チェックポイント阻害剤は、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、T I M - 3、T I G I T、およびB T L Aから選択される。

【0055】

10

20

30

40

50

また、医学的処置または予防の方法における使用のための、本発明に従う、抗原結合性分子、C A R、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、細胞、または組成物も提供される。

【0056】

また、がんまたは感染性疾患の処置または防止の方法における使用のための、本発明の、抗原結合性分子、C A R、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、細胞、または組成物も提供される。

【0057】

また、がんまたは感染性疾患の処置または防止の方法における使用のための医薬の製造における、本発明の、抗原結合性分子、C A R、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、細胞、または組成物の使用も提供される。

10

【0058】

また、がんまたは感染性疾患を処置または防止する方法であって、対象へと、治療または予防有効量の、本発明の、抗原結合性分子、C A R、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、細胞、または組成物を投与するステップを含む方法も提供される。

【0059】

一部の実施形態では、がんは、V I S T Aを発現する細胞を含むがん、V I S T Aを発現する細胞の浸潤を含むがん、V I S T Aを発現するがん細胞を含むがん、血液がん、白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、中皮腫、充実性腫瘍、肺がん、非小細胞肺癌、胃がん、胃癌、結腸直腸がん、結腸直腸癌、結腸直腸腺癌、子宮がん、子宮体内膜癌、乳がん、トリプルネガティブ浸潤性乳癌、肝がん、肝細胞癌、膵がん、膵管腺癌、甲状腺がん、胸腺腫、皮膚がん、黒色腫、皮膚黒色腫、腎がん、腎細胞癌、乳頭状腎細胞癌、頭頸部がん、頭頸部扁平上皮がん(S C C H N)、卵巣がん、卵巣癌、卵巣漿液性嚢胞腺癌、前立腺がん、および/または前立腺腺癌から選択される。

20

【0060】

また、骨髄由来抑制細胞(M D S C)が病理学的に関与する疾患を処置または防止する方法における使用のための、本発明の、抗原結合性分子、C A R、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、細胞、または組成物も提供される。

30

【0061】

また、骨髄由来抑制細胞(M D S C)が病理学的に関与する疾患を処置または防止する方法における使用のための医薬の製造における、本発明の、抗原結合性分子、C A R、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、細胞、または組成物の使用も提供される。

【0062】

また、骨髄由来抑制細胞(M D S C)が病理学的に関与する疾患を処置または防止する方法であって、対象へと、治療または予防有効量の、本発明の、抗原結合性分子、C A R、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、細胞、または組成物を投与するステップを含む方法も提供される。

40

【0063】

一部の実施形態では、方法は、V I S T A以外の免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤の投与をさらに含み、任意選択で、V I S T A以外の免疫チェックポイント分子は、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、T I M - 3、T I G I T、またはB T L Aから選択される。

【0064】

また、V I S T A媒介性シグナル伝達を阻害する方法であって、V I S T A発現細胞を、本発明に従う抗原結合性分子と接触させるステップを含む方法も提供される。

【0065】

50

また、骨髄由来抑制細胞（M D S C）の活性を阻害するための方法であって、M D S Cを、本発明に従う抗原結合性分子と接触させるステップを含む方法も提供される。

【0066】

また、エフェクター免疫細胞の数または活性を増大させるための方法であって、V I S T A 発現細胞の活性を、本発明に従う抗原結合性分子により阻害するステップを含む方法も提供される。

【0067】

また、V I S T A に結合した、本発明に従う抗原結合性分子を含む *in vitro* 複合体、任意選択で、単離 *in vitro* 複合体も提供される。

【0068】

また、V I S T A を含有するか、またはこれを含有することが疑われる試料を、本発明に従う抗原結合性分子と接触させるステップと、抗原結合性分子の、V I S T A との複合体の形成を検出するステップとを含む方法も提供される。

【0069】

また、対象を、V I S T A ターゲティング剤による処置のために選択または層別化する方法であって、*in vitro* において、対象に由来する試料を、本発明に従う抗原結合性分子と接触させるステップと、抗原結合性分子の、V I S T A との複合体の形成を検出するステップとを含む方法も提供される。

【0070】

また、本発明に従う抗原結合性分子の、*in vitro* または *in vivo* における、診断または予後診断剤としての使用も提供される。

【0071】

また、任意選択で、がんが、V I S T A を発現する細胞を含むがん、V I S T A を発現する細胞の浸潤を含むがん、V I S T A を発現するがん細胞を含むがん、血液がん、白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、中皮腫、充実性腫瘍、肺がん、非小細胞肺癌、胃がん、胃癌、結腸直腸がん、結腸直腸癌、結腸直腸腺癌、子宮がん、子宮体内膜癌、乳がん、トリプルネガティブ浸潤性乳癌、肝がん、肝細胞癌、膵がん、膵管腺癌、甲状腺がん、胸腺腫、皮膚がん、黒色腫、皮膚黒色腫、腎がん、腎細胞癌、乳頭状腎細胞癌、頭頸部がん、頭頸部扁平上皮がん（S C C H N）、卵巣がん、卵巣癌、卵巣漿液性嚢胞腺癌、前立腺がん、および/または前立腺腺癌から

説明

本発明は、公知の抗V I S T A抗体と比較して、新規の特性および/または改善された特性を有する、新規のV I S T A結合性分子に関する。

【0072】

本発明者らは、V I S T A の細胞外領域内の、特に目的となる領域に結合する抗原結合性分子を作出した。本発明のV I S T A 結合性分子は、先行技術において開示された、V I S T A 結合性抗原結合性分子と比較して、所望の生物物理的特性および機能的特性の組合せを備えている。

【0073】

特に、本明細書で記載されるV I S T A 結合性分子は、F c 媒介性機能を要求しない機構を介して、V I S T A 媒介性シグナル伝達をアンタゴナイズすることが可能であることが裏付けられている。本発明者らは、F c 受容体および/またはC 1 q に結合する能力を欠くF c を含む、本明細書で記載されるV I S T A 結合性分子が、*in vivo* において、抗がん治療効果をもたらすことが可能であることを裏付ける。

【0074】

本発明者らは、初めて、F c 媒介性のエフェクター機能（例えば、V I S T A 発現細胞に対するA D C C / A D C P / C D C）を要求しない機構を通して、直接、V I S T A 媒介性シグナル伝達をアンタゴナイズすることが可能であることを確立する。

10

20

30

40

50

【0075】

本開示のVISTA結合性分子は、公知の抗VISTA抗体によりターゲティングされる領域とは異なる、VISTAの領域をターゲティングする。VISTAの特定の領域をターゲティングする抗原結合性分子は、Fc媒介性のエフェクター機能を要求せずに、VISTA媒介性シグナル伝達をアンタゴナイズすることが可能である。

【0076】

したがって、本明細書で開示されるVISTA結合性分子は、VISTA発現細胞を枯渇させずに、VISTA媒介性シグナル伝達を阻害するために有用である。VISTAは、枯渇させることが所望されない細胞上で発現されるため、これは重要である。したがって、本明細書で開示されるVISTA結合性分子は、所望されない副作用を最小化させながら、VISTA媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。

10

【0077】

本明細書で開示されるVISTA結合性分子はまた、T細胞を、VISTA媒介性抑制から解放することが可能であることが示されたことも有利である。具体的には、本明細書で開示されるVISTA結合性分子は、T細胞の増殖、ならびに、例えば、VISTAまたはVISTA発現細胞の存在下で培養されたT細胞からの、IFN およびTNF α の産生を増大させることが可能であることを示す。

VISTA、結合パートナー、およびVISTA媒介性シグナル伝達

V-type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation (VISTA; 例えば、B7-H5、SISP1、PD-1Hとしてもまた公知である) は、配列番号1に示されるアミノ酸配列(Q9H7M9-1、v3)を有する、UniProt: Q9H7M9により同定されるタンパク質である。VISTAの構造および機能については、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Linesら、Cancer Res. (2014)、74(7): 1924~1932において記載されている。VISTAは、免疫チェックポイントとして機能し、C10orf54遺伝子によりコードされる、約50kDaの、I型1回膜貫通タンパク質である。VISTAの細胞外ドメインは、PD-L1と相同である。

20

【0078】

配列番号1の、N末端の32アミノ酸は、シグナルペプチドを構成するので、VISTAの成熟形態(すなわち、シグナルペプチドを除去するプロセッシングの後における)は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する。配列番号1の33~194位は、細胞外ドメイン(配列番号3)を形成し、195~215位は、膜貫通ドメイン(配列番号4)を形成し、216~311位は、細胞質ドメイン(配列番号5)を形成する。細胞外ドメインは、Ig様V型ドメイン(配列番号6に示される、配列番号1の33~168位)を含む。

30

【0079】

本明細書では、「VISTA」とは、任意の種に由来するVISTAを指し、任意の種に由来する、VISTAの、アイソフォーム、断片、変異体(突然変異体を含む)、または相同体を含む。

40

【0080】

本明細書で使用される、タンパク質の「断片」、「変異体」、または「相同体」は、任意選択で、参照タンパク質(例えば、参照アイソフォーム)のアミノ酸配列に対する、少なくとも60%、好ましくは、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のうちの1つのアミノ酸配列同一性を有することとして特徴付けられうる。一部の実施形態では、参照タンパク質の、断片、変異体、アイソフォーム、および相同体は、参照タンパク質により果たされる機能を果たす能力により特徴付けられうる。

【0081】

「断片」とは、一般に、参照タンパク質の部分を指す。「変異体」とは、一般に、参照

50

タンパク質のアミノ酸配列と比べて、1つまたは複数のアミノ酸の置換、挿入、欠失、または他の修飾を含むが、参照タンパク質のアミノ酸配列に対する、かなりの程度の配列同一性（例えば、少なくとも60%）を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を指す。「アイソフォーム」とは、一般に、参照タンパク質の種と同じ種により発現される、参照タンパク質の変異体を指す。「相同体」とは、一般に、参照タンパク質の種と比較して、異なる種により産生される、参照タンパク質の変異体を指す。相同体は、オーソログを含む。

【0082】

「断片」は、任意の長さ（アミノ酸の数による）でありうるが、任意選択で、参照タンパク質（すなわち、断片が由来するタンパク質）の長さの、少なくとも20%であることが可能であり、参照タンパク質の長さの、50%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のうちの1つの、最大の長さを有しうる。VISTAの断片は、10、20、30、40、50、100、150、200、250、または300アミノ酸のうちの1つの、最小の長さを有することが可能であり、20、30、40、50、100、150、200、250、または300アミノ酸のうちの1つの、最大の長さを有しうる。

10

【0083】

一部の実施形態では、VISTAは、哺乳動物に由来するVISTA（例えば、霊長動物（アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長動物、またはヒト）、および/または齧歯動物（例えば、ラットまたはマウス）のVISTA）である。VISTAの、アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、所与の種、例えば、ヒトに由来する、未成熟または成熟のVISTAアイソフォームのアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有することとして特徴付けられうる。

20

【0084】

アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、例えば、機能的特性/活性に適切なアッセイを介する解析により決定する場合、リファレンスVISTAの機能的特性/活性を有する、機能的なアイソフォーム、断片、変異体、または相同体でありうる。例えば、VISTAのアイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、例えば、V

30

【0085】

一部の実施形態では、VISTAは、配列番号1または2に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。一部の実施形態では、VISTAの断片は、配列番号2、3、または6のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。

40

【0086】

VISTAは、タンパク質のB7ファミリーのメンバーであり、主に、白血球により発現され、特に、CD14+単球（単球由来抑制細胞（MDSC）を含む）およびCD33+骨髄細胞により発現される。VISTAはまた、CD56+ NK細胞、樹状細胞によっても発現され、より小さな程度で、CD4+およびCD8+ T細胞上でも発現される。VISTAは、MDSC、特に、腫瘍浸潤性MDSC上で、高度に発現され、また、腫瘍浸潤性骨髄DC上（Le Mercierら、Cancer Res. (2014)、74(7):1933~44）のほか、腫瘍関連マクロファージ（TAM）上および好中球上でも高度に発現される。

【0087】

50

VISTAは、T細胞上で、リガンドおよび受容体のいずれとしても、T細胞のエフェクター機能を阻害し、末梢における寛容を維持するように作用し、VISTAを過剰発現させるように操作された腫瘍は、免疫によるコントロールを回避し、VISTAを過剰発現させない腫瘍より、急速に増殖するという証拠がある(Wangら、Journal of Experimental Medicine. (2011)、208(3):577~92; Linesら、Cancer Res. (2014)、74(7):1924~1932)。VISTAは、CD4+ T細胞上の、共阻害型受容体、またはT細胞に対する、共阻害型リガンドであることが示されている。VISTA-/-CD4+ T細胞野生型CD4+ T細胞より強い抗原特異的増殖およびサイトカイン産生を呈することが報告されていることから、VISTAは、CD4+ T細胞上で、阻害型受容体として機能することが示唆される。モノクローナル抗VISTA抗体を使用して、VISTAの機能を遮断することは、腫瘍微小環境における、腫瘍反応性T細胞の浸潤、増殖、およびエフェクター機能を増強することが示されている(Le Mercierら、Cancer Res. (2014)、74(7):1933~44)。

10

【0088】

VISTAは、VSIG-3(IGSF11)と相互作用することが示されている(例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Wangら、J Immunol(2017)、198(増刊1号)、154.1を参照されたい)。活性化T細胞上のVISTAを介する、VSIG-3のエンゲージメントは、T細胞の増殖を阻害し、IFN- γ 、IL-2、IL-17、CCL5/RANTES、CCL3/MIP-1 α 、およびCXCL11/I-TACなどの、サイトカインおよびケモカインの産生を低減する。

20

【0089】

VSIG-3は、UniProt:Q5DX21により同定されるタンパク質である。ヒトIGSF11遺伝子によりコードされるmRNAの、代替的なスプライシングは、3つの異なるアイソフォーム:アイソフォーム1(UniProt:Q5DX21-1、v3;配列番号7);1~17位において、配列番号7と異なる配列を含む、アイソフォーム2(UniProt:Q5DX21-2;配列番号8);および1~17位において、配列番号7と異なる配列を含み、また、211~235位において、配列番号7と異なる配列も含む、アイソフォーム3(UniProt:Q5DX21-3;配列番号9)をもたらし。

30

【0090】

配列番号7、8、および9の、N末端の22アミノ酸は、シグナルペプチドを構成するので、VSIG-3の成熟形態アイソフォーム1、2、および3(すなわち、シグナルペプチドを除去するプロセッシングの後における)は、それぞれ、配列番号10、11、および12に示されるアミノ酸を有する。配列番号7および8の23~241位は、VSIG-3の細胞外ドメインアイソフォーム1および2(配列番号13)を形成し、配列番号9の23~216位は、VSIG-3の細胞外ドメインアイソフォーム3(配列番号14)を形成する。VSIG-3の膜貫通ドメインは、配列番号15に示され、細胞質ドメインは、配列番号16に示される。細胞外ドメインは、Ig様V型ドメイン(配列番号17に示される)を含み、VSIG-3の細胞外ドメインアイソフォーム1および2は、加えて、Ig様C2型ドメイン(配列番号18に示される)を含む。

40

【0091】

本明細書では、「VSIG-3」とは、任意の種に由来するVSIG-3を指し、任意の種に由来する、VSIG-3の、アイソフォーム、断片、変異体(突然変異体を含む)、または相同体を含む。

【0092】

VSIG-3の断片は、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、または400アミノ酸のうちの1つの、最小の長さを有することが可能であり、20、30、40、50、100、150、200、250、300、3

50

50、または400アミノ酸のうちの1つの、最大の長さを有しうる。

【0093】

一部の実施形態では、V S I G - 3は、哺乳動物に由来するV S I G - 3（例えば、霊長動物（アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長動物、またはヒト）、および/または齧歯動物（例えば、ラットまたはマウス）のV S I G - 3）である。V S I G - 3の、アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、所与の種、例えば、ヒトに由来する、未成熟または成熟のV S I G - 3アイソフォームのアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有することとして特徴付けられうる。

10

【0094】

アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、例えば、機能的特性/活性に適切なアッセイを介する解析により決定する場合、参照V S I G - 3の機能的特性/活性を有する、機能的なアイソフォーム、断片、変異体、または相同体でありうる。例えば、V S I G - 3のアイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、例えば、V I S T Aとの会合を呈しうる。

【0095】

一部の実施形態では、V S I G - 3は、配列番号7~12のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。一部の実施形態では、V S I G - 3の断片は、配列番号10~14、17、または18のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。

20

【0096】

V I S T Aはまた、V S I G - 8と相互作用することも提起されている（例えば、WO 2016/090347A1を参照されたい）。V S I G - 8は、UniProt:P0DPA2（配列番号19）により同定されるタンパク質である。配列番号19の、N末端の21アミノ酸は、シグナルペプチドを構成するので、V S I G - 8の成熟形態（すなわち、シグナルペプチドを除去するプロセッシングの後における）は、配列番号20に示されるアミノ酸配列を有する。配列番号19の22~263位は、V S I G - 8の細胞外ドメイン（配列番号21）を形成する。V S I G - 8の膜貫通ドメインは、配列番号22に示され、細胞質ドメインは、配列番号23に示される。細胞外ドメインは、Ig様V型ドメイン1（配列番号24に示される）と、Ig様V型ドメイン2（配列番号25に示される）とを含む。

30

【0097】

本明細書では、「V S I G - 8」とは、任意の種に由来するV S I G - 8を指し、任意の種に由来する、V S I G - 8の、アイソフォーム、断片、変異体（突然変異体を含む）、または相同体を含む。

40

【0098】

V S I G - 8の断片は、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、または400アミノ酸のうちの1つの、最小の長さを有することが可能であり、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、または400アミノ酸のうちの1つの、最大の長さを有しうる。

【0099】

一部の実施形態では、V S I G - 8は、哺乳動物に由来するV S I G - 8（例えば、霊長動物（アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長動物、またはヒト）、および/または齧歯動物（例えば、ラットまたはマウス）のV S I G - 8）である。V S I G - 8の、アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、所与の種、例えば、ヒトに由

50

来する、未成熟または成熟のV S I G - 8アイソフォームのアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有することとして特徴付けられうる。

【0100】

アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、例えば、機能的特性/活性に適切なアッセイを介する解析により決定する場合、参照V S I G - 8の機能的特性/活性を有する、機能的なアイソフォーム、断片、変異体、または相同体でありうる。例えば、V S I G - 8のアイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、例えば、V I S T Aとの会合を呈しうる。

10

【0101】

一部の実施形態では、V S I G - 8は、配列番号19または20に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。一部の実施形態では、V S I G - 8の断片は、配列番号20、21、24、または25のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。

【0102】

V I S T Aはまた、P S G L - 1と相互作用することも提起されている(例えば、W O 2 0 1 8 / 1 3 2 4 7 6 A 1を参照されたい)。P S G L - 1アイソフォーム1は、U n i P r o t : Q 1 4 2 4 2 - 1 (配列番号323)により同定されるタンパク質である。P S G L - 1アイソフォーム2は、U n i P r o t : Q 1 4 2 4 2 - 2 (配列番号324)により同定されるタンパク質であり、配列番号323の1位の後に、さらなる16アミノ酸を含む点で、P S G L - 1アイソフォーム1と異なる。

20

【0103】

配列番号323の、N末端の17アミノ酸は、シグナルペプチドを構成するので、P S G L - 1の成熟形態(すなわち、シグナルペプチドを除去するプロセッシングの後における)は、配列番号325に示されるアミノ酸配列を有する。配列番号323の18~320位は、P S G L - 1の細胞外ドメイン(配列番号326)を形成する。P S G L - 1の膜貫通ドメインは、配列番号327に示され、細胞質ドメインは、配列番号328に示される。細胞外ドメインは、12、10アミノ酸のタンデムリピートを含み、リピート領域は、配列番号329に示される。

30

【0104】

本明細書では、「P S G L - 1」とは、任意の種に由来するP S G L - 1を指し、任意の種に由来する、P S G L - 1の、アイソフォーム、断片、変異体(突然変異体を含む)、または相同体を含む。

【0105】

P S G L - 1の断片は、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、または400アミノ酸のうちの1つの、最小の長さを有することが可能であり、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、または400アミノ酸のうちの1つの、最大の長さを有しうる。

40

【0106】

一部の実施形態では、P S G L - 1は、哺乳動物に由来するP S G L - 1(例えば、霊長動物(アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長動物、またはヒト)、および/または齧歯動物(例えば、ラットまたはマウス)のP S G L - 1)である。P S G L - 1の、アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、所与の種、例えば、ヒトに由来する、未成熟または成熟のP S G L - 1アイソフォームのアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%

50

、 95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有することとして特徴付けられうる。

【0107】

アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、例えば、機能的特性/活性に適切なアッセイを介する解析により決定する場合、参照PSGL-1の機能的特性/活性を有する、機能的なアイソフォーム、断片、変異体、または相同体でありうる。例えば、PSGL-1のアイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、例えば、VISTAとの会合を呈しうる。

【0108】

一部の実施形態では、PSGL-1は、配列番号323または324に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。一部の実施形態では、PSGL-1の断片は、配列番号325、326、または329のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。

標的分子上の、特に目的となる領域

本発明の抗原結合性分子は、VISTAの、特に目的となる領域をターゲティングするように、特異的にデザインされた。2ステップ法では、予測される抗原性、機能、および安全性についての解析に従い、ターゲティングされるVISTA領域が選択された。次いで、標的領域に対応するペプチドを、特異的モノクローナル抗体を惹起するための免疫原として使用して、VISTAの標的領域に特異的な抗体が調製され、後続するスクリーニングは、ナイーブ状態において、VISTAに結合することが可能な抗体を同定した。この手法は、抗体エピトープに対する、精緻な制御をもたらす。

【0109】

本発明の抗原結合性分子は、それらが結合する、VISTAの領域を参照することにより規定されうる。本発明の抗原結合性分子は、VISTAの、特に目的となる領域に結合しうる。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、アミノ酸連続配列（すなわち、アミノ酸の一次配列）からなる、VISTAの直鎖状エピトープに結合しうる。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、アミノ酸配列のうちの、アミノ酸の不連続配列からなる、VISTAのコンフォメーションエピトープに結合しうる。

【0110】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTAに結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAの細胞外領域（例えば、配列番号3に示される領域）に結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAのIg様V型ドメイン（例えば、配列番号6に示される領域）に結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号1の61~162位に対応する領域（配列番号31に示される）内で、VISTAに結合する。

【0111】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号322に示される、VISTAの領域に結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号26に示される、VISTAの領域に結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号27に示される、VISTAの領域に結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号28に示される、VISTAの領域に結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号29に示される、VISTAの領域に結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号30に示される、VISTAの領域に結合する。

【0112】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号271に示される、VISTAの領域に結合しない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号272に示される、

10

20

30

40

50

V I S T Aの領域に結合しない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号273に示される、V I S T Aの領域に結合しない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号274に示される、V I S T Aの領域に結合しない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号275に示される、V I S T Aの領域に結合しない。

【0113】

抗体が結合する、ペプチド/ポリペプチドの領域は、抗体-抗原複合体についてのX線共結晶構造解析、ペプチド走査、突然変異誘発マッピング、質量分析による水素-重水素交換解析、ファージディスプレイ、競合ELISA、およびタンパク質分解ベースの「保護」法を含む、当技術分野で周知の、多様な方法を使用して、当業者により決定されうる。このような方法については、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Gershoniら、BioDrugs、2007、21(3):145~156において記載されている。

10

【0114】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、本明細書で記載される抗体クローンである、4M2-C12、4M2-B4、4M2-C9、4M2-D9、4M2-D5、4M2-A8、V4H1、V4H2、V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、V4-C31、2M1-B12、2M1-D2、1M2-D2、13D5p、13D5-1、13D5-13、5M1-A11または9M2-C12のうちの1つのVH配列およびVL配列を含む抗体が結合するV I S T Aの領域と同じV I S T A領域、または重複するV I S T Aの領域に結合することが可能である。

20

【0115】

本明細書で使用される、「ペプチド」とは、ペプチド結合により連結された、2つ以上のアミノ酸単量体による鎖を指す。ペプチドは、典型的に、領域内に、約2~50アミノ酸の長さを有する。「ポリペプチド」とは、2つ以上のペプチドによるポリマー鎖である。ポリペプチドは、典型的に、約50アミノ酸を超える長さを有する。

【0116】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、配列番号1、2、3、6、または31のうちの1つのアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるポリペプチドに結合することが可能である。

30

【0117】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号322のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるペプチド/ポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号26のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるペプチド/ポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号27のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるペプチド/ポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号28のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるペプチド/ポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号29のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるペプチド/ポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号30のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるペプチド/ポリペプチドに結合することが可能である。

40

【0118】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号271のアミノ酸配列からなるペプチドに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号272のアミノ酸配列からなるペプチドに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号273のアミノ酸配列からなるペプチドに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号274のアミノ酸配列からなるペプチドに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号275のアミノ酸配列からなるペプチドに結合することが可能ではない。

50

【0119】

抗原結合性分子が、所与のペプチド/ポリペプチドに結合する能力は、ELISA、免疫ブロット（例えば、ウェスタンブロット）、免疫沈降、表面プラズモン共鳴（SPR；例えば、Heartlyら、Methods Mol Biol (2012)、907:411~442を参照されたい）、またはバイオレイヤー干渉法（例えば、Ladら（2015）、J Biomol Screen、20(4):498~507を参照されたい）による解析を含む、当業者に周知の方法により解析されうる。

【0120】

抗原結合性分子が、参照アミノ酸配列を含むペプチド/ポリペプチドに結合することが可能である実施形態では、ペプチド/ポリペプチドは、参照アミノ酸配列の、一方または両方の末端において、1つまたは複数の、さらなるアミノ酸を含みうる。一部の実施形態では、ペプチド/ポリペプチドは、参照アミノ酸配列の、一方または両方の末端において、例えば、1~5、1~10、1~20、1~30、1~40、1~50、5~10、5~20、5~30、5~40、5~50、10~20、10~30、10~40、10~50、20~30、20~40、または20~50の、さらなるアミノ酸を含む。

10

【0121】

一部の実施形態では、VISTAのアミノ酸配列の文脈では、参照配列の一方または両方の末端（すなわち、N末端およびC末端）においてもたらされる、さらなるアミノ酸（複数可）は、参照配列の末端における位置に対応する。例を目的として述べると、抗原結合性分子が、配列番号26の配列、および配列番号26のC末端における、さらなる、2つのアミノ酸を含むペプチドに結合することが可能である場合、さらなる、2つのアミノ酸は、配列番号1の90および91位に対応する、アルギニンおよびアスパラギンでありうる。

20

【0122】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、本明細書に記載される抗体クローンである、4M2-C12、4M2-B4、4M2-C9、4M2-D9、4M2-D5、4M2-A8、V4H1、V4H2、V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、V4-C31、2M1-B12、2M1-D2、1M2-D2、13D5p、13D5-1、13D5-13、5M1-A11または9M2-C12のうちの1つのVHおよびVL配列を含む抗体が結合するペプチド/ポリペプチドに結合することが可能である。

30

骨髄由来抑制細胞（MDSC）

骨髄由来抑制細胞（MDSC）は、免疫抑制性表現型により特徴付けられる、骨髄系列細胞のうちの、非同種の免疫細胞群である。MDSCの生物学については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Kumarら、Trends Immunol (2016)、37(3):208~220において総説されている。

【0123】

MDSCは、NADPHオキシダーゼ（Nox2）の発現の増大、反応性酸素分子種（ROS）（スーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）、過酸化水素（ H_2O_2 ）、およびペルオキシナイトライト（PNT； $ONOO^-$ ）など）の産生の増大；アルギナーゼ1および一酸化窒素シンターゼ2（nos2）の発現の増大、ならびに一酸化窒素（NO）の産生の増大；c/EBP およびSTAT3の発現の増大；IRF8の発現の減少；ならびにS100A8/9タンパク質の産生の増大など、これらの細胞を、成熟骨髄細胞（すなわち、マクロファージ、樹状細胞、および好中球）から識別する、多数の生化学的およびゲノム的特色により特徴付けられる。

40

【0124】

2つの異なる種類のMDSC：形態的かつ表現型的に、好中球に類似する、多型核MDSC（PMN-MDSC）と、単球により類似する、単球性MDSC（M-MDSC）とが存在する。MDSCの、形態的かつ表現型的な特徴については、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、MarvelおよびGabrilovich、

50

J Clin Invest.、2015年9月1日、125(9):3356~3364
 において記載されている。マウスでは、MDSCは、広く、CD11b+Gr1+細胞と
 して同定される。Gr-1hi細胞は、大半が、PMN-MDSCであり、Gr-1lo
 細胞は、大半が、M-MDSCである。これらのサブセットは、Ly6CおよびLy6G
 マーカーに基づき、より正確に同定される場合があり、M-MDSCは、CD11b+Ly
 6ChiLy6G-であり、PMN-MDSCは、CD11b+Ly6C^{lo}Ly6G
 +である。ヒトでは、MDSCは、単核画分内で同定される。PMN-MDSCは、CD
 14-CD11b+CD33+CD15+またはCD66b+細胞であり、M-MDSC
 は、CD14+HLA-DR-/lo細胞である。Lin-HLA-DR-CD33+M
 DSCの集団は、骨髄前駆細胞についてエンリッチされた混合細胞群を表す。

10

【0125】

MDSC媒介性免疫抑制に関与する因子は、アルギナーゼ(ARG1)、誘導性NOS
 (iNOS)、TGF-、IL-10、およびCOX2の発現、システインの封鎖、T
 細胞による、L-セレクチンの発現の減少、ならびにTregの誘導を含む。M-MDS
 Cと、PMN-MDSCとは、異なる免疫抑制の機構を利用する。M-MDSCは、NO
 およびサイトカインの産生を介して、抗原特異的T細胞応答および非特異的T細胞応答の
 いずれも抑制し、PMN-MDSCより、強く免疫抑制性である。PMN-MDSCは、
 ROSの産生を介して、免疫応答を、抗原特異的に抑制する。

【0126】

MDSCは、がんおよび感染性疾患の発症および進行に、病理学的に関与する。MDS
 Cの、ヒト疾患における役割については、例えば、Kumarら、Trends Imm
 unol.(2016)、37(3):208~220(参照により本明細書に組み込ま
 れる);および参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Gretenら、
 Int Immunopharmacol.(2011)、11(7):802~807
 において総説されている。

20

【0127】

MDSCは、腫瘍組織内に豊富に存在し、複数の機構を介して、がんの発症および進行
 に寄与し、例えば、Umanskyら、Vaccines(Basel)(2016)、
 4(4):36において総説されている。MDSCは、ケモカインの発現を介して、腫瘍
 部位へと動員され、腫瘍微小環境内の炎症促進性因子は、MDSCによる、免疫抑制性機
 能の、著明な上方調節を結果としてもたらす。MDSCは、エフェクター免疫細胞機能(
 例えば、エフェクターT細胞およびNK細胞の機能)の抑制、制御性T細胞の産生/活性
 の促進、VEGFおよびbFGFなど、増殖因子の産生、マトリックスメタロプロテイナー
 ーゼなど、ECM修飾因子の産生を介して、腫瘍の発症、血管新生、および転移に寄与す
 る。

30

【0128】

MDSCは、VISTAの発現に対して特徴付けられうる。本発明の多様な態様につい
 ての実施形態では、MDSCは、「VISTA発現MDSC」または「VISTA+M
 DSC」でありうる。MDSCは、VISTAを、細胞表面において発現させうる(すな
 わち、VISTAは、細胞膜内または細胞膜において発現されうる)。

40

抗原結合性分子

本発明は、VISTAに結合することが可能な抗原結合性分子を提供する。

【0129】

「抗原結合性分子」とは、標的抗原に結合することが可能な分子を指し、それらが、対
 象とする標的分子(複数可)への結合を呈する限りにおいて、モノクローナル抗体、ポリ
 クローナル抗体、単一特異性抗体および多特異性抗体(例えば、二特異性抗体)、ならび
 に抗体断片(例えば、Fv、scFv、Fab、scFab、F(ab')₂、Fab₂、
 ダイアポドimer、トリアポドimer、scFv-Fc、ミニポドimer、単一ドメイン抗体(
 例えば、VhH)など)を包含する。

【0130】

50

本発明の抗原結合性分子は、標的抗原（複数可）に結合することが可能な部分を含む。一部の実施形態では、標的抗原に結合することが可能な部分は、標的抗原に特異的に結合することが可能な抗体の、抗体重鎖可変領域（VH）と、抗体軽鎖可変領域（VL）とを含む。一部の実施形態では、標的抗原に結合することが可能な部分は、標的抗原に結合することが可能なアプタマー、例えば、核酸アプタマー（例えば、ZhouおよびRossi、Nat Rev Drug Discov.、2017、16（3）：181～202において総説された）を含むか、またはこれからなる。一部の実施形態では、標的抗原に結合することが可能な部分は、抗原結合性ペプチド/ポリペプチド、例えば、ペプチドアプタマー、チオレドキシン、モノボディー、アンチカリン、Kunitzドメイン、アピマー、ノッティン、フィノマー、アトリマー、DARPin、アフィボディー、ナノボディー（すなわち、単一ドメイン抗体（sdAb））、アフィリン、アルマジロリピートタンパク質（ArmRP）、OBody、またはフィブロネクチン（例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Reverdattaら、Curr Top Med Chem.、2015、15（12）：1082～1101において総説された（例えば、Boersmaら、J Biol Chem（2011）、286：41273～85；およびEmanuelら、Mab（2011）、3：38～48もまた参照されたい））を含むか、またはこれからなる。

10

【0131】

本発明の抗原結合性分子は、一般に、標的抗原に特異的に結合することが可能な、抗体のVHおよびVLを含む、抗原結合性ドメインを含む。本明細書では、VHおよびVLにより形成される抗原結合性ドメインはまた、Fv領域とも称される。

20

【0132】

抗原結合性分子は、抗原結合性ポリペプチド、または抗原結合性ポリペプチド複合体でありうるか、またはこれを含みうる。抗原結合性分子は、併せて、抗原結合性ドメインを形成する、1つを超えるポリペプチドを含みうる。ポリペプチドは、共有結合的に会合する場合もあり、非共有結合的に会合する場合もある。一部の実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドを含むより大型ポリペプチドの一部を形成する（例えば、VHおよびVLを含むscFvの場合、またはVH-CH1およびVL-CLを含むscFabの場合において）。

【0133】

抗原結合性分子は、1つを超えるポリペプチド（例えば、2つ、3つ、4つ、6つ、または8つのポリペプチド）、例えば、2つの重鎖ポリペプチドと、2つの軽鎖ポリペプチドとを含む、IgG様抗原結合性分子の、非共有結合的または共有結合的複合体を指す場合がある。

30

【0134】

本発明の抗原結合性分子は、VISTAに結合することが可能な、モノクローナル抗体（mAb）の配列を使用して、デザインおよび調製されうる。単鎖可変断片（scFv）、Fab、およびF(ab')₂断片など、抗体の抗原結合性領域もまた、使用されうる/もたらされうる。「抗原結合性領域」とは、所与の抗体が特異的である標的に結合することが可能な抗体の、任意の断片である。

40

【0135】

抗体は、一般に、重鎖可変（VH）領域内の3つ：HC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3、ならびに軽鎖可変（VL）領域内の3つ：LC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3である、6つの相補性決定領域であるCDRを含む。6つのCDRは、併せて、標的抗原に結合する、抗体の部分である、抗体のパラトープを規定する。

【0136】

VH領域およびVL領域は、各CDRのいずれの側にも、CDRのための足場をもたらす、フレームワーク領域（FR）を含む。N末端から、C末端へと、VH領域は、以下の構造：N末端-[HC-FR1]-[HC-CDR1]-[HC-FR2]-[HC-C

50

DR2] - [HC - FR3] - [HC - CDR3] - [HC - FR4] - C末端を含み、VL領域は、以下の構造：N末端 - [LC - FR1] - [LC - CDR1] - [LC - FR2] - [LC - CDR2] - [LC - FR3] - [LC - CDR3] - [LC - FR4] - C末端を含む。

【0137】

Kabatら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD (1991)；Chothiaら、J. Mol. Biol.、196：901～917 (1987)において記載された慣例、ならびにRetterら、Nucl. Acids Res.、(2005)、33 (増刊1号)：D671～D674において記載されたVBASE2など、抗体のCDRおよびFRを規定するための、いくつかの異なる慣例が存在する。本明細書で記載される抗体クローンの、VH領域およびVL領域のCDRおよびFRは、Lefrancら、Dev. Comp. Immunol. (2003)、27：55～77において記載された、IMGT Vドメイン番号付け規則を使用する、international IMGT (IMMUNOGENETICS) information system (Lefrancら、Nucleic Acids Res. (2015)、43 (データベース号)：D413～22)に従い規定された。

10

【0138】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAに結合することが可能な抗原結合性分子のCDRを含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAに結合することが可能な抗原結合性分子のFRを含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAに結合することが可能な抗原結合性分子のCDRおよびFRを含む。すなわち、一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAに結合することが可能な抗原結合性分子のVH領域およびVL領域を含む。

20

【0139】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、本明細書で記載されるVISTA結合性抗体クローン (すなわち、抗VISTA抗体クローンである、4M2 - C12、4M2 - B4、4M2 - C9、4M2 - D9、4M2 - D5、4M2 - A8、V4H1、V4H2、V4 - C1、V4 - C9、V4 - C24、V4 - C26、V4 - C27、V4 - C28、V4 - C30、V4 - C31、2M1 - B12、2M1 - D2、1M2 - D2、13D5p、13D5 - 1、13D5 - 13、5M1 - A11または9M2 - C12) のVH/VL領域であるか、またはこれらに由来する、VH領域およびVL領域を含む。

30

【0140】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、下記の(1)～(18)のうちの1つに従うVH領域を含む。

【0141】

(1) (4M2 - C12由来のコンセンサス) 以下のCDR：

配列番号305のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号306のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号307のアミノ酸配列を有するHC - CDR3、

またはHC - CDR1、HC - CDR2、もしくはHC - CDR3のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

40

【0142】

(2) (V4 - C24、V4 - C26、V4 - C27、V4 - C28、V4 - C30、V4 - C31) 以下のCDR：

配列番号290のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号291のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号278のアミノ酸配列を有するHC - CDR3、

50

またはHC - CDR 1、HC - CDR 2、もしくはHC - CDR 3のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

【0143】

(3)(V4 - C1)以下のCDR:

配列番号33のアミノ酸配列を有するHC - CDR 1

配列番号277のアミノ酸配列を有するHC - CDR 2

配列番号278のアミノ酸配列を有するHC - CDR 3、

またはHC - CDR 1、HC - CDR 2、またはHC - CDR 3のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

10

【0144】

(4)(V4 - C9)以下のCDR:

配列番号33のアミノ酸配列を有するHC - CDR 1

配列番号286のアミノ酸配列を有するHC - CDR 2

配列番号278のアミノ酸配列を有するHC - CDR 3、

またはHC - CDR 1、HC - CDR 2、またはHC - CDR 3のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

【0145】

(5)(4M2 - C12 / V4H1 / V4H2 コンセンサス)以下のCDR:

配列番号244のアミノ酸配列を有するHC - CDR 1

配列番号34のアミノ酸配列を有するHC - CDR 2

配列番号35のアミノ酸配列を有するHC - CDR 3、

またはHC - CDR 1、HC - CDR 2、またはHC - CDR 3のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

20

【0146】

(6)(4M2 - C12、4M2 - B4、V4H2)以下のCDR:

配列番号33のアミノ酸配列を有するHC - CDR 1

配列番号34のアミノ酸配列を有するHC - CDR 2

配列番号35のアミノ酸配列を有するHC - CDR 3、

またはHC - CDR 1、HC - CDR 2、またはHC - CDR 3のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

30

【0147】

(7)(V4H1)以下のCDR:

配列番号53のアミノ酸配列を有するHC - CDR 1

配列番号34のアミノ酸配列を有するHC - CDR 2

配列番号35のアミノ酸配列を有するHC - CDR 3、

またはHC - CDR 1、HC - CDR 2、またはHC - CDR 3のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

40

【0148】

(8)(2M1 - B12、2M1 - D2)以下のCDR:

配列番号72のアミノ酸配列を有するHC - CDR 1

配列番号73のアミノ酸配列を有するHC - CDR 2

配列番号74のアミノ酸配列を有するHC - CDR 3、

またはHC - CDR 1、HC - CDR 2、またはHC - CDR 3のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これら

50

の変異体を組み込んだV H領域。

【0149】

(9)(4M2 - C9、5M1 - A11)以下のCDR:

配列番号88のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号89のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号90のアミノ酸配列を有するHC - CDR3、

またはHC - CDR1、HC - CDR2、もしくはHC - CDR3のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV H領域。

【0150】

(10)(4M2 - D9)以下のCDR:

配列番号33のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号107のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号108のアミノ酸配列を有するHC - CDR3、

またはHC - CDR1、HC - CDR2、もしくはHC - CDR3のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV H領域。

【0151】

(11)(1M2 - D2)以下のCDR:

配列番号120のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号121のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号122のアミノ酸配列を有するHC - CDR3、

またはHC - CDR1、HC - CDR2、もしくはHC - CDR3のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV H領域。

【0152】

(12)(4M2 - D5)以下のCDR:

配列番号144のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号145のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号146のアミノ酸配列を有するHC - CDR3、

またはHC - CDR1、HC - CDR2、もしくはHC - CDR3のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV H領域。

【0153】

(13)(4M2 - A8)以下のCDR:

配列番号158のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号159のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号160のアミノ酸配列を有するHC - CDR3、

またはHC - CDR1、HC - CDR2、またはHC - CDR3のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV H領域。

【0154】

(14)(9M2 - C12)以下のCDR:

配列番号169のアミノ酸配列を有するHC - CDR1

配列番号170のアミノ酸配列を有するHC - CDR2

配列番号171のアミノ酸配列を有するHC - CDR3、

またはHC - CDR1、HC - CDR2、もしくはHC - CDR3のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV H領域。

【0155】

10

20

30

40

50

(1 5) (1 3 D 5 由来) 以下の C D R :

配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 8 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 4 6 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3、

または H C - C D R 1、H C - C D R 2、もしくは H C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V H 領域。

【 0 1 5 6 】

(1 6) (1 3 D 5 p) 以下の C D R :

配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 8 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 1 8 5 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3、

または H C - C D R 1、H C - C D R 2、もしくは H C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V H 領域。

【 0 1 5 7 】

(1 7) (1 3 D 5 - 1) 以下の C D R :

配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 8 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 1 9 5 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3、

または H C - C D R 1、H C - C D R 2、もしくは H C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V H 領域。

【 0 1 5 8 】

(1 8) (1 3 D 5 - 1 3) 以下の C D R :

配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 8 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 0 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3、

または H C - C D R 1、H C - C D R 2、もしくは H C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V H 領域。

【 0 1 5 9 】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、下記の (1 9) ~ (3 5) のうちの 1 つに従う V H 領域を含む。

【 0 1 6 0 】

(1 9) (V 4 - C 2 4、V 4 - C 2 6、V 4 - C 2 7、V 4 - C 2 8、V 4 - C 3 0、V 4 - C 3 1) 以下の F R :

配列番号 6 3 のアミノ酸配列を有する H C - F R 1

配列番号 2 9 2 のアミノ酸配列を有する H C - F R 2

配列番号 2 9 3 のアミノ酸配列を有する H C - F R 3

配列番号 2 8 1 のアミノ酸配列を有する H C - F R 4、

または H C - F R 1、H C - F R 2、H C - F R 3、もしくは H C - F R 4 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V H 領域。

【 0 1 6 1 】

(2 0) (V 4 - C 1、V 4 - C 9) 以下の F R :

配列番号 6 3 のアミノ酸配列を有する H C - F R 1

配列番号 2 7 9 のアミノ酸配列を有する H C - F R 2

配列番号 2 8 0 のアミノ酸配列を有する H C - F R 3

配列番号 2 8 1 のアミノ酸配列を有する H C - F R 4、

10

20

30

40

50

またはHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、またはHC - FR 4のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

【0162】

(21)(4M2 - C12)以下のFR：

配列番号36のアミノ酸配列を有するHC - FR 1

配列番号37のアミノ酸配列を有するHC - FR 2

配列番号38のアミノ酸配列を有するHC - FR 3

配列番号39のアミノ酸配列を有するHC - FR 4、

またはHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、またはHC - FR 4のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

10

【0163】

(22)(4M2 - B4)以下のFR：

配列番号49のアミノ酸配列を有するHC - FR 1

配列番号37のアミノ酸配列を有するHC - FR 2

配列番号38のアミノ酸配列を有するHC - FR 3

配列番号39のアミノ酸配列を有するHC - FR 4、

またはHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、またはHC - FR 4のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

20

【0164】

(23)(V4H1)以下のFR：

配列番号54のアミノ酸配列を有するHC - FR 1

配列番号55のアミノ酸配列を有するHC - FR 2

配列番号56のアミノ酸配列を有するHC - FR 3

配列番号39のアミノ酸配列を有するHC - FR 4、

またはHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、もしくはHC - FR 4のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

30

【0165】

(24)(V4H2)以下のFR：

配列番号63のアミノ酸配列を有するHC - FR 1

配列番号64のアミノ酸配列を有するHC - FR 2

配列番号65のアミノ酸配列を有するHC - FR 3

配列番号39のアミノ酸配列を有するHC - FR 4、

またはHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、もしくはHC - FR 4のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

【0166】

(25)(2M1 - B12)以下のFR：

配列番号75のアミノ酸配列を有するHC - FR 1

配列番号76のアミノ酸配列を有するHC - FR 2

配列番号77のアミノ酸配列を有するHC - FR 3

配列番号78のアミノ酸配列を有するHC - FR 4、

またはHC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、もしくはHC - FR 4のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

40

【0167】

(26)(4M2 - C9)以下のFR：

50

配列番号 91 のアミノ酸配列を有する HC - FR 1

配列番号 92 のアミノ酸配列を有する HC - FR 2

配列番号 93 のアミノ酸配列を有する HC - FR 3

配列番号 94 のアミノ酸配列を有する HC - FR 4、

または HC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、もしくは HC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VH 領域。

【0168】

(27)(2M1-D2) 以下の FR :

配列番号 103 のアミノ酸配列を有する HC - FR 1

配列番号 76 のアミノ酸配列を有する HC - FR 2

配列番号 77 のアミノ酸配列を有する HC - FR 3

配列番号 78 のアミノ酸配列を有する HC - FR 4、

または HC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、もしくは HC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VH 領域。

【0169】

(28)(4M2-D9) 以下の FR :

配列番号 109 のアミノ酸配列を有する HC - FR 1

配列番号 110 のアミノ酸配列を有する HC - FR 2

配列番号 111 のアミノ酸配列を有する HC - FR 3

配列番号 112 のアミノ酸配列を有する HC - FR 4、

または HC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、もしくは HC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VH 領域。

【0170】

(29)(1M2-D2) 以下の FR :

配列番号 123 のアミノ酸配列を有する HC - FR 1

配列番号 124 のアミノ酸配列を有する HC - FR 2

配列番号 125 のアミノ酸配列を有する HC - FR 3

配列番号 78 のアミノ酸配列を有する HC - FR 4、

または HC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、もしくは HC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VH 領域。

【0171】

(30)(5M1-A11) 以下の FR :

配列番号 134 のアミノ酸配列を有する HC - FR 1

配列番号 92 のアミノ酸配列を有する HC - FR 2

配列番号 93 のアミノ酸配列を有する HC - FR 3

配列番号 135 のアミノ酸配列を有する HC - FR 4、

または HC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、もしくは HC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VH 領域。

【0172】

(31)(4M2-D5) 以下の FR :

配列番号 147 のアミノ酸配列を有する HC - FR 1

配列番号 148 のアミノ酸配列を有する HC - FR 2

配列番号 149 のアミノ酸配列を有する HC - FR 3

配列番号 135 のアミノ酸配列を有する HC - FR 4、

または HC - FR 1、HC - FR 2、HC - FR 3、もしくは HC - FR 4 のうちの 1 つ

10

20

30

40

50

もしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

【0173】

(32)(4M2-A8)以下のFR:

配列番号161のアミノ酸配列を有するHC-FR1

配列番号162のアミノ酸配列を有するHC-FR2

配列番号163のアミノ酸配列を有するHC-FR3

配列番号135のアミノ酸配列を有するHC-FR4、

またはHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3、もしくはHC-FR4のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

10

【0174】

(33)(9M2-C12)以下のFR:

配列番号172のアミノ酸配列を有するHC-FR1

配列番号173のアミノ酸配列を有するHC-FR2

配列番号174のアミノ酸配列を有するHC-FR3

配列番号175のアミノ酸配列を有するHC-FR4、

またはHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3、もしくはHC-FR4のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

20

【0175】

(34)(13D5p、13D5-1)以下のFR:

配列番号103のアミノ酸配列を有するHC-FR1

配列番号186のアミノ酸配列を有するHC-FR2

配列番号187のアミノ酸配列を有するHC-FR3

配列番号86のアミノ酸配列を有するHC-FR4、

またはHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3、もしくはHC-FR4のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

【0176】

(35)(13D5-13)以下のFR:

配列番号103のアミノ酸配列を有するHC-FR1

配列番号186のアミノ酸配列を有するHC-FR2

配列番号201のアミノ酸配列を有するHC-FR3

配列番号86のアミノ酸配列を有するHC-FR4、

またはHC-FR1、HC-FR2、HC-FR3、もしくはHC-FR4のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだVH領域。

30

【0177】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、上記の(1)~(18)のうちの1つに従うCDRと、上記の(19)~(35)のうちの1つに従うFRとを含むVH領域を含む。

40

【0178】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、下記の(36)~(57)のうちの1つに従うVH領域を含む。

【0179】

(36)(1)に従うCDRと、(19)、(20)、(21)、(22)、(23)、または(24)に従うFRとを含むVH領域。

【0180】

(37)(2)に従うCDRと、(19)に従うFRとを含むVH領域。

【0181】

50

- (3 8) (3) に従う C D R と、(2 0) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 8 2 】
- (3 9) (4) に従う C D R と、(2 0) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 8 3 】
- (4 0) (5) に従う C D R と、(2 1)、(2 2)、(2 3)、または (2 4) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 8 4 】
- (4 1) (6) に従う C D R と、(2 1) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 8 5 】
- (4 2) (6) に従う C D R と、(2 2) に従う F R とを含む V H 領域。 10
 【 0 1 8 6 】
- (4 3) (6) に従う C D R と、(2 4) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 8 7 】
- (4 4) (7) に従う C D R と、(2 3) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 8 8 】
- (4 5) (8) に従う C D R と、(2 5) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 8 9 】
- (4 6) (8) に従う C D R と、(2 7) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 9 0 】
- (4 7) (9) に従う C D R と、(2 6) に従う F R とを含む V H 領域。 20
 【 0 1 9 1 】
- (4 8) (9) に従う C D R と、(3 0) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 9 2 】
- (4 9) (1 0) に従う C D R と、(2 8) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 9 3 】
- (5 0) (1 1) に従う C D R と、(2 9) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 9 4 】
- (5 1) (1 2) に従う C D R と、(3 1) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 9 5 】
- (5 2) (1 3) に従う C D R と、(3 2) に従う F R とを含む V H 領域。 30
 【 0 1 9 6 】
- (5 3) (1 4) に従う C D R と、(3 3) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 9 7 】
- (5 4) (1 5) に従う C D R と、(3 4) または (3 5) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 9 8 】
- (5 5) (1 6) に従う C D R と、(3 4) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 1 9 9 】
- (5 6) (1 7) に従う C D R と、(3 4) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 2 0 0 】 40
- (5 7) (1 8) に従う C D R と、(3 5) に従う F R とを含む V H 領域。
 【 0 2 0 1 】
- 一部の実施形態では、抗原結合性分子は、下記の (5 8) ~ (7 6) のうちの 1 つに従う V H 領域を含む。
 【 0 2 0 2 】
- (5 8) 配列番号 2 7 6 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性、より好ましくは、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性のうちの 1 つを有するアミノ酸配列を含む V H 領域。
 【 0 2 0 3 】 50

(59) 配列番号285のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0204】

(60) 配列番号289のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0205】

10

(61) 配列番号32のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0206】

(62) 配列番号48のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0207】

20

(63) 配列番号52のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0208】

(64) 配列番号62のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0209】

30

(65) 配列番号71のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0210】

(66) 配列番号87のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0211】

40

(67) 配列番号102のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0212】

(68) 配列番号106のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVH領域。

【0213】

50

(6 9) 配列番号 1 1 9 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性、より好ましくは、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性のうちの 1 つを有するアミノ酸配列を含む V H 領域。

【 0 2 1 4 】

(7 0) 配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性、より好ましくは、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性のうちの 1 つを有するアミノ酸配列を含む V H 領域。

【 0 2 1 5 】

(7 1) 配列番号 1 4 3 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性、より好ましくは、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性のうちの 1 つを有するアミノ酸配列を含む V H 領域。

【 0 2 1 6 】

(7 2) 配列番号 1 5 7 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性、より好ましくは、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性のうちの 1 つを有するアミノ酸配列を含む V H 領域。

【 0 2 1 7 】

(7 3) 配列番号 1 6 8 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性、より好ましくは、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性のうちの 1 つを有するアミノ酸配列を含む V H 領域。

【 0 2 1 8 】

(7 4) 配列番号 1 8 3 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性、より好ましくは、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性のうちの 1 つを有するアミノ酸配列を含む V H 領域。

【 0 2 1 9 】

(7 5) 配列番号 1 9 4 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性、より好ましくは、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性のうちの 1 つを有するアミノ酸配列を含む V H 領域。

【 0 2 2 0 】

(7 6) 配列番号 1 9 9 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性、より好ましくは、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性のうちの 1 つを有するアミノ酸配列を含む V H 領域。

【 0 2 2 1 】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、下記の (7 7) ~ (9 6) のうちの 1 つに従う V L 領域を含む。

【 0 2 2 2 】

(7 7) (4 M 2 - C 1 2 由来のコンセンサス) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 3 0 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 3 】

(7 8) (C 2 4 / C 2 6 / C 2 7 コンセンサス) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 3 0 9 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、または L C - C D R 3 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 2 4 】

(7 9) (V 4 - C 2 4、V 4 - C 2 6) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 2 9 5 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、または L C - C D R 3 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 2 5 】

(8 0) (V 4 - C 2 7、V 4 - C 3 0、V 4 - C 3 1) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 3 0 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 2 6 】

(8 1) (4 M 2 - C 1 2 / V 4 H 1 / V 4 H 2 コンセンサス) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 2 4 5 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、または L C - C D R 3 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 2 7 】

(8 2) (4 M 2 - C 1 2、4 M 2 - B 4、V 4 - C 1、V 4 - C 9、V 4 - C 2 8)

以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 2 8 】

(8 3) (V 4 H 1) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 5 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 2 9 】

10

20

30

40

50

(8 4) (V 4 H 2) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 6 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 3 0 】

(8 5) (2 M 1 - B 1 2、2 M 1 - D 2) 以下の C D R :

配列番号 8 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 8 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 8 2 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 3 1 】

(8 6) (4 M 2 - C 9) 以下の C D R :

配列番号 9 6 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 9 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 9 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 3 2 】

(8 7) (4 M 2 - D 9) 以下の C D R :

配列番号 1 1 4 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 6 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 1 5 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V H 領域。

【 0 2 3 3 】

(8 8) (1 M 2 - D 2) 以下の C D R :

配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 2 9 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 3 4 】

(8 9) (5 M 1 - A 1 1) 以下の C D R :

配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3 ;

または L C - C D R 1、L C - C D R 2、もしくは L C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 3 5 】

(9 0) (4 M 2 - D 5) 以下の C D R :

配列番号 1 5 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

10

20

30

40

50

配列番号 152 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 153 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3 ;

または LC - CDR 1、LC - CDR 2、または LC - CDR 3 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

【0236】

(91) (4M2 - A8) 以下の CDR :

配列番号 165 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 152 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 153 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3 ;

または LC - CDR 1、LC - CDR 2、もしくは LC - CDR 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

10

【0237】

(92) (9M2 - C12) 以下の CDR :

配列番号 177 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 179 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3 ;

または LC - CDR 1、LC - CDR 2、もしくは LC - CDR 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

20

【0238】

(93) (13D5 p 由来) 以下の CDR :

配列番号 247 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 190 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3 ;

または LC - CDR 1、LC - CDR 2、もしくは LC - CDR 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

30

【0239】

(94) (13D5 p) 以下の CDR :

配列番号 189 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 190 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3 ;

または LC - CDR 1、LC - CDR 2、もしくは LC - CDR 3 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

【0240】

(95) (13D5 - 1) 以下の CDR :

配列番号 197 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 190 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3 ;

または LC - CDR 1、LC - CDR 2、または LC - CDR 3 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

40

【0241】

(96) (13D5 - 13) 以下の CDR :

配列番号 203 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 178 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 190 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3 ;

50

または LC - CDR 1、LC - CDR 2、または LC - CDR 3 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 4 2 】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、下記の (9 7) ~ (1 2 0) のうちの 1 つに従う V L 領域を含む。

【 0 2 4 3 】

(9 7) (V 4 - C 1) 以下の F R :

配列番号 5 9 のアミノ酸配列を有する LC - F R 1

配列番号 2 8 3 のアミノ酸配列を有する LC - F R 2

配列番号 2 8 4 のアミノ酸配列を有する LC - F R 3

配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する LC - F R 4、

または LC - F R 1、LC - F R 2、LC - F R 3、もしくは LC - F R 4 のうちの 1 つもしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 4 4 】

(9 8) (V 4 - C 9) 以下の F R :

配列番号 2 8 8 のアミノ酸配列を有する LC - F R 1

配列番号 2 8 3 のアミノ酸配列を有する LC - F R 2

配列番号 2 8 4 のアミノ酸配列を有する LC - F R 3

配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する LC - F R 4、

または LC - F R 1、LC - F R 2、LC - F R 3、または LC - F R 4 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 4 5 】

(9 9) (V 4 - C 2 4) 以下の F R :

配列番号 2 8 8 のアミノ酸配列を有する LC - F R 1

配列番号 2 8 3 のアミノ酸配列を有する LC - F R 2

配列番号 2 9 6 のアミノ酸配列を有する LC - F R 3

配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する LC - F R 4、

または LC - F R 1、LC - F R 2、LC - F R 3、または LC - F R 4 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 4 6 】

(1 0 0) (V 4 - C 2 6) 以下の F R :

配列番号 2 8 8 のアミノ酸配列を有する LC - F R 1

配列番号 2 9 8 のアミノ酸配列を有する LC - F R 2

配列番号 2 8 4 のアミノ酸配列を有する LC - F R 3

配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する LC - F R 4、

または LC - F R 1、LC - F R 2、LC - F R 3、または LC - F R 4 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 4 7 】

(1 0 1) (V 4 - C 2 7) 以下の F R :

配列番号 2 8 8 のアミノ酸配列を有する LC - F R 1

配列番号 2 8 3 のアミノ酸配列を有する LC - F R 2

配列番号 2 8 4 のアミノ酸配列を有する LC - F R 3

配列番号 4 7 のアミノ酸配列を有する LC - F R 4、

または LC - F R 1、LC - F R 2、LC - F R 3、または LC - F R 4 のうちの 1 つまたは複数における、1 つまたは 2 つまたは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された

10

20

30

40

50

、これらの変異体を組み込んだV L領域。

【0248】

(102)(V4-C28)以下のFR：

配列番号288のアミノ酸配列を有するLC-FR1

配列番号283のアミノ酸配列を有するLC-FR2

配列番号296のアミノ酸配列を有するLC-FR3

配列番号47のアミノ酸配列を有するLC-FR4、

またはLC-FR1、LC-FR2、LC-FR3、もしくはLC-FR4のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV L領域。

10

【0249】

(103)(V4-C30)以下のFR：

配列番号288のアミノ酸配列を有するLC-FR1

配列番号283のアミノ酸配列を有するLC-FR2

配列番号296のアミノ酸配列を有するLC-FR3

配列番号47のアミノ酸配列を有するLC-FR4、

またはLC-FR1、LC-FR2、LC-FR3、またはLC-FR4のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV L領域。

【0250】

(104)(V4-C31)以下のFR：

配列番号288のアミノ酸配列を有するLC-FR1

配列番号283のアミノ酸配列を有するLC-FR2

配列番号304のアミノ酸配列を有するLC-FR3

配列番号47のアミノ酸配列を有するLC-FR4、

またはLC-FR1、LC-FR2、LC-FR3、またはLC-FR4のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV L領域。

20

【0251】

(105)(4M2-C12)以下のFR：

配列番号44のアミノ酸配列を有するLC-FR1

配列番号45のアミノ酸配列を有するLC-FR2

配列番号46のアミノ酸配列を有するLC-FR3

配列番号47のアミノ酸配列を有するLC-FR4、

またはLC-FR1、LC-FR2、LC-FR3、またはLC-FR4のうちの1つまたは複数における、1つまたは2つまたは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV L領域。

30

【0252】

(106)(4M2-B4)以下のFR：

配列番号51のアミノ酸配列を有するLC-FR1

配列番号45のアミノ酸配列を有するLC-FR2

配列番号46のアミノ酸配列を有するLC-FR3

配列番号47のアミノ酸配列を有するLC-FR4、

またはLC-FR1、LC-FR2、LC-FR3、もしくはLC-FR4のうちの1つもしくは複数における、1つもしくは2つもしくは3つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された、これらの変異体を組み込んだV L領域。

40

【0253】

(107)(V4H1)以下のFR：

配列番号59のアミノ酸配列を有するLC-FR1

配列番号60のアミノ酸配列を有するLC-FR2

50

配列番号 61 のアミノ酸配列を有する LC - FR 3

配列番号 47 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4、

または LC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、もしくは LC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

【0254】

(108) (V4H2) 以下の FR :

配列番号 68 のアミノ酸配列を有する LC - FR 1

配列番号 69 のアミノ酸配列を有する LC - FR 2

配列番号 70 のアミノ酸配列を有する LC - FR 3

配列番号 47 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4、

または LC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、もしくは LC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

【0255】

(109) (2M1 - B12) 以下の FR :

配列番号 83 のアミノ酸配列を有する LC - FR 1

配列番号 84 のアミノ酸配列を有する LC - FR 2

配列番号 85 のアミノ酸配列を有する LC - FR 3

配列番号 86 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4、

または LC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、もしくは LC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

【0256】

(110) (4M2 - C9) 以下の FR :

配列番号 99 のアミノ酸配列を有する LC - FR 1

配列番号 100 のアミノ酸配列を有する LC - FR 2

配列番号 101 のアミノ酸配列を有する LC - FR 3

配列番号 86 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4、

または LC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、もしくは LC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

【0257】

(111) (2M1 - D2) 以下の FR :

配列番号 105 のアミノ酸配列を有する LC - FR 1

配列番号 84 のアミノ酸配列を有する LC - FR 2

配列番号 85 のアミノ酸配列を有する LC - FR 3

配列番号 86 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4、

または LC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、もしくは LC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

【0258】

(112) (4M2 - D9) 以下の FR :

配列番号 116 のアミノ酸配列を有する LC - FR 1

配列番号 117 のアミノ酸配列を有する LC - FR 2

配列番号 118 のアミノ酸配列を有する LC - FR 3

配列番号 86 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4、

または LC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、もしくは LC - FR 4 のうちの 1 つ
もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 9 】

(1 1 3) (1 M 2 - D 2) 以下の F R :

配列番号 1 3 0 のアミノ酸配列を有する L C - F R 1

配列番号 1 3 1 のアミノ酸配列を有する L C - F R 2

配列番号 1 3 2 のアミノ酸配列を有する L C - F R 3

配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有する L C - F R 4、

または L C - F R 1、L C - F R 2、L C - F R 3、もしくは L C - F R 4 のうちの 1 つ
 もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
 換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 6 0 】

(1 1 4) (5 M 1 - A 1 1) 以下の F R :

配列番号 1 4 0 のアミノ酸配列を有する L C - F R 1

配列番号 1 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - F R 2

配列番号 1 4 2 のアミノ酸配列を有する L C - F R 3

配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有する L C - F R 4、

または L C - F R 1、L C - F R 2、L C - F R 3、もしくは L C - F R 4 のうちの 1 つ
 もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
 換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 6 1 】

(1 1 5) (4 M 2 - D 5) 以下の F R :

配列番号 1 5 4 のアミノ酸配列を有する L C - F R 1

配列番号 1 5 5 のアミノ酸配列を有する L C - F R 2

配列番号 1 5 6 のアミノ酸配列を有する L C - F R 3

配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有する L C - F R 4、

または L C - F R 1、L C - F R 2、L C - F R 3、もしくは L C - F R 4 のうちの 1 つ
 もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
 換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 6 2 】

(1 1 6) (4 M 2 - A 8) 以下の F R :

配列番号 1 6 6 のアミノ酸配列を有する L C - F R 1

配列番号 1 5 5 のアミノ酸配列を有する L C - F R 2

配列番号 1 6 7 のアミノ酸配列を有する L C - F R 3

配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有する L C - F R 4、

または L C - F R 1、L C - F R 2、L C - F R 3、もしくは L C - F R 4 のうちの 1 つ
 もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
 換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 6 3 】

(1 1 7) (9 M 2 - C 1 2) 以下の F R :

配列番号 1 8 0 のアミノ酸配列を有する L C - F R 1

配列番号 1 8 1 のアミノ酸配列を有する L C - F R 2

配列番号 1 8 2 のアミノ酸配列を有する L C - F R 3

配列番号 8 6 のアミノ酸配列を有する L C - F R 4、

または L C - F R 1、L C - F R 2、L C - F R 3、もしくは L C - F R 4 のうちの 1 つ
 もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
 換された、これらの変異体を組み込んだ V L 領域。

【 0 2 6 4 】

(1 1 8) (1 3 D 5 p) 以下の F R :

配列番号 1 9 1 のアミノ酸配列を有する L C - F R 1

配列番号 1 9 2 のアミノ酸配列を有する L C - F R 2

配列番号 1 9 3 のアミノ酸配列を有する L C - F R 3

10

20

30

40

50

配列番号 86 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4、
 または LC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、もしくは LC - FR 4 のうちの 1 つ
 もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
 換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

【0265】

(119)(13D5-1) 以下の FR :

配列番号 191 のアミノ酸配列を有する LC - FR 1

配列番号 198 のアミノ酸配列を有する LC - FR 2

配列番号 193 のアミノ酸配列を有する LC - FR 3

配列番号 86 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4、

または LC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、もしくは LC - FR 4 のうちの 1 つ
 もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
 換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

10

【0266】

(120)(13D5-13) 以下の FR :

配列番号 191 のアミノ酸配列を有する LC - FR 1

配列番号 192 のアミノ酸配列を有する LC - FR 2

配列番号 204 のアミノ酸配列を有する LC - FR 3

配列番号 86 のアミノ酸配列を有する LC - FR 4、

または LC - FR 1、LC - FR 2、LC - FR 3、もしくは LC - FR 4 のうちの 1 つ
 もしくは複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置
 換された、これらの変異体を組み込んだ VL 領域。

20

【0267】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、上記の (77) ~ (96) のうちの 1 つに従
 う CDR と、上記の (97) ~ (120) のうちの 1 つに従う FR とを含む VL 領域を含
 む。

【0268】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、下記の (121) ~ (148) のうちの 1 つ
 に従う VL 領域を含む。

【0269】

(121)(77) に従う CDR と、(97)、(98)、(99)、(100)、(101)、(102)、(103)、(104)、(105)、(106)、(107)
 または (108) に従う FR とを含む VL 領域。

30

【0270】

(122)(78) に従う CDR と、(99)、(100)、または (101) に従う
 FR とを含む VL 領域。

【0271】

(123)(79) に従う CDR と、(99) に従う FR とを含む VL 領域。

【0272】

(124)(79) に従う CDR と、(100) に従う FR とを含む VL 領域。

40

【0273】

(125)(80) に従う CDR と、(101) に従う FR とを含む VL 領域。

【0274】

(126)(82) に従う CDR と、(97) に従う FR とを含む VL 領域。

【0275】

(127)(82) に従う CDR と、(98) に従う FR とを含む VL 領域。

【0276】

(128)(82) に従う CDR と、(102) に従う FR とを含む VL 領域。

【0277】

(129)(80) に従う CDR と、(103) に従う FR とを含む VL 領域。

50

【0278】

(130)(80)に従うCDRと、(104)に従うFRとを含むVL領域。

【0279】

(131)(81)に従うCDRと、(105)、(106)、(107)、または(108)に従うFRとを含むVL領域。

【0280】

(132)(82)に従うCDRと、(105)に従うFRとを含むVL領域。

【0281】

(133)(82)に従うCDRと、(106)に従うFRとを含むVL領域。

【0282】

(134)(83)に従うCDRと、(107)に従うFRとを含むVL領域。

10

【0283】

(135)(84)に従うCDRと、(108)に従うFRとを含むVL領域。

【0284】

(136)(85)に従うCDRと、(109)に従うFRとを含むVL領域。

【0285】

(137)(85)に従うCDRと、(111)に従うFRとを含むVL領域。

【0286】

(138)(86)に従うCDRと、(110)に従うFRとを含むVL領域。

【0287】

(139)(87)に従うCDRと、(112)に従うFRとを含むVL領域。

20

【0288】

(140)(88)に従うCDRと、(113)に従うFRとを含むVL領域。

【0289】

(141)(89)に従うCDRと、(114)に従うFRとを含むVL領域。

【0290】

(142)(90)に従うCDRと、(115)に従うFRとを含むVL領域。

【0291】

(143)(91)に従うCDRと、(116)に従うFRとを含むVL領域。

【0292】

(144)(92)に従うCDRと、(117)に従うFRとを含むVL領域。

30

【0293】

(145)(93)に従うCDRと、(118)、(119)、または(120)に従うFRとを含むVL領域。

【0294】

(146)(94)に従うCDRと、(118)に従うFRとを含むVL領域。

【0295】

(147)(95)に従うCDRと、(119)に従うFRとを含むVL領域。

【0296】

(148)(96)に従うCDRと、(120)に従うFRとを含むVL領域。

40

【0297】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、下記の(149)~(173)のうちの1つに従うVL領域を含む。

【0298】

(149)配列番号310のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むVL領域。

【0299】

(150)配列番号282のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、

50

より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0300】

(151) 配列番号287のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0301】

(152) 配列番号294のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

10

【0302】

(153) 配列番号297のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0303】

(154) 配列番号299のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

20

【0304】

(155) 配列番号301のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0305】

(156) 配列番号302のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

30

【0306】

(157) 配列番号303のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0307】

(158) 配列番号40のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

40

【0308】

(159) 配列番号50のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0309】

(160) 配列番号57のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、よ

50

り好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0310】

(161) 配列番号66のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0311】

(162) 配列番号79のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

10

【0312】

(163) 配列番号95のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0313】

(164) 配列番号104のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

20

【0314】

(165) 配列番号113のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0315】

(166) 配列番号126のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

30

【0316】

(167) 配列番号136のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0317】

(168) 配列番号150のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

40

【0318】

(169) 配列番号164のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0319】

(170) 配列番号176のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、

50

より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0320】

(171) 配列番号188のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0321】

(172) 配列番号196のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

10

【0322】

(173) 配列番号202のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%の配列同一性、より好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むV L領域。

【0323】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、上記の(1)~(76)のうちのいずれか1つに従うV H領域と、上記の(77)~(173)のうちのいずれか1つに従うV L領域とを含む。

20

【0324】

1つまたは複数のアミノ酸が、別のアミノ酸で置換される、本発明に従う実施形態では、置換は、例えば、以下の表に従う、保存的置換でありうる。一部の実施形態では、中欄の同じブロック内のアミノ酸が置換される。一部の実施形態では、最も右の欄の同じ連なりのアミノ酸が置換される。

【0325】

【表1】

脂肪族	非極性	GAP ILV
	極性(非帯電)	CSTM NQ
	極性(帯電)	DE KR
芳香族		HFWY

30

一部の実施形態では、置換(複数可)は、機能的に保存的でありうる。すなわち、一部の実施形態では、置換は、同等の非置換分子と比較して置換を含む抗原結合性分子の、1つまたは複数の機能的特性(例えば、標的への結合)に影響を及ぼさない場合がある(またはこれに実質的に影響を及ぼさない場合がある)。

40

【0326】

抗体の抗原結合性領域の、V HおよびV L領域は、併せて、F v領域を構成する。一部の実施形態では、本発明に従う抗原結合性分子は、V I S T Aに結合するF v領域を含むか、またはこれらからなる。一部の実施形態では、F vのV HおよびV L領域は、リンカー領域により接合された、単一のポリペプチド、すなわち、単鎖F v (s c F v)として提供される。

【0327】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、免疫グロブリンの重鎖定常配列の、1つまたは複数の領域を含む。一部の実施形態では、免疫グロブリンの重鎖定常配列は、

50

I g G (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、I g A (例えば、I g A 1、I g A 2)、I g D、I g E、またはI g Mの重鎖定常配列であるか、またはこれらに由来する。

【0328】

一部の実施形態では、免疫グロブリンの重鎖定常配列は、ヒト免疫グロブリンG1定常配列 (IGHG1; UniProt: P01857-1, v1; 配列番号205) である。配列番号205の1~98位は、CH1領域 (配列番号206) を形成する。配列番号205の99~110位は、CH1とCH2領域との間のヒンジ領域 (配列番号207) を形成する。配列番号205の111~223位は、CH2領域 (配列番号208) を形成する。配列番号205の224~330位は、CH3領域 (配列番号209) を形成する。

10

【0329】

例示される抗原結合性分子は、CH3領域内に、置換である、D356E、L358M (EU番号付けに従い番号付けされた位置) を含む、pFUSE-CHIG-hG1を使用して調製されうる。pFUSE-CHIG-hG1によりコードされるCH3領域のアミノ酸配列を、配列番号210に示す。CH3領域は、本明細書に記載される抗原結合性分子のFc領域への修飾に従い、さらなる置換を施されうることが理解されるであろう。

【0330】

一部の実施形態では、CH1領域は、配列番号206の配列、または配列番号206のアミノ酸配列に対する、少なくとも60%、好ましくは、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%のうちの1つのアミノ酸配列同一性を有する配列を含むか、またはこれらからなる。一部の実施形態では、CH1-CH2間のヒンジ領域は、配列番号207の配列、または配列番号207のアミノ酸配列に対する、少なくとも60%、好ましくは、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%のうちの1つのアミノ酸配列同一性を有する配列を含むか、またはこれらからなる。一部の実施形態では、CH2領域は、配列番号208の配列、または配列番号208のアミノ酸配列に対する、少なくとも60%、好ましくは、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%のうちの1つのアミノ酸配列同一性を有する配列を含むか、またはこれらからなる。一部の実施形態では、CH3領域は、配列番号209もしくは210の配列、または配列番号209もしくは210のアミノ酸配列に対する、少なくとも60%、好ましくは、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%のうちの1つのアミノ酸配列同一性を有する配列を含むか、またはこれらからなる。

20

30

【0331】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、免疫グロブリンの軽鎖定常配列の、1つまたは複数の領域を含む。一部の実施形態では、免疫グロブリンの軽鎖定常配列は、ヒト免疫グロブリンカッパ定常配列 (IGKC; C; UniProt: P01834-1, v2; 配列番号211) である。一部の実施形態では、免疫グロブリンの軽鎖定常配列は、ヒト免疫グロブリンラムダ定常配列 (IGLC; C) 、例えば、IGLC1、IGLC2、IGLC3、IGLC6、またはIGLC7である。一部の実施形態では、CL領域は、配列番号211の配列、または配列番号211のアミノ酸配列に対する、少なくとも60%、好ましくは、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%のうちの1つのアミノ酸配列同一性を有する配列を含むか、またはこれらからなる。

40

【0332】

抗体の抗原結合性領域の、VLおよび軽鎖定常 (CL) 領域、ならびにVH領域および重鎖定常1 (CH1) 領域は、併せて、Fab領域を構成する。一部の実施形態では、抗

50

原結合性分子は、VH、CH1、VL、CL（例えば、C またはC ）を含むFab領域を含む。一部の実施形態では、Fab領域は、VHとCH1とを含むポリペプチド（例えば、VH-CH1融合ポリペプチド）、およびVLとCLとを含むポリペプチド（例えば、VL-CL融合ポリペプチド）を含む。一部の実施形態では、Fab領域は、VHとCLとを含むポリペプチド（例えば、VH-CL融合ポリペプチド）、およびVLとCH1とを含むポリペプチド（例えば、VL-CH1融合ポリペプチド）を含む；すなわち、一部の実施形態では、Fab領域は、CrossFab領域である。一部の実施形態では、FabまたはCrossFabの、VH、CH1、VL、およびCL領域は、リンカー領域により接合された、単一のポリペプチド、すなわち、単鎖Fab（scFab）または単鎖CrossFab（scCrossFab）として提供される。

10

【0333】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTAに結合するFab領域を含むか、またはこれらからなる。

【0334】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原結合性分子は、VISTAに結合する全抗体を含むか、またはこれらからなる。本明細書で使用される、「全抗体」とは、免疫グロブリン（Ig）の構造と、実質的に同様の構造を有する抗体を指す。異なる種類の免疫グロブリン、およびそれらの構造については、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、SchroederおよびCavacini、J Allergy Clin Immunol.（2010）、125（202）：S41～S52において記載されている。

20

【0335】

G型の免疫グロブリン（すなわち、IgG）は、2つの重鎖と、2つの軽鎖とを含む、約150kDaの糖タンパク質である。N末端から、C末端へと、重鎖は、VHに続き、3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）を含む、重鎖定常領域を含み、同様に、軽鎖は、VLに続き、CLを含む。重鎖に応じて、免疫グロブリンは、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgA（例えば、IgA1、IgA2）、IgD、IgE、またはIgMと分類されうる。軽鎖は、カッパ（ ）鎖の場合もあり、ラムダ（ ）鎖の場合もある。

【0336】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原結合性分子は、VISTAに結合するIgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgA（例えば、IgA1、IgA2）、IgD、IgE、またはIgMを含むか、またはこれらからなる。

30

【0337】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTAに対して、少なくとも一価の結合性分子である。結合価とは、所与の抗原決定基についての、抗原結合性分子内の結合性部位の数を指す。したがって、一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAに対する、少なくとも1つの結合性部位を含む。

【0338】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAに対する、1つを超える結合性部位、例えば、2つ、3つ、または4つの結合性部位を含む。結合性部位は、同じ場合もあり、異なる場合もある。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAに対して、例えば、二価、三価、または四価である。

40

【0339】

本発明の態様は、多特異性の抗原結合性分子に関する。「多特異性」とは、抗原結合性分子が、1つを超える標的への特異的結合をもたらすことを意味する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、二特異性の抗原結合性分子である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、少なくとも2つの、異なる抗原結合性ドメイン（すなわち、例えば、同一でないVHおよびVLを含む、少なくとも2つの抗原結合性ドメイン）を含む。

【0340】

50

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、V I S T A、および別の標的（例えば、V I S T A以外の抗原）に結合するので、少なくとも二特異性である。「二特異性」という用語は、抗原結合性分子が、少なくとも2つの、別個の抗原決定基に特異的に結合することが可能であることを意味する。

【0341】

本発明に従う抗原結合性分子（例えば、多特異性抗原結合性分子）は、抗原結合性分子が特異的である標的に結合することが可能な抗原結合性分子を含みうるということが理解されるであろう。例えば、V I S T AおよびV I S T A以外の抗原に結合することが可能な抗原結合性分子は、(i) V I S T Aに結合することが可能な抗原結合性分子、および(ii) V I S T A以外の抗原に結合することが可能な抗原結合性分子を含みうる。

10

【0342】

また、本発明に従う抗原結合性分子（例えば、多特異性抗原結合性分子）は、抗原結合性分子が特異的である標的に結合することが可能な、抗原結合性ポリペプチド、または抗原結合性ポリペプチド複合体を含みうることも理解されるであろう。例えば、本発明に従う抗原結合性分子は、例えば、(i) 軽鎖ポリペプチド（構造V L - C Lを含む）と、重鎖ポリペプチド（構造V H - C H 1 - C H 2 - C H 3を含む）とを含む、V I S T Aに結合することが可能な抗原結合性ポリペプチド複合体、および(ii) 軽鎖ポリペプチド（構造V L - C Lを含む）と、重鎖ポリペプチド（構造V H - C H 1 - C H 2 - C H 3を含む）とを含む、V I S T A以外の抗原に結合することが可能な抗原結合性ポリペプチド複合体を含みうる。

20

【0343】

一部の実施形態では、より大型の抗原結合性分子（例えば、多特異性抗原結合性分子）の、構成要素である抗原結合性分子は、より大型の抗原結合性分子の、例えば、「抗原結合性ドメイン」または「抗原結合性領域」と称されうる。

【0344】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、V I S T Aに結合することが可能な抗原結合性分子と、V I S T A以外の抗原に結合することが可能な抗原結合性分子とを含む。一部の実施形態では、V I S T A以外の抗原は、免疫細胞の表面分子である。一部の実施形態では、V I S T A以外の抗原は、がん細胞抗原である。一部の実施形態では、V I S T A以外の抗原は、受容体分子、例えば、細胞表面受容体である。一部の実施形態では、V I S T A以外の抗原は、細胞シグナル伝達分子、例えば、サイトカイン、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、またはリンホカインである。一部の実施形態では、V I S T A以外の抗原は、増殖因子またはホルモンである。

30

【0345】

がん細胞抗原とは、がん細胞により発現または過剰発現される抗原である。がん細胞抗原は、任意のペプチド/ポリペプチド、糖タンパク質、リポタンパク質、グリカン、糖脂質、脂質、またはこれらの断片でありうる。がん細胞抗原の発現は、がんと関連しうる。がん細胞抗原は、がん細胞により、異常に発現される場合もあり（例えば、がん細胞抗原は、異常な局在化を伴って発現されうる）、がん細胞による、異常な構造を伴って発現される場合もある。がん細胞抗原は、免疫応答を誘発することが可能でありうる。一部の実施形態では、抗原は、がん細胞の細胞表面において発現される（すなわち、がん細胞抗原は、がん細胞表面抗原である）。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子が結合する、抗原の部分は、がん細胞の外部表面上に呈示される（すなわち、細胞外にある）。がん細胞抗原は、がん関連抗原でありうる。一部の実施形態では、がん細胞抗原は、その発現が、がんの発症、進行、または症状の重症度と関連する抗原である。がん関連抗原は、がんの原因または病理と関連する場合もあり、がんの帰結として、異常に発現される場合もある。一部の実施形態では、がん細胞抗原は、その発現が、がんの細胞により、例えば、同等の非がん性細胞（例えば、同じ組織/細胞型に由来する、非がん性細胞）による発現レベルと比較して、上方調節される（例えば、RNAレベルおよび/またはタンパク質レベルで）抗原である。一部の実施形態では、がん関連抗原は、がん性細胞により、優先

40

50

的に発現され、同等な非がん性細胞（例えば、同じ組織／細胞型に由来する、非がん性細胞）により発現されない場合がある。一部の実施形態では、がん関連抗原は、突然変異したがん遺伝子、または突然変異した腫瘍サプレッサー遺伝子の産物でありうる。一部の実施形態では、がん関連抗原は、過剰発現された細胞内タンパク質の産物の場合もあり、発がん性ウイルス、がん胎児抗原、または細胞表面糖脂質もしくは糖タンパク質により産生されたがん抗原の場合もある。

【0346】

免疫細胞の表面分子は、免疫細胞の細胞表面、または細胞表面上において発現される、任意のペプチド／ポリペプチド、糖タンパク質、リポタンパク質、グリカン、糖脂質、脂質、またはこれらの断片でありうる。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子が結合する、免疫細胞の表面分子の部分は、免疫細胞の外部表面上にある（すなわち、細胞外にある）。免疫細胞の表面分子は、任意の免疫細胞の細胞表面において発現されうる。一部の実施形態では、免疫細胞は、造血細胞由来の細胞、例えば、好中球、好酸球、好塩基球、樹状細胞、リンパ球、または単球でありうる。リンパ球は、例えば、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK T細胞、もしくは自然リンパ球細胞（ILC）、またはこれらの前駆細胞（例えば、胸腺細胞またはプレB細胞）でありうる。一部の実施形態では、免疫細胞の表面分子は、共刺激分子（例えば、CD28、OX40、4-1BB、ICOS、またはCD27）またはこれらのリガンドでありうる。一部の実施形態では、免疫細胞の表面分子は、チェックポイント分子（例えば、PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、TIGIT、またはBTLA）またはこれらのリガンドでありうる。

【0347】

本発明に従う、多特異性抗原結合性分子は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、BrinkmannおよびKontermann、MAbs（2017）、9（2）：182～212において記載されたフォーマットなど、任意の適切なフォーマットで提供されうる。適切なフォーマットは、BrinkmannおよびKontermann、MAbs（2017）、9（2）：182～212の図2に示されたフォーマット：抗体コンジュゲート、例えば、IgG₂、F(ab')₂、またはCovX-Body；IgGまたはIgG様分子、例えば、IgG、キメラIgG、
-bodyの共通HC；CH1/CL融合タンパク質、例えば、scFv₂-CH1/CL、VHH₂-CH1/CL；「可変ドメインだけの」二特異性抗原結合性分子、例えば、タンデムscFv（taFv）、トリプルボディー、ダイアボディー（Db）、dsDb、Db(kih)、DART、scDb、dsFv-dsFv、tandAb、トリプルヘッド、タンデムdAb/VHH、四価dAb.VHH；非Ig融合タンパク質、例えば、scFv₂-アルブミン、scDb-アルブミン、taFv-アルブミン、taFv-毒素、ミニ抗体、DNL-Fab₂、DNL-Fab₂-scFv、DNL-Fab₂-IgG-サイトカイン₂、ImmTAC（TCR-scFv）；修飾Fc/CH₃融合タンパク質、例えば、scFv-Fc(kih)、scFv-Fc（CH₃電荷対）、scFv-Fc（EW-RVT）、scFv-fc（HA-TF）、scFv-Fc（SEEDbody）、taFv-Fc(kih)、scFv-Fc(kih)-Fv、Fab-Fc(kih)-scFv、Fab-scFv-Fc(kih)、Fab-scFv-Fc（BEAT）、Fab-scFv-Fc（SEEDbody）、DART-Fc、scFv-CH₃(kih)、TriFab；Fc融合体、例えば、ジダイアボディー、scDb-Fc、taFv-Fc、scFv-Fc-scFv、HCAb-VHH、Fab-scFv-Fc、scFv₄-Ig、scFv₂-Fcab；CH₃融合体、例えば、ダイア-ダイアボディー、scDb-CH₃；IgE/IgM CH₂融合体、例えば、scFv-EHD₂-scFv、scFvMHD₂-scFv；Fab融合タンパク質、例えば、Fab-scFv（パイボディー）、Fab-scFv₂（トリボディー）、Fab-Fv、Fab-dsFv、Fab-VHH、直交型Fab-Fab；非Ig融合タンパク質、例えば、DNL-Fab₃、DNL-Fab₂-scFv、DNL-Fab₂-IgG-サイトカ

イン₂；非対称IgGまたはIgG様分子、例えば、IgG(kih)、IgG(kih)共通LC、ZW1 IgG共通LC、Biclonics共通LC、CrossMab、CrossMab(kih)、scFab-IgG(kih)、Fab-scFab-IgG(kih)、直交型Fab IgG(kih)、DuetMab、CH₃電荷対+CH₁/CL電荷対、ヒンジ/CH₃電荷対、SEED-body、デュオボディー、four-in-one-CrossMab(kih)、LUZ-Y共通LC；LUZ-Y scFab-IgG、FcFc*；アペンデッド/Fc修飾IgG、例えば、IgG(kih)-Fv、IgG HA-TF-Fv、IgG(kih)scFab、scFab-Fc(kih)-scFv₂、scFab-Fc(kih)-scFv、half DVD-Ig、DVI-Ig(four-in-one)、CrossMab-Fab；修飾Fc/CH₃融合タンパク質、例えば、Fab-Fc(kih)-scFv、Fab-scFv-Fc(kih)、Fab-scFv-Fc(BEAT)、Fab-scFv-Fc-SEEDbody、TriFab；アペンデッドIgG-HC融合体、例えば、IgG-HC、scFv、IgG-dAb、IgG-taFv、IgG-CrossFab、IgG-直交型Fab、IgG-(C C)Fab、scFv-HC-IgG、タンデムFab-IgG(直交型Fab)Fab-IgG(C C Fab)、Fab-IgG(CR3)、Fab-ヒンジ-IgG(CR3)；アペンデッドIgG-LC融合体、例えば、IgG-scFv(LC)、scFv(LC)-IgG、dAb-IgG；アペンデッドIgG-HC/LC融合体、例えば、DVD-Ig、TVD-Ig、CODV-Ig、scFv₄-IgG、Zybody；Fc融合体、例えば、Fab-scFv-Fc、scFv₄-IgG；F(ab')₂融合体、例えば、F(ab')₂-scFv₂；CH₁/CL融合タンパク質、例えば、scFv₂-CH₁-ヒンジ/CL；修飾IgG、例えば、DAF(two-in-one-IgG)、DutaMab、Mab²；および非Ig融合体、例えば、DNL-Fab₄-IgGを含む。

【0348】

当業者は、二特異性の抗原結合性分子を、デザインし、調製することが可能である。二特異性の抗原結合性分子を作製するための方法は、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、SegalおよびBast、2001、「Production of Bispecific Antigen-binding molecules」、「Current Protocols in Immunology」、14:IV:2.13:2.13.1~2.13.16において記載される通りに、例えば、還元性ジスルフィド結合または非還元性チオエーテル結合により、抗原結合性分子または抗体断片を、化学的に架橋するステップを含む。例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネート(SPDP)は、例えば、ヒンジ領域のSH基を介して、Fab断片を、化学的に架橋して、ジスルフィドにより連結された、二特異性F(ab)₂ヘテロ二量体を創出するのに使用されうる。

【0349】

二特異性の抗原結合性分子を作製するための、他の方法は、抗体産生ハイブリドーマを、例えば、ポリエチレングリコールと融合させて、例えば、D.M.およびBast、B.J.、2001、「Production of Bispecific Antigen-binding molecules」、「Current Protocols in Immunology」、14:IV:2.13:2.13.1~2.13.16に記載された、二特異性抗体を分泌することが可能なクアドローマ細胞を作製するステップを含む。

【0350】

本発明に従う、二特異性抗原結合性分子はまた、例えば、それらの両方の全内容が、参照により本明細書に組み込まれる、「Antibody Engineering: Methods and Protocols」、2版(Humana Press、2012)、40章:「Production of Bispecific Antigen-binding molecules: Diabodies and Tandem scF

10

20

30

40

50

v」(HornigおよびFaerber-Schwarz);またはFrench、「How to make bispecific antigen-binding molecules」、Methods Mol. Med.、2000、40:333~339に記載された、抗原結合性分子のためのポリペプチドをコードする核酸構築物からの組換え発現によっても作製されうる。例えば、2つの抗原結合性断片のための軽鎖および重鎖可変ドメイン(すなわち、VISTAに結合することが可能な抗原結合性断片のための、軽鎖および重鎖可変ドメイン、ならびに別の標的タンパク質に結合することが可能な抗原結合性断片のための、軽鎖および重鎖可変ドメイン)をコードし、抗原結合性断片の間の、適切なリンカーまたは二量体化ドメインをコードする配列を含むDNA構築物は、分子クローニング法により調製されうる。その後、組換え二特異性抗体は、適切な宿主細胞(例えば、哺乳動物宿主細胞)内の、構築物の発現(例えば、in vitroにおける)により産生され、次いで、発現された組換え二特異性抗体は、任意選択で、精製されうる。

10

Fc領域

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、Fc領域を含む。

【0351】

IgG、IgA、およびIgDのアイソタイプでは、Fc領域は、1つのポリペプチドに由来する、CH2およびCH3領域と、別のポリペプチドに由来する、CH2およびCH3領域とから構成される。2つのポリペプチドに由来する、CH2およびCH3領域が、併せて、Fc領域を形成する。IgMおよびIgEのアイソタイプでは、Fc領域は、3つの定常ドメイン(CH2、CH3、およびCH4)を含有し、2つのポリペプチドに由来するCH2~CH4が、併せて、Fc領域を形成する。

20

【0352】

Fc領域は、Fc受容体と、免疫系の他の分子との相互作用をもたらして、機能的作用をもたらす。IgG Fc媒介性のエフェクター機能は、例えば、Jefferysら、Immunol Rev、1998、163:59~76(参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)において総説されており、Fc領域と、免疫細胞により発現されるFc受容体との相互作用を介する、Fcに媒介される、免疫細胞(例えば、マクロファージ、樹状細胞、NK細胞、およびT細胞)の動員および活性化、Fc領域の、補体タンパク質C1qへの結合を介する、補体経路成分の動員、ならびに帰結としての、補体カスケードの活性化を介してもたらされる。

30

【0353】

Fc媒介性機能は、Fc受容体への結合、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)、抗体依存性細胞媒介性食作用(ADCP)、補体依存性細胞傷害作用(CDC)、膜侵襲複合体(MAC)の形成、細胞からの脱顆粒、サイトカインおよび/またはケモカインの産生、ならびに抗原のプロセッシングおよび提示を含む。

【0354】

当技術分野では、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Wangら、Protein Cell(2018)、9(1):63~73に記載された修飾など、Fc媒介性機能に影響を及ぼす、抗体のFc領域への修飾が公知である。特に、抗体のエフェクター機能に影響を及ぼすことが公知である、例示的なFc領域の修飾は、Wangら、Protein Cell(2018)、9(1):63~73の表1にまとめられている。本明細書の下記では、抗体のエフェクター活性に影響を及ぼす、Fc領域への修飾が記載される。

40

【0355】

Fc領域/CH2/CH3が、参照の置換(複数可)「に対応する」修飾(複数可)を含むものとして記載される場合、相同なFc/CH2/CH3内の、同等の置換(複数可)が想定される。例示を目的として述べると、ヒトIgG1内のL234A/L235A置換(Kabatら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、5版、Public Health Servi

50

ce、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991に記載されている、EU番号付けシステムに従い番号付けされた)は、マウスIgガンマ2A鎖C領域の117および118位における、LからAへの置換に対応し、A対立遺伝子は、配列番号256に従い番号付けされる。

【0356】

Fc領域が、修飾を含むものとして記載される場合、修飾は、併せて、Fc領域を形成する、ポリペプチド鎖の一方または両方に存在しうる。

【0357】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、修飾を含むFc領域を含む。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、CH2および/またはCH3領域のうちの1つまたは複数において、修飾を含むFc領域を含む。

10

【0358】

一部の実施形態では、Fc領域は、Fc媒介性機能を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、ADCCを増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、ADCPを増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、CDCを増大させる修飾を含む。Fc媒介性機能(例えば、ADCC、ADCP、CDC)を増大させる修飾を含むFc領域を含む抗原結合性分子は、対応する非修飾のFc領域を含む抗原結合性分子と比較した、関連するエフェクター機能のレベルの上昇を誘導する。

【0359】

一部の実施形態では、Fc領域は、Fc受容体への結合を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Fc受容体への結合を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRI、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、およびFcRIIIbのうちの1つまたは複数への結合を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRIIIaへの結合を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRIIaへの結合を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRIIbへの結合を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRnへの結合を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、補体タンパク質への結合を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、C1qへの結合を増大させる修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、抗原結合性分子の六量体化を促進する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、抗原結合性分子の半減期を延長する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、コエンゲージメントを増大させる修飾を含む。

20

30

【0360】

一部の実施形態では、Fc領域は、Stavenhagenら、Cancer Res. (2007)、67:8882~8890に記載された、置換の組合せである、F243L/R292P/Y300L/V305I/P396Lに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Lazarら、Proc Natl Acad Sci USA. (2006)、103:4005~4010に記載された、置換の組合せである、S239D/I332EまたはS239D/I332E/A330Lに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Shieldsら、J Biol Chem. (2001)、276:6591~6604に記載された、置換の組合せである、S298A/E333A/K334Aに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Mimotoら、MAbs. (2013):5:229~236に記載された、置換の組合せである、L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298Aに対応する、重鎖ポリペプチドのうちの1つに対する修飾と、置換の組合せである、D270E/K326D/A330M/K334Eに対応する、他の重鎖ポリペプチドに対する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Richardsら、Mol Cancer Ther. (2008)7:2517~2527に記載された、置換の組合せである、G236A/S239D/I332Eに対応する修飾を含む。

40

【0361】

50

一部の実施形態では、Fc領域は、Idusogiera、J Immunol. (2001)、166(4):2571~5に記載された、置換の組合せである、K326W/E333Sに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Mooreら、MAbs. (2010)、2(2):181~9に記載された、置換の組合せである、S267E/H268F/S324Tに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Natsumeら、Cancer Res. (2008)、68(10):3863~72に記載された、置換の組合せに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Dieboldera、Science (2014)、343(6176):1260~3に記載された、置換の組合せである、E345R/E430G/S440Yに対応する修飾を含む。

10

【0362】

一部の実施形態では、Fc領域は、Dall'Acquara、J Immunol. (2002)、169:5171~5180に記載された、置換の組合せである、M252Y/S254T/T256Eに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Zalivskyら、Nat Biotechnol. (2010)、28:157~159に記載された、置換の組合せである、M428L/N434Sに対応する修飾を含む。

【0363】

一部の実施形態では、Fc領域は、Chura、Mol Immunol. (2008)、45:3926~3933に記載された、置換の組合せである、S267E/L328Fに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Shangら、Biol Chem. (2014)、289:15309~15318に記載された、置換の組合せである、N325S/L328Fに対応する修飾を含む。

20

【0364】

一部の実施形態では、Fc領域は、Fc媒介性機能を低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、ADCCを低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、ADCPを低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、CDCを低減/防止する修飾を含む。Fc媒介性機能(例えば、ADCC、ADCP、CDC)を低減/防止する修飾を含むFc領域を含む抗原結合性分子は、対応する非修飾のFc領域を含む抗原結合性分子と比較した、関連するエフェクター機能のレベルの低減を誘導する。

30

【0365】

一部の実施形態では、Fc領域は、Fc受容体への結合を低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Fc受容体への結合を低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRI、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、およびFcRIIIbのうちの一つまたは複数への結合を低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRIIIaへの結合を低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRIIIaへの結合を低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRIIbへの結合を低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、補体タンパク質への結合を低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、C1qへの結合を低減/防止する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、N297に対応するアミノ酸残基のグリコシル化を低減/防止する修飾を含む。

40

【0366】

一部の実施形態では、Fc領域は、一つまたは複数のFc媒介性機能を誘導することが可能ではない(すなわち、関連するFc媒介性機能(複数可)を誘発する能力を欠く)。したがって、このようなFc領域を含む抗原結合性分子はまた、関連する機能(複数可)を誘導する能力も欠く。このような抗原結合性分子は、関連する機能(複数可)が欠如すると記載されうる。

【0367】

一部の実施形態では、Fc領域は、ADCCを誘導することが可能ではない。一部の実

50

施形態では、Fc領域は、ADC Pを誘導することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、CDCを誘導することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、ADC Cを誘導することが可能ではなく、かつ/またはADC Pを誘導することが可能ではなく、かつ/またはCDCを誘導することが可能ではない。

【0368】

一部の実施形態では、Fc領域は、Fc受容体に結合することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、Fc受容体に結合することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRI、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、およびFcRIIIbのうちの1つまたは複数に結合することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRIIIaに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRIIIaに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRIIbに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、FcRnに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、補体タンパク質に結合することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、C1qに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、Fc領域は、N297に対応するアミノ酸残基においてグリコシル化されない。

10

【0369】

一部の実施形態では、Fc領域は、Leabmanら、MAbs.(2013)、5:896~903に記載された、N297AまたはN297QまたはN297Gに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Alegreら、J Immunol.(1992)、148:3461~3468に記載された、L235Eに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Xuら、Cell Immunol.(2000)、200:16~26に記載された、置換の組合せである、L234A/L235AまたはF234A/L235Aに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Schlothauerら、Protein Engineering, Design and Selection(2016)、29(10):457~466に記載された、P329AまたはP329Gに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Loら、J. Biol. Chem(2017)、292(9):3900~3908に記載された、置換の組合せである、L234A/L235A/P329Gに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Rotherら、Nat Biotechnol.(2007)、25:1256~1264に記載された、置換の組合せに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Newmanら、Clin. Immunol.(2001)、98:164~174に記載された、置換の組合せである、S228P/L235Eに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Anら、MAbs.(2009)、1:572~579に記載された、置換の組合せである、H268Q/V309L/A330S/P331Sに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、Vafaら、Methods.(2014)、65:114~126に記載された、置換の組合せである、V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331Sに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、US2015/0044231A1に記載された、置換の組合せである、L234A/L235E/G237A/A330S/P331Sに対応する修飾を含む。

20

30

40

【0370】

置換の組合せ「L234A/L235A」、および対応する置換(例えば、ヒトIgG4におけるF234A/L235Aなど)は、Fcの、Fc受容体への結合を破壊し、ADC C、ADC Pを阻害し、C1qへの結合もまたを低減し、これにより、CDCを低減することが公知である(参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Schlothauerら、Protein Engineering, Design and Selection(2016)、29(10):457~466)。置換である、「P329G」および「P329A」は、C1qへの結合を低減する(そして、これにより、CDCを低減する)。「N297」の、「A」、「G」、または「Q」による置換は、グ

50

リコシル化を消失させ、これにより、Fcの、C1qおよびFc 受容体への結合を低減し、これにより、CDCおよびADCCを低減することが公知である。Lora、J. Biol. Chem (2017)、292(9):3900~3908(参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)は、置換の組合せである、L234A/L235A/P329Gが、マウスIgG2aおよびヒトIgG1のいずれにおいても、補体の結合および固定、ならびにFc 受容体依存的な、抗体依存性、細胞媒介性細胞傷害作用を消失させたことについて報告している。

【0371】

IgG1 Fc内の置換の組合せである、L234A/L235E/G237A/A330S/P331Sは、US2015/0044231A1において、食作用、ADCC、およびCDCの誘導を失効化させることが開示されている。

10

【0372】

一部の実施形態では、Fc領域は、Silvra、J Biol Chem. (2015)、290(9):5462~5469に記載された、置換である、S228Pに対応する修飾を含む。IgG4 Fc内の置換である、S228Pは、Fabアーム交換(Fabアーム交換は、所望されない場合がある)を低減する。

【0373】

一部の実施形態では、Fc領域は、置換の組合せである、L234A/L235Aに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、置換である、P329Gに対応する修飾を含む。一部の実施形態では、Fc領域は、置換である、N297Qに対応する修飾を含む。

20

【0374】

一部の実施形態では、Fc領域は、置換の組合せである、L234A/L235A/P329Gに対応する修飾を含む。

【0375】

一部の実施形態では、Fc領域は、置換の組合せである、L234A/L235A/P329G/N297Qに対応する修飾を含む。

【0376】

一部の実施形態では、Fc領域は、置換の組合せである、L234A/L235E/G237A/A330S/P331Sに対応する修飾を含む。

30

【0377】

一部の実施形態では、Fc領域は、例えば、IgG4における置換である、S228Pに対応する修飾を含む。

【0378】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、CH2およびCH3領域のうちの1つまたは複数における、Fc領域の会合を促進する修飾を含むFc領域を含む。抗原結合性分子の構成要素であるポリペプチドの組換え共発現、および後続する会合は、いくつかの可能な組合せをもたらす。組換え作製において、抗原結合性分子内の、所望の組合せのポリペプチドの収率を改善するために、所望の組合せの、重鎖ポリペプチドの会合を促進する、Fc領域の修飾(複数可)を導入することが有利である。修飾は、例えば、異なるポリペプチド鎖の、CH2および/またはCH3領域の間の疎水性および/または静電相互作用を促進しうる。適切な修飾については、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Hara、Front. Immunol (2016)、7:394において記載されている。

40

【0379】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、Hara、Front. Immunol (2016)、7:394の表1において示される、以下のフォーマット: KiH、KiHS-S、HA-TF、ZW1、7.8.60、DD-KK、EW-RVT、EW-RVTS-S、SEED、またはA107のうちの1つに従う、Fc領域のCH3領域内に、対をなす置換を含むFc領域を含む。

50

【0380】

一部の実施形態では、Fc領域は、例えば、US 7,695,936；およびCarter, J Immunol Meth, 248, 7~15 (2001)に、記載された、「knob-into-hole (KIH)」または「KiH」修飾を含む。このような実施形態では、Fc領域のうちの、CH3領域の1つは、「ノブ」修飾を含み、他のCH3領域は、「ホール」修飾を含む。「ノブ」が、ポリペプチドのヘテロ二量体化を促進し（そして、ホモ二量体化を阻害し）、かつ/またはヘテロ二量体を安定化させるために、「ホール」内に配置されるように、「ノブ」修飾および「ホール」修飾は、それぞれのCH3領域内に配置される。ノブは、小型鎖を有するアミノ酸を、より大型の側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）を有するアミノ酸で置換することにより構築される。ホールは、大型側鎖を有するアミノ酸を、より小型の側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）を有するアミノ酸で置換することにより創出される。

10

【0381】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子のFc領域のうちの、CH3領域の1つは、置換である、（本明細書における、Fc、CH2、およびCH3領域の、位置/置換の番号付けは、Kabata, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991において記載されている、EU番号付けシステムに従う）T366Wを含み、Fc領域のうちの、他のCH3領域は、置換である、Y407Vを含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子のFc領域のうちの、CH3領域の1つは、置換である、T366Wを含み、Fc領域のうちの、他のCH3領域は、置換である、T366SおよびL368Aを含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子のFc領域のうちの、CH3領域の1つは、置換である、T366Wを含み、Fc領域のうちの、他のCH3領域は、置換である、Y407V、T366S、およびL368Aを含む。

20

【0382】

一部の実施形態では、Fc領域は、例えば、WO 2014/131694 A1に記載された、「DD-KK」修飾を含む。一部の実施形態では、CH3領域の1つは、置換である、K392DおよびK409Dを含み、Fc領域のうちの、他のCH3領域は、置換である、E356KおよびD399Kを含む。修飾は、CH3領域の間の静電相互作用を促進する。

30

【0383】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、Labrijnら、Proc Natl Acad Sci USA, (2013), 110(13): 5145~50において記載される通りに修飾され、「デュオボディー」フォーマットと称されるFc領域を含む。一部の実施形態では、CH3領域の1つは、置換である、K409Rを含み、Fc領域のうちの、他のCH3領域は、置換である、K405Lを含む。

【0384】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、Stropら、J Mol Biol, (2012), 420(3): 204~19に記載された、「EEE-RRR」修飾を含むFc領域を含む。一部の実施形態では、CH3領域の1つは、置換である、D221E、P228E、およびL368Eを含み、Fc領域のうちの、他のCH3領域は、置換である、D221R、P228R、およびK409Rを含む。

40

【0385】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Choiら、Mol Cancer Ther (2013), 12(12): 2748~59に記載された、「EW-RVT」修飾を含むFc領域を含む。一部の実施形態では、CH3領域の1つは、置換である、K360EおよびK409Wを含み、Fc領域のうちの、他のCH3領域は、置換である、Q347R、D399V、およびF405Tを含む。

【0386】

50

一部の実施形態では、C H 3領域の1つは、置換である、S 3 5 4 Cを含み、F c領域のうちの、他のC H 3領域は、置換である、Y 3 4 9 Cを含む。これらのシステイン残基の導入は、F c領域の、2つのC H 3領域の間のジスルフィド架橋の形成を結果としてもたらし、ヘテロ二量体を、さらに安定化させる (C a r t e r (2 0 0 1)、J I m m u n o l M e t h o d s、2 4 8、7 ~ 1 5)。

【0387】

一部の実施形態では、F c領域は、「K i H S - S」修飾を含む。一部の実施形態では、C H 3領域の1つは、置換である、T 3 6 6 WおよびS 3 5 4 Cを含み、F c領域のうちの、他のC H 3領域は、置換である、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V、およびY 3 4 9 Cを含む。

【0388】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、D a v i s ら、P r o t e i n E n g D e s S e l (2 0 1 0)、2 3 (4) : 1 9 5 ~ 2 0 2 に記載された、ヒトI g G 1 C H 3の鎖セグメントと、ヒトI g A C H 3の鎖セグメントとが交換される、「S E E D」修飾を含むF c領域を含む。

【0389】

一部の実施形態では、C H 3領域の1つは、置換である、S 3 6 4 HおよびF 4 0 5 Aを含み、F c領域のうちの、他のC H 3領域は、置換である、Y 3 4 9 TおよびT 3 9 4 F (例えば、M o o r e ら、M A b s (2 0 1 1)、3 (6) : 5 4 6 ~ 5 7を参照されたい)を含む。

【0390】

一部の実施形態では、C H 3領域の1つは、置換である、T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A、およびY 4 0 7 Vを含み、F c領域のうちの、他のC H 3領域は、置換である、T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9 2 L、およびT 3 9 4 W (例えば、V o n K r e u d e n s t e i n ら、M A b s (2 0 1 3)、5 (5) : 6 4 6 ~ 5 4を参照されたい)を含む。

【0391】

一部の実施形態では、C H 3領域の1つは、置換である、K 3 6 0 D、D 3 9 9 M、およびY 4 0 7 Aを含み、F c領域のうちの、他のC H 3領域は、置換である、E 3 4 5 R、Q 3 4 7 R、T 3 6 6 V、およびK 4 0 9 V (例えば、L e a v e r - F a y ら、S t r u c t u r e (2 0 1 6)、2 4 (4) : 6 4 1 ~ 5 1を参照されたい)を含む。

【0392】

一部の実施形態では、C H 3領域の1つは、置換である、K 3 7 0 EおよびK 4 0 9 Wを含み、F c領域のうちの、他のC H 3領域は、置換である、E 3 5 7 N、D 3 9 9 V、およびF 4 0 5 T (例えば、C h o i ら、P L o S O n e (2 0 1 5)、1 0 (1 2) : e 0 1 4 5 3 4 9を参照されたい)を含む。

【0393】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、F c 受容体に結合しないF c領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、F c R I、F c R I I a、F c R I I b、F c R I I c、F c R I I I a、およびF c R I I I bのうちの1つまたは複数に結合しないF c領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、F c R I I a、F c R I I b、およびF c R I I I aのうちの1つまたは複数に結合しないF c領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、F c R I I aおよびF c R I I bの一方または両方に結合しないF c領域を含む。

【0394】

F c領域、またはF c領域を含む抗原結合性分子が、参照タンパク質 (例えば、F c受容体) に結合する能力は、E L I S A、免疫プロット、免疫沈降、表面プラズモン共鳴 (S P R ; 例えば、H e a r t y ら、M e t h o d s M o l B i o l (2 0 1 2)、9 0 7 : 4 1 1 ~ 4 4 2を参照されたい)、またはバイオレイヤー干渉法 (B L I ; 例えば、L a d ら (2 0 1 5)、J B i o m o l S c r e e n、2 0 (4) : 4 9 8 ~ 5 0 7を

10

20

30

40

50

参照されたい)など、当技術分野で周知の方法に従い解析されうる。

【0395】

本明細書で使用された、参照タンパク質「に結合しない」Fc領域は、例えば、ELISA、免疫プロット(例えば、ウェスタンプロット)、免疫沈降、SPR、またはBLIにより決定する場合、参照タンパク質への結合を、実質的に呈さない場合がある。「～に実質的に結合しないこと」は、所与のアッセイにおいて、互いに結合しないタンパク質について決定される、相互作用のレベルを著明に超えない、相互作用のレベルでありうる。「～に実質的に結合しないこと」は、所与のアッセイにおいて、互いに結合しないタンパク質について決定される、相互作用のレベルの、5倍、例えば、4倍、3倍、2.5倍、2倍、または1.5倍である、相互作用のレベルでありうる。

10

【0396】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、FcRnに結合するFc領域を含む。

【0397】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、FcRnに結合するが、FcRIIa、FcRIIb、およびFcRIIIaのうち1つまたは複数に結合しないFc領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、FcRnに結合するが、FcRIIaおよびFcRIIbの一方または両方に結合しないFc領域を含む。

【0398】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、ADCCを誘導しないFc領域を含む。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、ADCPを誘導しないFc領域を含む。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、CDCを誘導しないFc領域を含む。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、ADCC、ADCP、またはCDCを誘導しないFc領域を含む。

20

【0399】

本明細書で使用される、ADCC/ADCP/CDCを誘導しない(すなわち、これを誘導することが可能ではない)Fc領域/抗原結合性分子は、例えば、対象とする活性に適切なアッセイにおける解析により決定する場合、ADCC/ADCP/CDC活性を実質的に誘発しない。「ADCC/ADCP/CDC活性を実質的に伴わない」とは、所与のアッセイにおいて、適切な陰性対照分子について決定されるADCC/ADCP/CDCのレベルを著明に超えない、ADCC/ADCP/CDCのレベルを指す(例えば、Fc領域を欠く抗原結合性分子、または「サイレント」Fc領域を含む抗原結合性分子(例えば、参照により本明細書の上記に組み込まれる、Schlothauerら、Protein Engineering, Design and Selection(2016)、29(10):457~466に記載された))。「活性を実質的に伴わない」とは、所与のアッセイにおいて、適切な陰性対照分子について決定される活性のレベルの、5倍、例えば、4倍、3倍、2.5倍、2倍、または1.5倍である、対象とする活性のレベルでありうる。

30

【0400】

Fc領域、またはFc領域を含む抗原結合性分子が、ADCCを誘導する能力は、例えば、Yamashitaら、Scientific Reports(2016)、6:19772(参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)に記載された方法に従い、解析される場合もあり、例えば、Jedemaら、Blood(2004)、103:2677~82(参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)に記載された、51Cr放出アッセイにより解析される場合もある。Fc領域、またはFc領域を含む抗原結合性分子が、ADCPを誘導する能力は、例えば、Kamenら、J Immunol(2017)、198(増刊1号)157.17(参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)に記載された方法に従い解析されうる。Fc領域、またはFc領域を含む抗原結合性分子が、CDCを誘導する能力は、例えば、Schlothauerら、Protein Engineering, Design and Selection(2016)、29(10):457~466(参照により本明細書の上記に組み込ま

40

50

れた)において記載された、例えば、C1q結合アッセイを使用して解析されうる。

【0401】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号254に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むFc領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号257に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むFc領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号259に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むFc領域を含む。

10

【0402】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、Fc領域を欠く。

Fc受容体

Fc受容体とは、免疫グロブリンのFc領域に結合するポリペプチドである。Fc受容体の構造および機能については、例えば、それらのいずれもが、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Masudara、Inflamm Allergy Drug Targets (2009)、8(1):80~86およびBruhns、Blood (2012)、119:5640~5649において総説されている。

20

【0403】

Fc受容体は、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、好塩基球、マスト細胞、およびNK細胞を含む、造血細胞の表面において発現される。Fc受容体は、IgG結合性Fc受容体、IgEに対する高アフィニティー受容体(FcRI)、IgA受容体、ならびにIgAおよびIgMに対する、ポリマー性Ig受容体を含む。新生児Fc受容体(FcRn)は、IgGに対する、さらなるFc受容体であり、上皮障壁を隔てたIgG輸送(トランスサイトーシス)、IgGの分解からの保護、および抗原提示に関与する。

30

【0404】

ヒトは、Fc受容体の、6つの異なるクラス(マウスオーソログを、カッコ内に示す): FcRI(mFcRI)、FcRIIa(mFcRIII)、FcRIIb(mFcRIIb)、FcRIIc、FcRIIIa(mFcRIV)、およびFcRIIIbを有する。

【0405】

FcRI、FcRIIa、FcRIIc、およびFcRIIIaは、それらの細胞内ドメイン内に、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含み、Fcによるライゲーションは、受容体を発現する細胞の活性化をもたらす。FcRIIbは、その細胞内ドメイン内に、免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ(ITIM)を含み、Fcによるライゲーション時に、細胞の活性化および脱顆粒、細胞の増殖、エンドサイトーシス、ならびに食作用を、負に調節する。

40

【0406】

本明細書では、「Fc受容体」は、任意の種に由来することが可能であり、任意の種に由来する、アイソフォーム、断片、変異体(突然変異体を含む)、または相同体を含みうる。同様に、「FcRI」、「FcRIIa」、「FcRIIb」、「FcRIIc」、「FcRIIIa」、および「FcRIIIb」とは、それぞれ、任意の種に由来する、FcRI/FcRIIa/FcRIIb/FcRIIc/Fc

50

R I I I a / F c R I I I bを指し、任意の種に由来する、アイソフォーム、断片、変異体（突然変異体を含む）、または相同体を含む。

【0407】

一部の実施形態では、F c 受容体（例えば、F c R I / F c R I I a / F c R I I b / F c R I I c / F c R I I I a / F c R I I I b）は、哺乳動物（例えば、霊長動物（アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長動物、またはヒト）、および/または齧歯動物（例えば、ラットまたはマウス）に由来する。アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、所与の種、例えば、ヒトに由来する、F c 受容体（例えば、F c R I / F c R I I a / F c R I I b / F c R I I c / F c R I I I a / F c R I I I b）の、未成熟または成熟のアイソフォームのアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有することとして特徴付けられうる。

10

【0408】

アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、例えば、機能的特性/活性に適切なアッセイを介する解析により決定する場合、参照F c 受容体の機能的特性/活性を有する、機能的なアイソフォーム、断片、変異体、または相同体でありうる。例えば、F c R Iのアイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、例えば、ヒトI g G 1 F cとの会合を呈しうる。

【0409】

本明細書では、「F c R n受容体」は、任意の種に由来することが可能であり、任意の種に由来する、アイソフォーム、断片、変異体（突然変異体を含む）、または相同体を含むうる。

20

【0410】

一部の実施形態では、F c R n受容体は、哺乳動物（例えば、霊長動物（アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長動物、またはヒト）、および/または齧歯動物（例えば、ラットまたはマウス）に由来する。アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、所与の種、例えば、ヒトに由来する、未成熟または成熟のF c 受容体アイソフォームのアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有することとして特徴付けられうる。

30

【0411】

アイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、任意選択で、例えば、機能的特性/活性に適切なアッセイを介する解析により決定する場合、参照F c R nの機能的特性/活性を有する、機能的なアイソフォーム、断片、変異体、または相同体でありうる。例えば、F c R nのアイソフォーム、断片、変異体、または相同体は、例えば、ヒトI g G 1 F cとの会合を呈しうる。

ポリペプチド

本発明はまた、抗原結合性分子の、ポリペプチド構成要素も提供する。ポリペプチドは、単離形態で提供される場合もあり、実質的な精製形態で提供される場合もある。

40

【0412】

本発明の抗原結合性分子は、ポリペプチドの複合体でありうるか、またはこれを含みうる。

【0413】

ポリペプチドが、1つを超えるドメインまたは領域を含む、本明細書では、複数のドメイン/領域が、同じポリペプチド鎖内に存在することが好ましいことが理解されるであろう。すなわち、1つを超えるドメインまたは領域を含むポリペプチドは、ドメイン/領域を含む融合ポリペプチドである。

【0414】

一部の実施形態では、本発明に従うポリペプチドは、本明細書に記載されるV Hを含む

50

か、またはこれらからなる。一部の実施形態では、本発明に従うポリペプチドは、本明細書で記載されるV Lを含むか、またはこれらからなる。

【0415】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、加えて、1つまたは複数の、抗体の重鎖定常領域(CH)を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、加えて、1つまたは複数の、抗体の軽鎖定常領域(CL)を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、免疫グロブリン(Ig)のCH1、CH2領域、および/またはCH3領域を含む。

【0416】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、免疫グロブリンの重鎖定常配列の、1つまたは複数の領域を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、本明細書で記載されるCH1領域を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、本明細書で記載される、CH1 - CH2間のヒンジ領域を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、本明細書で記載されるCH2領域を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、本明細書で記載されるCH3領域を含む。

【0417】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換/アミノ酸置換の組合せ：
 F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L；S239D/I332E；S239D/I332E/A330L；S298A/E333A/K334A；L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A；D270E/K326D/A330M/K334E；G236A/S239D/I332E；K326W/E333S；S267E/H268F/S324T；E345R/E430G/S440Y；M252Y/S254T/T256E；M428L/N434S；S267E/L328F；N325S/L328F；N297A；N297Q；N297G；L235E；L234A/L235A；F234A/L235A；P329A；P329G；L234A/L235A/P329G；H268Q/V309L/A330S/P331S；およびV234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331Sのうちのいずれか1つを含む、CH2および/またはCH3領域を含む。

【0418】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換/アミノ酸置換の組合せ(例えば、参照により本明細書の上記に組み込まれた、Haら、Front. Immunol(2016)、7:394の表1に示される)：T366W；T366S、L368A、およびY407V；T366WおよびS354C；T366S、L368A、Y407V、およびY349C；S364HおよびF405A；Y349TおよびT394F；T350V、L351Y、F405A、およびY407V；T350V、T366L、K392L、およびT394W；K360D、D399M、およびY407A；E345R、Q347R、T366V、およびK409V；K409DおよびK392D；D399KおよびE356K；K360EおよびK409W；Q347R、D399V、およびF405T；K360E、K409W、およびY349C；Q347R、D399V、F405T、およびS354C；K370EおよびK409W；ならびにE357N、D399V、およびF405Tのうちのいずれか1つを含むCH3領域を含む。

【0419】

一部の実施形態では、ポリペプチドのCH2および/またはCH3領域は、ポリペプチドの、CH2および/またはCH3領域を含む、別のポリペプチドとの会合を促進するための、1つまたは複数のアミノ酸置換を含む。

【0420】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、免疫グロブリンの軽鎖定常配列の、1つまたは複数の領域を含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、本明細書で記載されるCL領域を含む。

【0421】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ポリペプチドは、免疫グロブリンの重鎖定常配列の、1つまたは複数の領域を欠く。一部の実施形態では、ポリペプチドは、C H 2 領域を欠く。一部の実施形態では、ポリペプチドは、C H 3 領域を欠く。一部の実施形態では、ポリペプチドは、C H 2 領域を欠き、C H 3 領域もまた欠く。

【0422】

一部の実施形態では、本発明に従うポリペプチドは、N末端から、C末端へと、以下：

- (i) V H
- (i i) V L
- (i i i) V H - C H 1
- (i v) V L - C L
- (v) V L - C H 1
- (v i) V H - C L
- (v i i) V H - C H 1 - C H 2 - C H 3
- (v i i i) V L - C L - C H 2 - C H 3
- (i x) V L - C H 1 - C H 2 - C H 3
- (x) V H - C L - C H 2 - C H 3

10

のうちの1つに従う構造を含む。

【0423】

本発明によりまた、本発明のポリペプチドから構成される抗原結合性分子も提供される。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、以下のポリペプチドの組合せ：

20

- (A) V H + V L
- (B) V H - C H 1 + V L - C L
- (C) V L - C H 1 + V H - C L
- (D) V H - C H 1 - C H 2 - C H 3 + V L - C L
- (E) V H - C L - C H 2 - C H 3 + V L - C H 1
- (F) V L - C H 1 - C H 2 - C H 3 + V H - C L
- (G) V L - C L - C H 2 - C H 3 + V H - C H 1
- (H) V H - C H 1 - C H 2 - C H 3 + V L - C L - C H 2 - C H 3
- (I) V H - C L - C H 2 - C H 3 + V L - C H 1 - C H 2 - C H 3

のうちの1つを含む。

30

【0424】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、上記の(A)~(I)に示された組合せのポリペプチドのうちの、1つを超えるポリペプチドを含む。例を目的として述べると、上記の(D)を参照すると、一部の実施形態では、抗原結合性分子は、構造V H - C H 1 - C H 2 - C H 3を含む、2つのポリペプチドと、構造V L - C Lを含む、2つのポリペプチドとを含む。

【0425】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、以下のポリペプチドの組合せ：

- (J) V H (抗 V I S T A) + V L (抗 V I S T A)
- (K) V H (抗 V I S T A) - C H 1 + V L (抗 V I S T A) - C L
- (L) V L (抗 V I S T A) - C H 1 + V H (抗 V I S T A) - C L
- (M) V H (抗 V I S T A) - C H 1 - C H 2 - C H 3 + V L (抗 V I S T A) - C L
- (N) V H (抗 V I S T A) - C L - C H 2 - C H 3 + V L (抗 V I S T A) - C H 1
- (O) V L (抗 V I S T A) - C H 1 - C H 2 - C H 3 + V H (抗 V I S T A) - C L
- (P) V L (抗 V I S T A) - C L - C H 2 - C H 3 + V H (抗 V I S T A) - C H 1
- (Q) V H (抗 V I S T A) - C H 1 - C H 2 - C H 3 + V L (抗 V I S T A) - C L - C H 2 - C H 3
- (R) V H (抗 V I S T A) - C L - C H 2 - C H 3 + V L (抗 V I S T A) - C H 1 - C H 2 - C H 3

40

のうちの1つを含むが、この場合、「V H (抗 V I S T A)」とは、本明細書で記載され

50

る、例えば、(1)～(76)のうちの1つにおいて規定される、VISTAに結合することが可能な抗原結合性分子のVHを指し；「VL(抗VISTA)」とは、本明細書に記載される、例えば、(77)～(173)のうちの1つにおいて規定される、VISTAに結合することが可能な抗原結合性分子のVLを指す。

【0426】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号212～243、248～250、258、266、または311～321のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。

10

リンカーおよびさらなる配列

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子およびポリペプチドは、ヒンジ領域を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、CH1領域と、CH2領域との間にもたらされる。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、CL領域と、CH2領域との間にもたらされる。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、配列番号207のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる。

【0427】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子およびポリペプチドは、アミノ酸配列の間に、1つまたは複数のリンカー配列を含む。リンカー配列は、抗原結合性分子/ポリペプチドの、VH、VL、CH1-CH2間のヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域のうちの1つまたは複数の、一方または両方の末端にもたらされうる。

20

【0428】

当業者には、リンカー配列が公知であり、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Chenら、Adv Drug Deliv Rev(2013)、65(10):1357～1369において記載されている。一部の実施形態では、リンカー配列は、可動性リンカー配列でありうる。可動性リンカー配列は、リンカー配列により連結されたアミノ酸配列の、相対的運動を可能とする。当業者には、リンカー配列が公知であり、いくつかのリンカー配列は、Chenら、Adv Drug Deliv Rev(2013)、65(10):1357～1369において同定されている。可動性リンカー配列は、しばしば、高比率のグリシン残基および/またはセリン残基を含む。

30

【0429】

一部の実施形態では、リンカー配列は、少なくとも1つのグリシン残基、および/または少なくとも1つのセリン残基を含む。一部の実施形態では、リンカー配列は、グリシンおよびセリン残基からなる。一部の実施形態では、リンカー配列は、1～2、1～3、1～4、1～5、または1～10アミノ酸の長さを有する。

【0430】

本発明の抗原結合性分子およびポリペプチドは、加えて、さらなるアミノ酸またはアミノ酸の配列を含みうる。例えば、抗原結合性分子およびポリペプチドは、抗原結合性分子/ポリペプチドの、発現、フォールディング、トラフィッキング、プロセッシング、精製、または検出を容易とするアミノ酸配列(複数可)を含みうる。例えば、抗原結合性分子/ポリペプチドは、任意選択で、抗原結合性分子/ポリペプチドのN末端またはC末端において、His(例えば、6×His)、Myc、GST、MBP、FLAG、HA、E、またはビオチンタグをコードする配列を含みうる。一部の実施形態では、抗原結合性分子/ポリペプチドは、検出用部分、例えば、蛍光、発光、免疫検出用、放射性、化学、核酸、または酵素標識を含む。

40

【0431】

本発明の抗原結合性分子およびポリペプチドは、加えて、シグナルペプチド(また、リーダー配列またはシグナル配列としても公知である)を含みうる。シグナルペプチドは通

50

常、単一のアルファヘリックスを形成する、5～30の疎水性アミノ酸の配列からなる。細胞表面で分泌されるタンパク質および発現されるタンパク質は、しばしば、シグナルペプチドを含む。

【0432】

シグナルペプチドは、抗原結合性分子/ポリペプチドのN末端に存在することが可能であり、新たに合成される抗原結合性分子/ポリペプチド内に存在しうる。シグナルペプチドは、抗原結合性分子/ポリペプチドの、効率的なトラフィッキングおよび分泌をもたらす。シグナルペプチドは、しばしば、切断により除去されるため、抗原結合性分子/ポリペプチドを発現する細胞から分泌される、成熟抗原結合性分子/ポリペプチド内に含まれない。

10

【0433】

シグナルペプチドは、多くのタンパク質について公知であり、GenBank、UniProt、Swiss-Prot、TrEMBL、Protein Information Resource、Protein Data Bank、Ensembl、およびInterProなどのデータベースに登録されており、かつ/または例えば、SignalP (Petersenら、2011、Nature Methods、8:785~786)またはSignal-BLAST (FrankおよびSippl、2008、Bioinformatics、24:2172~2176)などのアミノ酸配列解析ツールを使用して、同定/予測されうる。

標識およびコンジュゲート

20

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、加えて、検出可能部分を含む。

【0434】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、検出可能部分、例えば、蛍光標識、リン光標識、発光標識、免疫検出可能標識(例えば、エピトープタグ)、放射性標識、化学、核酸、または酵素標識を含む。抗原結合性分子は、検出可能部分で、共有結合的に標識付けされる場合もあり、非共有結合的に標識付けされる場合もある。

【0435】

蛍光標識は、例えば、フルオレセイン、ローダミン、アロフィコシアニン、エオシン、およびNDB、緑色蛍光タンパク質(GFP)、ユーロピウム(Eu)、テルビウム(Tb)、およびサマリウム(Sm)など、希土類のキレート剤、テトラメチルローダミン、Texas Red、4-メチルウンベリフェロン、7-アミノ-4-メチルクマリン、Cy3、Cy5を含む。放射性標識は、ヨウ素123、ヨウ素125、ヨウ素126、ヨウ素131、ヨウ素133、臭素77、テクネシウム99m、インジウム111、インジウム113m、ガリウム67、ガリウム68、ルテニウム95、ルテニウム97、ルテニウム103、ルテニウム105、水銀207、水銀203、レニウム99m、レニウム101、レニウム105、スカンジウム47、テルリウム121m、テルリウム122m、テルリウム125m、ツリウム165、ツリウム167、ツリウム168、銅67、フッ素18、イットリウム90、パラジウム100、ビスマス217、およびアンチモン-211などの放射性同位体を含む。発光標識は、放射性発光標識、化学発光標識(例えば、アクリジニウムエステル、ルミノール、イソルミノール)、および生物発光標識を含む。免疫検出可能標識は、ハプテン、ペプチド/ポリペプチド、抗体、受容体、およびビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、またはジゴキシゲニンなどのリガンドを含む。核酸標識は、アプタマーを含む。酵素標識は、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼを含む。

30

40

【0436】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、化学的部分へとコンジュゲートされる。化学的部分は、治療効果をもたらすための部分でありうる。抗体-薬物コンジュゲートについては、例えば、Parslowら、Biomedicines、2016年9月、4(3):14において総説されている。一部の実施形態では、化学的部分は、薬物部分(例えば、細胞傷害剤)でありうる。一部の実施形態では、薬物部分は、化学療法剤で

50

ありうる。一部の実施形態では、薬物部分は、カリケアミシン、DM1、DM4、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)、モノメチルアウリスタチンF(MMAF)、SN-38、ドキシソルピシン、デュオカルマイシン、D6.5、およびPBDから選択される。抗原結合性分子についての、特定の例示的な実施形態

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号212のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号213のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

10

【0437】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号214のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号215のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

20

【0438】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号216のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号217のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

30

【0439】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号218のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号219のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

40

【0440】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号220のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75

50

%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号221のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

【0441】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号222のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号223のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

【0442】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号224のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号225のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

【0443】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号226のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号227のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

【0444】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号228のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号229のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

【0445】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号230のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号231のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

10

【0446】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号232のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号233のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

20

【0447】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号234のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号235のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

30

【0448】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号236のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号237のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

40

【0449】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号238のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97

50

%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号239のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

【0450】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号240のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

10

(ii) 配列番号241のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

【0451】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号242のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

20

(ii) 配列番号243のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

【0452】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号248のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

30

(ii) 配列番号250のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

40

【0453】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号249のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号250のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド

50

を含むか、またはこれからなる。

【0454】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号258のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号250のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

10

【0455】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号266のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号250のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

20

【0456】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、

(i) 配列番号330のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチド；および

(ii) 配列番号213のアミノ酸配列に対する、少なくとも70%、好ましくは、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、2つのポリペプチドを含むか、またはこれからなる。

30

抗原結合性分子の機能的特性

本明細書に記載される抗原結合性分子は、ある特定の機能的特性に言及することにより特徴付けられうる。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗原結合性分子は、以下の特性：

VISTA（例えば、ヒト、マウス、および/またはカニクイザルVISTA）に結合すること；

40

PD-L1および/またはHER3に結合しないこと；

Fc受容体に結合しないこと；

C1qに結合しないこと；

ADCCを誘導しないこと；

ADCPを誘導しないこと；

CDCを誘導しないこと；

FcRn受容体に結合すること；

VISTA発現細胞に結合すること；

VISTAと、VISTAの結合パートナー（例えば、PSGL-1、VSIG-3、またはVSIG-8）との相互作用を阻害すること；

50

V I S T A 媒介性シグナル伝達を阻害すること；
 F c 媒介性機能に依存せずに、V I S T A 媒介性シグナル伝達を阻害すること；
 V I S T A 発現細胞の殺滅を増大させること；
 V I S T A 発現細胞の殺滅を誘導しない／増大させないこと；
 V I S T A 発現細胞の数／比率を低減すること；
 V I S T A 発現細胞の数／比率を低減しないこと；
 エフェクター免疫細胞の数／活性を増大させること；
 免疫抑制細胞の数／活性を低減すること；
 免疫抑制細胞の増殖を低減すること；
 V I S T A 発現細胞により媒介される免疫抑制を減少させること；
 抗原提示細胞による抗原提示を増大させること；
 免疫細胞による I L - 6 の産生を増大させること；
 混合リンパ球反応 (M L R) アッセイにおいて、I F N - 、 I L - 2、および／または I L - 17 の産生を増大させること；
 T 細胞の増殖、I F N - の産生、および／または T N F a の産生を増大させること；
 ならびに

10

i n v i v o におけるがんの発症および／または進行を阻害すること
 のうちの1つまたは複数を所有しうる。

【 0 4 5 7 】

本明細書で記載される抗原結合性分子は、好ましくは、V I S T A への特異的結合を呈する。本明細書で使用される、「特異的結合」とは、抗原に対して選択的であり、非標的抗原への非特異的結合から区別されうる結合を指す。標的分子に特異的に結合する抗原結合性分子は、好ましくは、他の非標的分子に結合する場合より、大きなアフィニティーおよび／または長い持続時間で、標的に結合する。

20

【 0 4 5 8 】

所与のポリペプチドが、所与の分子に特異的に結合する能力は、E L I S A、表面プラズモン共鳴 (S P R ; 例えば、H e a r t y ら、M e t h o d s M o l B i o l (2 0 1 2)、9 0 7 : 4 1 1 ~ 4 4 2 を参照されたい)、バイオレイヤー干渉法 (例えば、L a d ら (2 0 1 5)、J B i o m o l S c r e e n、2 0 (4) : 4 9 8 ~ 5 0 7 を参照されたい)、フローサイトメトリー、または放射性標識抗原結合性アッセイ (R I A)、酵素免疫測定アッセイによる方法など、当技術分野で公知の方法に従う解析により決定されうる。このような解析によって、所与の分子への結合は、測定および定量されうる。一部の実施形態では、結合は、所与のアッセイにおいて検出される応答でありうる。

30

【 0 4 5 9 】

一部の実施形態では、抗原結合性分子の、非標的分子への結合の程度は、例えば、E L I S A、S P R、バイオレイヤー干渉法により、または R I A により測定される、抗体の、標的分子への結合の、約 1 0 % 未満である。代替的に、結合特異性は、抗原結合性分子が、抗原結合性分子の、非標的分子への K_D を超える、少なくとも 0 . 1 の桁数 (すなわち、 $0 . 1 \times 10^n$ [式中、 n は、桁数を表す整数である]) である解離定数 (K_D) で結合する、結合アフィニティーの点でも反映されうる。これは、任意選択で、少なくとも 0 . 2、0 . 3、0 . 4、0 . 5、0 . 6、0 . 7、0 . 8、0 . 9、1 . 0、1 . 5、または 2 . 0 のうちの 1 つでありうる。

40

【 0 4 6 0 】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ヒト V I S T A、マウス (m u r i n e) (例えば、マウス (m o u s e)) V I S T A、および／またはカニクイザル (M a c a c a f a s c i c u l a r i s) V I S T A への結合を呈する。すなわち、一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ヒト V I S T A、およびマウス V I S T A、および／またはカニクイザル V I S T A に対して、交差反応性である。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、非ヒト霊長動物の V I S T A との交差反応性をもたらす。モデル種における V I S T A に対する交差反応性は、i n v i v o の同系モデルにおける、サロゲー

50

ト分子に依拠しない、有効性についての調べることを可能とする。

【0461】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、PD-L1（例えば、ヒトPD-L1）への特異的結合をもたらさない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、HER3（例えば、ヒトHER3）への特異的結合をもたらさない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、タンパク質のB7ファミリーの、別のメンバーへの特異的結合をもたらさない（すなわち、これらと交差反応しない）。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、PD-1、PD-L2、CD80、CD86、ICOSLG、CD276、VTCN1、NCR3LG1、HLA2、および/またはCTLA4への特異的結合をもたらさない。

【0462】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、PD-1、PD-L1、B7H3、VTCN1（B7H4）、NCR3LG1（B7H6）、HLA2（B7H7）、および/またはCTLA4への特異的結合を呈さない。

【0463】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、1つまたは複数のFc媒介性機能を誘導することが可能ではない（すなわち、関連するFc媒介性機能（複数可）を誘発する能力を欠く）。このような抗原結合性分子は、関連する機能（複数可）が欠如すると記載されうる。

【0464】

本明細書の上記で説明された通り、ADCC/ADCP/CDcを誘導しない（すなわち、これを誘導することが可能ではない）Fc領域/抗原結合性分子は、例えば、対象とする活性に適切なアッセイにおける解析により決定する場合、ADCC/ADCP/CDc活性を実質的に誘発しない。同様に、参照タンパク質（例えば、所与のFc受容体または補体タンパク質）「に結合しない」抗原結合性分子は、適切なアッセイにおいて、参照タンパク質への結合を、実質的に呈さない場合がある。

【0465】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ADCCを誘導することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ADCPを誘導することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、CDcを誘導することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ADCCを誘導することが可能ではなく、かつ/またはADCPを誘導することが可能ではなく、かつ/またはCDcを誘導することが可能ではない。

【0466】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc受容体に結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc受容体に結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、FcRI、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、およびFcRIIIbのうちの1つまたは複数に結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、FcRIIIaに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、FcRIIIaに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、FcRIIIbに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、FcRnに結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、補体タンパク質に結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、C1qに結合することが可能ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、N297に対応するアミノ酸残基においてグリコシル化されない。

【0467】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ヒトVISTA、マウスVISTA、および/またはカニクイザルVISTAに結合し、PD-L1、PD-1、B7H3、VTCN1（B7H4）、NCR3LG1（B7H6）、HLA2（B7H7）、および/またはCTLA4（例えば、ヒトPD-L1/ PD-1/ B7H3/ VTCN1/ NCR3LG1/ HLA2/ CTLA4）に結合しない。

【0468】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本明細書で記載される抗原結合性分子は、 $10\ \mu\text{M}$ 以下、好ましくは、 $5\ \mu\text{M}$ 、 $2\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $500\ \text{nM}$ 、 $100\ \text{nM}$ 、 $75\ \text{nM}$ 、 $50\ \text{nM}$ 、 $40\ \text{nM}$ 、 $30\ \text{nM}$ 、 $20\ \text{nM}$ 、 $15\ \text{nM}$ 、 $12.5\ \text{nM}$ 、 $10\ \text{nM}$ 、 $9\ \text{nM}$ 、 $8\ \text{nM}$ 、 $7\ \text{nM}$ 、 $6\ \text{nM}$ 、 $5\ \text{nM}$ 、 $4\ \text{nM}$ 、 $3\ \text{nM}$ 、 $2\ \text{nM}$ 、 $1\ \text{nM}$ 、または $500\ \text{pM}$ のうちの1つの K_D で、VISTA（例えば、ヒトVISTA、マウスVISTA）に結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、 K_D $10\ \text{nM}$ 、 $9\ \text{nM}$ 、 $8\ \text{nM}$ 、 $7\ \text{nM}$ 、または $6\ \text{nM}$ 、 $5\ \text{nM}$ 、 $4\ \text{nM}$ 、 $3\ \text{nM}$ 、 $2\ \text{nM}$ 、または $1\ \text{nM}$ のアフィニティーで、VISTA（例えば、ヒトVISTA、マウスVISTA）に結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、 K_D $500\ \text{pM}$ 、 $100\ \text{pM}$ 、 $90\ \text{pM}$ 、 $80\ \text{pM}$ 、 $70\ \text{pM}$ 、または $60\ \text{pM}$ 、 $50\ \text{pM}$ 、 $40\ \text{pM}$ 、 $30\ \text{pM}$ 、 $20\ \text{pM}$ 、 $10\ \text{pM}$ 、 $9\ \text{pM}$ 、 $8\ \text{pM}$ 、 $7\ \text{pM}$ 、または $6\ \text{pM}$ 、 $5\ \text{pM}$ 、 $4\ \text{pM}$ 、 $3\ \text{pM}$ 、 $2\ \text{pM}$ 、または $1\ \text{pM}$ のアフィニティーで、VISTA（例えば、ヒトVISTA、マウスVISTA）に結合する。

10

【0469】

本発明の抗原結合性分子は、VISTAの、特に目的となる領域に結合しうる。本発明に従う抗原結合性分子の抗原結合性領域は、アミノの酸連続配列（すなわち、アミノ酸の一次配列）からなる、VISTAの直鎖状エピトープに結合しうる。一部の実施形態では、抗原結合性領域は、アミノ酸配列のうちの、アミノ酸の不連続配列からなる、VISTAのコンフォメーションエピトープに結合しうる。

20

【0470】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTAに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAの細胞外領域内で、VISTAに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Ig様V型ドメイン（例えば、配列番号6に示される領域）内で、VISTAに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号31に示される領域内で、VISTAに結合することが可能である。

【0471】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号6に示されるアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号31に示されるアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号322に示されるアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、ペプチドまたはポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号26に示されるアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、ペプチドまたはポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号27に示されるアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、ペプチドまたはポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号28に示されるアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、ペプチドまたはポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号29に示されるアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、ペプチドまたはポリペプチドに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号30に示されるアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、ペプチドまたはポリペプチドに結合することが可能である。

30

40

【0472】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、IGN175Aが結合する、VISTAの領域（例えば、WO2014/197849A2に記載された）に結合しない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号267の配列からなるポリペプチドおよび配列番号268の配列からなるポリペプチドから構成される抗原結合性分子が結合する、VISTAの領域に結合しない。

50

【0473】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、IGN175A（例えば、WO2014/197849A2に記載された）と、VISTAへの結合について競合しない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号267の配列からなるポリペプチドおよび配列番号268の配列からなるポリペプチドから構成される抗原結合性分子と、VISTAへの結合について競合しない。

【0474】

所与の抗原結合性分子が、IGN175Aまたは配列番号267の配列からなるポリペプチドおよび配列番号268の配列からなるポリペプチドから構成される抗原結合性分子と、VISTAへの結合について競合する能力は、例えば、Abdicheら、J Immunol Methods (2012)、382(2):101~116（参照によりその全体において本明細書に組み込まれる）において記載されている通り、競合ELISA、またはエピトープマッピングにより解析されうる。エピトープマッピングは、例えば、例えば、本出願の実施例8に記載される通り、BLI解析により実施されうる。

10

【0475】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号275に示されるアミノ酸配列からなるペプチドに結合することが可能ではない。

【0476】

本明細書で使用される、「ペプチド」とは、ペプチド結合により連結された、2つ以上のアミノ酸単量体による鎖を指す。ペプチドは、典型的に、領域内に、約2~50アミノ酸の長さを有する。「ポリペプチド」とは、2つ以上のペプチドによるポリマー鎖である。ポリペプチドは、典型的に、約50アミノ酸を超える長さを有する。

20

【0477】

抗原結合性分子が、所与のペプチド/ポリペプチドに結合する能力は、ELISA、免疫ブロット（例えば、ウェスタンブロット）、免疫沈降、表面プラズモン共鳴、およびバイオレイヤー干渉法による解析を含む、当業者に周知の方法により解析されうる。

【0478】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、クローンである、4M2-C12、4M2-B4、4M2-C9、4M2-D9、4M2-D5、4M2-A8、V4H1、V4H2、V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、V4-C31、2M1-B12、2M1-D2、1M2-D2、13D5p、13D5-1、13D5-13、5M1-A11または9M2-C12のうちの1つのVHおよびVL配列を含む抗体が結合するVISTAの領域と同じVISTAの領域、または重複するVISTAの領域に結合することが可能である。

30

【0479】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、IGN175Aが結合する、VISTAの領域（例えば、WO2014/197849A2に記載された）と異なる、VISTAの領域に結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号267の配列からなるポリペプチドおよび配列番号268の配列からなるポリペプチドから構成される抗原結合性分子が結合する、VISTAの領域と異なる、VISTAの領域に結合することが可能である。

40

【0480】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、IGN175Aが結合する、VISTAの領域（例えば、WO2014/197849A2に記載された）と重複しないVISTAの領域に結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号267の配列からなるポリペプチドおよび配列番号268の配列からなるポリペプチドから構成される抗原結合性分子が結合する、VISTAの領域と重複しないVISTAの領域に結合することが可能である。

【0481】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VSTB112が接触するVISTAの残基

50

(例えば、WO2015/097536A2に記載された)と同一でない、VISTAの残基との接触を介して、VISTAに結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、配列番号269の配列からなるポリペプチドおよび配列番号270の配列からなるポリペプチドから構成される抗原結合性分子が接触するVISTAの残基と同一でない、VISTAの残基との接触を介して、VISTAに結合する。

【0482】

一部の実施形態では、抗原結合性分子のエピトープは、VSTB112のエピトープと同一ではない。一部の実施形態では、抗原結合性分子のエピトープは、配列番号269の配列からなるポリペプチドおよび配列番号270の配列からなるポリペプチドから構成される抗原結合性分子のエピトープと同一ではない。

10

【0483】

抗体が結合する、ペプチド/ポリペプチドの領域は、抗体-抗原複合体についてのX線共結晶構造解析、ペプチド走査、突然変異誘発マッピング、質量分析による水素-重水素交換解析、ファージディスプレイ、競合ELISA、およびタンパク質分解ベースの「保護」法を含む、当技術分野で周知の、多様な方法を使用して、当業者により決定されうる。このような方法については、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Gershoniら、BioDrugs、2007、21(3):145~156において記載されている。

【0484】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTAが、細胞表面(すなわち、細胞膜内または細胞膜)において発現される場合、抗原結合性分子(すなわち、細胞外抗原結合性分子)にアクセス可能な領域内のVISTAに結合する。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAを発現する細胞の細胞表面において発現されるVISTAに結合することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTA発現細胞(例えば、CD14+単球(単球由来抑制細胞(MDSC)など)および/またはCD33+骨髄細胞、腫瘍関連マクロファージ(TAM)、ならびに好中球)に結合することが可能である。

20

【0485】

抗原結合性分子が、所与の細胞型に結合する能力は、例えば、結合しなかった抗原結合性分子を除去する洗浄ステップの後で、細胞を、抗原結合性分子抗原結合性分子と接触させ、細胞に結合した抗原結合性分子を検出することにより解析されうる。抗原結合性分子が、免疫細胞表面分子発現細胞および/またはがん細胞抗原発現細胞に結合する能力は、フローサイトメトリーおよび免疫蛍光顕微鏡法などの方法により解析されうる。

30

【0486】

本発明の抗原結合性分子は、VISTAのアンタゴニストでありうる。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTAおよび/またはVISTAの結合パートナー(例えば、PSGL-1、VSI G-3、VSI G-8)により媒介される、機能または過程(例えば、相互作用、シグナル伝達、または他の活性)を阻害することが可能である。本明細書に、「阻害」とは、対照条件と比べた、低減、減少、または低下を指す。

【0487】

本明細書に記載されるVISTA結合性抗原結合性分子は、ADCC、ADCP、およびCDCなどのFc媒介性機能を要求しない機構により、VISTA媒介性機能/過程を阻害することが可能である。すなわち、本明細書に記載されるVISTA結合性抗原結合性分子は、ADCC、ADCP、および/またはCDCを誘発する必要を伴わずに、VISTA発現細胞の免疫抑制活性を阻害することが可能である。

40

【0488】

特に、本明細書に記載されるVISTA結合性抗原結合性分子は、Fc受容体への結合および/またはC1qへの結合を要求しない機構を介して、VISTAを阻害することが可能である。

【0489】

50

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTAと、VISTAの結合パートナー（例えば、PSGL-1、VSIG-3、VSIG-8）との相互作用を阻害することが可能である。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTAと、PSGL-1との相互作用を阻害することが可能である。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTAとVSIG-3との相互作用を阻害することが可能である。

【0490】

抗原結合性分子が、2つの因子の間の相互作用を阻害する能力は、例えば、抗体/断片の存在下で、または相互作用パートナーの一方もしくは両方の、抗体/断片を伴うインキュベーションの後で、相互作用を解析することにより決定されうる。所与の抗原結合性分子が、2つの相互作用パートナーの間の相互作用を阻害することが可能であるのかどうかを決定するためのアッセイは、競合ELISAアッセイおよびSPRによる解析を含む。

10

【0491】

所与の相互作用（例えば、VISTAと、VISTAの結合パートナーとの相互作用）を阻害することが可能な抗原結合性分子は、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）における相互作用のレベルと比較した、抗原結合性分子の存在下（または相互作用パートナーの一方または両方の、抗原結合性分子を伴うインキュベーションの後）における、相互作用パートナー間の相互作用のレベルの低減/減少の観察により同定されうる。適切な解析は、*in vitro*において、例えば、組換え相互作用パートナーを使用するか、または相互作用パートナーを発現する細胞を使用して実施されうる。相互作用パートナーを発現する細胞は、これを、内因的に発現させる場合もあり、細胞へと導入された核酸から発現させる場合もある。このようなアッセイの目的で、相互作用パートナーの一方もしくは両方、および/または抗原結合性分子は、相互作用のレベルを検出および/または測定することを目的とする、検出可能実体で標識付けされる場合もあり、これと共に使用される場合もある。

20

【0492】

抗原結合性分子が、2つの結合パートナーの間の相互作用を阻害する能力はまた、このような相互作用の、下流の機能的帰結を解析することによっても決定されうる。例えば、VISTAと、VISTAの結合パートナーとの相互作用の、下流の機能的帰結は、VISTA媒介性シグナル伝達を含みうる。例えば、抗原結合性分子が、VISTAと、VISTAの結合パートナーとの相互作用を阻害する能力は、MLRアッセイにおける、IL-2、IFN- γ 、および/またはIL-17の産生の解析により決定されうる。

30

【0493】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTAと、VISTAの結合パートナー（例えば、PSGL-1、VSIG-3、VSIG-8）との相互作用を、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）における、VISTAと、VISTAの結合パートナーと相互作用のレベルの、1倍未満、例えば、0.99倍、0.95倍、0.9倍、0.85倍、0.8倍、0.75倍、0.7倍、0.65倍、0.6倍、0.55倍、0.5倍、0.45倍、0.4倍、0.35倍、0.3倍、0.25倍、0.2倍、0.15倍、0.1倍、0.05倍、または0.01倍へと阻害することが可能である。

40

【0494】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTA媒介性シグナル伝達を阻害する。VISTA媒介性シグナル伝達は、例えば、本明細書の実施例に記載されたMLRアッセイなど、エフェクター免疫細胞の数/活性についてのアッセイを使用して解析されうる。VISTA媒介性シグナル伝達の阻害は、例えば、IL-2、IFN- γ 、および/またはIL-17の産生の増大により決定される、エフェクター免疫細胞の数および/または活性の増大の検出により同定されうる。

【0495】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc媒介性機能を要求しないか、または伴わない機構により、VISTA媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実

50

施形態では、抗原結合性分子は、Fc 媒介性機能に依存せずに、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。すなわち、一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc 領域に依存せずに、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。

【0496】

抗原結合性分子が、Fc 媒介性機能を要求しない/伴わない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害する能力は、例えば、機能的なFc 領域を欠くフォーマットで用意された抗原結合性分子が、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害する能力を解析することにより評価されうる。例えば、VISTA 媒介性シグナル伝達に対する効果は、「サイレント」Fc 領域（例えば、LALA PG置換を含む）を含む抗原結合性分子を使用して調べる場合もあり、Fc 領域を欠くフォーマットで用意された抗原結合性分子（例えば、scFv、Fab など）を使用して調べる場合もある。

10

【0497】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ADCC を伴わない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ADCP を伴わない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、CDC を伴わない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。

【0498】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、抗原結合性分子の、Fc 受容体への結合を要求しない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、抗原結合性分子の、Fc 受容体への結合を要求しない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、抗原結合性分子の、Fc RI、Fc RIIa、Fc RIIb、Fc RIIc、Fc RIIIIa、およびFc RIIIIbのうちの1つまたは複数への結合を要求しない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc RIIIIaへの結合を要求しない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc RIIIIaへの結合を要求しない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc RIIIIbへの結合を要求しない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、補体タンパク質への結合を要求しない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、C1qへの結合を要求しない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、N297のグリコシル化を要求しない機構により、VISTA 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である。

20

30

【0499】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTA 発現細胞の殺滅を増大させることが可能である。VISTA 発現細胞の殺滅は、抗原結合性分子のエフェクター機能を介して増大させうる。抗原結合性分子が、Fc 領域を含む実施形態では、抗原結合性分子は、補体依存性細胞傷害作用（CDC）、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用（ADCC）、および抗体依存性細胞性食作用（ADCP）のうちの1つまたは複数を通じて、VISTA 発現細胞の殺滅を増大させうる。

40

【0500】

VISTA 発現細胞の殺滅を増大させることが可能な抗原結合性分子は、適切なアッセイの、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）において検出される細胞殺滅のレベルと比較した、抗原結合性分子の存在下（またはVISTA 発現細胞の、抗原結合性分子を伴うインキュベーションの後）における、VISTA 発現細胞の殺滅のレベルの上昇の観察により同定されうる。当業者には、CDC、ADCC、およびADCPについてのアッセイが周知である。VISTA 発現細胞の殺滅のレベルはま

50

た、異なる処置条件への曝露の後における、V I S T A 発現細胞の、生存および/または非生存の数/比率を測定することによっても決定されうる。

【0501】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、V I S T A 発現細胞（例えば、V I S T A 発現 M D S C）の殺滅を、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）において観察される殺滅のレベルの、1倍を超えて、例えば、1.01倍、1.02倍、1.03倍、1.04倍、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍へと増大させることが可能である。

10

【0502】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、同等なアッセイにおいて、V I S T A 発現細胞（例えば、V I S T A 発現 M D S C）の数を、抗原結合性分子の非存在下におけるインキュベーションの後（または適切な対照の抗原結合性分子の存在下におけるインキュベーションの後）に検出される、V I S T A 発現細胞（例えば、V I S T A を発現させる M D S C、T A M、好中球）の数の、1倍未満、例えば、0.99倍、0.95倍、0.9倍、0.85倍、0.8倍、0.75倍、0.7倍、0.65倍、0.6倍、0.55倍、0.5倍、0.45倍、0.4倍、0.35倍、0.3倍、0.25倍、0.2倍、0.15倍、0.1倍、0.05倍、または0.01倍へと低減することが可能である。

20

【0503】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、非枯渇性抗原結合性分子である。すなわち、一部の実施形態では、抗原結合性分子は、V I S T A 発現細胞の、実質的な枯渇を引き起こさない。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、V I S T A 発現細胞に対する、A D C C、A D C P、および/または C D C を誘発しない/増大させない。

【0504】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、例えば、抗原結合性分子が、F c 領域を欠く実施形態、または抗原結合性分子が、F c 媒介性抗体エフェクター機能を誘導することが可能ではない F c 領域を含む実施形態では、V I S T A 発現細胞の殺滅を誘導しない/増大させない。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、V I S T A 発現細胞の数/比率を低減しない。

30

【0505】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、(i) V I S T A 媒介性シグナル伝達を阻害し、かつ、(ii) V I S T A 発現細胞の殺滅を誘導しない/増大させない。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、(i) V I S T A 媒介性シグナル伝達を阻害し、かつ、(ii) V I S T A 発現細胞の数/比率を低減しない。

【0506】

V I S T A は、枯渇することが所望されない細胞により発現されるために、これは、特に、有利でありうる。例えば、V I S T A は、死滅させるか、または数/比率を低減することが所望されない免疫細胞（例えば、ある特定の種類の T 細胞および樹状細胞）により、低レベルで発現される。

40

【0507】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、例えば、適切な *in vitro* アッセイ、または *in vivo* において、陰性対照条件と比べて、エフェクター免疫細胞の数および/または活性を増大させることが可能である。説明を目的として述べると、本発明の抗原結合性分子は、エフェクター免疫細胞を、エフェクター免疫細胞の増殖および機能に対する、M D S C 媒介性抑制から解放することが可能でありうる。一部の実施形態では、エフェクター免疫細胞は、例えば、C D 8 + T 細胞、C D 8 + 細胞傷害性 T リンパ球 (C D 8 + C T L)、C D 4 + T 細胞、C D 4 + ヘルパー T 細胞、N K 細胞、I F N 産生細胞、メモリー T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、抗原経験 T 細胞、または C

50

D45RO+T細胞でありうる。

【0508】

細胞の数および比率は、例えば、細胞型の検出を可能とする抗体を使用するフローサイトメトリー解析により決定されうる。細胞分裂は、例えば、³H-チミジンの取込みについての*in vitro*解析により解析される場合もあり、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、FulcherおよびWong、*Immunol Cell Biol* (1999)、77(6):559~564において記載された、CFSE希釈アッセイにより解析される場合もある。エフェクター免疫細胞の活性は、このような活性の相関因子を測定することにより解析されうる。一部の実施形態では、エフェクター免疫細胞の活性は、例えば、IL-2、IFN- γ 、および/またはIL-17の産生の解析により決定されうる。

10

【0509】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、エフェクター免疫細胞型の数を、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）において観察される数の、1倍を超えて、例えば、1.01倍、1.02倍、1.03倍、1.04倍、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍へと増大させることが可能である。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、エフェクター免疫細胞活性の相関因子のレベルを、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）において観察されるレベルの、1倍を超えて、例えば、1.01倍、1.02倍、1.03倍、1.04倍、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍へと増大させることが可能である。

20

【0510】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、VISTA発現細胞により媒介される免疫抑制のレベルを減少させることが可能である。免疫抑制のレベルの変化は、例えば、Ochoaら、*Ann Surg*、2001年3月、233(3):393~399；ならびにDikalovおよびHarrison、*Antioxid Redox Signal*、2014年1月10日、20(2):372~382において記載されている通り、VISTA発現細胞による、アルギナーゼ1の発現および/または反応性酸素分子種(ROS)の産生を測定する方法を使用して決定されうる。

30

【0511】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、例えば、抗原提示についての適切なアッセイを使用して決定する場合、抗原提示細胞による抗原提示を増大させることが可能である。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、例えば、食作用のレベルについての適切なアッセイを使用して決定する場合、食細胞（例えば、好中球、単球、マクロファージ、マスト細胞、および/または樹状細胞）による食作用を増大させることが可能である。

40

【0512】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、免疫細胞によるIL-6の産生を増大させることが可能である。免疫細胞は、例えば、PBMC、リンパ球、T細胞、B細胞、NK細胞、または単球でありうる。一部の実施形態では、免疫細胞は、単球である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、例えば、LPSで刺激した後における免疫細胞による、IL-6の産生を増大させることが可能である。抗原結合性分子が、免疫細胞による、IL-6の産生を増大させる能力は、例えば、本明細書の実施例10に記載される*in vitro*アッセイにおいて解析されうる。このような方法は、単球（例えば、THP1細胞）を、LPSで刺激するステップと、刺激された細胞を、抗原結合性分子と共にインキュベートするステップとを含みうる。

50

【0513】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、免疫細胞（例えば、LPSにより刺激されたTHP1細胞）による、IL-6の産生を、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）において観察されるレベルの、1倍を超えて、例えば、1.01倍、1.02倍、1.03倍、1.04倍、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍へと増大させることが可能である。

【0514】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおける、T細胞の増殖、IL-2の産生、IFN- γ の産生、および/またはIL-17の産生を増大させることが可能である。MLRアッセイは、Bromelowら、J. Immunol Methods、2001年1月1日；247（1-2）：1-8（参照によりその全体において本明細書に組み込まれる）に記載される通りに、または本明細書の実施例に記載される通りに実施されうる。IL-2、IFN- γ 、および/またはIL-17の産生は、例えば、ウェスタンブロット、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、ELISA、ELISPOTなど、当業者に周知の抗体ベースの方法により解析される場合もあり、レポーターベースの方法により解析される場合もある。

10

【0515】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、MLRアッセイにおける、T細胞の増殖、IL-2の産生、IFN- γ の産生、および/またはIL-17の産生を、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）において観察されるレベルの、1倍を超えて、例えば、1.01倍、1.02倍、1.03倍、1.04倍、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍へと増大させることが可能である。

20

【0516】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、例えば、VISTA/VISTA発現細胞の存在下で、T細胞の増殖、IFN- γ の産生、および/またはTNF α の産生を増大させることが可能である。抗原結合性分子は、例えば、本明細書の実施例に記載される*in vitro*アッセイにおいて、このような特性について評価されうる。

30

【0517】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、T細胞の増殖、IFN- γ の産生、および/またはTNF α の産生（例えば、VISTA/VISTAを発現する細胞の存在下における）を、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）において観察されるレベルの、1倍を超えて、例えば、1.01倍、1.02倍、1.03倍、1.04倍、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍へと増大させることが可能である。

40

【0518】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、T細胞（例えば、CD4+ T細胞および/またはCD8+ T細胞）の増殖を、先行技術において開示されたVISTA結合性抗体（例えば、例えば、WO2015/097536A2において記載されたVSTB112）より大きな程度へと増大させることが可能である。T細胞の増殖は、例えば、本明細書の実施例9に記載される、*in vitro*アッセイにおいて評価される場合があり、アゴニスト性抗CD3抗体の存在下における培養により、T細胞増殖を刺激することを伴いうる。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、このようなアッセイにおける、T細胞の増殖を、先行技術のVISTA結合性抗体（例えば、VSTB112）により誘導される増殖レベルの、1倍を超えて、例えば、1.01倍、1.02倍、

50

1.03倍、1.04倍、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍へと増大させることが可能である。

【0519】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、THP1細胞による、IL-6の産生を、先行技術において開示されたVISTA結合性抗体（例えば、WO2015/097536A2において記載されたVSTB112）より大きな程度へと増大させることが可能である。THP1細胞による、IL-6の産生は、例えば、本明細書の実施例10に記載される、*in vitro*アッセイにおいて評価される場合があり、THP1細胞を、LPSで刺激することを伴いうる。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、このようなアッセイにおける、IL-6の産生を、先行技術のVISTA結合性抗体（例えば、VSTB112）により誘導されるレベルの、1倍を超えて、例えば、1.01倍、1.02倍、1.03倍、1.04倍、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍へと増大させることが可能である。

10

【0520】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、例えば、適切な*in vitro*アッセイ、または*in vivo*において、対照条件と比べて、免疫抑制細胞の数および/もしくは活性を低減し、免疫抑制細胞の増殖を阻害し、かつ/または細胞（例えば、CD45+細胞、例えば、腫瘍から得られたCD45+細胞）集団内の、免疫抑制細胞の比率を低減することが可能である。

20

【0521】

免疫抑制細胞は、例えば、VISTA発現細胞、Arg1発現細胞、MDSC、顆粒球型MDSC（g-MDSC）、または単球型MDSC（m-MDSC）でありうる。

【0522】

一部の実施形態では、数/活性/増殖/比率の低減は、抗原結合性分子の非存在下（または適切な対照抗原結合性分子の存在下）において観察される数/活性/増殖/比率の、1倍未満、例えば、0.99倍、0.95倍、0.9倍、0.85倍、0.8倍、0.75倍、0.7倍、0.65倍、0.6倍、0.55倍、0.5倍、0.45倍、0.4倍、0.35倍、0.3倍、0.25倍、0.2倍、0.15倍、0.1倍、0.05倍、または0.01倍への低減である。

30

【0523】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc媒介性機能を伴わない機構により、免疫抑制細胞の数/活性/増殖/比率を低減することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc媒介性機能に依存せずに（すなわち、Fc領域に依存せずに）、免疫抑制細胞の数/活性/増殖/比率を低減することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、ADCC、ADCP、および/またはCDCを伴わない機構により、免疫抑制細胞の数/活性/増殖/比率を低減することが可能である。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、VISTA発現細胞の枯渇を伴わない機構により、免疫抑制細胞の数/活性/増殖/比率を低減することが可能である。

40

【0524】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、*in vivo*におけるがんの発症および/または進行を阻害する。

【0525】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、例えば、エフェクター免疫細胞により、がん細胞の殺滅の増大を引き起こす。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、例えば、適切な対照条件と比較した、*in vivo*におけるがん細胞の数の低減を引き起こす。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、例えば、時間経過にわたり、腫瘍サイズ/容量を測

50

定することにより決定される、腫瘍増殖を阻害する。

【0526】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、抗原結合性分子で処置されたマウスにおける、IFN- および/またはIL-23の血清レベルを増大させることが可能である。IFN- および/またはIL-23の血清レベルは、例えば、マウスから得られた血液試料に由来する血清についてのELISAにより解析されうる。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子の投与は、IFN- および/またはIL-23の血清レベルを、抗原結合性分子の非存在下において観察されるレベル（または適切な対照抗原結合性分子の投与後において観察されるレベル）の、1倍を超えて、例えば、1.01倍、1.02倍、1.03倍、1.04倍、1.05倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍へと増大させる。

10

【0527】

本発明の抗原結合性分子は、CT26細胞由来モデル、4T-1細胞由来モデル、LL2細胞由来モデル、B16細胞由来モデル、またはEL4細胞由来モデルなど、適切なin vivoモデル、例えば、細胞株由来異種移植モデルにおいて、がんの発症および/または進行を阻害する能力について解析されうる。がんは、VISTA発現細胞および/またはMDS C（例えば、VISTAを発現させるMDS C、TAM、好中球）が病理学的に関与するがんでありうる。MDS Cが「病理学的に関与する」がんは、MDS C、またはMDS Cの数/比率の増大が、がんの発生、発症、もしくは進行、および/またはがんの、1つもしくは複数の症状の重症度と正に関連するがん、あるいはMDS C、またはMDS Cの数/比率の増大が、がんの発生、発症、または進行の危険性因子であるがんを含む。がんは、疾患の影響を受ける臓器/組織（例えば、疾患/状態の症状が顕在化する臓器/組織）内、または腫瘍内に、MDS Cを含みうる。

20

【0528】

一部の実施形態では、本発明に従う抗原結合性分子の投与は、例えば、CT26細胞、4T-1細胞、LL2細胞、B16細胞、またはEL4細胞に由来する異種移植モデルにおいて決定する場合、がんの発症/進行の阻害、がんの発生までの遅延/がんの発生の防止、腫瘍増殖の軽減/腫瘍増殖までの遅延/腫瘍増殖の防止、転移の軽減/転移までの遅延/転移の防止、がんの症状の重症度の軽減、がん細胞数の低減、腫瘍サイズ/体積の低減、および/または生存（例えば、無増悪生存期間）の延長のうちの1つまたは複数を引き起こしうる。

30

【0529】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子の投与は、抗原結合性分子の投与の非存在下において（または適切な対照抗原結合性分子の投与後において）観察される腫瘍増殖の5%超、例えば、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%を阻害することが可能である。

キメラ抗原受容体（CAR）

40

本発明はまた、本発明の抗原結合性分子またはポリペプチドを含むキメラ抗原受容体（CAR）も提供する。

【0530】

CARは、抗原結合およびT細胞活性化機能の両方をもたらす、組換え受容体である。CARの構造および操作については、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Dottrら、Immunol Rev（2014）、257（1）において総説されている。CARは、細胞膜アンカー領域およびシグナル伝達領域へと連結された、抗原結合性領域を含む。任意選択のヒンジ領域は、抗原結合性領域と、細胞膜アンカー領域との分離をもたらすことが可能であり、可動性リンカーとして作用しうる。

【0531】

50

本発明のCARは、本発明の抗原結合性分子を含むか、もしくはこれからなるか、または本発明に従うポリペプチドを含むか、もしくはこれからなる、抗原結合性領域を含む。

【0532】

細胞膜アンカー領域は、CARの、抗原結合性領域と、シグナル伝達領域との間にもたらされ、細胞外腔に抗原結合性領域を伴い、細胞内部にシグナル伝達領域を伴う、CARの、CARを発現する細胞の細胞膜へのアンカリングをもたらす。一部の実施形態では、CARは、CD3-、CD4、CD8、またはCD28のうちの1つの、膜貫通領域のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、またはこれに由来するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる細胞膜アンカー領域を含む。本明細書で使用される、参照アミノ酸配列「に由来する」領域は、参照配列に対する、少なくとも60%、例えば、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性のうちの1つを有するアミノ酸配列を含む。

10

【0533】

CARのシグナル伝達領域は、T細胞の活性化を可能とする。CARのシグナル伝達領域は、CAR発現T細胞のリン酸化および活性化のための、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)をもたらす、CD3-の細胞内ドメインのアミノ酸配列を含みうる。CARでは、FcRIなど、他のITAM含有タンパク質の配列を含むシグナル伝達領域もまた利用されている(Haynesら、2001、J Immunol、166(1):182~187)。CARのシグナル伝達領域はまた、標的タンパク質への結合時における、CAR発現T細胞の活性化を容易とするように、共刺激分子のシグナル伝達領域に由来する、共刺激配列も含みうる。適切な共刺激分子は、CD28、OX40、4-1BB、ICOS、およびCD27を含む。場合によって、CARは、異なる細胞内シグナル伝達経路の共刺激をもたらすように操作される。例えば、CD28の共刺激と関連するシグナル伝達が、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(P13K)経路を優先的に活性化させるのに対し、4-1BB媒介性シグナル伝達TNF受容体関連因子(TRAF)アダプタータンパク質を介する。したがって、CARのシグナル伝達領域は、場合によって、1つを超える共刺激分子のシグナル伝達領域に由来する共刺激配列を含有する。一部の実施形態では、本発明のCARは、CD28、OX40、4-1BB、ICOS、およびCD27のうちの1つまたは複数の細胞内ドメインのアミノ酸配列を含むか、これからなるか、またはこれに由来するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなる、1つまたは複数の共刺激配列を含む。

20

30

【0534】

任意選択のヒンジ領域は、抗原結合性ドメインと、膜貫通ドメインとの分離をもたらすことが可能であり、可動性リンカーとして作用しうる。ヒンジ領域は、IgG1に由来しうる。一部の実施形態では、本発明のCARは、このIgG1のヒンジ領域のアミノ酸配列を含むか、これからなるか、またはこれに由来するアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるヒンジ領域を含む。

【0535】

また、本発明に従うCARを含む細胞も提供される。本発明に従うCARは、CAR発現免疫細胞、例えば、CAR-T細胞またはCAR-NK細胞を作出するのに使用されうる。CARの、免疫細胞への操作は、*in vitro*における培養時に実施されうる。

40

【0536】

本発明のCARの抗原結合性領域は、例えば、scFv、scFabなど、任意の適切なフォーマットでもたらされうる。

核酸およびベクター

本発明は、本発明に従う、抗原結合性分子、ポリペプチド、またはCARをコードする、1つの核酸または複数の核酸を提供する。

【0537】

一部の実施形態では、核酸は、例えば、他の核酸から、精製または単離される場合もあ

50

り、天然に存在する生物学的素材から、精製または単離される場合もある。一部の実施形態では、核酸（複数可）は、DNAおよび/またはRNAを含むか、またはこれからなる。

【0538】

本発明はまた、本発明に従う、1つの核酸または複数の核酸を含む、1つのベクターまたは複数のベクターも提供する。

【0539】

ヌクレオチド配列は、ベクター、例えば、発現ベクター内に含有されうる。本明細書で使用される、「ベクター」とは、外因性核酸を、細胞へと導入するビヒクルとして使用される核酸分子である。ベクターは、細胞内で核酸を発現させるためのベクターでありうる。このようなベクターは、発現される配列をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含みうる。ベクターはまた、終止コドンおよび発現エンハンサーも含みうる。当技術分野で公知である、任意の、適切なベクター、プロモーター、エンハンサー、および終止コドンが、ペプチドまたはポリペプチドを、本発明に従うベクターから発現させるのに使用されうる。

10

【0540】

「作動可能に連結された」という用語は、核酸配列の発現を、調節配列の影響下または制御下に置く（これにより、発現カセットを形成する）ように、選択された核酸配列と、調節的核酸配列（例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー）とが、共有結合的に連結された状況を含みうる。したがって、調節配列が、核酸配列の転写を実行することが可能な場合、調節配列は、選択された核酸配列に作動可能に連結されている。次いで、結果として得られる転写物（複数可）は、所望のペプチド（複数可）/ポリペプチド（複数可）へと翻訳されうる。

20

【0541】

適切なベクターは、プラスミド、二元ベクター、DNAベクター、mRNAベクター、ウイルスベクター（例えば、ガンマレトロウイルスベクター（例えば、マウス白血病ウイルス（MLV）由来ベクター）、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、およびヘルペスウイルスベクター）、トランスポゾンベースのベクター、および人工染色体（例えば、酵母人工染色体）を含む。

【0542】

一部の実施形態では、ベクターは、真核生物ベクター、例えば、真核細胞内のベクターからの、タンパク質の発現に必要なエレメントを含むベクターでありうる。一部の実施形態では、ベクターは、例えば、タンパク質の発現を駆動する、サイトメガロウイルス（CMV）またはSV40プロモーターを含む、哺乳動物ベクターでありうる。

30

【0543】

本発明に従う抗原結合性分子の、構成要素であるポリペプチドは、複数の核酸のうちの、異なる核酸、または複数のベクターのうちの、異なるベクターによりコードされうる。抗原結合性分子およびポリペプチドを含む/発現する細胞

本発明はまた、本発明に従う、抗原結合性分子、ポリペプチド、またはCARを含むか、またはこれを発現する細胞も提供する。また、本発明に従う1つの核酸、複数の核酸、1つのベクター、または複数のベクターを含むか、またはこれを発現する細胞も提供される。

40

【0544】

細胞は、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞でありうる。哺乳動物は、霊長動物（アカゲザル、カニクイザル、非ヒト霊長動物、またはヒト）、または非ヒト哺乳動物（例えば、ウサギ、モルモット、ラット、マウスまたは他の齧歯動物（ネズミ目内の任意の動物を含む）、ネコ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、畜牛（ウシ、例えば、乳牛、またはウシ目内の任意の動物を含む）、ウマ（ウマ目内の任意の動物を含む）、ロバ、および非ヒト霊長動物）でありうる。

【0545】

50

本発明はまた、本発明に従う核酸（複数可）またはベクター（複数可）を含む細胞を作製するための方法であって、本発明に従う1つの核酸、複数の核酸、1つのベクター、または複数のベクターを、細胞へと導入するステップを含む方法も提供する。一部の実施形態では、本発明に従う、単離核酸（複数可）または単離ベクター（複数可）を、細胞へと導入するステップは、形質転換、トランスフェクション、電気穿孔、または形質導入（例えば、レトロウイルスによる形質導入）を含む。

【0546】

本発明はまた、本発明に従う、抗原結合性分子、ポリペプチド、またはCARを発現する/含む細胞を作製するための方法であって、本発明に従う1つの核酸、複数の核酸、1つのベクター、または複数のベクターを、細胞へと導入するステップを含む方法も提供する。一部の実施形態では、方法は、細胞を、細胞による、核酸（複数可）またはベクター（複数可）の発現にも適する条件下で培養するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、*in vitro*において実施される。

10

【0547】

本発明はまた、本発明に従う方法により得られるか、または得られうる細胞も提供する。抗原結合性分子およびポリペプチドの作製

本発明に従う抗原結合性分子およびポリペプチドは、当業者に公知の、ポリペプチドを作製するための方法に従い調製されうる。

【0548】

ポリペプチドは、化学合成、例えば、液相または固相合成により調製されうる。例えば、ペプチド/ポリペプチドは、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Chandrurら、Molecules (2013)、18:4373~4388において記載された方法を使用して合成されうる。

20

【0549】

代替的に、抗原結合性分子およびポリペプチドは、組換え発現によっても作製されうる。当技術分野では、それらのいずれもが、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、GreenおよびSambrook、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(4版)、Cold Spring Harbor Press、2012；ならびにNat Methods. (2008)、5(2):135~146において明示された分子生物学法など、ポリペプチドの組換え作製に適する分子生物学法が周知である。抗原結合性分子の組換え作製のための方法はまた、それらのいずれもが、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Frenzelら、Front Immunol. (2013)、4:217；ならびにKunertおよびReinhart、Appl Microbiol Biotechnol. (2016)、100:3451~3461においても記載されている。

30

【0550】

場合によって、本発明の抗原結合性分子は、1つを超えるポリペプチド鎖から構成される。このような場合に、抗原結合性分子の作製は、抗原結合性分子を形成するのに、1つを超えるポリペプチドの転写および翻訳と、後続するポリペプチド鎖の会合とを含みうる。

【0551】

本発明に従う組換え作製のために、ポリペプチドの発現に適する、任意の細胞が使用されうる。細胞は、原核細胞の場合もあり、真核細胞の場合もある。一部の実施形態では、細胞は、古細菌または細菌の細胞などの原核細胞である。一部の実施形態では、細菌は、Enterobacteraceae科の細菌、例えば、Escherichia coliなどのグラム陰性菌でありうる。一部の実施形態では、細胞は、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞、例えば、CHO、HEK（例えば、HEK293）、HeLa、またはCOS細胞などの真核細胞である。一部の実施形態では、細胞は、一過性に、または安定的にポリペプチドを発現するCHO細胞である。

40

【0552】

場合によって、細胞は、一部の原核細胞は、真核細胞と同じフォールディングまたは翻

50

訳後修飾を可能としないため、原核細胞ではない。加えて、真核細胞内では、極めて高度の発現レベルが可能であり、タンパク質は、適切なタグを使用する、真核細胞からの精製が容易である。タンパク質の、培地への分泌を増強する、特異的なプラスミドもまた利用されうる。

【0553】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Zemellaら、Chembiochem(2015)、16(17):2420~2431において記載されたシステムを使用する、無細胞タンパク質合成(CFPS)により調製されうる。

【0554】

作製は、目的のポリペプチド(複数可)を発現するように修飾された、真核細胞の培養または発酵を伴いうる。培養または発酵は、栄養物、空気/酸素、および/または増殖因子の適切な供給がなされたバイオリアクター内で実施されうる。分泌されたタンパク質は、培養培地/発酵培養液を、細胞から分別し、タンパク質含有物を抽出し、個別のタンパク質を分離して、分泌されたポリペプチド(複数可)を単離することにより回収されうる。当業者には、培養、発酵、および分離法が周知であり、例えば、GreenおよびSambrook、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(4版; 参照により、本明細書の上記に組み込まれた)において記載されている。

【0555】

バイオリアクターは、細胞が培養されうる、1または複数の反応槽を含む。バイオリアクター内の培養は、反応物の、リアクターへの、持続的な流入と、培養された細胞の、リアクターからの、持続的な流出とにより、持続的に生じうる。代替的に、培養は、バッチ内で生じうる。バイオリアクターは、培養される細胞に、最適の条件がもたらされるように、pH、酸素、反応槽への流入および反応槽からの流出の流量、ならびに反応槽内の攪拌などの環境条件をモニタリングし、制御する。

【0556】

抗原結合性分子/ポリペプチド(複数可)を発現する細胞の培養の後、目的のポリペプチド(複数可)は、単離されうる。当技術分野で公知の、細胞から、タンパク質を分離するための、任意の適切な方法が使用されうる。ポリペプチドを単離するために、細胞を、栄養培地から分離することが必要でありうる。目的のポリペプチド(複数可)が、細胞から分泌される場合、細胞は、分泌された目的のポリペプチド(複数可)を含有する培養培地から、遠心分離により分離されうる。目的のポリペプチド(複数可)が、細胞内に集まる場合、タンパク質の単離は、細胞を、細胞培養培地から分離する遠心分離、細胞ペレットの、溶解緩衝液による処理、および超音波処理、急速な凍結-融解、または浸透圧溶解による、細胞の破壊を含みうる。

【0557】

次いで、目的のポリペプチド(複数可)を、他のタンパク質および非タンパク質成分を含有しうる、上清または培養物培地を単離することが所望されうる。タンパク質成分を、上清または培養培地から分離するための、一般的な手法は、沈殿である。可溶性が異なるタンパク質は、硫酸アンモニウムなど、異なる濃度の沈殿剤で沈殿する。例えば、低濃度の沈殿剤では、水溶性のタンパク質が抽出される。したがって、増大させる、異なる濃度の沈殿剤を添加することにより、可溶性の異なるタンパク質が、識別されうる。その後、分離されたタンパク質から、硫酸アンモニウムを除去するのに、透析が使用されうる。

【0558】

当技術分野では、異なるタンパク質を識別するための、他の方法、例えば、イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズクロマトグラフィーが公知である。これらは、沈殿に対する代替法として使用される場合もあり、沈殿に後続して実施される場合もある。

【0559】

目的のポリペプチド(複数可)が、培養物から単離されたら、ポリペプチド(複数可)

10

20

30

40

50

を濃縮することが所望または必要でありうる。当技術分野では、限外濾過または凍結乾燥など、タンパク質を濃縮する、多数の方法が公知である。

組成物

本発明はまた、本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸、発現ベクター、および細胞を含む組成物も提供する。

【0560】

本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸、発現ベクター、および細胞は、臨床使用のための医薬組成物または医薬として製剤化される場合があり、薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、またはアジュバントを含みうる。組成物は、注射または注入を含みうる、局所、非経口、全身、腔内、静脈内、動脈内、筋内、髄腔内、眼内、結膜内、腫瘍内、皮下、皮内、髄腔内、経口、または経皮投与経路のために製剤化されうる。

10

【0561】

適切な製剤は、滅菌媒体中または等張性媒体中の抗原結合性分子を含みうる。医薬および医薬組成物は、ゲル形態を含む、流体中で製剤化されうる。流体製剤は、ヒトまたは動物体内の、選択された領域への、注射または注入（例えば、カテーテルを介する）による投与のために製剤化されうる。

【0562】

一部の実施形態では、組成物は、例えば、血管または腫瘍への、注射または注入のために製剤化される。

20

【0563】

また、本発明に従い、本明細書で記載される、薬学的に有用な組成物を作製するための方法も提供され、このような作製法は、本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、もしくは細胞を作製するステップ；本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、もしくは細胞を単離するステップ；および/または本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、もしくは細胞を、薬学的に許容される担体、アジュバント、賦形剤、または希釈剤と混合するステップから選択される、1つまたは複数のステップを含みうる。

30

【0564】

例えば、本明細書で記載される、本発明のさらなる態様は、疾患/状態（例えば、がん）の処置における使用のための医薬または医薬組成物を製剤化または作製する方法であって、本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、または細胞を、薬学的に許容される担体、アジュバント、賦形剤、または希釈剤と混合することにより、医薬組成物または医薬を製剤化するステップに関する。

治療適用および予防適用

本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸、発現ベクター、細胞、および組成物は、治療法および予防法において使用される。

40

【0565】

本発明は、医学的処置または予防の方法における使用のための、本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、細胞、または組成物を提供する。また、疾患または状態を処置または防止するための医薬の製造における、本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、細胞、または組成物の使用も提供される。また、疾患または状態を処置または防止する方法であって、対象へと、治療または予防有効量の、本明細書で記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、細胞、または組成物を投与するステップを含む方法も提供さ

50

れる。

【0566】

方法は、疾患／状態の発症もしくは進行の低減、疾患／状態の症状の緩和、または疾患／状態の病態の軽減に効果的でありうる。方法は、疾患／状態の進行を防止する、例えば、疾患／状態の増悪を防止するか、または疾患／状態の発症速度を遅くするのに効果的でありうる。一部の実施形態では、方法は、疾患／状態の改善、例えば、疾患／状態の症状の軽減、または疾患／状態の、重症度／活動性についての、他の一部の相関因子の低減をもたらす。一部の実施形態では、方法は、疾患／状態の後期（例えば、慢性期または転移）の発症を防止する。

【0567】

本発明の物品は、VISTAを発現する細胞（例えば、MDS C）の数および／または活性の低減から、治療または予防利益を引き出す、任意の疾患／状態の処置／防止のために使用されることが理解されるであろう。また、本発明の治療的および予防的有用性が、MDS Cおよび／または他のVISTAを発現する細胞、例えば、腫瘍関連マクロファージ（TAM）および好中球の数または活性の低減から利益を得る、任意の疾患／状態へと本質的に拡張されることも明らかであろう。VISTAに対するアンタゴニズムは、エフェクター免疫細胞を、MDS Cおよび／または他のVISTAを発現する細胞による抑制から、効果的に解放する。

【0568】

例えば、疾患／状態は、VISTA（例えば、MDS C）を発現する細胞が、病理学的に関与する疾患／状態、例えば、VISTA（例えば、MDS C）を発現する細胞の数／比率の増大が、疾患／状態の発生、発症、もしくは進行、および／または疾患／状態の1つもしくは複数の症状の重症度と正に関連するか、あるいはVISTA（例えば、MDS C）を発現する細胞の数／比率の増大が、疾患／状態の、発生、発症、または進行の危険性因子である、疾患／状態でありうる。

【0569】

一部の実施形態では、本発明に従い処置／防止される疾患／状態は、VISTA（例えば、MDS C）を発現する細胞の数／比率／活性の、例えば、疾患／状態の非存在下における、VISTA（例えば、MDS C）を発現する細胞の数／比率／活性と比較した増大により特徴付けられる疾患／状態である。

【0570】

一部の実施形態では、対象は、例えば、末梢、もしくは疾患／状態の影響を受ける臓器／組織（例えば、疾患／状態の症状が顕在化する臓器／組織）における、VISTAを発現する細胞（例えば、MDS C）の、数／比率／活性の増大の検出に基づき、本明細書に記載される処置に選択される場合もあり、腫瘍内の、VISTAを発現する細胞（例えば、MDS Cまたは腫瘍関連マクロファージ）の存在により、これに選択される場合もある。疾患／状態は、任意の組織または臓器または臓器系に影響を及ぼす。一部の実施形態では、疾患／状態は、いくつかの組織／臓器／臓器系に影響を及ぼす。

【0571】

一部の実施形態では、対象は、対象が、末梢または臓器／組織における、VISTAを発現する細胞（例えば、MDS C）の数／比率／活性を、健常対象における、このような細胞の数／比率／活性と比べて増大させているという決定に基づき、本発明に従う治療／予防に選択される場合もあり、対象が、VISTAを発現する細胞（例えば、MDS C）を含む腫瘍を有するという決定に基づき、これに選択される場合もある。

【0572】

一部の実施形態では、処置／防止される疾患／状態は、がんである。

【0573】

抗原結合性分子は、本発明の抗原結合性分子は、エフェクター免疫細胞を、MDS C媒介性抑制、またはVISTAを発現する細胞による抑制から解放し、これにより、抗がん免疫応答を増強するのに有用であるため、がん一般の処置に有用であることが理解される

10

20

30

40

50

であろう。

【0574】

がんは、任意の、望ましくない細胞増殖（または望ましくない細胞増殖により顕示される、任意の疾患）、新生物、または腫瘍でありうる。がんは、良性の場合もあり、悪性の場合もあり、原発性の場合もあり、続発性（転移性）の場合もある。新生物または腫瘍は、細胞の、任意の異常な増殖（growthまたはproliferation）であることが可能であり、任意の組織内に位置しうる。がんは、例えば、副腎、副腎髄質、肛門、虫垂、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、盲腸、中枢神経系（脳を含むか、または除外する）、小脳、子宮頸部、結腸、十二指腸、子宮内膜、上皮細胞（例えば、腎臓上皮）、胆嚢、食道、神経膠細胞、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺、喉頭、肝臓、肺、リンパ、リンパ節、リンパ芽球、顎、縦隔、腸間膜、子宮筋層、鼻咽頭、網、口腔、卵巣、膵臓、耳下腺、末梢神経系、腹膜、胸膜、前立腺、唾液腺、S字結腸、皮膚、小腸、軟部組織、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、舌、扁桃腺、気管、子宮、外陰、および/または白血球に由来する組織/細胞のがんでありうる。

10

【0575】

処置される腫瘍は、神経系腫瘍の場合もあり、非神経系腫瘍の場合もある。神経系腫瘍、例えば、神経膠腫、髄芽腫、髄膜腫、神経線維腫、上衣腫、シュワン細胞腫、神経線維肉腫、星状細胞腫、および希突起神経膠腫は、中枢神経系に由来する場合もあり、末梢神経系に由来する場合もある。非神経系がん/腫瘍は、他の任意の非神経組織に由来する場合があり、例は、黒色腫、中皮腫、リンパ腫、骨髄腫、白血病、非ホジキンリンパ腫（NHL）、ホジキンリンパ腫、慢性骨髄性白血病（CML）、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、肝がん、類表皮癌、前立腺癌、乳がん、肺がん、結腸がん、卵巣がん、膵がん、胸腺癌、NSCLC、血液がん、および肉腫を含む。

20

【0576】

MDSCは、進行性結腸直腸がんにおいて上昇する（Toorら、Front Immunol.、2016、7:560）。MDSCはまた、乳がんにおいても観察され、末梢血中のMDSCの百分率は、後期乳がんを伴う患者において増大する（Markowitzら、Breast Cancer Res Treat.、2013年7月、140(1):13~21）。MDSCの存在度はまた、充実性腫瘍における予後不良とも関連し（Charoentongら、Cell Rep.、2017年1月3日、18(1):248~262）、MDSCは、肝がんモデルにおいてエンリッチされる（Connollyら、J Leukoc Biol.（2010）、87(4):713~25）。前立腺癌および乳癌、黒色腫、結腸直腸がん、ならびにLewis肺癌は、MDSCを誘引するケモカインを産生し、免疫抑制に寄与することが報告されており（Umanskyら、Vaccines（Basel）（2016）、4(4):36）、膵がん患者におけるMDSCは、腫瘍負荷と正に相関する（Xuら、Hepatobiliary Pancreat Dis Int.（2016）、15(1):99~105）。VISTAはまた、卵巣がん（例えば、US9,631,018B2を参照されたい）およびリンパ腫（例えば、WO2017/023749A1を参照されたい）の処置のための標的であることも報告されている。

30

40

【0577】

Blandoら、Proc Natl Acad Sci USA.（2019）、116(5):1692~1697は、VISTA発現骨髄細胞の、膵がんへの著明な浸潤について最近報告し、前立腺がんでは、CTLA4アンタゴニストによる処置後には、VISTA発現骨髄細胞の拡大が観察され、黒色腫では、PD-L1アンタゴニストによる処置の前後いずれにおいてもVISTA発現骨髄細胞の拡大が観察されることを報告した。

【0578】

一部の実施形態では、がんは、VISTAを発現する細胞を含むがん、VISTAを発現する細胞の浸潤を含むがん、VISTAを発現するがん細胞を含むがん、血液がん、白

50

血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、中皮腫、充実性腫瘍、肺がん、非小細胞肺癌、胃がん、胃癌、結腸直腸がん、結腸直腸癌、結腸直腸腺癌、子宮がん、子宮体内膜癌、乳がん、トリプルネガティブ浸潤性乳癌、肝がん、肝細胞癌、膵がん、膵管腺癌、甲状腺がん、胸腺腫、皮膚がん、黒色腫、皮膚黒色腫、腎がん、腎細胞癌、乳頭状腎細胞癌、頭頸部がん、頭頸部扁平上皮がん（SCCHN）、卵巣がん、卵巣癌、卵巣漿液性嚢胞腺癌、前立腺がん、および/または前立腺腺癌から選択される。

【0579】

一部の実施形態では、がんは、結腸直腸がん（例えば、結腸癌、結腸腺癌）、膵がん、乳がん、肝がん、前立腺がん、卵巣がん、頭頸部がん、白血病（例えば、T細胞白血病）、リンパ腫、黒色腫、胸腺腫、肺がん、非小細胞肺がん（NSCLC）、および/または充実性腫瘍である。

10

【0580】

処置/防止は、がんの症状の発症/進行を遅延させる/防止すること、がんの症状の重症度を軽減すること、がんの細胞の生存期間/増殖/浸潤/転移を低減すること、がんの細胞の数を低減すること、および/または対象の生存期間を延長することのうちの1つまたは複数を目標としうる。

【0581】

一部の実施形態では、処置/防止されるがんは、VISTAを発現する細胞を含む。一部の実施形態では、処置/防止されるがんは、VISTAを発現するがん細胞を含む。一部の実施形態では、VISTAを発現する細胞は、MDSC（例えば、g-MDSCおよび/またはm-MDSC）である。一部の実施形態では、がんは、VISTAを発現する細胞（例えば、MDSC）を含む腫瘍を含む。一部の実施形態では、処置/防止されるがんは、MDSCを含む腫瘍を含む。一部の実施形態では、処置/防止されるがんは、VISTAを発現する細胞（例えば、MDSC）の浸潤を含む。一部の実施形態では、処置/防止されるがんは、VISTAを発現する細胞（例えば、MDSC）の浸潤を呈する腫瘍を含む。

20

【0582】

一部の実施形態では、処置/防止されるがんは、MDSCを、1%を超えて、例えば、2%、5%、10%、15%、20%、25%、または30%含む（例えば、腫瘍の免疫プロファイリングにより決定する場合）、CD45+細胞の集団を含む腫瘍を含む。

30

【0583】

一部の実施形態では、対象は、例えば、対象から得られた試料中の、VISTAを発現する細胞（例えば、MDSC）を含むがんの検出、またはVISTAを発現する細胞（例えば、MDSC）を含む腫瘍の検出に基づき、本明細書に記載される処置に選択されうる。

【0584】

一部の実施形態では、VISTA発現細胞が、病理学的に関与する疾患/状態は、感染性疾患、例えば、細菌、ウイルス、真菌、または寄生虫感染症である。一部の実施形態では、慢性/遷延性感染症を処置することは、例えば、このような感染症が、T細胞の機能不全またはT細胞の疲弊と関連する場合、特に所望されうる。T細胞の疲弊は、多くの慢性感染症（ウイルス、細菌、および寄生虫を含む）、ならびにがんにおいて生じる、T細胞の機能不全状態であることが十分に確立されている（Wherry、Nature Immunology、12巻、6号、492~499頁、2011年6月）。

40

【0585】

処置されうる細菌感染症の例は、Bacillus属種、Bordetella pertussis、Clostridium属種、Corynebacterium属種、Vibrio cholerae、Staphylococcus属種、Streptococcus属種、Escherichia、Klebsiella、Proteus、Yersinia、Erwinia、Salmonella、Listeria属種、He

50

licobacter pylori、抗酸菌（例えば、Mycobacterium tuberculosis）、およびPseudomonas aeruginosaによる感染を含む。例えば、細菌感染症は、敗血症または結核でありうる。処置されうるウイルス感染症の例は、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）、単純ヘルペスウイルス、およびヒトパピローマウイルス（HPV）による感染を含む。処置されうる真菌の感染症の例は、Alternaria属種、Aspergillus属種、Candida属種、およびHistoplasma属種による感染を含む。真菌感染症は、真菌性敗血症またはヒストプラズマ症でありうる。処置されうる寄生虫感染症の例は、Plasmodium属種（例えば、Plasmodium falciparum、Plasmodium yoeli、Plasmodium ovale、Plasmodium vivax、またはPlasmodium chabaudi chabaudi）による感染を含む。寄生虫感染症は、マラリア、リーシュマニア症、およびトキソプラズマ症などの疾患でありうる。

10

【0586】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、Fc領域媒介性エフェクター機能（例えば、ADCC、ADCP、CDC）を伴わない分子機構を介して、その治療/予防効果を及ぼす。一部の実施形態では、分子機構は、抗原結合性分子の、Fc受容体（例えば、FcRI、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIc、FcRIIIa、およびFcRIIIbのうちの1つまたは複数）への結合を伴わない。一部の実施形態では、分子機構は、抗原結合性分子の、補体タンパク質（例えば、C1q）への結合を伴わない。

20

【0587】

一部の実施形態（例えば、抗原結合性分子が、Fc領域を欠く実施形態、または抗原結合性分子が、Fc媒介性抗体エフェクター機能を誘導することが可能ではないFc領域を含む実施形態）では、処置は、VISTA発現細胞の殺滅を誘導しない/増大させない。一部の実施形態では、処置は、VISTA発現細胞の数/比率を低減しない。

【0588】

一部の実施形態では、処置は、(i) VISTA媒介性シグナル伝達を阻害し、かつ、(ii) VISTA発現細胞の殺滅を誘導しない/増大させない。一部の実施形態では、処置は、(i) VISTA媒介性シグナル伝達を阻害し、かつ、(ii) VISTA発現細胞の数/比率を低減しない。

30

【0589】

本発明の物品の投与は、好ましくは、「治療有効」量または「予防有効」量であり、これは、対象に対して、治療または予防利益を示すのに十分な量である。投与される実際の量、および速度、ならびに投与の時間経過は、疾患/状態の性質および重症度、ならびに投与される、特定の物品に依存するであろう。処置の処方、例えば、投与量についての決定などは、一般的な従事者および他の医師の責任の範囲内にあり、典型的に、処置される疾患/障害、個々の対象の状態、送達部位、投与方法、および従事者に公知の他の因子を考慮に入れる。上記で言及された技法およびプロトコールの例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、20版、2000、Lippincott, Williams & Wilkins刊において見出されうる。

40

【0590】

投与は、処置される状態に応じて、単独でなされる場合もあり、他の処置と同時に、または逐次的に、組み合わせられてなされる場合もある。本明細書に記載される抗原結合性分子または組成物と、治療剤とは、同時に投与される場合もあり、逐次的に投与される場合もある。

【0591】

一部の実施形態では、方法は、例えば、がんの処置/防止のための、さらなる治療的または予防的介入を含む。一部の実施形態では、治療的または予防的介入は、化学療法、免疫療法、放射線治療、手術、ワクチン接種、および/またはホルモン療法から選択される

50

。一部の実施形態では、治療的または予防的介入は、白血球除去療法を含む。一部の実施形態では、治療的または予防的介入は、幹細胞移植を含む。

【0592】

一部の実施形態では、抗原結合性分子は、V I S T A以外の免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤と組み合わせて投与される。一部の実施形態では、免疫チェックポイント分子は、例えば、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、T I M - 3、T I G I T、またはB T L Aである。一部の実施形態では、抗原結合性分子は、共刺激受容体により媒介されるシグナル伝達を促進することが可能な薬剤と組み合わせて投与される。一部の実施形態では、共刺激受容体は、例えば、C D 2 8、C D 8 0、C D 4 0 L、C D 8 6、O X 4 0、4 - 1 B B、C D 2 7、またはI C O S

10

【0593】

したがって、本発明は、本発明に従う物品（例えば、本発明に従う抗原結合性分子）と、V I S T A以外の免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤とを含む組成物を提供する。また、本発明の物品と、共刺激受容体により媒介されるシグナル伝達を促進することが可能な薬剤とを含む組成物も提供される。また、本明細書に記載される疾患／状態の、医学的な処置および予防の方法における、このような組成物の使用も提供される。

【0594】

また、本明細書に記載される疾患／状態を処置／防止するための方法であって、本発明に従う物品（例えば、本発明に従う抗原結合性分子）と、V I S T A以外の免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤とを投与するステップを含む方法も提供される。また、本明細書に記載される疾患／状態を処置／防止するための方法であって、本発明に従う物品（例えば、本発明に従う抗原結合性分子）と、共刺激受容体により媒介されるシグナル伝達を促進することが可能な薬剤とを投与するステップを含む方法も提供される。

20

【0595】

当技術分野では、免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤が公知であり、例えば、免疫チェックポイント分子、またはそれらに対するリガンドに結合し、免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な抗体を含む。免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な、他の薬剤は、免疫チェックポイント分子、または免疫チェックポイント分子に対するリガンドの、遺伝子／タンパク質の発現を低減すること（例えば、免疫チェックポイント分子／リガンドをコードする遺伝子（複数可）の転写を阻害すること、免疫チェックポイント分子／リガンドをコードするR N Aの転写後プロセッシングを阻害すること、免疫チェックポイント分子／リガンドをコードするR N Aの安定性を低減すること、免疫チェックポイント分子／リガンドをコードするR N Aの分解を促進すること、免疫チェックポイント分子／リガンドの翻訳後プロセッシングを阻害すること、免疫チェックポイント分子／リガンドの安定性を低減すること、または免疫チェックポイント分子／リガンドの分解を促進することを介して）が可能な薬剤、および低分子阻害剤を含む。

30

40

【0596】

当技術分野では、共刺激受容体により媒介されるシグナル伝達を促進することが可能な薬剤が公知であり、例えば、共刺激受容体に結合し、共刺激受容体により媒介されるシグナル伝達を誘発するか、または増大させることが可能なアゴニスト抗体を含む。共刺激受容体により媒介されるシグナル伝達を促進することが可能な、他の薬剤は、共刺激受容体、または共刺激受容体に対するリガンドの、遺伝子／タンパク質の発現を増大させる（例えば、共刺激受容体／リガンドをコードする遺伝子（複数可）の転写を促進すること、共刺激受容体／リガンドをコードするR N Aの転写後プロセッシングを促進すること、共刺激受容体／リガンドをコードするR N Aの安定性を増大させること、共刺激受容体／リガンドをコードするR N Aの分解を阻害すること、共刺激受容体／リガンドの翻訳後プロセシ

50

ングを促進すること、共刺激受容体／リガンドの安定性を増大させること、または共刺激受容体／リガンドの分解を阻害することを介して)ことが可能な薬剤、および低分子アゴニストを含む。

【0597】

VISTA発現MDS Cによる免疫抑制は、免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤による処置の失敗、およびこれに対する耐性の発生に關与している。Gaora、Nature Medicine(2017)、23:551~555は、最近、VISTAが、イピリムマブ(すなわち、抗CTLA-4抗体)療法の後に、前立腺腫瘍における代償性阻害経路でありうることを示唆した。

【0598】

特定の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、PD-1により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤と組み合わせて投与される。PD-1により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、PD-1ターゲティング剤またはPD-L1ターゲティング剤でありうる。PD-1により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、例えば、PD-1またはPD-L1に結合し、PD-1媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗体でありうる。一部の実施形態では、薬剤は、アンタゴニスト性抗PD-1抗体である。一部の実施形態では、薬剤は、アンタゴニスト性抗PD-L1抗体である。

【0599】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、CTLA-4により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤と組み合わせて投与される。CTLA-4により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、CTLA-4ターゲティング剤、またはCD80もしくはCD86など、CTLA-4に対するリガンドに対してターゲティングされた薬剤でありうる。一部の実施形態では、CTLA-4により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、例えば、CTLA-4、CD80またはCD86に結合し、CTLA-4媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗体でありうる。

【0600】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、LAG-3により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤と組み合わせて投与される。LAG-3により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、LAG-3ターゲティング剤、またはMHCクラスIIなど、LAG-3に対するリガンドに対してターゲティングされた薬剤でありうる。一部の実施形態では、LAG-3により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、例えば、LAG-3またはMHCクラスIIに結合し、LAG-3媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗体でありうる。

【0601】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、TIM-3により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤と組み合わせて投与される。TIM-3により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、TIM-3ターゲティング剤、またはガレクチン9など、TIM-3に対するリガンドに対してターゲティングされた薬剤でありうる。一部の実施形態では、TIM-3により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、例えば、TIM-3またはガレクチン9に結合し、TIM-3媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗体でありうる。

【0602】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、TIGITにより媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤と組み合わせて投与される。TIGITにより媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、TIGITターゲティング剤、またはCD113、CD112、もしくはCD155など、TIGITに対するリガンドに対してターゲティングされた薬剤でありうる。一部の実施形態では、TIGITにより媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、例えば、TIGIT、CD113、CD112、またはCD155に結合し、TIGIT媒介性シグナル伝達を阻害することが

10

20

30

40

50

可能な抗体でありうる。

【0603】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子は、BTLAにより媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤と組み合わせて投与される。BTLAにより媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、BTLAターゲティング剤、またはHVE Mなど、BTLAに対するリガンドに対してターゲティングされた薬剤でありうる。一部の実施形態では、BTLAにより媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤は、例えば、BTLAまたはHVE Mに結合し、BTLA媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗体でありうる。

【0604】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子と、免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤（例えば、PD-1および/またはPD-L1）との組合せを利用する方法は、いずれかの薬剤が、単剤療法として使用される場合に観察される効果と比較した、処置効果の改善をもたらす。一部の実施形態では、本発明の抗原結合性分子と、免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤（例えば、PD-1および/またはPD-L1）との組合せは、相乗的（すなわち、相加効果を超える）処置効果をもたらす。

【0605】

一部の実施形態では、(i)本発明の抗原結合性分子と、(ii)免疫チェックポイント分子（例えば、PD-1および/またはPD-L1）により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤とを含む組合せによる処置は、

単独で使用された、組合せの一方の構成要素について観察される処置効果と比較した、処置効果の改善；

単独で使用された、組合せの一方の構成要素について観察される処置効果と比較して、相乗的（すなわち、相加効果を超える）である処置効果；

単独で使用された、組合せの一方の構成要素による腫瘍増殖の阻害と比較した、腫瘍増殖の阻害の増大；

単独で使用された、組合せの一方の構成要素による腫瘍増殖の阻害と比較して、相乗的（すなわち、相加効果を超える）である腫瘍増殖の阻害；

単独で使用された、組合せの一方の構成要素による免疫抑制細胞の数/活性の低減と比較して大きな、免疫抑制細胞の数/活性の低減；

単独で使用された、組合せの一方の構成要素による免疫抑制細胞の数/活性の低減と比較して、相乗的（すなわち、相加効果を超える）である免疫抑制細胞の数/活性の低減；

単独で使用された、組合せの一方の構成要素による免疫抑制細胞の増殖の低減と比較して大きな、免疫抑制細胞の増殖の低減；

単独で使用された、組合せの一方の構成要素による免疫抑制細胞の増殖の低減と比較して、相乗的（すなわち、相加効果を超える）である免疫抑制細胞の増殖の低減；

単独で使用された、組合せの一方の構成要素による免疫抑制細胞の比率の低減と比較して、細胞（例えば、CD45+細胞、例えば、腫瘍から得られたCD45+細胞）集団内の、大きな免疫抑制細胞の比率活性の低減；および

単独で使用された、組合せの一方の構成要素による免疫抑制細胞の比率の低減と比較して、相乗的（すなわち、相加効果を超える）である細胞（例えば、CD45+細胞、例えば、腫瘍から得られたCD45+細胞）集団内の、免疫抑制細胞の比率の低減のうちの一つまたは複数と関連しうる。

【0606】

同時的投与とは、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、細胞、または組成物と、治療剤との、併せた投与、例えば、両方の薬剤を含有する医薬組成物（組合せ調製物）としての投与、または互いの直後における、任意選択で、同じ投与経路を介する、例えば、同じ動脈、静脈、または他の血管への投与を指す。逐次的投与とは、抗原結合性分子/組成物または治療

10

20

30

40

50

剤のうちの1つの投与に後続する、所与の時間間隔の後における、他の薬剤の、別個の投与を指す。2つの薬剤が、同じ経路により投与されることは、要求されないが、一部の実施形態では、これが該当する。時間間隔は、任意の時間間隔でありうる。

【0607】

化学療法および放射線療法は、それぞれ、薬物またはイオン化放射線（例えば、X線または線を使用する放射線療法）によるがんの処置を指す。薬物は、化学的実体、例えば、低分子医薬の、抗生剤、DNA挿入剤、タンパク質阻害剤（例えば、キナーゼ阻害剤）、または生物学的薬剤、例えば、抗体、抗体断片、アプタマー、核酸（例えば、DNA、RNA）、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質でありうる。薬物は、医薬組成物または医薬として製剤化されうる。製剤は、1つまたは複数の薬物（例えば、1つまたは複数の活性の薬剤）を、1つまたは複数の薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、または担体と併せて含みうる。

10

【0608】

処置は、1つを超える薬物の投与を伴いうる。薬物は、処置される状態に応じて、単独で投与される場合もあり、他の処置と、同時に、または逐次的に組み合わせて投与される場合もある。例えば、化学療法は、それらのうちの1つまたは複数が、がんを処置することを意図されうる、2つ薬物の投与を伴う併用療法でありうる。

【0609】

化学療法は、1つまたは複数の投与経路、例えば、非経口、静脈内注射、経口、皮下、皮内、または腫瘍内の投与経路により投与されうる。

20

【0610】

化学療法は、処置レジメに従い投与されうる。処置レジメは、医師または医療従事者により作成されうる、化学療法投与についての、所定の時程表、計画、スキーム、またはスケジュールであることが可能であり、処置を要求する患者に適するように、微調整されうる。処置レジメは、患者へと投与される化学療法の種類；各薬物の用量または放射線の線量；投与の間の時間間隔；各処置の長さ；存在する場合、任意の休業日の数および性質などのうちの1つまたは複数を指し示しうる。併用療法では、各薬物が、どのようにして投与されるべきであるのかを指し示す、単一の処置レジメが提示されうる。

【0611】

化学療法薬は、アベマシクリブ、アピラテロン酢酸塩、アビトレキサート（メトトレキサート）、Abraxane（パクリタキセルのアルブミン安定化ナノ粒子製剤）、ABVD、ABVE、ABVE-PC、AC、アカラブルチニブ、AC-T、Adcetris（ブレンツキシマブ・ペドチン）、ADE、Ado-トラスツズマブ・エムタンシン、アドリアマイシン（ドキシソルピシン塩酸塩）、アフアチニブジマレイン酸塩、アフィニトール（エベロリムス）、Akyzreo（ネツピタントおよびパロノセトロン塩酸塩）、Aldara（イミキモド）、アルデスロイキン、Alecensa（アレクチニブ）、アレクチニブ、アレムツズマブ、Alimta（ペメトレキセドニナトリウム）、Aliqopa（コパンリシブ塩酸塩）、Alkeran注射剤（メルファラン塩酸塩）、Alkeran錠（メルファラン）、Aloxix（パロノセトロン塩酸塩）、Alunbrig（ブリガチニブ）、Ambochlorin（クロランブシル）、Amboclorin（クロランブシル）、アミホスチン、アミノレブリン酸、アナストロゾール、アプレピタント、Aredia（パミドロネートニナトリウム）、Arimidex（アナストロゾール）、Aromasin（エキセメスタン）、Arranon（ネララビン）、三酸化ヒ素、Arzerra（オフアツムマブ）、Erwinia chrysanthemii由来のアスパラギナーゼ、アテゾリズマブ、Avastin（ベバシズマブ）、アベルマブ、アキシカブタゲン・シロロイセル、アキシチニブ、アザシチジン、Bavencio（アベルマブ）、BEACOPP、Becenum（カルムスチン）、Beleodaq（ベリノスタット）、ベリノスタット、ベンダムスチン塩酸塩、BEP、Besponsa（イノツズマブ・オゾガマイシン）、ベバシズマブ、ベキサロテン、Bexxar（トシツモマブおよびヨウ素I-131トシツモマブ）、ピカルタミド、BiCNU（カル

30

40

50

ムスチン)、プレオマイシン、プリナツモマブ、Blincyto (プリナツモマブ)、ボルテゾミブ、Bosulif (ボスチニブ)、ボスチニブ、プレントキシマブ・ベドチン、ブリガチニブ、BuMel、ブスルファン、Busulfex (ブスルファン)、カバジタキセル、Cabometyx (カボザンチニブ - S - リンゴ酸塩)、カボザンチニブ - S - リンゴ酸塩、CAF、Calquence (アカラブルチニブ)、Campath (アレムツズマブ)、Camptosar (イリノテカン塩酸塩)、カペシタビン、CAPOX、Carac (外用フルオロウラシル)、カルボプラチン、カルボプラチン - TAXOL、カルフィルゾミブ、Carmubris (カルムスチン)、カルムスチン、カルムスチンインプラント剤、Casodex (ピカルタミド)、CEM、Ceritinib、Cerubidine (ダウノルピシン塩酸塩)、Cervarix (組換えHPV二価ワクチン)、セツキシマブ、CEV、クロランブシル、クロランブシル - PREDNISON、CHOP、シスプラチン、クラドリピン、Clafen (シクロホスファミド)、クロファラビン、Clofarex (クロファラビン)、Clolar (クロファラビン)、CMF、コビメチニブ、Cometriq (カボザンチニブ - S - リンゴ酸塩)、コパンリシブ塩酸塩、COPDAC、COPP、COPP - ABV、Cosmegen (ダクチノマイシン)、Cotellix (コビメチニブ)、クリゾチニブ、CVP、シクロホスファミド、Cyfos (イホスファミド)、Cyranza (ラムシルマブ)、シタラビン、シタラビンリポソーム剤、Cytosar - U (シタラビン)、Cytosan (シクロホスファミド)、ダラフェニブ、ダカルバジン、Dacogen (デシタビン)、ダクチノマイシン、ダラツムマブ、Darzalex (ダラツムマブ)、ダサチニブ、ダウノルピシン塩酸塩、ダウノルピシン塩酸塩およびシタラビンリポソーム剤、デシタビン、デフィブロチドナトリウム、Defitelio (デフィブロチドナトリウム)、デガレリクス、デニロイキンディフチトクス、デノスマブ、DepoCyt (シタラビンリポソーム剤)、デキサメタゾン、デクスラゾキサラン塩酸塩、ジヌツキシマブ、ドセタキセル、Doxil (ドキシソルピシン塩酸塩リポソーム剤)、ドキシソルピシン塩酸塩、ドキシソルピシン塩酸塩リポソーム剤、Dox - SL (ドキシソルピシン塩酸塩リポソーム剤)、DTIC - Dome (ダカルバジン)、デュルバルマブ、Efudex (外用フルオロウラシル)、Elitek (ラスブリカーゼ)、Ellence (エピルピシン塩酸塩)、エロツズマブ、Eloxatin (オキサリプラチン)、エルトロンボバグオラミン、Emend (アプレピタント)、Empliciti (エロツズマブ)、エナシデニブメシル酸塩、エンザルタミド、エピルピシン塩酸塩、EPOCH、Erbix (セツキシマブ)、エリ布林メシル酸塩、Erivedge (ビスモデジブ)、エルロチニブ塩酸塩、Erwinaze (Erwinia chrysanthemi 由来のアスパラギナーゼ)、Ethiol (アミホスチン)、Etopophos (エトポシドリン酸塩)、エトポシド、エトポシドリン酸塩、Evacet (ドキシソルピシン塩酸塩リポソーム剤)、エベロリムス、Evista (ラロキシフェン塩酸塩)、Evomela (メルファラン塩酸塩)、エキセメスタン、5 - FU (フルオロウラシル注射)、5 - FU (外用フルオロウラシル)、Fareston (トレミフェン)、Farydak (パノビノスタット)、Faslodex (フルベストラント)、FEC、Femara (レトロゾール)、フィルグラスチム、Fludara (フルダラビンリン酸塩)、フルダラビンリン酸塩、Fluoroplex (外用フルオロウラシル)、フルオロウラシル注射剤、外用フルオロウラシル、フルタミド、Folex (メトトレキサート)、Folex PF5 (メトトレキサート)、FOLFIRI、FOLFIRI - ベバシズマブ、FOLFIRI - セツキシマブ、FOLFIRINOX、FOLFOX、Folotyn (プララトレキサート)、FU - LV、フルベストラント、Gardasil (組換えHPV四価ワクチン)、Gardasil9 (組換えHPV九価ワクチン)、Gazyva (オビヌツズマブ)、ゲフィチニブ、ゲムシタビン塩酸塩、ゲムシタビン - シスプラチン、ゲムシタビン - オキサリプラチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、Gemzar (ゲムシタビン塩酸塩)、Gilotrif (アフアチニブジマレイン酸塩)、Gleevec (イマチニブメシル酸塩)、Gliadel (カルムスチンインプラント剤)、Gliadelウエ

10

20

30

40

50

ハー剤（カルムスチンインプラント剤）、グルカルピダーゼ、ゴセレリン酢酸塩、Halaven（エリブリンメシル酸塩）、Hemangeol（プロプラノロール塩酸塩）、Herceptin（トラスツズマブ）、HPV二価ワクチン、組換えHPV九価ワクチン、組換えHPV四価ワクチン、組換えHycamtin（トポテカン塩酸塩）、Hydrea（ヒドロキシウレア）、ヒドロキシウレア、Hyper-CVAD、Ibrance（パルボシクリブ）、イブリツモマブチウキセタン、Ibrutinib、ICE、Iclusig（ボナチニブ塩酸塩）、Idamycin（イダルピシン塩酸塩）、イダルピシン塩酸塩、イデラリシブ、Idhifa（エナシデニブメシル酸塩）、Ifex（イホスファミド）、イホスファミド、Ifosfamidum（イホスファミド）、IL-2（アルデスロイキン）、イマチニブメシル酸塩、Imbruvica（イブルチニブ）、Imfinzi（デュルバルマブ）、イミキモド、Imlygic（タリモジェン・ラヘルパレブベク）、Inlyta（アキシチニブ）、イノツズマブ・オゾガマイシン、インターフェロンアルファ-2b、組換え、インターロイキン2（アルデスロイキン）、Intron A（組換えインターフェロンアルファ-2b）、ヨウ素I-131トシツモマブおよびトシツモマブ、イピリムマブ、Iressa（ゲフィチニブ）、イリノテカン塩酸塩、イリノテカン塩酸塩リポソーム剤、Istodax（ロミデプシン）、イキサベピロン、イキサゾミブクエン酸塩、Ixempra（イキサベピロン）、Jakafi（ルキソリチニブリン酸塩）、JEB、Jevtana（カバジタキセル）、Kadcyla（Ado-トラスツズマブ・エムタンシン）、Keoxifene（ラロキシフェン塩酸塩）、Kepivance（パリフェルミン）、Keytruda（ペムブロリズマブ）、Kisqali（リボシクリブ）、Kymriah（チサゲンレクロイセル）、Kyprolis（カルフィルゾミブ）、ランレオチド酢酸塩、ラバチニブジトシル酸塩、Lartruvo（オララツマブ）、レナリドミド、レンパチニブメシル酸塩、Lenvima（レンパチニブメシル酸塩）、レトロゾール、ロイコポリンカルシウム、Leukeran（クロランブシル）、ロイプロリド酢酸塩、Leustatin（クラドリピン）、Levulan（アミノレブリン酸）、Linfolizin（クロランブシル）、LipoDox（ドキシソルピシン塩酸塩リポソーム剤）、ロムスチン、Lonsurf（トリフルリジンおよびチピラシル塩酸塩）、Lupron（ロイプロリド酢酸塩）、Lupronデポ剤（ロイプロリド酢酸塩）、Lupron小児用デポ剤（ロイプロリド酢酸塩）、Lynparza（オラパリブ）、Marqibo（ピンクリスチン硫酸塩リポソーム剤）、Matulane（プロカルバジン塩酸塩）、メクロレタミン塩酸塩、メゲストロール酢酸塩、Mekinist（トラメチニブ）、メルファラン、メルファラン塩酸塩、メルカプトプリン、メスナ、Mesnex（メスナ）、Methazolastone（テモゾロミド）、メトトレキサート、メトトレキサートLPF（メトトレキサート）、メチルナルトレキソン臭化物、Mexate（メトトレキサート）、Mexate-AQ（メトトレキサート）、ミドスタウリン、マイトマイシンC、ミトキサントロン塩酸塩、Mitozytrex（マイトマイシンC）、MOPP、Mozobil（プレリキサフォル）、Mustargen（メクロレタミン塩酸塩）、Mutamycin（マイトマイシンC）、Myleran（ブスルファン）、Mylasar（アザシチジン）、Mylotarg（ゲムツズマブオゾガマイシン）、ナノ粒子パクリタキセル（パクリタキセルのアルブミン安定化ナノ粒子製剤）、ナベルピン（ピノレルピン酒石酸塩）、ネシツムマブ、ネララビン、Neosar（シクロホスファミド）、ネラチニブマレイン酸塩、Nerlynx（ネラチニブマレイン酸塩）、ネツピタントおよびパロノセトロン塩酸塩、Neulasta（ペグフィルグラスチム）、Neupogen（フィルグラスチム）、Nexavar（ソラフェニブトシル酸塩）、Nilandron（ニルタミド）、ニロチニブ、ニルタミド、Ninlaro（イキサゾミブクエン酸塩）、ニラパリブトシル酸塩一水和物、ニボルマブ、Nolvadex（タモキシフェンクエン酸塩）、Nplate（ロミプロスチム）、オビヌツズマブ、Odomzo（ソニデジブ）、OEP A、オファツムマブ、OFF、オラパリブ、オララツマブ、オマセタキシンメペスクシネート、Oncaspar（ペガスパルガーゼ）、オندانセトロン塩酸塩、Onivyde（イリ

10

20

30

40

50

ノテカン塩酸塩リポソーム剤)、Ontak(デニロイキンディフチトクス)、Opdivo(ニボルマブ)、OPPA、オシメルチニブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パクリタキセルのアルブミン安定化ナノ粒子製剤、PAD、バルボシクリブ、バリフェルミン、パロノセトロン塩酸塩、パロノセトロン塩酸塩およびネツピタント、パミドロネート二ナトリウム、パニツムマブ、パノビノスタット、Paraplat(カルボプラチン)、Paraplatin(カルボプラチン)、パゾパニブ塩酸塩、PCV、PEB、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、Pegインターフェロンアルファ-2b、PEG

- Intron(Pegインターフェロンアルファ-2b)、ペムブロリズマブ、ペメトレキセド二ナトリウム、Perjeta(ペルツズマブ)、ペルツズマブ、Platinol(シスプラチン)、Platinol-AQ(シスプラチン)、プレリキサフォル、ポマリドミド、Pomalyst(ポマリドミド)、ポナチニブ塩酸塩、Portraza(ネシツムマブ)、プララトレキサート、プレドニゾン、プロカルバジン塩酸塩、Proleukin(アルデスロイキン)、Prolia(デノスマブ)、Promacta(エルトロンボパグオラミン)、プロプラノロール塩酸塩、Provence(シプリューセルT)、Purinethol(メルカプトプリン)、Purixan(メルカプトプリン)、[未記載]、ラジウム223二塩化物、ラロキシフェン塩酸塩、ラムシルマブ、ラスブリカーゼ、R-CHOP、R-CVP、組換えヒトパピローマウイルス(HPV)二価ワクチン、組換えヒトパピローマウイルス(HPV)九価ワクチン、組換えヒトパピローマウイルス(HPV)四価ワクチン、組換えインターフェロンアルファ-2b、レゴラフェニブ、Relistor(メチルナルトレキソン臭化物)、R-EPOCH、Revlimid(レナリドミド)、Rheumatrex(メトトレキサート)、リボシクリブ、R-ICE、Rituxan(リツキシマブ)、RituxanHycela(リツキシマブおよびヒトヒアルロニダーゼ)、リツキシマブ、リツキシマブおよびヒトヒアルロニダーゼ、ロラピタント塩酸塩、ロミデプシン、ロミプロスチム、Rubidomycin(ダウノルピシン塩酸塩)、Rubraca(ルカバリブカムシル酸塩)、ルカバリブカムシル酸塩、ルキソリチニブリン酸塩、Rydapt(ミドスタウリン)、スクレロゾール胸膜内エアゾール(タルク)、シルツキシマブ、シプリューセルT、ソマツリンデボ剤(ランレオチド酢酸塩)、ソニデジブ、ソラフェニブトシル酸塩、Sprycel(ダサチニブ)、STANFORD V、滅菌タルク粉末(タルク)、Steritalc(タルク)、Stivarga(レゴラフェニブ)、スニチニブリンゴ酸塩、Sutent(スニチニブリンゴ酸塩)、Sylatron(Pegインターフェロンアルファ-2b)、Sylvant(シルツキシマブ)、Synribo(オマセタキシンメベスクシネート)、Tabloid(チオグアニン)、TAC、Tafinlar(ダラフェニブ)、Tagrisso(オシメルチニブ)、タルク、タリモジェン・ラヘルパレベク、タモキシフェンクエン酸塩、Tarabine PFS(シタラビン)、Tarcava(エルロチニブ塩酸塩)、Targretin(ベキサロテン)、Tasigna(ニロチニブ)、Taxol(パクリタキセル)、Taxotere(ドセタキセル)、Tecentriq(アテゾリズマブ)、Temodar(テモゾロミド)、テモゾロミド、テムシロリムス、サリドマイド、Thalomid(サリドマイド)、チオグアニン、チオテパ、チサゲンレクロイセル、Tolak(外用フルオロウラシル)、トポテカン塩酸塩、トレミフェン、Torisel(テムシロリムス)、トシツモマブおよびヨウ素I-131トシツモマブ、Totect(デクスラゾキサン塩酸塩)、TPF、Trabectedin、トラメチニブ、トラスツズマブ、Treanda(ベンダムスチン塩酸塩)、トリフルリジンおよびチピラシル塩酸塩、Trisenox(三酸化ヒ素)、Tykerb(ラパチニブジトシル酸塩)、Unituxin(ジヌツキシマブ)、ウリジン三酢酸塩、VAC、バルルピシン、Valstar(バルルピシン)、バンデタニブ、VAMP、Varubi(ロラピタント塩酸塩)、Vectibix(パニツムマブ)、VeIP、Velban(ピンブラスチン硫酸塩)、Velcade(ボルテゾミブ)、V

10

20

30

40

50

e l s a r (ビンブラスチン硫酸塩)、ベムラフェニブ、V e n c l e x t a (ベネトクラクス)、ベネトクラクス、V e r z e n i o (アベマシクリブ)、V i a d u r (ロイプロリド酢酸塩)、V i d a z a (アザシチジン)、ビンブラスチン硫酸塩、V i n c a s a r P F S (ビンクリスチン硫酸塩)、ビンクリスチン硫酸塩、ビンクリスチン硫酸塩リポソーム剤、ピノレルピン酒石酸塩、V I P、ビスモデジブ、V i s t o g a r d (ウリジン三酢酸塩)、V o r a x a z e (グルカルピダーゼ)、ポリノスタット、V o t r i e n t (パゾパニブ塩酸塩)、V y x e o s (ダウノルピシン塩酸塩およびシタラピンリポソーム剤)、W e l l c o v o r i n (ロイコボリンカルシウム)、X a l k o r i (クリゾチニブ)、ゼローダ (カペシタピン)、X E L I R I、X E L O X、X g e v a (デノスマブ)、X o f i g o (ラジウム 2 2 3 二塩化物)、X t a n d i (エンザルタミド)、Y e r v o y (イピリムマブ)、Y e s c a r t a (アキシカブタゲン・シロロイセル)、Y o n d e l i s (トラベクトジン)、Z a l t r a p (Z i v - アフリベルセプト)、Z a r x i o (フィルグラスチム)、Z e j u l a (ニラパリプトシル酸塩一水和物)、Z e l b o r a f (ベムラフェニブ)、Z e v a l i n (イブリツモマブチウキセタン)、Z i n e c a r d (デキスラゾキサン塩酸塩)、Z i v - アフリベルセプト、Z o f r a n (オンダンセトロン塩酸塩)、Z o l a d e x (ゴセレリン酢酸塩)、ゾレドロン酸、Z o l i n z a (ポリノスタット)、Z o m e t a (ゾレドロン酸)、Z y d e l i g (イデラリシブ)、Z y k a d i a (セリチニブ)、および Z y t i g a (アピラテロン酢酸塩) から選択されうる。

10

【 0 6 1 2 】

20

抗原結合性分子、ポリペプチド、C A R、核酸 (または複数の核酸)、発現ベクター (または複数の発現ベクター)、細胞、または組成物の複数回投与がなされうる。1 回もしくは複数回、または各回の投与は、別の治療剤の、同時的または逐次的投与に随伴されうる。

【 0 6 1 3 】

複数回投与は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、もしくは31日間、または1、2、3、4、5、もしくは6カ月間のうちの1つであるように選択されうる、所定の時間間隔により隔てられうる。例を目的として述べると、投与は、7、14、21、または28日 (± 3、2、または1日) ごとになされうる。

30

検出法

本発明はまた、V I S T A、またはV I S T A (例えば、M D S C) を発現する細胞を検出、位置特定、またはイメージングする方法における使用のための、本発明の物品も提供する。本明細書で記載される抗原結合性分子は、V I S T A に対する抗原結合性分子を伴う方法において使用されうる。このような方法は、抗原結合性分子とV I S T A との結合複合体の検出を伴いうる。

【 0 6 1 4 】

特に、V I S T A の検出は、V I S T A を発現する細胞 (例えば、M D S C) が病理学的に関与する疾患 / 状態を診断 / 予後診断し、このような疾患 / 状態を発症する危険性がある対象を同定する方法において有用な場合もあり、かつ / または治療介入に対する、対象の応答を予測する方法において有用な場合もある。

40

【 0 6 1 5 】

このように、V I S T A を含有するか、またはこれを含有することが疑われる試料を、本明細書で記載される抗原結合性分子と接触させるステップと、抗原結合性分子と、V I S T A との複合体の形成を検出するステップとを含む方法が提供される。また、V I S T A を発現する細胞を含有するか、またはこれを含有することが疑われる試料を、本明細書で記載される抗原結合性分子と接触させるステップと、抗原結合性分子と、V I S T A を発現する細胞との複合体の形成を検出するステップとを含む方法も提供される。

【 0 6 1 6 】

50

試料は、任意の組織または体液から採取されうる。試料は、多量の血液；血液フィブリン塊および血液細胞を除去した後で得られる流体部分を含みうる、個体の血液に由来する、多量の血清；組織試料または生検；胸水；脳脊髄液（CSF）；または前記個体から単離された細胞を含みうるか、またはこれらに由来しうる。一部の実施形態では、試料は、疾患／状態の影響を受ける、1つの組織または複数の組織（例えば、疾患の症状が顕在化するか、または疾患／状態の発症機序に関与する、1つの組織または複数の組織）から得られうるか、またはこれらに由来しうる。

【0617】

当技術分野では、サンドイッチアッセイ、例えば、ELISAなどのイムノアッセイを含む、適する方法フォーマットが周知である。方法は、検出可能部分、例えば、本明細書で記載される、蛍光標識、リン光標識、発光標識、免疫検出可能標識、放射性標識、化学、核酸、または酵素標識により、抗原結合性分子、または標的（複数可）、またはこれらの両方を標識付けするステップを伴いうる。当業者には、検出法が周知であり、標識化剤と対応するように選択されうる。

10

【0618】

この種の方法は、疾患または状態、例えば、がんについての、診断的および／または予後診断的評価のための方法のベースをもたらしうる。このような方法は、*in vitro*の患者試料に対して実施される場合もあり、患者試料の加工後に実施される場合もある。試料が回収されたら、患者は、*in vitro*法の実施に立ち会うことを要求されないため、方法は、ヒトまたは動物体内に対しては行われぬ方法である。一部の実施形態では、方法は、*in vivo*において実施される。

20

【0619】

試料中の検出は、疾患／状態（例えば、がん）、疾患／状態に対する素因の診断を目的として使用される場合もあり、疾患／状態、例えば、本明細書で記載される疾患／状態について予後診断する（予知する）ために使用される場合もある。診断または予後診断は、既存の（既に診断された）疾患／状態に関しうる。

【0620】

本発明はまた、対象を、VISTAターゲティング剤による処置のために選択／層別化するための方法も提供する。一部の実施形態では、対象は、例えば、対象から得られた試料中の、VISTA、またはVISTAを発現する細胞の検出／定量に基づき、本発明に従う処置／防止のために、このような処置／防止から、利益を得る対象として選択されるか、または同定される。

30

【0621】

このような方法は、例えば、患者試料中で、VISTAおよび／またはVISTA（例えば、MDS C）を発現する細胞を検出または定量するステップを伴いうる。方法が、対象とする因子を定量するステップを含む場合、方法は、診断的または予後診断的評価の一部として、決定された量を、標準値または参照値に対して比較するステップをさらに含みうる。他の診断／予後診断検査は、診断もしくは予後診断の精度を増強するか、または本明細書で記載される検査を使用することにより得られる結果を確認するように、本明細書で記載される診断検査／予後診断検査と共に使用されうる。

40

【0622】

VISTAレベルの増大が検出される場合、またはVISTAを発現する細胞（例えば、MDS C）の存在（またはこれらの数／比率の増大）が、対象から得られた試料中で検出される場合、対象は、MDS Cが病理学的に関与する疾患／状態を有するか、またはこのような疾患／状態を発症する危険性があると診断されうる。このような方法では、細胞の発現のレベルまたは数／比率「の増大」とは、例えば、健常対象から得られる、同等な試料（例えば、同じ体液、組織、臓器などから得られた、同じ種類の試料）中で検出されるレベル／数／比率など、適切な対照条件について決定されるレベル／数／比率を超えるレベル／数／比率を指す。

【0623】

50

V I S T Aレベルの増大が検出される場合、またはV I S T Aを発現する細胞（例えば、M D S C）の存在（またはこれらの数/比率の増大）が、対象から得られた試料中で検出される場合、対象は、同等な試料（例えば、同じ体液、組織、臓器などから得られた、同じ種類の試料）中の、V I S T Aレベルが低レベルであるか、またはV I S T Aを発現する細胞（例えば、M D S C）の数/比率を低減していると決定された対象と比較して、予後不良であると決定されうる。

【0624】

本発明の抗原結合性分子はまた、免疫療法に対する応答を予測する方法において有用でもある。「免疫療法」とは、一般に、疾患/状態を処置するのに、免疫系を役立てる治療介入を指す。免疫療法は、対象における、エフェクター免疫細胞（例えば、エフェクターT細胞（例えば、抗原特異的T細胞、C A R - T細胞）、NK細胞）の数/比率/活性を増大させる治療介入を含む。エフェクター免疫細胞の数/比率/活性を増大させる免疫療法は、エフェクター免疫細胞の増殖および/または生存を促進し、免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害し、共刺激受容体により媒介されるシグナル伝達を促進し、抗原提示細胞による抗原提示を増強する介入などを含む。エフェクター免疫細胞の数/比率/活性を増大させる免疫療法はまた、例えば、養子細胞移入（A C T）を介して、対象において、所望の特異性または活性を有するエフェクター免疫細胞の頻度を増大させる介入も包含する。A C Tは、典型的に、免疫細胞が単離される血液試料を採取することにより、対象から免疫細胞を得ることを伴う。次いで、細胞は、典型的に、何らかの形で処理または変更され、次いで、同じまたは異なる対象へと投与される。A C Tは、典型的に、ある特定の所望の特徴を伴う免疫細胞集団を、対象へと施すか、またはこの対象において、このような特徴を伴う免疫細胞の頻度を増大させることを目的とする。一部の実施形態では、A C Tは、例えば、標的抗原または目的の細胞型に特異的な、キメラ抗原受容体（C A R）を含む細胞のA C Tである。免疫療法はまた、対象における、免疫抑制細胞の数/比率/活性（例えば、制御性T細胞、M D S C）を減少させる治療介入も含む。免疫抑制細胞の数/比率/活性を減少させる免疫療法は、免疫抑制細胞に対する細胞殺滅を引き起こすか、または強化し、免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害する介入を含む。

【0625】

V I S T Aレベルの増大が検出される場合、またはV I S T Aを発現する細胞（例えば、M D S C）の存在（またはこれらの数/比率の増大）が、対象から得られた試料中で検出される場合、対象は、対象における、エフェクター免疫細胞の数/比率/活性を増大させる免疫療法に対して、同等な試料（例えば、同じ体液、組織、臓器などから得られた、同じ種類の試料）中の、V I S T Aレベルが低レベルであるか、またはV I S T Aを発現する細胞（例えば、M D S C）の数/比率を低減していると決定された対象と比較して応答が不良であることが予測されうる。V I S T Aレベルの増大が検出される場合、またはV I S T Aを発現する細胞（例えば、M D S C）の存在（またはこれらの数/比率の増大）が、対象から得られた試料中で検出される場合、対象は、対象における、免疫抑制細胞の数/比率/活性を低減することを目的とする免疫療法に対して、同等な試料（例えば、同じ体液、組織、臓器などから得られた、同じ種類の試料）中の、V I S T Aレベルが低レベルであるか、またはV I S T Aを発現する細胞（例えば、M D S C）の数/比率を低減していると決定された対象と比較して応答が改善されることが予測されうる。

【0626】

一部の実施形態では、方法は、免疫抑制細胞コンパートメント、およびエフェクター免疫細胞コンパートメントの相対的サイズ/活性を決定するステップを含む。例えば、一部の実施形態では、方法は、V I S T A発現細胞（例えば、M D S C、T A M、好中球）の、エフェクター免疫細胞に対する比を決定するための方法において、本明細書に記載される抗原結合性分子を利用する。比を増大させている対象は、免疫抑制細胞の数/比率/活性を低減することを目的とする免疫療法に対する応答を、比が低値であることが決定された対象と比較して改善されることが予測される場合もあり、かつ/または、エフェクター免

10

20

30

40

50

疫細胞の数 / 比率 / 活性を増大させる免疫療法に対する応答が、これと比較して不良であることが予測される場合もある。

【0627】

本発明の診断および予後診断法は、疾患および / または処置の経過を通して、複数の時点において、対象から得られた試料に対して実施される場合があり、時間経過にわたり、例えば、対象へと投与された処置に応答する、疾患 / 状態の発症をモニタリングするのに使用されうる。方法に従う特徴付けの結果は、いつ、どのような種類の治療を、対象へと投与するのかについての臨床的決定に情報を与えるのに使用されうる。

【0628】

診断法および予後診断法は、*in vitro*の患者から得られた試料に対して実施される場合もあり、患者から得られた試料の加工後に実施される場合もある。試料が回収されたら、患者は、*in vitro*法の実施に立ち会うことを要求されないため、方法は、ヒトまたは動物体内に対しては行われない方法である。

10

対象

本明細書に記載される、本発明の態様に従う対象は、任意の動物またはヒトでありうる。対象は、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトである。対象は、非ヒト哺乳動物でもありうるが、より好ましくは、ヒトである。対象は、雄の場合もあり、雌の場合もある。対象は、患者でありうる。対象は、処置を要求する疾患または状態（例えば、がん）を伴うと診断されている場合もあり、このような疾患 / 状態を有することが疑われる場合もあり、このような疾患 / 状態を発症する / このような疾患 / 状態に罹患する危険性がある場合もある。

20

【0629】

本発明に従う実施形態では、対象は、好ましくは、ヒト対象である。一部の実施形態では、本明細書における、本発明の治療または予防法に従い処置される対象は、がんを有するか、またはがんを発症させる危険性がある対象である。本発明に従う実施形態では、対象は、このような疾患 / 状態の、ある特定のマーカーについての特徴付けに基づく方法に従う処置のために選択されうる。

キット

本発明の一部の態様では、本明細書に記載される部材キットが提供される。一部の実施形態では、キットは、所定数量の、本明細書に記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、細胞、または組成物を有する、少なくとも1つの容器を有しうる。

30

【0630】

一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載される、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、細胞、または組成物を作製するための素材を含みうる。

【0631】

キットは、抗原結合性分子、ポリペプチド、CAR、核酸（または複数の核酸）、発現ベクター（または複数の発現ベクター）、細胞、または組成物を、指定された疾患 / 状態を処置するための、患者への投与のための指示書と併せて提供しうる。

40

【0632】

一部の実施形態では、キットは、所定数量の、別の治療剤（例えば、抗感染症剤または化学療法剤）を有する、少なくとも1つの容器をさらに含みうる。このような実施形態では、キットはまた、2つの医薬または医薬組成物が、特異的な疾患または状態のための組合せ処置をもたらすよう、同時に、または個別に投与されうるように、第2の医薬または医薬組成物も含みうる。治療剤はまた、腫瘍または血液への注射または注入に適するようにも製剤化されうる。

配列同一性

本明細書で使用される、「配列同一性」とは、配列の間で、最大の配列同一性パーセントを達成するように、配列をアライメントし、必要な場合は、ギャップを導入した後で、

50

参照配列内のヌクレオチド/アミノ酸残基と同一な、対象配列内のヌクレオチド/アミノ酸残基のパーセントを指す。2つ以上のアミノ酸配列または核酸配列の間の配列同一性パーセントを決定することを目的とする、対での、複数の配列アライメントは、例えば、ClustalOmega (Soding, J. 2005, Bioinformatics, 21, 951~960)、T-coffee (Notredameら, 2000, J. Mol. Biol. (2000), 302, 205~217)、Kalign (LassmannおよびSonnhammer, 2005, BMC Bioinformatics, 6(298))、およびMAFFT (KatoohおよびStandley, 2013, Molecular Biology and Evolution, 30(4), 772~780)ソフトウェアなど、市販のコンピュータソフトウェアを使用して、当業者に公知の、多様な形で達成されうる。このようなソフトウェアを使用する場合、例えば、ギャップペナルティおよび伸長ペナルティについての、デフォルトのパラメータを使用することが好ましい。

10

配列

【0633】

20

30

40

50

【表 2 - 1】

配列番号	説明	配列
1	ヒトVISTA(Q9H7M9-1、v3)	MGVPTALEAGSWRWGSLFLFALFLAASLGPVAAFVATPYSLVYCPEGQNVLTTCRLLGPVDKGDHVDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHGNGFSITMRNLTLDDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTKDAPSNCVWYSSSQDSENITAAALATGACIVGILCLPLILLVYKQROAASNRRRAQELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHPLSYVAQRQPSSEGRHLLSEPSTPLSPGPGDVFFPSLDPVPDPSNFEM
2	成熟ヒトVISTA(Q9H7M9-1、v3 33~311位)	FKVATPYSLVYCPEGQNVLTTCRLLGPVDKGDHVDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHGNGFSITMRNLTLDDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTKDAPSNCVWYSSSQDSENITAAALATGACIVGILCLPLILLVYKQROAASNRRRAQELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHPLSYVAQRQPSSEGRHLLSEPSTPLSPGPGDVFFPSLDPVPDPSNFEM
3	ヒトVISTA細胞外ドメイン(Q9H7M9-1、v3 33~194位)	FKVATPYSLVYCPEGQNVLTTCRLLGPVDKGDHVDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHGNGFSITMRNLTLDDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTKDAPSNCVWYSSSQDSENITAA
4	ヒトVISTA膜貫通ドメイン(Q9H7M9-1、v3 195~215位)	ALATGACIVGILCLPLILLV
5	ヒトVISTA細胞外ドメイン(Q9H7M9-1、v3 216~311位)	YKQROAASNRRRAQELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHPLSYVAQRQPSSEGRHLLSEPSTPLSPGPGDVFFPSLDPVPDPSNFEM
6	ヒトVISTA Ig様V型ドメイン(Q9H7M9-1、v3 33~168位)	FKVATPYSLVYCPEGQNVLTTCRLLGPVDKGDHVDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHGNGFSITMRNLTLDDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQV
7	ヒトVSIG-3アイソフォーム1(Q5DX21-1、v3)	MTSQRSPPLAPLLLLSLHGAASLEVSSESPGSIQVARGQPAVLPCFTTSAALINLNVMMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDFGAPRFHGRVGFGTGTMPTATNVSIFINNTQLSDTGTGYQCLVNNLPDGGRNIGVTGLTVLVPPSA PHCQIQGSQDQIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIGLAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSDNNLTSSNAYNSRYWSNPKVHRNTEVSVSHFSDLGQSFHSGNANIPSIYANGTHLVPQGHKTLVVTANRGSSPQVMSRNSGVS SRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV
8	ヒトVSIG-3アイソフォーム2(Q5DX21-2)	MSLVELLWVWNCFSRTGVAASLEVSSESPGSIQVARGQPAVLPCFTTSAALINLNVMMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDFGAPRFHGRVGFGTGTMPTATNVSIFINNTQLSDTGTGYQCLVNNLPDGGRNIGVTGLTVLVPPSA PHCQIQGSQDQIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIGLAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSDNNLTSSNAYNSRYWSNPKVHRNTEVSVSHFSDLGQSFHSGNANIPSIYANGTHLVPQGHKTLVVTANRGSSPQVMSRNSGVS SRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV
9	ヒトVSIG-3アイソフォーム3(Q5DX21-2)	MSLVELLWVWNCFSRTGVAASLEVSSESPGSIQVARGQPAVLPCFTTSAALINLNVMMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDFGAPRFHGRVGFGTGTMPTATNVSIFINNTQLSDTGTGYQCLVNNLPDGGRNIGVTGLTVLVPPSA PHCQIQGSQDQIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPATQDQVQGTVTIRNISALSSAQRNIGLAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSDNNLTSSNAYNSRYWSNPKVHRNTEVSVSHFSDLGQSFHSGNANIPSIYANGTHLVPQGHKTLVVTANRGSSPQVMSRNSGVS SRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV
10	成熟ヒトVSIG-3アイソフォーム1(Q5DX21-1、v3 23~431位)	LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCFTTSAALINLNVMMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDFGAPRFHGRVGFGTGTMPTATNVSIFINNTQLSDTGTGYQCLVNNLPDGGRNIGVTGLTVLVPPSA PHCQIQGSQDQIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIGLAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSDNNLTSSNAYNSRYWSNPKVHRNTEVSVSHFSDLGQSFHSGNANIPSIYANGTHLVPQGHKTLVVTANRGSSPQVMSRNSGVS SRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV
11	成熟ヒトVSIG-3アイソフォーム2(Q5DX21-2、23~431位)	LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCFTTSAALINLNVMMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDFGAPRFHGRVGFGTGTMPTATNVSIFINNTQLSDTGTGYQCLVNNLPDGGRNIGVTGLTVLVPPSA PHCQIQGSQDQIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIGLAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSDNNLTSSNAYNSRYWSNPKVHRNTEVSVSHFSDLGQSFHSGNANIPSIYANGTHLVPQGHKTLVVTANRGSSPQVMSRNSGVS SRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV
12	成熟ヒトVSIG-3アイソフォーム2(Q5DX21-2、23~407位)	LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCFTTSAALINLNVMMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDFGAPRFHGRVGFGTGTMPTATNVSIFINNTQLSDTGTGYQCLVNNLPDGGRNIGVTGLTVLVPPSA PHCQIQGSQDQIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPATQDQVQGTVTIRNISALSSAQRNIGLAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSDNNLTSSNAYNSRYWSNPKVHRNTEVSVSHFSDLGQSFHSGNANIPSIYANGTHLVPQGHKTLVVTANRGSSPQVMSRNSGVS SRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV
13	ヒトVSIG-3アイソフォーム1および2細胞外ドメイン	LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCFTTSAALINLNVMMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDFGAPRFHGRVGFGTGTMPTATNVSIFINNTQLSDTGTGYQCLVNNLPDGGRNIGVTGLTVLVPPSA PHCQIQGSQDQIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIG

10

20

30

40

【 0 6 3 4 】

50

【表 2 - 2】

14	ヒトVSIg-3アイソフォーム3細胞外ドメイン	LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNMVMMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDGAPRFHGRVGF TGTMPATNVISFINNTQLSDTGTYYQCLVNNLPDGGGRNIGVTGLTVLVPPSAPHQCQGSQDIGSDVILLCSSEE GIPRPTYLWEKLDNNTLKLPTATQDQVQGTVTIRNISALSSAQPRNIG
15	ヒトVSIg-3膜貫通ドメイン	LIAGAIGTGAVIIFCIALIL
16	ヒトVSIg-3細胞質ドメイン	GAFFYWRSKNKEEEEEIIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSDNNTLTSSNAYNSRYVSNPNKVRHRTES VSHFSDLGQSFHSGNANIPSIYANGTHLVPQGHKTLVVTANRGSSPQVMSRNSGVSRSRPRPHTHSYTI SHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV
17	ヒトVSIg-3 Ig様V型ドメイン	LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNMVMMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDGAPRFHGRVGF TGTMPATNVISFINNTQLSDTGTYYQCLVNNLPDGGGRNIGVT
18	ヒトVSIg-3 Ig様C2型ドメイン	PSAPHQCQGSQDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNNTLKLPTATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVA SNAIGTSTCLLDLQVMS
19	ヒトVSIg-8(PODPA2-1、v1)	MRVGGAFHLLLVCLSPALLSAVRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEYGPNGLDIEWMQVNSDPAH HRENVFLSYQDKRINHGSPLHLQQRVRFVAASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRVKKTMTATRKVIVTQ ARPAVPMCWTEGHMTYGNDVWLKCYASGGSQPLSYKWAKISGHHPYRAGSYTSQHSYHSELSYQESFH SSINQGLNNGDLVLDKISRADDGLYQCTVANNVGYVSVVWVKSVDSSRRIGVIGVLSLLALGCLAVGWGL VCCCCGGSGAGGARGAFGYGNGGGVGGGACGDLASEIREDAVAPGCKASGRGSRVTHLLGYPTQNVSR SLRRKYAPPPCGGPELAPCTAAACEAGPSPVYVVKVSAEPADCAEGPVQCKNGLLV
20	成熟ヒトVSIg-8(PODPA2-1、v1 22~414位)	VRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEYGPNGLDIEWMQVNSDPAHHRENVFLSYQDKRINHGSPLH LQQRVRFVAASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRVKKTMTATRKVIVTQARPAVPMCWTEGHMTYGND VWLKCYASGGSQPLSYKWAKISGHHPYRAGSYTSQHSYHSELSYQESFHSSINQGLNNGDLVLDKISRADD GLYQCTVANNVGYVSVVWVKSVDSSRRIGVIGVLSLLALGCLAVGWGLVCCCCGGSGAGGARGAFGYG NGGGVGGGACGDLASEIREDAVAPGCKASGRGSRVTHLLGYPTQNVSRSLRRKYAPPPCGGPELAPCT TAAACEAGPSPVYVVKVSAEPADCAEGPVQCKNGLLV
21	ヒトVSIg-8細胞外ドメイン(PODPA2-1、v1 22~263位)	VRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEYGPNGLDIEWMQVNSDPAHHRENVFLSYQDKRINHGSPLH LQQRVRFVAASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRVKKTMTATRKVIVTQARPAVPMCWTEGHMTYGND VWLKCYASGGSQPLSYKWAKISGHHPYRAGSYTSQHSYHSELSYQESFHSSINQGLNNGDLVLDKISRADD GLYQCTVANNVGYVSVVWVKSVDSSRRIG
22	ヒトVSIg-8膜貫通ドメイン(PODPA2-1、v1 264~284位)	VIGVLSLLALGCLAVGW
23	ヒトVSIg-8細胞質ドメイン(PODPA2-1、v1 285~414位)	GLVCCCCGGSGAGGARGAFGYGNGGGVGGGACGDLASEIREDAVAPGCKASGRGSRVTHLLGYPTQNV SRSLRRKYAPPPCGGPELAPCTAAACEAGPSPVYVVKVSAEPADCAEGPVQCKNGLLV
24	ヒトVSIg-8 Ig様V型ドメイン1(PODPA2-1、v1 22~141位)	VRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEYGPNGLDIEWMQVNSDPAHHRENVFLSYQDKRINHGSPLH LQQRVRFVAASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRVKKTMTATRKVIVT
25	ヒトVSIg-8 Ig様V型ドメイン2(PODPA2-1、v1 164~257位)	PAVPMCWTEGHMTYGNDVWLKCYASGGSQPLSYKWAKISGHHPYRAGSYTSQHSYHSELSYQESFHSSI NQGLNNGDLVLDKISRADDGLYQCTVANNVGYVSVVWVKS
26	抗VISTA抗体クローンである、4M2-C12、4M2-B4、4M2-C9、4M2-D9、4M2-D5、4M2-A8、V4H1、V4H2、V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30 およびV4-C31により認識されるエピトープ	SRGEVQTCERRPI
27	抗VISTA抗体クローンである、2M1-B12 および2M1-D2により認識されるエピトープ	FQDLHLHHGGHQAA

10

20

30

【 0 6 3 5 】

40

50

【表 2 - 3】

28	抗VISTA 抗体クローンである、1M2-D2、13D5p、13D5-1 および 13D5-13 により認識されるエピトープ	CLWEIRHHSEHR
29	抗VISTA 抗体クローンである5M1-A11により認識されるエピトープ	DKGHDVTFYKT
30	抗VISTA 抗体クローンである9M2-C12により認識されるエピトープ	RHHSEHRVHG
31	ヒトVISTA(Q9H7M9-1、v3)の61~162位	DKGHDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLEASDHHGNFS ITMRNLTLDSGLYCCLWEIRHHSEHRVHG
32	4M2-C12の重鎖可変領域	EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYISITSDYAWNMRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLRSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWFYDWWGAGTTVTVSS
33	4M2-C12、4M2-B4、V4H2、4M2-D9、V4-C1、V4-C9の重鎖CD R1	GYISITSDYA
34	4M2-C12、4M2-B4、V4H1、V4H2の重鎖 CDR2	ITYSGNI
35	4M2-C12、4M2-B4、V4H1、V4H2の重鎖 CDR3	ARSLYYPWFYDV
36	4M2-C12の重鎖FR1	EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVT
37	4M2-C12、4M2-B4の重鎖FR2	WNMRQFPGNKLEWMGY
38	4M2-C12、4M2-B4の重鎖FR3	SYNPSLRSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSC
39	4M2-C12、4M2-B4、V4H1、V4H2、13D5p、13D5-1、13D5-13の重鎖FR4	WGAGTTVTVSS
40	4M2-C12の軽鎖可変領域	DIVTQTPAILSTSPGEKVTMTCRASSVGYIHWWYQKPGSSPKPMYATSNLASGVPARFSGSGSGTNSLTI TRVEAEDAATYQCQWSSYPPIITFGGKTLEVK
41	4M2-C12、4M2-B4、V4H1、V4H2、V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、V4-C31の軽鎖 CDR1	SSVGY
42	4M2-C12、4M2-B4、V4-C1、V4-C9、V4-C28の軽鎖 CDR2	ATS
43	4M2-C12、4M2-B4、V4H1、V4H2、V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、V4-C31の軽鎖 CDR3	QQWSSYPPIIT
44	4M2-C12の軽鎖FR1	DIVTQTPAILSTSPGEKVTMTCRAS
45	4M2-C12、4M2-B4の軽鎖FR2	IHWYQKPGSSPKPMY

【 0 6 3 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

46	4M2-C12、4M2-B4の 軽鎖FR3	NLASGVPARFSGSGSNTSLTITRVEAEDAATYYC
47	4M2-C12、4M2-B4、 V4H1、V4H2、V4- C1、V4-C9、V4- C24、V4-C26、V4- C27、V4-C28、V4- C30、V4-C31の軽鎖 FR4	FGGGTKLEVK
48	4M2-B4の重鎖可変領 域	EVMLVESGPGVLVQPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNMIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLRSRISITRD TSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDWWGAGTTVTVSS
49	4M2-B4の重鎖FR1	EVMLVESGPGVLVQPSQSLTCTVT
50	4M2-B4の軽鎖可変領 域	DIVLTQTTAILSTSPGEKVTMTCRASSSVGIHWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSNTSLT ITRVEAEDAATYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
51	4M2-B4の軽鎖FR1	DIVLTQTTAILSTSPGEKVTMTCR
52	V4H1の重鎖可変領域	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAAASGYTITSDYAMSWRQAPGKLEWWSVITYSGNISYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLYYPWYFDWWGAGTTVTVSS
53	V4H1の重鎖CDR1	GYTITSDYA
54	V4H1の重鎖FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLAAAS
55	V4H1の重鎖FR2	MSWWRQAPGKLEWWSV
56	V4H1の重鎖FR3	SYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
57	V4H1の軽鎖可変領域	EMTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYLAWYQQKPGQAPRPLYDTSNRATGIPARFSGSGSNTSLT SSLEPEDFAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
58	V4H1の軽鎖CDR2	DTS
59	V4H1、V4-C1の軽鎖 FR1	EMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS
60	V4H1の軽鎖FR2	LAWYQQKPGQAPRPLY
61	V4H1の軽鎖FR3	NRATGIPARFSGSGSNTSLTSSLEPEDFAVYYC
62	V4H2の重鎖可変領域	QVQLQESGPGVLVQPSDLSLCTVSGYSITSDYAWSWIRQPPGKLEWIGYITYSGNISYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYDCARSLYYPWYFDWWGAGTTVTVSS
63	V4H2、V4-C1、V4- C9、V4-C24、V4- C26、V4-C27、V4- C28、V4-C30、V4- C31の重鎖FR1	QVQLQESGPGVLVQPSDLSLCTVSS
64	V4H2の重鎖FR2	WSWIRQPPGKLEWIGY
65	V4H2の重鎖FR3	SYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYDC
66	V4H2の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSVGYLNMWYQQKPGKAPKPLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSNTSLT TISSLQPEDFATYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
67	V4H2、4M2-D9の軽 鎖CDR2	AAS
68	V4H2の軽鎖FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR
69	V4H2の軽鎖FR2	LNWYQQKPGKAPKPLIY
70	V4H2の軽鎖FR3	SLQSGVPSRFSGSGSNTSLTSSLEPEDFATYYC
71	2M1-B12の重鎖可変 領域	EVQLQQSGAELVRPGTSVKTSCKASGYFTNYWLGWVKERAGHGLEWGEIFPGGGHTNYKEKFKGKATLT ADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFCAQIPLYGHYRSAYWGQGLTVSA
72	2M1-B12、2M1-D2、 13D5p、13D5-1、 13D5-13の重鎖CDR1	GYFTNYW
73	2M1-B12、2M1-D2の 重鎖CDR2	IFPGGGHT
74	2M1-B12、2M1-D2の 重鎖CDR3	AQIPLYGHYRSAY
75	2M1-B12の重鎖FR1	EVQLQQSGAELVRPGTSVKTSCKAS
76	2M1-B12、2M1-D2の 重鎖FR2	LGWVKERAGHGLEWIGE
77	2M1-B12、2M1-D2の 重鎖FR3	NYKEKFKGKATLTADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFC

【 0 6 3 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

78	2M1-B12、2M1-D2、 1M2-D2の重鎖FR4	WGQGLTVTSA
79	2M1-B12の軽鎖可変 領域	DIQMMQSPASLSASVGETVAITCGASENIYGALNWYQRKQKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGSGSGRQY SLKISSLHPDDVATYYCQNVLSTPYTFGGGKLEIK
80	2M1-B12、2M1-D2の 軽鎖CDR1	ENIYGA
81	2M1-B12、2M1-D2の 軽鎖CDR2	GAT
82	2M1-B12、2M1-D2の 軽鎖CDR3	QNVLSTPYT
83	2M1-B12の軽鎖FR1	DIQMMQSPASLSASVGETVAITCGAS
84	2M1-B12、2M1-D2の 軽鎖FR2	LNWYQRKQKSPQLLIY
85	2M1-B12、2M1-D2の 軽鎖FR3	NLADGMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYC
86	2M1-B12、4M2-C9、 2M1-D2、4M2-D9、 1M2-D2、5M1-A11、 4M2-D5、4M2-A8、 9M2-C12、13D5p、 13D5-1、13d5-13の軽 鎖FR4	FGGGKLEIK
87	4M2-C9の重鎖可変領 域	QVTLKECGPGLQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTIS KDSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARRLDGYNDPYYFDYWGGGTLTVSS
88	4M2-C9、5M1-A11の 重鎖CDR1	GFSLSTSGMG
89	4M2-C9、5M1-A11の 重鎖CDR2	IYWDDDK
90	4M2-C9、5M1-A11の 重鎖CDR3	ARRLDGYNDPYYFDY
91	4M2-C9の重鎖FR1	QVTLKECGPGLQPSQTLSTCSFS
92	4M2-C9、5M1-A11の 重鎖FR2	VSWIRQPSGKGLEWLAH
93	4M2-C9、5M1-A11の 重鎖FR3	RYNPSLKSRLTISKDSSNQVFLKITSVDTADTATYYC
94	4M2-C9の重鎖FR4	WGQGTTLTVSS
95	4M2-C9の軽鎖可変領 域	DIVMTQSPSSLSASLGDTVITTCASQNVNWWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHAGVPSRFSGSGSGTGFTL TISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGGGKLEIK
96	4M2-C9の軽鎖CDR1	QNVNWW
97	4M2-C9の軽鎖CDR2	KAS
98	4M2-C9の軽鎖CDR3	QQGQSYPLT
99	4M2-C9の軽鎖FR1	DIVMTQSPSSLSASLGDTVITTCAS
100	4M2-C9の軽鎖FR2	LSWYQQKPGNIPKLLIY
101	4M2-C9の軽鎖FR3	NLHAGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIATYYC
102	2M1-D2の重鎖可変領 域	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFITNYWLGWVKERAGHGLEWIGEIFPGGGHTNYKEKFKGKATLT ADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFCAQIPLYGHYRSAYWGQGLTVTSA
103	2M1-D2、13D5p、 13D5-1、13D5-13の 重鎖FR1	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKAS
104	2M1-D2の軽鎖可変領 域	DIVMTQSPASLSASVGETVAITCGASENIYGALNWYQRKQKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGSGSGRQYS LKISSLHPDDVATYYCQNVLSTPYTFGGGKLEIK
105	2M1-D2の軽鎖FR1	DIVMTQSPASLSASVGETVAITCGAS
106	4M2-D9の重鎖可変領 域	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNMRQFPGNRLEWWMGFISYSGFTTYSPLSRSITRD TSKNQFFLQLISVTTEDTATYYCARNHYGGSYWFYDWWGAGTSVTVSS
107	4M2-D9の重鎖CDR2	ISYSGFT
108	4M2-D9の重鎖CDR3	ARNHYGGSYWFYDV
109	4M2-D9の重鎖FR1	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT

【 0 6 3 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

110	4M2-D9の重鎖FR2	WNMIRQFPGNRLEVMGF
111	4M2-D9の重鎖FR3	TYSPLSERSITRDTSKNQFFLQLISVTTEDTATYYC
112	4M2-D9の重鎖FR4	WGAGTSVTVSS
113	4M2-D9の軽鎖可変領域	DIVMTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESVEYGTSLMQWYLQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFRGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSRKVPWTFGGGKLEIK
114	4M2-D9の軽鎖CDR1	ESVEYGTSL
115	4M2-D9の軽鎖CDR3	QQRKVPWT
116	4M2-D9の軽鎖FR1	DIVMTQSPGSLAVSLGQRATISCRAS
117	4M2-D9の軽鎖FR2	MQWYLQKPGQPPKLLIY
118	4M2-D9の軽鎖FR3	NVESGVPDRFRGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC
119	1M2-D2の重鎖可変領域	EVKVEESGGGLVQPGGSMKLSAASGFTFSDAWMDWVHQSPKEGLEWVAEIRSKANNHATYYVESVEGRFTISRDDSKSSVFLQVNSLRPEDTGIYYCTR RDGYFFAYWGQGLTVSA
120	1M2-D2の重鎖CDR1	GFTFSDAW
121	1M2-D2の重鎖CDR2	IRSKANNHAT
122	1M2-D2の重鎖CDR3	TRRDGYFFAY
123	1M2-D2の重鎖FR1	EVKVEESGGGLVQPGGSMKLSAAS
124	1M2-D2の重鎖FR2	MDWVHQSPKEGLEWVAE
125	1M2-D2の重鎖FR3	YYVESVEGRFTISRDDSKSSVFLQVNSLRPEDTGIYYC
126	1M2-D2の軽鎖可変領域	DIVLTQSPAIMSASLGEEITLCSASSVRDMHWYQQKSGTSPKVLINFTNLASGVPDRFRGSGSGTFYSLTSSVEAGDAAAYYCHQWSSYPTFGGGKLEIK
127	1M2-D2の軽鎖CDR1	SSSVRD
128	1M2-D2の軽鎖CDR2	NTF
129	1M2-D2の軽鎖CDR3	HQWSSYPT
130	1M2-D2の軽鎖FR1	DIVLTQSPAIMSASLGEEITLCSA
131	1M2-D2の軽鎖FR2	MHWYQQKSGTSPKVLIIY
132	1M2-D2の軽鎖FR3	NLASGVPDRFRGSGSGTFYSLTISSVEAGDAAAYYC
133	5M1-A11の重鎖可変領域	QVTLKVSQPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDKRYNPSLKSRLTISKSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARRLDGYNDPYYFDYWGGQGLTVSS
134	5M1-A11の重鎖FR1	QVTLKVSQPGILQPSQTLSTLCSFS
135	5M1-A11、4M2-D5、4M2-A8の重鎖FR4	WGQGLTLTVSS
136	5M1-A11の軽鎖可変領域	DVVMTQTPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTNLASGVPDRFRGSGSGTYSYSLTISSMEAEADAATYYCQQWNSNPYTFGGGKLEIK
137	5M1-A11の軽鎖CDR1	SSVSY
138	5M1-A11の軽鎖CDR2	LTS
139	5M1-A11の軽鎖CDR3	QQWNSNPYT
140	5M1-A11の軽鎖FR1	DVVMTQTPALMSASPGEKVTMTCSAS
141	5M1-A11の軽鎖FR2	MYWYQQKPRSSPKPWIY
142	5M1-A11の軽鎖FR3	NLASGVPDRFRGSGSGTYSYSLTISSMEAEADAATYYC
143	4M2-D5の重鎖可変領域	QVQLQQSGAELARPGASVRMSCKASGYTFTSYTMMWVKQRPQGQGLEWIGFINPDSYTYDQKFKDKATLTADSSSSSTAYMQLSSLTYDSSAVYYCTRHSYGNYG DYWGQGLTVSS
144	4M2-D5の重鎖CDR1	GYTFTSYT
145	4M2-D5の重鎖CDR2	INPDSYTY
146	4M2-D5の重鎖CDR3	TRHSYGNYG DY
147	4M2-D5の重鎖FR1	QVQLQQSGAELARPGASVRMSCKAS
148	4M2-D5の重鎖FR2	MNWKQRPQGQGLEWIGF
149	4M2-D5の重鎖FR3	TYDQKFKDKATLTADSSSSSTAYMQLSSLTYDSSAVYYC
150	4M2-D5の軽鎖可変領域	DIVLTQSPKFLVLSAGDRVITTCASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYASSRYTGVPDRFTGSGFGTDFTFINTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGKLEIK
151	4M2-D5の軽鎖CDR1	QSVTND
152	4M2-D5、4M2-A8の軽鎖CDR2	YAS
153	4M2-D5、4M2-A8の軽鎖CDR3	QQDYSSPYT

【0639】

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

154	4M2-D5の軽鎖FR1	DIVLTQSPKFLLLVSAGDRVITTCAS	
155	4M2-D5、4M2-A8の軽鎖FR2	VAWYQQKPGQSPKLLIY	
156	4M2-D5の軽鎖FR3	SRYTGVPRDFTGSGFGDTFTTINTVQAEDLAVYFC	
157	4M2-A8の重鎖可変領域	QVQLQQSGADLARPGASVKMSCKASGYTFIDYVHWVKRPGQGLEWIGFINPSNDYTSYNQKFKDKASLTADTSSSTAYMQLSSLTSDSAVYYCARHSYGNYGDYWGQGTTLTVSS	
158	4M2-A8の重鎖CDR1	GYTFIDYT	
159	4M2-A8の重鎖CDR2	INPSNDYT	
160	4M2-A8の重鎖CDR3	ARHSYGNYGDY	
161	4M2-A8の重鎖FR1	QVQLQQSGADLARPGASVKMSCKAS	
162	4M2-A8の重鎖FR2	VHWVKRPGQGLEWIGF	
163	4M2-A8の重鎖FR3	SYNQKFKDKASLTADTSSSTAYMQLSSLTSDSAVYYC	
164	4M2-A8の軽鎖可変領域	DIVMTQAPKFLLLVSAGDRVITTCASQSVTNGVAWYQQKPGQSPKLLIYASNRYTGVPRDFTGSGFGDTFTTSTVQAEDLAVYFCQDYSSPYTFGGGKLEIK	
165	4M2-A8の軽鎖CDR1	QSVTNG	
166	4M2-A8の軽鎖FR1	DIVMTQAPKFLLLVSAGDRVITTCAS	
167	4M2-A8の軽鎖FR3	NRYTGVPRDFTGSGFGDTFTTSTVQAEDLAVYFC	
168	9M2-C12の重鎖可変領域	QVQLQQSGAELVKPGASVRLSCKASGYTFYSYMMHWVRQRPGLGLEWIGEIDPSDSYTNQNRFKGKATLTVDKSSSTAYTQLSSLTSEDSAVYYCARWAYGPLYAMDYWGQGTSTVTVSS	
169	9M2-C12の重鎖CDR1	GYTFTSYW	
170	9M2-C12の重鎖CDR2	IDPSDSYT	
171	9M2-C12の重鎖CDR3	ARWAYGPLYAMDY	
172	9M2-C12の重鎖FR1	QVQLQQSGAELVKPGASVRLSCKAS	
173	9M2-C12の重鎖FR2	MHWVRQRPGLGLEWIGE	
174	9M2-C12の重鎖FR3	NCNQRFKGKATLTVDKSSSTAYTQLSSLTSEDSAVYYC	
175	9M2-C12の重鎖FR4	WGQGTSTVTVSS	
176	9M2-C12の軽鎖可変領域	DIVMTQTPLSLPLVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYKQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSTHVPWTFGGGKLEIK	
177	9M2-C12の軽鎖CDR1	QSLVHSNGNTY	
178	9M2-C12、13D5p、13D5-1、13D5-13の軽鎖CDR2	KVS	
179	9M2-C12の軽鎖CDR3	SQSTHVPWT	
180	9M2-C12の軽鎖FR1	DIVMTQTPLSLPLVSLGDQASISCRSS	
181	9M2-C12の軽鎖FR2	LHWYKQKPGQSPKLLIY	
182	9M2-C12の軽鎖FR3	NRFSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	
183	13D5pの重鎖可変領域	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFITNYWLGWVKRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGYGGSSWYFDVWGAGTTVTVSS	
184	13D5p、13D5-1、13D5-13の重鎖CDR2	IYPGGGYT	
185	13D5pの重鎖CDR3	ARGGGYGGSSWYFDV	
186	13D5p、13D5-1、13D5-13の重鎖FR2	LGWVKRPGHGLEWIGD	
187	13D5p、13D5-1の重鎖FR3	NYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	
188	13D5pの軽鎖可変領域	DVLMTQTPLSLPLVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYKQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCFQGSHPPTFGGGKLEIK	
189	13D5pの軽鎖CDR1	QSLVHSNGNTY	
190	13D5p、13D5-1、13D5-13の軽鎖CDR3	FQGSHPPT	
191	13D5p、13D5-1、13D5-13の軽鎖FR1	DVLMTQTPLSLPLVSLGDQASISCRSS	

10

20

30

40

【 0 6 4 0 】

50

【表 2 - 8】

192	13D5p、13D5-13の軽鎖FR2	LEWYLQKPGQSPKLLIY
193	13D5p、13D5-1の軽鎖FR3	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC
194	13D5-1の重鎖可変領域	QVQLQQSGAELVRPQGSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYGGGGYTNYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCVRSRGYGGYSSWYFDWWGAGTTVTSS
195	13D5-1の重鎖CDR3	VRSGYGGYSSWYFDV
196	13D5-1の軽鎖可変領域	DVLMQTPLSLPVSIGDQASISCRSSQSIHSSGNTYLEWYLQKPDQSPKLLIYKVSINRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIK
197	13D5-1の軽鎖CDR1	QSIHSSGNTY
198	13D5-1の軽鎖FR2	LEWYLQKPDQSPKLLIY
199	13D5-13の重鎖可変領域	QVQLQQSGAELVRPQGSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYGGGGYTNYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSADYFCVRSRGYGGYSSWYFDWWGAGTTVTSS
200	13D5-13の重鎖CDR3	VRGGYGGYSSWYFDV
201	13D5-13の重鎖FR3	NYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSADYFC
202	13D5-13の軽鎖可変領域	DVLMQTPLSLPVSIGDQASISCRSSQSTVHSIGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSINRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIK
203	13D5-13の軽鎖CDR1	QSTVHSIGNTY
204	13D5-13の軽鎖FR3	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC
205	ヒトIgG1 定常領域 (IGHG1; UniProt:P01857-1、v1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDRLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
206	CH1 IgG1(P01857-1、v1の1~98位)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCP
207	ヒンジIgG1(P01857-1、v1の99~110位)	EPKSCDKHTHTCP
208	CH2 IgG1(P01857-1、v1の111~223位)	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDRLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK
209	CH3 IgG1(P01857-1、v1の224~330位)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
210	CH3(D356E、L358M; EU番号付けに従い番号付けされた位置)	GQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
211	Cκ CL (IGCK; UniProt P01834-1、v2)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
212	4M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3	EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNMIRQFPGNKLEWVMGYITYSGNISYNPSLRSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYPWYFDWWGAGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDRLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
213	4M2-C12 VL-Cκ	DIVMTQTTPAILSTSPGKEKVTMTCRASSVGYIHWWYQQKPGSSPKPMYATSNLASGVPARFSGSGSGTNSLTI TRVEAEDAATYYCQQWSSYPPIFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
214	4M2-B4 VH-CH1-CH2-CH3	EVMLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNMIRQFPGNKLEWVMGYITYSGNISYNPSLRSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYPWYFDWWGAGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDRLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
215	4M2-B4 VL-Cκ	DIVLTQTTAILSTSPGKEKVTMTCRASSVGYIHWWYQQKPGSSPKPMYATSNLASGVPARFSGSGSGTNSLTI TRVEAEDAATYYCQQWSSYPPIFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

【 0 6 4 1】

40

50

【表 2 - 9】

216	V4H1 VH-CH1-CH2-CH3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITTSYDYAMSWVRQAPGKGLEWWSVITYSGNISYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARSLYPWFYFDWVGAGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKLSLSPGK
217	V4H1 VL-Ck	EIVTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYLAWYQQKPGQAPRPLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDNTLT SSLEPEDFAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
218	V4H2 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCTVSGYSITSDYAWSWIRQPPGKGLEWWSVITYSGNISYNPSLKSRTVTSVDT SKNQFSLKSSVTAADTAVYDCARSLYPWFYFDWVGAGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHPEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKLSLSPGK
219	V4H2 VL-Ck	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASSVGYLNMWYQQKPKAPKPLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDNTL TISSLQPEDFATYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
220	2M1-B12 VH-CH1-CH2-CH3	EVQLQQSGAELVRPQTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKERAGHGLEWIGEIFFGGGHTNYKEKFKGKATLT ADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFCAQIPLYYGHYRSAYWQGTLLVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHPEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSPGK
221	2M1-B12 VL-Ck	DIQMMQSPASLSASVGETVAITCGASENIYGALNMWYQRKQKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGSGSGRQY SLKISSLHPDDVATYYCQNVLSTPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
222	4M2-C9 VH-CH1-CH2-CH3	QVTLKECGPILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYVDDDKRYNPSLKSRLTIS KDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARRLDGYNPYYFDYWGQGTLLVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHPEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSPGK
223	4M2-C9 VL-Ck	DIVMTQSPSSLSASLGDVTITTCASQNVNWSLWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHAGVPSRFSGSGSGTGFTL TISSLQPEDATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
224	2M1-D2 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQQSGAELVRPQTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKERAGHGLEWIGEIFFGGGHTNYKEKFKGKATLT ADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFCAQIPLYYGHYRSAYWQGTLLVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHPEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSPGK
225	2M1-D2 VL-Ck	DIVMTQSPASLSASVGETVAITCGASENIYGALNMWYQRKQKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGSGSGRQYS LKISSLHPDDVATYYCQNVLSTPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
226	4M2-D9 VH-CH1-CH2-CH3	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVGTYSITSDYAWNWRQFPGNRLEWMMGFISYSGFTTYSPLSRESITRD TSKNQFFLQLISVTTEDTATYYCARNHYGGSYWFYFDWVGAGTSVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHPEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDVLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKLSLSPGK
227	4M2-D9 VL-Ck	DIVMTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSMLMQWYLQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFRGSGS GTFDSLNIHPVEEDDIAMYFCQQRKVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

10

20

30

【 0 6 4 2 】

40

50

【表 2 - 1 0】

228	1M2-D2 VH-CH1-CH2-CH3	EVKVEESGGGLVQPGGSMKLSAASGFTFSADAWMDVWHQSPKGLEWVAEIRSKANNHATYVYESVEGR FTISRDDSKSSVFLQVNSLRPEDTGIYYCTRRDGYFAYWGGGLTVTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSPGK
229	1M2-D2 VL-Ck	DIVLTQSPAIMSASLGEIITLCSASSSVRDMHWYQQKSGTSPKVLINFTNLASGVPSRFSGSGSGTFFYSLTI SSVEAGDAAYYCHQWSSYPFFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
230	5M1-A11 VH-CH1-CH2-CH3	QVTLKVSQPGILQPSQTLSTCSFSGFLSSTSGMGSVWRQPSGKLEWLAHIYVDDDKRYNPSLKSRLTIS KDSSNQVFLKITSVDTADTATYTCARRLDGYNDPYYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSPGK
231	5M1-A11 VL-Ck	DVVMQTQPALMSASPGKEVMTTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPMYLTNLASGVPARFSGSGSGTSTY SLTISSMEAEADAATYTCQVNSNPNYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
232	4M2-D5 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQQSGAELARPGASVLRMSCKASGYTFTSYTMNHWKQRPQGLWIGFINPDSYTYDQKFKDKATL TADSSSTAYMQLSSLTSDSAVYYCTRHSYGNVGYDWGQGTTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRV ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSPGK
233	4M2-D5 VL-Ck	DIVLTQSPKFLVLSAGDRVITTCASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYASSRYTGVPDRFTGSGFGTDFTF TINTVQAEGLAVYFCQQDYSSPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
234	4M2-A8 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQQSGADLARPGASVLRMSCKASGYTFTSYVHWKQRPQGLWIGFINPDSYTYDQKFKDKATL ADTSSSTAYMQLSSLTSDSAVYYCARHSYGNVGYDWGQGTTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKLSLSPGK
235	4M2-A8 VL-Ck	DIVMTQAPKFLVLSAGDRVITTCASQSVTNGVAWYQQKPGQSPKLLIYASNRYTGVPDRFTGSGFGTDFTF TISTVQAEGLAVYFCQQDYSSPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
236	9M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQQSGAELVKGASVRLSCKASGYTFTSYMHWKQRPGLWIGIDPDSYTNQNRFKGKATL TVDKSSSTAYTQLSSLTSEDSAVYYCARWAYGPIYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKLSLSPGK
237	9M2-C12 VL-Ck	DIVMTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYVLPKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSQSHVPTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
238	13D5p VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQQSGAELVRPQTSVTKSCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGLWIGDIYGGGYYTNYNEKFKGKATL ADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGYYGSSWYFDWVWAGTIVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSG GGAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVAVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
239	13D5p VL-Ck	DIVLMTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYVLPKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSQSHVPTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC

10

20

30

【 0 6 4 3】

40

50

【表 2 - 1 1】

240	13D5-1 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGKATLT ADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCVRSYGYGGSSWYFDWVGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSVNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGQTQYICNVNHHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	
241	13D5-1 VL-Ck	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVHSSGNTYLEWYLQKPDQSPKLLIYKVSNRFSVGPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	
242	13D5-13 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGKATLT ADISSSTAYMQLSSLTSEDSADYFCVRRGGYGYGGSSWYFDWVGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSVNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGQTQYICNVNHHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	10
243	13D5-13 VL-Ck	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVHSGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSVGPDRFSGSES GTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	
244	4M2-C12A4H1A4H2 の重鎖 CDR1 コンセン サス	GYX ₁ ITSDYA [配列中、X ₁ =S または T]	
245	4M2-C12A4H1A4H2 の軽鎖 CDR2 コンセン サス	X ₂ X ₃ S [配列中、X ₂ =A または D; X ₃ =T または A]	
246	13D5p 由来の重鎖 CDR3 コンセンサス	X ₄ RX ₅ GYYYGSSWYFDV [配列中、X ₄ =V または A; X ₅ =G または S]	20
247	13D5p 由来の軽鎖 CDR1 コンセンサス	QX ₆ VHSX ₇ GNTY wherein X ₆ = I or T; X ₇ = N, S or I	
248	4M2-C12 mlgG2a HC	EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNMIRQFPGNKLEW/MGYITYSGNISYNPSLRSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDWVGAGTTVTVSSAKTTPAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLG CLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVSSWVPSQITCNVAHPASSTKVDKDKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVWHEGLH NHHTTKSFSRTPGK	
249	4M2-C12 mlgG2a LALA PG HC	EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNMIRQFPGNKLEW/MGYITYSGNISYNPSLRSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDWVGAGTTVTVSSAKTTPAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLG CLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVSSWVPSQITCNVAHPASSTKVDKDKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVWHEGLH NHHTTKSFSRTPGK	30
250	4M2-C12 LC	DIVTQTTPAILSTSPGKVTMTCRASSVGYIHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTNSLTI TRVEAEDAATYCCQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVCFLLNNFYPKIDINVK WKIDGSEKQNGVLSNWDQDSKSTYSMSSTLTITKDEYERHNSYTCETHKTSTSPVWKFNRNEC	
251	mlgG2a CH1	AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVS STWVPSQITCNVAHPASSTKVDKDKI	
252	mlgG2a ヒンジ	EPRGPTIKPCPPCKCP	
253	mlgG2a CH2	APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK	
254	mlgG2a CH2 LALA PG	APNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMLSLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK	
255	mlgG2a CH3	GSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSGYFMYSKLR VEKKNWVERNSYSCSVWHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	

【 0 6 4 4】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

256	マウス Ig ガンマ 2A 鎖 C 領域、A 型対立遺伝子	AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTS STWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVW DVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERT SKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSGYFMY SKLRVEKKNWVERNSYSQSVWHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
257	mIgG2a CH2、CH3 LALA PG	APNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVW/DVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPE DIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSQSVWHEGLHNHHTTKSFSRTPG K
258	4M2-C12 mIgG2a NQ HC	EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNMIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPLSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYPWYFDWVGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLG CLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVW/DVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQ THREDYQSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSQSVWHEGLH NHHTTKSFSRTPGK
259	mIgG2a CH2 NQ	APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVW/DVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYQSTLRVVS ALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK
260	mIgG2a CH2、CH3 NQ	APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVW/DVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYQSTLRVVS ALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPED IYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSQSVWHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
261	マウス IGHG1	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS STWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVW/DISKDD PEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSSELPIMHQDNLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGR PKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMIDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMINTNGSYFVYSKLNQK SNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK
262	mIgG1 CH1	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS STWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKIV
263	mIgG1 ヒンジ	VPRDCGCKPCICT
264	mIgG1 CH2	VPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVW/DISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSSELPI IMHQDNLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK
265	mIgG1 CH3	GRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMIDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMINTNGSYFVYSKLNQ KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK
266	4M2-C12 mIgG1 HC	EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNMIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPLSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYPWYFDWVGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPGSAQAQNSMVTG CLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKIV PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVW/DISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREE QFNSTFRSSELPIMHQDNLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTC MIDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMINTNGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTK KSLSHSPGK
267	IGN175A HC	QVQLVQSGAELMKGASVSKSCATGYTFTSTHWIEMWVKRPGHGLEWGEILPGSGSTSYNEKFKGKATFT ADTSSNTAYMQLSLSLSEDSAVYYCARWLLYYAMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKV DKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPETVTCVW/DVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
268	IGN175A LC	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKLSNRFGSVPRDFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHFPYTFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP REAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
269	VSTB112 HC	QVQLVQSGAEVVKPGSSVK/SCKASGGTFSSYAISWWRQAPGQGLEWMGCIPIFGTANYAQKFGGRVITTA DESTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARSSYGWVSYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVD KKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTPETVTCVW/DVSHEDPEVKFNWYVDGVE HNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
270	VSTB112 LC	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSIDTRLNMYQQKPKGKAPKLLIYASSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSAYNPITFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
271	VSTB112 メジャー-エピトープ1	PVDKGDVTF

10

20

30

40

【 0 6 4 5】

50

【表 2 - 1 3】

272	VSTB112 メジャーエ ピトープ2	RRPIRNLTFQDL
273	VSTB112 マイナーエ ピトープ1	TWYRSSRGEVQTCS
274	VSTB112 マイナーエ ピトープ2	EIRHHHSEHRVHGAMEL
275	IGN175A エピトープ	FKVATPYSLYVCPGQNVTLTCRLLGFVDKGH
276	V4-C1 の重鎖可変領域	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWNVMIRQTPGKGLEWIGYITYSGYISYNPSLRSRVTISRDT TSKNQFSLKLSVTAADTAVYSCARALYYPWYFDWWTGTTTVSS
277	V4-C1 の重鎖 CDR2	ITYSGYI
278	V4-C1、V4-C9、V4- C24、V4-C26、V4- C27、V4-C28、V4- C30、V4-C31 の重鎖 CDR3	ARALYYPWYFDV
279	V4-C1、V4-C9 の重鎖 FR2	WNMIRQTPGKGLEWIGY
280	V4-C1、V4-C9 の重鎖 FR3	SYNPSLRSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYSC
281	V4-C1、V4-C9、V4- C24、V4-C26、V4- C27、V4-C28、V4- C30、V4-C31 の重鎖 FR4	WGTGTTTVSS
282	V4-C1 の軽鎖可変領域	EIVTQSPATLSLSPGERATLSRASSVGYIHVYQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSGTDNLTIT SSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
283	V4-C1、V4-C9、V4- C24、V4-C27、V4- C28、V4-C30、V4- C31 の軽鎖 FR2	IHWYQKPGQAPRPLIY
284	V4-C1、V4-C9、V4- C26、V4-C27 の軽鎖 FR3	NRATGIPARFSGSGSGTDNLTITSSLEPEDSAVYYC
285	V4-C9 の重鎖可変領域	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWNVMIRQTPGKGLEWIGYITYSGYVSYNPSLRSRVTISRDT TSKNQFSLKLSVTAADTAVYSCARALYYPWYFDWWTGTTTVSS
286	V4-C9 の重鎖 CDR2	ITYSGYV
287	V4-C9 の軽鎖可変領域	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSRASSVGYIHVYQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSGTDNLTIT SSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
288	V4-C9、V4-C24、V4- C26、V4-C27、V4- C28、V4-C30、V4- C31 の軽鎖 FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSRASS
289	V4-C24、V4-C26、 V4-C27、V4-C28、 V4-C30、V4-C31 の重 鎖可変領域	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWNVMIRQTPGKGLEWIGHITYSGSVSYNPSLRSRVTISRDT TSKNQFSLKLSVTAADTAVYSCARALYYPWYFDWWTGTTTVSS
290	V4-C24、V4-C26、 V4-C27、V4-C28、 V4-C30、V4-C31 の重 鎖 CDR1	GYSITSDYT
291	V4-C24、V4-C26、 V4-C27、V4-C28、 V4-C30、V4-C31 の重 鎖 CDR2	ITYSGSV
292	V4-C24、V4-C26、 V4-C27、V4-C28、 V4-C30、V4-C31 の重 鎖 FR2	WNMIRQTPGKGLEWIGH

10

20

30

40

【 0 6 4 6 】

50

【表 2 - 1 4】

293	V4-C24、V4-C26、 V4-C27、V4-C28、 V4-C30、V4-C31 の重鎖 FR3	SYNPSLRSRVTSRDTSKNQFSLKLSVTAADTATYSC
294	V4-C24 の軽鎖可変領域	EVLTTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYIHVYQQKPGQAPRPLIYTTSYRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
295	V4-C24、V4-C26 の軽鎖 CDR2	TTS
296	V4-C24、V4-C28、 V4-C30 の軽鎖 FR3	YRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYC
297	V4-C26 の軽鎖可変領域	EVLTTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYIHVYQQKPGQAPRPIIYTTSNRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
298	V4-C26 の軽鎖 FR2	IHWYQQKPGQAPRPIIY
299	V4-C27 の軽鎖可変領域	EVLTTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYIHVYQQKPGQAPRPLIYATYNRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
300	V4-C27、V4-C30、 V4-C31 の軽鎖 CDR2	ATY
301	V4-C28 の軽鎖可変領域	EVLTTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYIHVYQQKPGQAPRPLIYATSYRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
302	V4-C30 の軽鎖可変領域	EVLTTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYIHVYQQKPGQAPRPLIYATYRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
303	V4-C31 の軽鎖可変領域	EVLTTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYIHVYQQKPGQAPRPLIYATYRRTTGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK
304	V4-C31 の軽鎖 FR3	YRTTGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYC
305	4M2-C12 由来の重鎖 CDR1 コンセンサス	GYX ₉ ITSDYX ₉ [配列中、X ₉ =S または T;X ₉ =T または A]
306	4M2-C12 由来の重鎖 CDR2 コンセンサス	ITYSGX ₁₀ X ₁₁ [配列中、X ₁₀ =S、N または Y;X ₁₁ =V または I]
307	4M2-C12 由来の重鎖 CDR3 コンセンサス	ARX ₁₂ LYYPWYFDV [配列中、X ₁₂ =A または S]
308	4M2-C12 由来の軽鎖 CDR2 コンセンサス	X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ [配列中、X ₁₃ =A、T、または D;X ₁₄ =T または A;X ₁₅ =S または Y]
309	C24/C26/C27 の軽鎖 CDR2 コンセンサス	X ₁₆ TX ₁₇ [配列中、X ₁₆ =T または A;X ₁₇ =S または Y]
310	C24/C26/C27 の軽鎖可変領域コンセンサス	EVLTTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYIHVYQQKPGQAPRXP ₁₇ YX ₁₈ TX ₁₉ X ₂₀ YNRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVK [配列中、X ₁₇ =L または I;X ₁₈ =T または A;X ₁₉ =S または Y;X ₂₀ =N または Y]
311	V4-C1 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWNMRQTPGKGLEWIGYITYSGYISYNPSLRSRVTSRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYSCARALYYPWFYFDWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALTHNHYTQKSLSPGK
312	V4-C1 VL-Ck	EIMTTQSPATLSLSPGERATLSCRASSVGYIHVYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSELEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWIKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
313	V4-C9 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWNMRQTPGKGLEWIGYITYSGYISYNPSLRSRVTSRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYSCARALYYPWFYFDWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALTHNHYTQKSLSPGK

10

20

30

40

【 0 6 4 7】

50

【表 2 - 1 5】

314	V4-C9 VL-Ck	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWHYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSDNTLTI SSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
315	V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3	QVQLQESGPGLVKPSDITLCTVSGYSITSDYTWMMIRQTPGKLEWIGHITYSGSVSNPILRSRVITSRD TSKNQFSLKLSVTAADATYSCARALYYPWFYFDWVGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWSNGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWVTPSSSLGTQTYICNMNHPKSNKVDKVV EPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVAVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSINKALPAIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNYTQKLSLSLSPGK
316	V4-C24 VL-Ck	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWHYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSDNTLTI SSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
317	V4-C26 VL-Ck	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWHYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSDNTLTI SSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
318	V4-C27 VL-Ck	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWHYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSDNTLTI SSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
319	V4-C28 VL-Ck	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWHYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSDNTLTI SSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
320	V4-C30 VL-Ck	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWHYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSDNTLTI SSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
321	V4-C31 VL-Ck	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWHYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGSDNTLTI SSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPIITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
322	4M2-C12および派生体が結合するVISTA配列	SRGEVQ
323	ヒトPSGL-1アイソフォーム1(UniProt:Q14242-1, v1)	MPLQLLLLLLLLPGPNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEYLDYDFLPETEPPEMLRNSTDTPLT GPGTPESTTVEPAARRSTGLDAGGAVTELTELANMGNLSTDSAAMEIQTTPAATEAQTTPVPTAQTTP LAATEAQTTRLTATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPA AMEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPA VTHKGPMAASNLVSNYPVGPADHISVKQCLLAILLALVATIFFVCTVAVLAVRLSRKGMYPVRNYSPTMVC ISLLPDGGEGPSATANGGLSKAKSPGLTPEPREDEGDDLLTHSFLP
324	ヒトPSGL-1アイソフォーム2(UniProt:Q14242-2)	MAVGASGLEGDKMAGAMPLQLLLLLLLLPGPNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEYLDYDFLP ETEPPEMLRNSTDTPLTGPSTPESTTVEPAARRSTGLDAGGAVTELTELANMGNLSTDSAAMEIQTTPA ATEAQTTPVPTAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPA AQTTPAAMEAQTTPAAMEAQTTPAAMEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPA SMEPTTKRGLFIPFSVSSVTHKGPMAASNLVSNYPVGPADHISVKQCLLAILLALVATIFFVCTVAVLAVRLSRK GHMYPVRNYSPTMVCISLLPDGGEGPSATANGGLSKAKSPGLTPEPREDEGDDLLTHSFLP
325	成熟ヒトPSGL-1アイソフォーム1(Q14242-1, v1 18~412位)	LQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEYLDYDFLPETEPPEMLRNSTDTPLTGPSTPESTTVEPAAR RSTGLDAGGAVTELTELANMGNLSTDSAAMEIQTTPAATEAQTTPVPTAQTTPAATEAQTTRLTATEA QTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPA TTAPEATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPA YVPGAPDHISVKQCLLAILLALVATIFFVCTVAVLAVRLSRKGMYPVRNYSPTMVCISLLPDGGEGPSATAN GGLSKAKSPGLTPEPREDEGDDLLTHSFLP
326	PSGL-1細胞外ドメイン(Q14242-1, v1 18~320位)	LQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEYLDYDFLPETEPPEMLRNSTDTPLTGPSTPESTTVEPAAR RSTGLDAGGAVTELTELANMGNLSTDSAAMEIQTTPAATEAQTTPVPTAQTTPAATEAQTTRLTATEA QTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPA TTAPEATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPA YVPGAPDHISVKQCLLAILLALVATIFFVCTVAVLAVRLSRKGMYPVRNYSPTMVCISLLPDGGEGPSATAN GGLSKAKSPGLTPEPREDEGDDLLTHSFLP
327	PSGL-1膜貫通ドメイン(Q14242-1, v1 321~341位)	LLAILLALVATIFFVCTVAVL
328	PSGL-1細胞質ドメイン(Q14242-1, v1 342~412位)	AVRLSRKGMYPVRNYSPTMVCISLLPDGGEGPSATANGGLSKAKSPGLTPEPREDEGDDLLTHSFLP

10

20

30

【 0 6 4 8】

【表 2 - 1 6】

329	PSGL-1細胞外ドメインリポート領域(Q14242-1, v1 122~261位)	QTTQPAATEAQTTPVPTAQTTPAATEAQTTRLTATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPA APAAMEAQTTPAAMEAQTTPAAMEAQTTPAAMEAQTTPAATEAQTTPAATEAQTTPAAMEA
330	4M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 IgG4	EVKLVESGPGPLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWMMIRQFPGNKLEWIMGYITYSGNISYNPILRSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWFYFDWVGAGTTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESSTAALG CLVKDYFPEPVTVSWSNGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWVTPSSSLGTQTYICNMNHPKSNKVDKRV ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVAVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSINKALPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFLLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSSVMHEAL HNHYTQKLSLSLSPGK

40

50

番号付けされた項目

以下の番号付けされた項目 (p a r a) は、本発明の関連で想定される、特色および特色の組合せについての言明をさらに提示する：

1 . F c 媒介性機能に依存せずに、 V I S T A に結合し、 V I S T A 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能な抗原結合性分子、任意選択で、単離抗原結合性分子。

【 0 6 4 9 】

2 . I g 様 V 型ドメイン内で、 V I S T A に結合することが可能である、項目 1 に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 5 0 】

3 . 配列番号 6 のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるポリペプチドに結合することが可能である、項目 1 または項目 2 に記載の抗原結合性分子。

10

【 0 6 5 1 】

4 . 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含むか、またはこれからなるポリペプチドに結合することが可能である、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 5 2 】

5 . V I S T A への結合について、 I G N 1 7 5 A と競合しない、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 5 3 】

6 . 配列番号 2 7 5 のアミノ酸配列からなるペプチドに結合することが可能ではない、項目 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

20

【 0 6 5 4 】

7 . (i) 以下の C D R :

配列番号 3 0 5 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 3 0 6 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 3 0 7 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 3 0 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

30

【 0 6 5 5 】

8 . (i) 以下の C D R :

配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 3 0 9 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

40

【 0 6 5 6 】

9 . (i) 以下の C D R :

配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

50

(i i) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 2 9 5 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 5 7 】

1 0 . (i) 以下の C D R :

配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 3 0 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 5 8 】

1 1 . (i) 以下の C D R :

配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 2 7 7 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 5 9 】

1 2 . (i) 以下の C D R :

配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 2 8 6 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 4 2 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 4 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 6 0 】

1 3 . (i) 以下の C D R :

配列番号 2 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 2 9 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 7 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

	10
	20
	30
	40
	50

配列番号 42 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2
 配列番号 43 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3
 を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域
 を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。
 【0661】

14. (i) 以下の CDR :

配列番号 290 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 291 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 278 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 41 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 300 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 43 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域

を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【0662】

15. (i) 以下の CDR :

配列番号 33 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 34 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 35 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 41 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 42 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 43 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域

を含む、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【0663】

16. (i) 以下の CDR :

配列番号 33 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 34 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 35 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 41 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 67 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 43 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

を組み込んだ軽鎖可変 (VL) 領域

を含む、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【0664】

17. (i) 以下の CDR :

配列番号 53 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 1

配列番号 34 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 2

配列番号 35 のアミノ酸配列を有する HC - CDR 3

を組み込んだ重鎖可変 (VH) 領域 ; および

(ii) 以下の CDR :

配列番号 41 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 1

配列番号 58 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 2

配列番号 43 のアミノ酸配列を有する LC - CDR 3

10

20

30

40

50

を組み込んだ軽鎖可変（V L）領域
を含む、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 6 5 】

1 8 . (i) 以下の C D R :

配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 7 3 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 7 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変（V H）領域；および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 8 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 8 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 8 2 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変（V L）領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 6 6 】

1 9 . (i) 以下の C D R :

配列番号 8 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 8 9 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変（V H）領域；および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 9 6 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 9 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 9 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変（V L）領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 6 7 】

2 0 . (i) 以下の C D R :

配列番号 8 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 8 9 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 9 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変（V H）領域；および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変（V L）領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 6 8 】

2 1 . (i) 以下の C D R :

配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3、

または H C - C D R 1、H C - C D R 2、もしくは H C - C D R 3 のうちの 1 つもしくは
複数における、1 つもしくは 2 つもしくは 3 つのアミノ酸が、別のアミノ酸で置換された
、これらの変異体を組み込んだ重鎖可変（V H）領域；および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 1 1 4 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 6 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 1 5 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

10

20

30

40

50

を組み込んだ軽鎖可変（V L）領域を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 6 9 】

2 2 . (i) 以下の C D R :

配列番号 1 2 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 2 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 1 2 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変（V H）領域；および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 2 9 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変（V L）領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 7 0 】

2 3 . (i) 以下の C D R :

配列番号 1 4 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 1 4 6 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変（V H）領域；および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 1 5 1 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 5 2 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 5 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変（V L）領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 7 1 】

2 4 . (i) 以下の C D R :

配列番号 1 5 8 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 5 9 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 1 6 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変（V H）領域；および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 1 6 5 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 5 2 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 5 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変（V L）領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【 0 6 7 2 】

2 5 . (i) 以下の C D R :

配列番号 1 6 9 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 7 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 1 7 1 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変（V H）領域；および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 1 7 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 7 9 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変（V L）領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

10

20

30

40

50

【 0 6 7 3 】

26 . (i) 以下の C D R :

配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 8 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 4 6 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 2 4 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 9 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

10

【 0 6 7 4 】

27 . (i) 以下の C D R :

配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 8 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 1 8 5 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 1 8 9 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 9 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項または項目 2 6 に記載の抗原結合性分子。

20

【 0 6 7 5 】

28 . (i) 以下の C D R :

配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 8 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 1 9 5 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 1 9 7 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 9 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項または項目 2 6 に記載の抗原結合性分子。

30

【 0 6 7 6 】

29 . (i) 以下の C D R :

配列番号 7 2 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 1

配列番号 1 8 4 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 2

配列番号 2 0 0 のアミノ酸配列を有する H C - C D R 3

を組み込んだ重鎖可変 (V H) 領域 ; および

(i i) 以下の C D R :

配列番号 2 0 3 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 1

配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 2

配列番号 1 9 0 のアミノ酸配列を有する L C - C D R 3

を組み込んだ軽鎖可変 (V L) 領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項または項目 2 6 に記載の抗原結合性分子。

40

【 0 6 7 7 】

30 . 配列番号 2 8 9 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 7 0 % の配列同一性を有す

50

配列番号 57 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 62 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 66 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 48 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 50 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 87 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 95 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 106 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 113 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 143 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 150 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 157 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 164 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 71 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 79 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 102 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 104 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 119 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 126 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 183 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

10

20

30

40

50

配列番号 188 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 194 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 196 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 199 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 202 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 133 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 136 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域；

または

配列番号 168 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域；および

配列番号 176 のアミノ酸配列に対する、少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域

を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【0678】

31. ヒト V I S T A、ならびにマウス V I S T A およびカニクイザル V I S T A のうちの 1 つまたは複数に結合することが可能である、項目 1 から 30 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【0679】

32. (i) 項目 1 から 31 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、および (ii) V I S T A 以外の抗原に結合することが可能な抗原結合性分子を含む、抗原結合性分子、任意選択で、単離抗原結合性分子。

【0680】

33. V I S T A を発現する細胞の、細胞表面に結合することが可能である、項目 1 から 32 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【0681】

34. V I S T A と、V I S T A の結合パートナーとの相互作用を阻害することが可能である、項目 1 から 33 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【0682】

35. V I S T A 媒介性シグナル伝達を阻害することが可能である、項目 1 から 34 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【0683】

36. エフェクター免疫細胞の増殖、および/またはこれらによるサイトカイン産生を増大させることが可能である、項目 1 から 35 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子。

【0684】

37. 項目 1 から 36 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子を含むキメラ抗原受容体 (C A R)。

【0685】

38. 項目 1 から 36 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、または項目 37 に記載の C A R をコードする、1 つの核酸または複数の核酸、任意選択で、1 つの単離核酸または複数の単離核酸。

10

20

30

40

50

【 0 6 8 6 】

39. 項目38に記載の、1つの核酸または複数の核酸を含む、1つの発現ベクターまたは複数の発現ベクター。

【 0 6 8 7 】

40. 項目1から36のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、項目37に記載のCAR、項目38に記載の、1つの核酸もしくは複数の核酸、または項目39に記載の、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクターを含む細胞。

【 0 6 8 8 】

41. 項目38に記載の、1つの核酸もしくは複数の核酸、または項目39に記載の、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクターを含む細胞を、抗原結合性分子またはCARの、核酸(複数可)または発現ベクター(複数可)からの発現に適する条件下で培養するステップを含む方法。

10

【 0 6 8 9 】

42. 項目1から36のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、項目37に記載のCAR、項目38に記載の、1つの核酸もしくは複数の核酸、項目39に記載の、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、または項目40に記載の細胞を含む組成物。

【 0 6 9 0 】

43. VISTA以外の免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤をさらに含み、任意選択で、VISTA以外の免疫チェックポイント分子が、PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、TIGIT、およびBTLAから選択される、項目42に記載の組成物。

20

【 0 6 9 1 】

44. 医学的処置または予防の方法における使用のための、項目1から36のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、項目37に記載のCAR、項目38に記載の1つの核酸もしくは複数の核酸、項目39に記載の1つの発現ベクターまたは複数の発現ベクター、項目40に記載の細胞、または項目42もしくは項目43に記載の組成物。

【 0 6 9 2 】

45. がんまたは感染性疾患の処置または防止の方法における使用のための、項目1から36のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、項目37に記載のCAR、項目38に記載の1つの核酸もしくは複数の核酸、項目39に記載の1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、項目40に記載の細胞、または項目42もしくは項目43に記載の組成物。

30

【 0 6 9 3 】

46. がんまたは感染症疾患の処置または防止の方法における使用のための医薬の製造における、項目1から36のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、項目37に記載のCAR、項目38に記載の、1つの核酸もしくは複数の核酸、項目39に記載の、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、項目40に記載の細胞、または項目42もしくは項目43に記載の組成物の使用。

【 0 6 9 4 】

47. がんまたは感染性疾患を処置または防止する方法であって、対象へと、治療または予防有効量の、項目1から36のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、項目37に記載のCAR、項目38に記載の、1つの核酸もしくは複数の核酸、項目39に記載の、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、項目40に記載の細胞、または項目42もしくは項目43に記載の組成物を投与するステップを含む方法。

40

【 0 6 9 5 】

48. がんが、結腸直腸がん、膵がん、乳がん、肝がん、前立腺がん、卵巣がん、頭頸部がん、白血病、リンパ腫、黒色腫、胸腺腫、肺がん、非小細胞肺がん(NSCLC)、および充実性腫瘍から選択される、項目45に記載の使用、項目46に記載の使用、または項目47に記載の方法のための、抗原結合性分子、CAR、1つの核酸もしくは複数の核酸、1つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、細胞、または組成物。

50

【 0 6 9 6 】

49. 骨髄由来抑制細胞 (M D S C) が病理学的に關与する疾患を処置または防止する方法における使用のための、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、項目 3 7 に記載の C A R、項目 3 8 に記載の 1 つの核酸もしくは複数の核酸、項目 3 9 に記載の 1 つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、項目 4 0 に記載の細胞、または項目 4 2 もしくは項目 4 3 に記載の組成物。

【 0 6 9 7 】

50. 骨髄由来抑制細胞 (M D S C) が病理学的に關与する疾患を処置または防止する方法における使用のための医薬の製造における、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、項目 3 7 に記載の C A R、項目 3 8 に記載の 1 つの核酸もしくは複数の核酸、項目 3 9 に記載の 1 つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、項目 4 0 に記載の細胞、または項目 4 2 もしくは項目 4 3 に記載の組成物の使用。

10

【 0 6 9 8 】

51. 骨髄由来抑制細胞 (M D S C) が病理学的に關与する疾患を処置または防止する方法であって、対象へと、治療または予防有効量の、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子、項目 3 7 に記載の C A R、項目 3 8 に記載の 1 つの核酸もしくは複数の核酸、項目 3 9 に記載の 1 つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、項目 4 0 に記載の細胞、または項目 4 2 もしくは項目 4 3 に記載の組成物を投与するステップを含む方法。

【 0 6 9 9 】

52. 方法が、V I S T A 以外の免疫チェックポイント分子により媒介されるシグナル伝達を阻害することが可能な薬剤の投与をさらに含み、任意選択で、V I S T A 以外の免疫チェックポイント分子が、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、T I M - 3、T I G I T、または B T L A から選択される、項目 4 5 から 5 1 のいずれか一項に記載の、使用のための抗原結合性分子、C A R、1 つの核酸もしくは複数の核酸、1 つの発現ベクターもしくは複数の発現ベクター、細胞、もしくは組成物、使用または方法。

20

【 0 7 0 0 】

53. V I S T A 媒介性シグナル伝達を阻害する方法であって、V I S T A 発現細胞を、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子と接触させるステップを含む方法。

30

【 0 7 0 1 】

54. 骨髄由来抑制細胞 (M D S C) の活性を阻害するための方法であって、M D S C を、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子と接触させるステップを含む方法。

【 0 7 0 2 】

55. エフェクター免疫細胞の数または活性を増大させるための方法であって、V I S T A 発現細胞の活性を、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子により阻害するステップを含む方法。

【 0 7 0 3 】

56. V I S T A に結合した、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子を含む *in vitro* 複合体、任意選択で、単離 *in vitro* 複合体。

40

【 0 7 0 4 】

57. V I S T A を含有するか、またはこれを含有することが疑われる試料を、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子と接触させるステップと、抗原結合性分子の、V I S T A との複合体の形成を検出するステップとを含む方法。

【 0 7 0 5 】

58. 対象を、V I S T A ターゲティング剤による処置のために選択または層別化する方法であって、*in vitro* において、対象に由来する試料を、項目 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性分子と接触させるステップと、抗原結合性分子の、V I S T A との複合体の形成を検出するステップとを含む方法。

50

【0706】

59. 項目1から36のいずれか一項に記載の抗原結合性分子の、*in vitro*または*in vivo*における診断または予後診断剤としての使用。

【0707】

60. 任意選択で、がんが、結腸直腸がん、膵がん、乳がん、肝がん、前立腺がん、卵巣がん、頭頸部がん、白血病、リンパ腫、黒色腫、胸腺腫、肺がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、および充実性腫瘍から選択される、がんを検出、位置特定、またはイメージングするための方法における、項目1から36のいずれか一項に記載の抗原結合性分子の使用。

【0708】

本発明は、このような組合せが、明らかに許容されないか、または明示的に回避される場合を除き、記載される態様と好ましい特徴との組合せを含む。

【0709】

本明細書で使用される節の小見出しは、構成上の目的だけのものであり、記載される対象物を限定するものと見なすべきではない。

【0710】

ここで、付属の図面を参照しながら、例を目的として、本発明の態様および実施形態が例示される。当業者には、さらなる態様および実施形態が明らかであろう。本文で言及される全ての文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0711】

本明細書および後続の特許請求の範囲を通して、文脈によりそうでないことが要求されない限りにおいて、「～を含む（comprise）」という語、ならびに「～を含む（comprises）」および「～を含むこと」などの変化形は、言明された整数またはステップまたは整数もしくはステップの群の包含を含意し、他の任意の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群の除外は含意しないように理解される。

【0712】

そうでないことが文脈により明確に指示されない限りにおいて、本明細書および付属の特許請求の範囲において使用される単数形の「ある（a）」、「ある（an）」、および「その」は、複数の指示対象を含むことに注意されたい。本明細書では、範囲は、「約」1つ特定の値から、かつ/または「約」別の特定の値までの範囲として表される。このような範囲が表される場合、別の実施形態は、1つ特定の値から、かつ/または他の特定の値までの範囲を含む。同様に、値が、先行詞である「約」の使用により、近似値として表される場合、特定の値は、別の実施形態を形成することが理解されるであろう。

【0713】

本明細書で、核酸配列が開示される場合、その逆相補体もまた、明示的に想定される。

【0714】

本明細書で記載される方法は、好ましくは、*in vitro*において実施されうる。「*in vitro*」と言う用語が、培養物中の細胞に対して実施される手順を包含することが意図されるのに対し、「*in vivo*」と言う用語は、無傷の多細胞生物に対する/上の手順を包含することが意図される。

【0715】

ここで、付属の図を参照しながら、本発明の原理を例示する、実施形態および実験が論じられる。

【図面の簡単な説明】

【0716】

【図1A】フローサイトメトリーにより決定される、抗VISTA抗体による、細胞の染色を示すヒストグラムである。ヒストグラムは、抗VISTA抗体クローンである、VSTB112（陽性対照；WO2015/097536）による、HEK293細胞（VISTAを発現させない）、またはHEK293 VISTA過剰発現細胞（HEK293 VISTA O/E）の染色を示す。

10

20

30

40

50

【図1B】フローサイトメトリーにより決定される、抗VISTA抗体による、細胞の染色を示すヒストグラムである。ヒストグラムは、抗VISTA抗体クローンである、4-M2-D5による、HEK293細胞(VISTAを発現させない)、またはHEK293 VISTA過剰発現細胞(HEK293 VISTA O/E)の染色を示す。

【図1C】フローサイトメトリーにより決定される、抗VISTA抗体による、細胞の染色を示すヒストグラムである。ヒストグラムは、抗VISTA抗体クローンである、9M2-C12による、HEK293細胞(VISTAを発現させない)、またはHEK293 VISTA過剰発現細胞(HEK293 VISTA O/E)の染色を示す。

【図1D】フローサイトメトリーにより決定される、抗VISTA抗体による、細胞の染色を示すヒストグラムである。ヒストグラムは、抗VISTA抗体クローンである、4M2-C12(本明細書ではまた、「V4」とも称される)による、HEK293細胞(VISTAを発現させない)、またはHEK293 VISTA過剰発現細胞(HEK293 VISTA O/E)の染色を示す。

10

【図2】フローサイトメトリーにより決定される、抗VISTA抗体による、細胞の染色を示すヒストグラムである。ヒストグラムは、抗VISTA抗体クローンである、9M2-C12、V4、およびクローンである、VSTB112、またはアイソタイプ対照抗体による、HEK293細胞(VISTAを発現させない)、またはHEK293 VISTA過剰発現細胞(HEK293 VISTA O/E)の染色を示す。非染色の細胞を、陰性対照として解析した。

【図3A】抗VISTA抗体クローンである、V4による、ヒト、カニクイザル、およびマウスVISTAに対する結合アフィニティーについての解析の結果を示すセンサーグラムである。ヒトVISTAへの結合を示す。K_{on}、K_{off}、およびK_Dを示す。

20

【図3B】抗VISTA抗体クローンである、V4による、ヒト、カニクイザル、およびマウスVISTAに対する結合アフィニティーについての解析の結果を示すセンサーグラムである。カニクイザルVISTAへの結合を示す。K_{on}、K_{off}、およびK_Dを示す。

【図3C】抗VISTA抗体クローンである、V4による、ヒト、カニクイザル、およびマウスVISTAに対する結合アフィニティーについての解析の結果を示すセンサーグラムである。マウスVISTAへの結合を示す。K_{on}、K_{off}、およびK_Dを示す。

【図4A】抗VISTA抗体の、異なるタンパク質への結合についての解析の結果を示すグラフである。ELISAにより決定される、抗VISTA抗体クローンである、V4による、ヒト、カニクイザル、およびマウスVISTA、ヒトPD-L1およびヒトHER3への結合を示す。

30

【図4B】抗VISTA抗体の、異なるタンパク質への結合についての解析の結果を示すグラフである。抗VISTA抗体クローンである、V4の、ヒトの、VISTA、PD-1、PD-L1、B7H3、B7H4、B7H6、B7H7、CTLA4、および無関係な抗原への結合を示す。

【図5】VISTAと、VSI G-3との結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図6】抗VISTA抗体クローンである、5M1-A11および9M2-C12による、VISTAと、VSI G-3との結合の阻害についての解析の結果を示すグラフである。

40

【図7A】抗VISTA抗体クローンである、13D5pによる処置の、混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおける、IFN- γ 、IL-2、およびIL-17Aの産生に対する効果についての解析の結果を示すグラフおよび棒グラフである。アッセイの終了時に、細胞培養物上清中で検出された、サイトカインのレベルを示す。

【図7B】抗VISTA抗体クローンである、13D5pによる処置の、混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおける、IFN- γ 、IL-2、およびIL-17Aの産生に対する効果についての解析の結果を示すグラフおよび棒グラフである。表示のサイトカインのレベルの倍数変化(「FC」)を示す。

【図8A】抗PD-L1抗体クローンである、MIH5(ThermoFisher S

50

c i e n t i f i c) による処置の、混合リンパ球反応 (M L R) アッセイにおける、 I F N - γ 、 I L - 2、および I L - 17 A の産生に対する効果についての解析の結果を示すグラフおよび棒グラフである。アッセイの終了時に、細胞培養物上清中で検出された、サイトカインのレベルを示す。

【図 8 B】抗 P D - L 1 抗体クローンである、 M I H 5 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) による処置の、混合リンパ球反応 (M L R) アッセイにおける、 I F N - γ 、 I L - 2、および I L - 17 A の産生に対する効果についての解析の結果を示すグラフおよび棒グラフである。表示のサイトカインのレベルの倍数変化 (「 F C 」) を示す。

【図 9】示差走査蛍光測定解析による、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4 の安定性についての解析の結果を示すグラフである。 10

【図 10】サイズ除外クロマトグラフィーによる、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4 についての解析の結果を示すグラフである。

【図 11】 S D S - P A G E およびウェスタンブロットによる、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4 の発現についての解析の結果を示す画像である。レーン： M 1 = 型番： 3 4 5 2 の、 T a K a R a タンパク質マーカー； M 2 = 型番： M 0 0 5 2 1 の、 G e n S c r i p t タンパク質マーカー； 1 = 還元条件； 2 = 非還元条件； P = 陽性対照：マウス I g G 1、カッパ (S i g m a ; 型番： M 9 2 6 9) である。ウェスタンブロットのために使用される一次抗体は、ヤギ抗マウス I g G (H + L) 抗体 (L I - C O R ; 型番： 9 2 6 ~ 3 2 2 1 0) であった。 20

【図 12】抗体血清についての E L I S A 解析による、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4 の薬物動態解析の結果を示すグラフおよび表である。

【図 13】 i n v i v o の、同系細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルにおける、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4 の抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。

【図 14】表示のチェックポイント分子をターゲティングする、単剤療法または組合せ療法による処置後 15 日目の、同系細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルにおける、腫瘍増殖の阻害を示す棒グラフである。この研究で使用された抗体は、以下の通り：抗 V I S T A = クローン V 4、抗 P D - L 1 = クローン 1 0 F . 9 G 2、抗 T I G I T = クローン 1 G 9、抗 L A G - 3 = クローン C 9 B 7 W、および抗 T I M - 3 = クローン R M T 3 - 2 3 であった。 30

【図 15】抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4 単独、抗 P D - L 1 抗体クローンである、 1 0 F . 9 G 2 単独による処置、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4 および抗 P D - L 1 抗体クローンである、 1 0 F . 9 G 2 による組合せ処置、または P B S による処置 (陰性対照) の後における、バルク腫瘍についての R N A - S e q 解析により決定される、同系細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルの腫瘍バルク内の、細胞 1 0 0 , 0 0 0 個当たりの M D S C の数、および C D 8 + T 細胞 : T r e g の比を示す棒グラフである。

【図 16】 i n v i v o の、同系細胞株に由来する、 L e w i s 肺癌についてのマウスモデルにおける、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4 の抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。 40

【図 17】 i n v i v o の、同系細胞株に由来する、黒色腫についてのマウスモデルにおける、単剤療法としての、または抗 P D - 1 抗体である、 R M P 1 - 1 4 (B i o X C e l l) と組み合わせた、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4 の抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。

【図 18】 9 0 0 μ g の、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4、または陰性対照としての、等容量の溶媒 (P B S) の単回投与を行った後における、白血球の数または異なる種類を示す棒グラフである。

【図 19 A】 9 0 0 μ g の、抗 V I S T A 抗体クローンである、 V 4、または陰性対照としての、等容量の溶媒 (P B S) の単回投与を行った後における、肝機能の相関因子の評 50

価による、肝毒性の解析を示す棒グラフである。アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) およびアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) のレベルを示す。

【図19B】900 μgの、抗VISTA抗体クローンである、V4、または陰性対照としての、等容量の溶媒 (PBS) の単回投与を行った後における、腎機能の相関因子の評価による、腎毒性の解析を示す棒グラフである。血中尿素窒素 (BUN) およびクレアチニン (CREA) のレベルを示す。

【図20】ELISAにより決定される、抗VISTA抗体クローンである、13D5-1による、ヒト、カニクイザル、およびマウスVISTA、ならびにヒトPD-L1への結合についての解析の結果を示すグラフである。

【図21】ELISAにより決定される、抗VISTA抗体クローンである、13D5-13による、ヒトおよびマウスVISTAへの結合についての解析の結果を示すグラフである。

10

【図22】*in vivo*の、細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルにおける、単独の、または抗PD-L1と組み合わせた、抗VISTA抗体クローンである、13D5-1の抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。

【図23】*in vivo*の、細胞株に由来する、乳癌についてのマウスモデルにおける、抗VISTA抗体クローンである、13D5-1の抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。

【図24】フローサイトメトリーにより決定される、抗VISTA抗体による、細胞の染色を示すヒストグラムである。ヒストグラムは、抗VISTA抗体クローンである、4M2-B4、2M1-B12、4M2-C9、2M1-D2、4M2-D9、1M2-D2、5M1-A11、4M2-D5、4M2-A8および9M2-C12による、HEK293細胞 (VISTAを発現しない)、またはHEK293 VISTA過剰発現細胞 (HEK293 VISTA O/E) の染色を示す。

20

【図25A】4M2-C12 mIgG1の、マウスFc RIVへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図25B】4M2-C12 mIgG1の、マウスFc RIIIへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図25C】4M2-C12 mIgG1の、マウスFc RIIbへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

30

【図25D】4M2-C12 mIgG1の、マウスFc Rnへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図26A】4M2-C12 mIgG2aの、マウスFc RIVへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図26B】4M2-C12 mIgG2aの、マウスFc RIIIへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図26C】4M2-C12 mIgG2aの、マウスFc RIIbへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図26D】4M2-C12 mIgG2aの、マウスFc Rnへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

40

【図27A】4M2-C12 mIgG2a LALA PGの、マウスFc RIVへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図27B】4M2-C12 mIgG2a LALA PGの、マウスFc RIIIへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図27C】4M2-C12 mIgG2a LALA PGの、マウスFc RIIbへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図27D】4M2-C12 mIgG2a LALA PGの、マウスFc Rnへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図28A】4M2-C12 mIgG2a NQの、マウスFc RIVへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

50

【図28B】4M2 - C12 mIgG2a NQの、マウスFc RIIIへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図28C】4M2 - C12 mIgG2a NQの、マウスFc RIIIbへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図28D】4M2 - C12 mIgG2a NQの、マウスFcRnへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図29A】4M2 - C12 mIgG1、4M2 - C12 mIgG2a、4M2 - C12 mIgG2a LALA PG、および4M2 - C12 mIgG2aの、マウスFc RIV、マウスFc RIII、マウスFc RIIIb、およびマウスFcRnへの結合についての解析の結果についてについてまとめる表である。計算によるKon値を示す。

10

【図29B】4M2 - C12 mIgG1、4M2 - C12 mIgG2a、4M2 - C12 mIgG2a LALA PG、および4M2 - C12 mIgG2aの、マウスFc RIV、マウスFc RIII、マウスFc RIIIb、およびマウスFcRnへの結合についての解析の結果についてについてまとめる表である。計算によるKdis値を示す。

【図29C】4M2 - C12 mIgG1、4M2 - C12 mIgG2a、4M2 - C12 mIgG2a LALA PG、および4M2 - C12 mIgG2aの、マウスFc RIV、マウスFc RIII、マウスFc RIIIb、およびマウスFcRnへの結合についての解析の結果についてについてまとめる表である。計算によるKD値を示す。

【図30A】細胞株に由来する、T細胞リンパ腫についてのマウスモデルにおける、mIgG2aおよびmIgG2a LALA PGフォーマットの、抗VISTA抗体クローンである、4M2 - C12の、in vivoの抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。異なる処置群についてのデータを示す。

20

【図30B】細胞株に由来する、T細胞リンパ腫についてのマウスモデルにおける、mIgG2aおよびmIgG2a LALA PGフォーマットの、抗VISTA抗体クローンである、4M2 - C12の、in vivoの抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。溶媒対照群および4M2 - C12 mIgG2a処置群における、個別のマウスについて得られたデータを示す。

【図30C】細胞株に由来する、T細胞リンパ腫についてのマウスモデルにおける、mIgG2aおよびmIgG2a LALA PGフォーマットの、抗VISTA抗体クローンである、4M2 - C12の、in vivoの抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。溶媒対照群および4M2 - C12 mIgG2a LALA PG処置群における、個別のマウスについて得られたデータを示す。

30

【図31A】BLIによる、ヒトVISTAへの結合についての、異なる抗VISTA抗体間の競合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図31B】BLIによる、ヒトVISTAへの結合についての、異なる抗VISTA抗体間の競合についての解析の結果を示すセンサーグラムである。

【図32】抗VISTA抗体である、4M2 - C12による、VISTAと、VSI G-3との結合の阻害についての解析の結果を示すグラフである。

【図33A】CFSE希釈アッセイにより決定する場合の、抗VISTA抗体が、VISTA-Igで処置されたT細胞に、T細胞増殖を取り戻させる能力についての解析の結果を示す棒グラフである。1:1の比の、アゴニスト性抗CD3抗体およびVISTA-Igでコーティングされたウェルを使用する条件から得られた結果を示す。CFSE-low CD4+ T細胞の百分率を示す。

40

【図33B】CFSE希釈アッセイにより決定する場合の、抗VISTA抗体が、VISTA-Igで処置されたT細胞に、T細胞増殖を取り戻させる能力についての解析の結果を示す棒グラフである。2:1の比の、アゴニスト性抗CD3抗体およびVISTA-Igでコーティングされたウェルを使用する条件から得られた結果を示す。CFSE-low CD4+ T細胞の百分率を示す。

【図33C】CFSE希釈アッセイにより決定する場合の、抗VISTA抗体が、VISTA-Ig

50

T A - I gで処置されたT細胞に、T細胞増殖を取り戻させる能力についての解析の結果を示す棒グラフである。1 : 1の比の、アゴニスト性抗CD3抗体およびV I S T A - I gでコーティングされたウェルを使用する条件から得られた結果を示す。C F S E - l o w C D 8 + T細胞の百分率を示す。

【図33D】C F S E希釈アッセイにより決定する場合の、抗V I S T A抗体が、V I S T A - I gで処置されたT細胞に、T細胞増殖を取り戻させる能力についての解析の結果を示す棒グラフである。2 : 1の比の、アゴニスト性抗CD3抗体およびV I S T A - I gでコーティングされたウェルを使用する条件から得られた結果を示す。C F S E - l o w C D 8 + T細胞の百分率を示す。

【図34A】抗V I S T A抗体が、L P Sで刺激されたT H P - 1細胞による、I L - 6の産生を促進する能力についての解析の結果を示す棒グラフである。4 M 2 - C 1 2を使用して得られた結果を示す。

10

【図34B】抗V I S T A抗体が、L P Sで刺激されたT H P - 1細胞による、I L - 6の産生を促進する能力についての解析の結果を示す棒グラフである。V S T B 1 1 2を使用して得られた結果を示す。

【図35】投与の2時間前、ならびに投与の0.5時間後、6時間後、24時間後、および96時間後において、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2を投与されたマウスから得られた血液試料中で検出された、I L - 6のレベルを示す棒グラフである。

【図36A】細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルにおける、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 a (V 4)、抗P D - 1抗体 (P D 1)、または4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 aおよび抗P D - 1抗体による組合せ処置の、i n v i v oの抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。異なる処置群についてのデータを示す。

20

【図36B】細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルにおける、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 a (V 4)、抗P D - 1抗体 (P D 1)、または4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 aおよび抗P D - 1抗体による組合せ処置の、i n v i v oの抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。溶媒対照群および4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 a + 抗P D - 1処置群における、個別のマウスについて得られたデータを示す。

【図37】細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルの、P B S (溶媒)、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 a (V 4)、抗P D - 1抗体 (抗P D 1)、または4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 aおよび抗P D - 1抗体による組合せ処置 (C o m b o)で処置されたマウスから得られた、22日目における腫瘍に対する、g - M D S Cである、腫瘍浸潤性C D 4 5 + 細胞の百分率を示す棒グラフである。

30

【図38A】細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルの、P B S (溶媒)、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 a (V 4)、抗P D - 1抗体 (P D 1)、または4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 aおよび抗P D - 1抗体による組合せ処置 (V 4 + P D 1)で処置されたマウスから、18日目に得られた血清中の、I F N のレベルを示す棒グラフである。

【図38B】細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルの、P B S (溶媒)、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 a (V 4)、抗P D - 1抗体 (P D 1)、または4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 aおよび抗P D - 1抗体による組合せ処置 (V 4 + P D 1)で処置されたマウスから、18日目に得られた血清中の、I L - 2 3のレベルを示す棒グラフである。

40

【図38C】細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルの、P B S (溶媒)、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 a (V 4)、抗P D - 1抗体 (P D 1)、または4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 aおよび抗P D - 1抗体による組合せ処置 (V 4 + P D 1)で処置されたマウスから、18日目に得られた血清中の、I L - 1 0のレベルを示す棒グラフである。

【図38D】細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルの、P B S (溶媒)、抗

50

VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a (V4)、抗PD - 1抗体 (PD1)、または4M2 - C12 mIgG2aおよび抗PD - 1抗体による組合せ処置 (V4 + PD1) で処置されたマウスから、18日目に得られた血清中の、IL - 4のレベルを示す棒グラフである。

【図38E】細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルの、PBS (溶媒)、抗VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a (V4)、抗PD - 1抗体 (PD1)、または4M2 - C12 mIgG2aおよび抗PD - 1抗体による組合せ処置 (V4 + PD1) で処置されたマウスから、18日目に得られた血清中の、IL - 5のレベルを示す棒グラフである。

【図39】細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルの、PBS (溶媒)、抗VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a (V4)、抗PD - L1抗体 (PDL1)、または4M2 - C12 mIgG2aおよび抗PD - 1抗体による組合せ処置 (V4 + PDL1) で処置されたマウスから得られた、21日目における腫瘍内の、Arg1 RNAの発現レベルを示す棒グラフである。

【図40A】細胞株に由来する、黒色腫についてのマウスモデルにおける、抗VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a (V4)、抗PD - 1抗体 (PD1)、または4M2 - C12 mIgG2aおよび抗PD - 1抗体による組合せ処置の、*in vivo*の抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。異なる処置群についてのデータを示す。

【図40B】細胞株に由来する、黒色腫についてのマウスモデルにおける、抗VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a (V4)、抗PD - 1抗体 (PD1)、または4M2 - C12 mIgG2aおよび抗PD - 1抗体による組合せ処置の、*in vivo*の抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。溶媒対照群および4M2 - C12 mIgG2a + 抗PD - 1処置群における、個別のマウスについて得られたデータを示す。

【図41】PBS (溶媒)、抗VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a (V4)、抗PD - 1抗体 (抗PD1)、または4M2 - C12 mIgG2aおよび抗PD - 1抗体による組合せ処置 (Combo) で処置されたマウスから得られた、細胞株に由来する、黒色腫についてのマウスモデルの、18日目における腫瘍に対する、g - MDSCである、腫瘍浸潤性CD45 + 細胞の百分率を示す棒グラフである。

【図42】細胞株に由来する、T細胞白血病/リンパ腫についてのマウスモデルにおける、抗VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a (V4)、抗PD - 1抗体 (抗PD1)、または4M2 - C12 mIgG2aおよび抗PD - 1抗体による組合せ処置 (V4 + 抗PD1) の、*in vivo*の抗がん活性についての解析の結果を示すグラフである。

【図43】PBS (溶媒)、抗VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a (V4)、抗PD - 1抗体 (抗PD1)、または4M2 - C12 mIgG2aおよび抗PD - 1抗体による組合せ処置 (Combo) で処置されたマウスから得られた、細胞株に由来する、T細胞白血病/リンパ腫についてのマウスモデルの、16日目における腫瘍に対する、g - MDSCである、腫瘍浸潤性CD45 + 細胞の百分率を示す棒グラフである。

【図44】PBS (溶媒)、抗VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a (V4)、抗PD - L1抗体 (抗PDL1)、または4M2 - C12 mIgG2aおよび抗PD - 1抗体による組合せ処置 (V4 + 抗PDL1) による、細胞株に由来する、結腸癌についてのマウスモデルの処置の経過中における、マウスの体重を示すグラフである。

【図45A】バイオレイヤー干渉法により決定される、異なる抗VISTA抗体の、ヒトVISTAへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムおよび表である。

【図45B】バイオレイヤー干渉法により決定される、異なる抗VISTA抗体の、マウスVISTAへの結合についての解析の結果を示すセンサーグラムおよび表である。

【図45C】バイオレイヤー干渉法により決定される、異なる抗VISTA抗体の、ヒトPD - L1への結合についての解析の結果を示すセンサーグラムおよび表である。

10

20

30

40

50

【図 4 5 D】4 5 A および 4 5 B のセンサーグラムから計算された、反応速度および熱力学定数についてまとめる図である。

【図 4 6 A】バイオレイヤー干渉法により決定される、異なる抗 V I S T A 抗体の、マウス V I S T A への結合についての解析の結果を示すセンサーグラムおよび表である。

【図 4 6 B】4 6 A のセンサーグラムから計算された、反応速度および熱力学定数についてまとめる図である。

【図 4 7 A】バイオレイヤー干渉法により決定される、異なる抗 V I S T A 抗体の、ヒト V I S T A への結合についての解析の結果を示すセンサーグラムおよび表である。

【図 4 7 B】バイオレイヤー干渉法により決定される、異なる抗 V I S T A 抗体の、マウス V I S T A への結合についての解析の結果を示すセンサーグラムおよび表である。

10

【図 4 7 C】4 7 A および 4 7 B のセンサーグラムから計算された、反応速度および熱力学定数についてまとめる図である。

【図 4 8 A】バイオレイヤー干渉法により決定される、異なる抗 V I S T A 抗体の、ヒト V I S T A およびマウス V I S T A ならびにヒト C D 4 7 への結合についての解析の結果を示すセンサーグラムおよび表である。

【図 4 8 B】4 8 A のセンサーグラムから計算された、反応速度および熱力学定数についてまとめる図である。

【図 4 9 A】E L I S A により決定される、異なる抗体の、ヒト V I S T A への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフおよび表である。

【図 4 9 B】E L I S A により決定される、異なる抗体の、マウス V I S T A への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフおよび表である。

20

【図 4 9 C】異なる抗体の、表示のタンパク質への結合についての E C 5 0 値 (n M) を示す図である。

【図 5 0 A】E L I S A により決定される、異なる抗体の、ヒト V I S T A への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフおよび表である。

【図 5 0 B】E L I S A により決定される、異なる抗体の、マウス V I S T A への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフおよび表である。

【図 5 0 C】異なる抗体の、表示のタンパク質への結合についての E C 5 0 値 (n M) を示す図である。

【図 5 1 A】E L I S A により決定される、異なる抗体の、ヒト V I S T A への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフおよび表である。

30

【図 5 1 B】E L I S A により決定される、異なる抗体の、マウス V I S T A への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフおよび表である。

【図 5 1 C】異なる抗体の、表示のタンパク質への結合についての E C 5 0 値 (n M) を示す図である。

【図 5 2 A】示差走査蛍光測定解析による、異なる抗 V I S T A 抗体の安定性についての解析の結果を示す溶融グラフおよび表である。被験抗体調製物およびタンパク質非含有対照 (N P C) 調製物について得られた生データについての一次微分を、3 連で示す。

【図 5 2 B】示差走査蛍光測定解析による、異なる抗 V I S T A 抗体の安定性についての解析の結果を示す溶融グラフおよび表である。被験抗体調製物およびタンパク質非含有対照 (N P C) 調製物について得られた生データについての一次微分を、3 連で示す。

40

【図 5 2 C】示差走査蛍光測定解析による、異なる抗 V I S T A 抗体の安定性についての解析の結果を示す溶融グラフおよび表である。被験抗体調製物およびタンパク質非含有対照 (N P C) 調製物について得られた生データについての一次微分を、3 連で示す。

【図 5 2 D】示差走査蛍光測定解析による、異なる抗 V I S T A 抗体の安定性についての解析の結果を示す溶融グラフおよび表である。被験抗体調製物およびタンパク質非含有対照 (N P C) 調製物について得られた生データについての一次微分を、3 連で示す。

【図 5 2 E】示差走査蛍光測定解析による、異なる抗 V I S T A 抗体の安定性についての解析の結果を示す溶融グラフおよび表である。被験抗体調製物およびタンパク質非含有対照 (N P C) 調製物について得られた生データについての一次微分を、3 連で示す。

50

【図5 2 F】示差走査蛍光測定解析による、異なる抗V I S T A抗体の安定性についての解析の結果を示す溶融グラフおよび表である。被験抗体調製物およびタンパク質非含有対照（N P C）調製物について得られた生データについての一次微分を、3連で示す。

【図5 2 G】示差走査蛍光測定解析による、異なる抗V I S T A抗体の安定性についての解析の結果を示す溶融グラフおよび表である。被験抗体調製物およびタンパク質非含有対照（N P C）調製物について得られた生データについての一次微分を、3連で示す。

【図5 2 H】示差走査蛍光測定解析による、異なる抗V I S T A抗体の安定性についての解析の結果を示す溶融グラフおよび表である。被験抗体調製物およびタンパク質非含有対照（N P C）調製物について得られた生データについての一次微分を、3連で示す。

【図5 2 I】示差走査蛍光測定解析による、異なる抗V I S T A抗体の安定性についての解析の結果を示す溶融グラフおよび表である。被験抗体調製物およびタンパク質非含有対照（N P C）調製物について得られた生データについての一次微分を、3連で示す。

10

【図5 2 J】5 2 A ~ 5 2 Iの結果についてまとめる図である。

【図5 3】異なる抗V I S T A抗体の、安全性および免疫原性についての、コンピュータによる解析の結果についてまとめる表である。

【図5 4】抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2による、V I S T Aと、V S I G - 3との結合の阻害についての解析の結果を示すグラフである。

【図5 5】抗V I S T A抗体クローンである、4 M 2 - C 1 2（V 4）による、V I S T Aと、P S G L - 1との結合の阻害についての解析の結果を示す棒グラフである。

【図5 6 A】E L I S Aにより決定される、V 4の、ヒトの、V I S T A、P D - L 1、B 7 H 3、B 7 H 4、B 7 H 6、B 7 H 7、P D - 1、およびC T L A - 4への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

20

【図5 6 B】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 2 4の、ヒトの、V I S T A、P D - L 1、B 7 H 3、B 7 H 4、B 7 H 6、B 7 H 7、P D - 1、およびC T L A - 4への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図5 6 C】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 2 6の、ヒトの、V I S T A、P D - L 1、B 7 H 3、B 7 H 4、B 7 H 6、B 7 H 7、P D - 1、およびC T L A - 4への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図5 6 D】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 2 7の、ヒトの、V I S T A、P D - L 1、B 7 H 3、B 7 H 4、B 7 H 6、B 7 H 7、P D - 1、およびC T L A - 4への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

30

【図5 6 E】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 2 8の、ヒトの、V I S T A、P D - L 1、B 7 H 3、B 7 H 4、B 7 H 6、B 7 H 7、P D - 1、およびC T L A - 4への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図5 6 F】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 3 0の、ヒトの、V I S T A、P D - L 1、B 7 H 3、B 7 H 4、B 7 H 6、B 7 H 7、P D - 1、およびC T L A - 4への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図5 6 G】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 3 1の、ヒトの、V I S T A、P D - L 1、B 7 H 3、B 7 H 4、B 7 H 6、B 7 H 7、P D - 1、およびC T L A - 4への結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

40

【図5 7 A】E L I S Aにより決定される、V 4の、ヒトV I S T A、マウスV I S T A、ラットV I S T A、およびカニクイザルV I S T Aへの結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図5 7 B】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 2 4の、ヒトV I S T A、マウスV I S T A、ラットV I S T A、およびカニクイザルV I S T Aへの結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図5 7 C】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 2 6の、ヒトV I S T A、マウスV I S T A、ラットV I S T A、およびカニクイザルV I S T Aへの結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図5 7 D】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 2 7の、ヒトV I S T A、マウスV

50

I S T A、ラットV I S T A、およびカニクイザルV I S T Aへの結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図57E】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 2 8の、ヒトV I S T A、マウスV I S T A、ラットV I S T A、およびカニクイザルV I S T Aへの結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図57F】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 3 0の、ヒトV I S T A、マウスV I S T A、ラットV I S T A、およびカニクイザルV I S T Aへの結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図57G】E L I S Aにより決定される、V 4 - C 3 1の、ヒトV I S T A、マウスV I S T A、ラットV I S T A、およびカニクイザルV I S T Aへの結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

10

【図57H】E L I S Aにより決定される、アイソタイプとマッチさせた対照抗体の、ヒトV I S T A、マウスV I S T A、ラットV I S T A、およびカニクイザルV I S T Aへの結合についての解析の結果を示す濃度 - 応答グラフである。

【図57I】異なる抗体の、表示のタンパク質への結合についてのE C 5 0値(M)を示す図である。

【図58A】フローサイトメトリーにより決定される、異なる抗V I S T A抗体またはアイソタイプ対照抗体による細胞の染色を示すヒストグラムである。抗体の、野生型の、非トランスフェクトH E K 2 9 3 - 6 E細胞への結合を示す。1 = 抗体なし(非染色)、2 = ヒトI g G 1アイソタイプ対照抗体、3 = V S T B 1 1 2 I g G 1、4 = 4 M 2 - C 1 2 I g G 1、5 = V 4 - C 2 4 I g G 1、6 = V 4 - C 2 6 I g G 1、7 = V 4 - C 2 7 I g G 1、8 = V 4 - C 2 8 I g G 1、9 = V 4 - C 3 0 I g G 1、および10 = V 4 - C 3 1 I g G 1である。

20

【図58B】フローサイトメトリーにより決定される、異なる抗V I S T A抗体またはアイソタイプ対照抗体による細胞の染色を示すヒストグラムである。抗体の、ヒトV I S T Aタンパク質を過剰発現させるH E K 2 9 3 - 6 E細胞への結合を示す。1 = 抗体なし(非染色)、2 = ヒトI g G 1アイソタイプ対照抗体、3 = V S T B 1 1 2 I g G 1、4 = 4 M 2 - C 1 2 I g G 1、5 = V 4 - C 2 4 I g G 1、6 = V 4 - C 2 6 I g G 1、7 = V 4 - C 2 7 I g G 1、8 = V 4 - C 2 8 I g G 1、9 = V 4 - C 3 0 I g G 1、および10 = V 4 - C 3 1 I g G 1である。

30

【図58C】フローサイトメトリーにより決定される、異なる抗V I S T A抗体またはアイソタイプ対照抗体による細胞の染色を示すヒストグラムである。抗体の、マウスV I S T Aタンパク質を過剰発現させるH E K 2 9 3 - 6 E細胞への結合を示す。1 = 抗体なし(非染色)、2 = ヒトI g G 1アイソタイプ対照抗体、3 = V S T B 1 1 2 I g G 1、4 = 4 M 2 - C 1 2 I g G 1、5 = V 4 - C 2 4 I g G 1、6 = V 4 - C 2 6 I g G 1、7 = V 4 - C 2 7 I g G 1、8 = V 4 - C 2 8 I g G 1、9 = V 4 - C 3 0 I g G 1、および10 = V 4 - C 3 1 I g G 1である。

【図59A】抗V I S T A抗体を使用する、ヒト組織についての免疫組織化学染色を示す画像である。4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 aによる、ヒト正常脾臓組織の染色を示す。

【図59B】抗V I S T A抗体を使用する、ヒト組織についての免疫組織化学染色を示す画像である。表示の拡大率における、4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 aによる、ヒト正常卵巣組織の染色を示す。

40

【図60A】抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1 (V 4) またはV S T B 1 1 2 が、活性化T細胞を、V I S T A発現細胞による抑制を解除する能力についての解析の結果を示すヒストグラムおよび棒グラフである。5日間にわたる、V I S T A発現細胞、および表示の数量の抗V I S T A抗体の存在下における、T細胞増殖についてのC F S E希釈解析の結果を示す。

【図60B】抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1 (V 4) またはV S T B 1 1 2 が、活性化T細胞を、V I S T A発現細胞による抑制を解除する能力についての解析の結果を示すヒストグラムおよび棒グラフである。5日間にわたる、V I S T A発

50

現細胞、および表示の数量の抗V I S T A抗体の存在下における、T細胞増殖についてのC F S E希釈解析の結果を示す。

【図60C】抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1 (V 4)またはV S T B 1 1 2が、活性化T細胞を、V I S T A発現細胞による抑制を解除する能力についての解析の結果を示すヒストグラムおよび棒グラフである。5日後において、細胞培養物上清中で検出された、I F N の濃度を示す。

【図60D】抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1 (V 4)またはV S T B 1 1 2が、活性化T細胞を、V I S T A発現細胞による抑制を解除する能力についての解析の結果を示すヒストグラムおよび棒グラフである。5日後において、細胞培養物上清中で検出された、T N F aの濃度を示す。

10

【図61A】抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1 (V 4)またはV S T B 1 1 2が、L P Sで刺激されたT H P - 1細胞による、サイトカインの産生を促進する能力についての解析の結果を示す棒グラフである。細胞培養物上清中で検出された、I L - 6の濃度を示す。1 = 非染色、2 = アイソタイプとマッチさせた対照抗体により染色された細胞、3 = 20 μ gのV 4により染色された細胞、4 = 40 μ gのV 4により染色された細胞、および5 = 20 μ gのV S T B 1 1 2により染色された細胞である。

【図61B】抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1 (V 4)またはV S T B 1 1 2が、L P Sで刺激されたT H P - 1細胞による、サイトカインの産生を促進する能力についての解析の結果を示す棒グラフである。表示の数量の抗V I S T A抗体の存在下で24時間にわたり、細胞培養物上清中で検出された、T N F aの濃度を示す。1 = 非染色、2 = アイソタイプとマッチさせた対照抗体により染色された細胞、3 = 20 μ gのV 4により染色された細胞、4 = 40 μ gのV 4により染色された細胞、および5 = 20 μ gのV S T B 1 1 2により染色された細胞である。

20

【図61C】抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1 (V 4)またはV S T B 1 1 2が、L P Sで刺激されたT H P - 1細胞による、サイトカインの産生を促進する能力についての解析の結果を示す棒グラフである。T H P 1細胞が、V I S T A発現細胞であることを示し、培養物中の、V I S T Aを発現させることが決定された細胞の百分率が示される。1 = 非染色、2 = アイソタイプとマッチさせた対照抗体により染色された細胞、3 = 20 μ gのV 4により染色された細胞、4 = 40 μ gのV 4により染色された細胞、および5 = 20 μ gのV S T B 1 1 2により染色された細胞である。

30

【図62】抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1または4 M 2 - C 1 2 - h I g G 4が、L P Sで刺激されたT H P - 1細胞による、I L - 6の産生を促進する能力についての解析の結果を示す棒グラフである。細胞培養物上清中で検出された、I L - 6の濃度が示される。

【図63A】抗体血清についてのE L I S A解析による、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1および4 M 2 - C 1 2 - h I g G 4の薬物動態解析の結果を示すグラフおよび表である。10 mg / k gの抗体の投与後における結果が示される。

【図63B】抗体血清についてのE L I S A解析による、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1および4 M 2 - C 1 2 - h I g G 4の薬物動態解析の結果を示すグラフおよび表である。25 mg / k gの抗体の投与後における結果が示される。

40

【図63C】抗体血清についてのE L I S A解析による、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1および4 M 2 - C 1 2 - h I g G 4の薬物動態解析の結果を示すグラフおよび表である。100 mg / k gの抗体の投与後における結果が示される。

【図63D】抗体血清についてのE L I S A解析による、抗V I S T A抗体である、4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1および4 M 2 - C 1 2 - h I g G 4の薬物動態解析の結果を示すグラフおよび表である。250 mg / k gの抗体の投与後における結果が示される。

【図64A】50 mg / k gの4 M 2 - C 1 2 - h I g G 1または等容量のP B Sの投与の96時間後のB A L B / Cマウスにおける、代表的な血液学的プロファイルを示す表である。赤血球コンパートメントについての解析の結果を示す。R B C = 赤血球、M V C = 平均値赤血球容積、M C H = 平均値赤血球ヘモグロビン、M C H C = 平均値赤血球ヘモグ

50

ロビン濃度、WBC = 白血球、ALT = アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP = アルカリホスファターゼ、CREA = クレアチニン、およびBUN = 血中尿素窒素である。

【図64B】50mg/kgの4M2-C12-hIgG1または等容量のPBSの投与の96時間後のBALB/Cマウスにおける、代表的な血液学的プロファイルを示す表である。白血球コンパートメントについての解析の結果を示す。RBC = 赤血球、MVC = 平均値赤血球容積、MCH = 平均値赤血球ヘモグロビン、MCHC = 平均値赤血球ヘモグロビン濃度、WBC = 白血球、ALT = アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP = アルカリホスファターゼ、CREA = クレアチニン、およびBUN = 血中尿素窒素である。

【図64C】50mg/kgの4M2-C12-hIgG1または等容量のPBSの投与の96時間後のBALB/Cマウスにおける、代表的な血液学的プロファイルを示す表である。肝機能および腎機能の相関因子についての解析の結果を示す。RBC = 赤血球、MVC = 平均値赤血球容積、MCH = 平均値赤血球ヘモグロビン、MCHC = 平均値赤血球ヘモグロビン濃度、WBC = 白血球、ALT = アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP = アルカリホスファターゼ、CREA = クレアチニン、およびBUN = 血中尿素窒素である。

10

【図65A】250mg/kgの4M2-C12-hIgG1、250mg/kgの4M2-C12-hIgG4、または等容量のPBSの投与後におけるSDラットについての、代表的な血液学的プロファイルを示す表である。赤血球コンパートメントについての解析の結果を示す。RBC = 赤血球、MVC = 平均値赤血球容積、MCH = 平均値赤血球ヘモグロビン、MCHC = 平均値赤血球ヘモグロビン濃度、WBC = 白血球、ALT = アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP = アルカリホスファターゼ、CREA = クレアチニン、BUN = 血中尿素窒素、GLU = グルカゴン、AMY = アミラーゼ、NA = ナトリウム、K = カリウム、P = リン、およびCA = カルシウムである。

20

【図65B】250mg/kgの4M2-C12-hIgG1、250mg/kgの4M2-C12-hIgG4、または等容量のPBSの投与後におけるSDラットについての、代表的な血液学的プロファイルを示す表である。白血球コンパートメントについての解析の結果を示す。RBC = 赤血球、MVC = 平均値赤血球容積、MCH = 平均値赤血球ヘモグロビン、MCHC = 平均値赤血球ヘモグロビン濃度、WBC = 白血球、ALT = アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP = アルカリホスファターゼ、CREA = クレアチニン、BUN = 血中尿素窒素、GLU = グルカゴン、AMY = アミラーゼ、NA = ナトリウム、K = カリウム、P = リン、およびCA = カルシウムである。

30

【図65C】250mg/kgの4M2-C12-hIgG1、250mg/kgの4M2-C12-hIgG4、または等容量のPBSの投与後におけるSDラットについての、代表的な血液学的プロファイルを示す表である。肝機能、腎機能、および膵機能、ならびに電解質レベルの相関因子についての解析の結果を示す。RBC = 赤血球、MVC = 平均値赤血球容積、MCH = 平均値赤血球ヘモグロビン、MCHC = 平均値赤血球ヘモグロビン濃度、WBC = 白血球、ALT = アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP = アルカリホスファターゼ、CREA = クレアチニン、BUN = 血中尿素窒素、GLU = グルカゴン、AMY = アミラーゼ、NA = ナトリウム、K = カリウム、P = リン、およびCA = カルシウムである。

40

【実施例】

【0717】

以下の実施例では、本発明者らは、VISTA分子内の、目的の特異的領域へとターゲットィングされる、新規の抗VISTA抗体クローンの作出、ならびにこれらの抗原結合性分子についての生物物理的および機能的特徴付け、ならびに治療的評価について記載する。

【0718】

実施例1

VISTA標的のデザインおよび抗VISTA抗体ハイブリドーマの作製

本発明者らは、VISTA結合性モノクローナル抗体を惹起するために、ヒトVISTA A (配列番号3)の細胞外領域内の領域を選択した。

50

【0719】

FGグループ領域は、VISTAのこの領域が、VISTAの阻害性機能に重要であると提起されている (Vigdorovichら、Structure、2013; 21(5): 707~717) ため、ターゲティングした。VISTAの、正面を向くシート領域もまた、ターゲティングした。

1.1 ハイブリドーマの作製

約6週齢の、雌BALB/cマウスは、Invivos (Singapore) から得た。動物は、特定の無病原体条件下で飼育し、Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) ガイドラインに準拠して処置した。

【0720】

ハイブリドーマの作製のために、マウスを、抗原性ペプチド、組換え標的タンパク質、または標的タンパク質を発現する細胞の、本発明者らに所有権がある混合物で免疫化した。

【0721】

融合のための脾臓を採取する前に、マウスに、抗原混合物を、連続3日間にわたり追加免疫した。最終追加免疫の24時間後、全脾臓細胞を単離し、製造元の指示書 (Stemcell Technologies、Canada) に従い、ClonaCell-HYハイブリドーマクローニングキットを使用して、PEGにより、骨髓腫細胞株である、P3X63.Ag8.653 (ATCC、USA) と融合させた。

【0722】

融合細胞は、37℃、5%CO₂のインキュベーター内の、ClonaCell-HY培地C (Stemcell Technologies、Canada) 中で、一晩にわたり培養した。翌日、融合細胞を遠心分離し、10mlのClonaCell-HY培地C中に再懸濁させ、次いで、HAT成分を含有する、90mlの、半固体メチルセルローススペースの、ClonaCell-HY培地D (Stemcell Technologies、Canada) と、静かに混合し、これにより、ハイブリドーマの選択と、クローニングとを、1つステップへと組み合わせた。

【0723】

次いで、融合細胞を、96ウェルプレートへと播種し、37℃、5%CO₂のインキュベーター内で増殖させた。7~10日後、単一のハイブリドーマクローンを単離し、抗体産生ハイブリドーマを、酵素免疫測定アッセイ (ELISA) および蛍光標識細胞分取 (FACS) によって、上清をスクリーニングすることにより選択した。

1.2 抗体可変領域の増幅およびシーケンシング

製造元のプロトコールを使用する、TRIzol試薬 (Life Technologies, Inc., USA) を使用して、全RNAを、ハイブリドーマ細胞から抽出した。製造元の指示書に従い、SMARTer RACE 5' / 3' キット (Clontech (商標)、USA) を使用して、二本鎖cDNAを合成した。略述すると、5' - RACE CDSプライマー (キット内に提供された)、および5'アダプター (SMARTer IIAプライマー) を使用して、全長cDNAを作出するのに、1µgの全RNAを使用し、次いで、製造元の指示書に従い、各cDNAへと組み込んだ。cDNA合成反応物は、5倍濃度のFirst-Strand緩衝液、DTT (20mM)、dNTPミックス (10mM)、RNアーゼ阻害剤 (40U/µl)、およびSMARTscribe逆転写酵素 (100U/µl) を含有した。

【0724】

SeqAmp DNAポリメラーゼ (Clontech (商標)、USA) を使用して、rapid amplification of cDNA ends (RACE) の準備ができたcDNAを増幅した。増幅反応物は、SeqAmp DNAポリメラーゼ、2倍濃度のSeqAMP緩衝液、5' SMARTer Raceキットで提供される、アダプター配列に相補的な、5'ユニバーサルプライマー、および、それぞれの重鎖定常領域または軽鎖定常領域のプライマーにアニーリングする、3'プライマーを含有した。5'定常

10

20

30

40

50

領域は、Kreberら、J. Immunol. Methods、1997、201：35～55；Wangら、Journal of Immunological Methods、2000、233、167～177；またはTillerら、Journal of Immunological Methods、2009、350：183～193により、既に報告されたプライマーミックスに基づきデザインした。以下の熱プロトコール：94 で、1分間にわたる、前変性サイクル；94 で、30秒間、55 で、30秒間、および72 で、45秒間にわたる、35サイクル；72 で、3分間にわたる、最終伸長を使用した。

【0725】

CloneJET PCRクローニングキット(Thermo Scientific、USA)を使用して、結果として得られる、約550bpである、VHおよびVLのPCR産物を、pJET1.2/bluntベクターへとクローニングし、高度にコンピテントのE. coli DH5 を形質転換するのに使用した。Miniprepキット(Qiagen、Germany)を使用して、結果として得られる形質転換体から、プラスミドDNAを調製し、シーケンシングした。DNAシーケンシングは、AITbioTechにより行われた。international IMGT(ImmunoGenetics) information system(LeFrancら、Nucleic Acids Res. (2015)、43(データベース号)：D413～22)を使用して、これらのシーケンシングデータを解析して、個々のCDRおよびフレームワーク配列を特徴付けた。VHおよびVLの5'末端におけるシグナルペプチドは、SignalP(v 4.1；Nielsen；Kihara、D(編)：「Protein Function Prediction」(Methods in Molecular Biology、1611巻)59～73、Springer、2017)により同定した。

【0726】

次いで、抗VISTAモノクローナル抗体クローンを、さらなる開発および特徴付けのために選択した。

【0727】

また、抗体クローンである、4M2-C12(本明細書ではまた、「V4」とも称される)のヒト化バージョンも、抗体のCDRを、ヒト抗体フレームワーク領域を含むVHおよびVLへとクローニングすることにより、標準的な方法に従い調製した。

【0728】

10

20

30

40

50

【表 3】

抗体クローン	VH/VL 配列	抗体を惹起するのに使用されるペプチド免疫原
4M2-C12 (本明細書ではまた、「V4」とも称される)	VH=配列番号 32	配列番号 26
	VL=配列番号 40	
V4H1	VH=配列番号 52	
	VL=配列番号 57	
V4H2	VH=配列番号 62	
	VL=配列番号 66	
4M2-B4	VH=配列番号 48	
	VL=配列番号 50	
4M2-C9	VH=配列番号 87	
	VL=配列番号 95	
4M2-D9	VH=配列番号 106	
	VL=配列番号 113	
4M2-D5	VH=配列番号 143	
	VL=配列番号 150	
4M2-A8	VH=配列番号 157	
	VL=配列番号 164	
2M1-B12	VH=配列番号 71	配列番号 27
	VL=配列番号 79	
2M1-D2	VH=配列番号 102	
	VL=配列番号 104	
1M2-D2	VH=配列番号 119	配列番号 28
	VL=配列番号 126	
13D5p	VH=配列番号 183	
	VL=配列番号 188	
13D5-1	VH=配列番号 194	
	VL=配列番号 196	
13D5-13	VH=配列番号 199	
	VL=配列番号 202	
5M1-A11	VH=配列番号 133	配列番号 29
	VL=配列番号 136	
9M2-C12	VH=配列番号 168	配列番号 30
	VL=配列番号 176	

10

20

30

実施例 2

抗体の作製および精製

2.1 VHおよびVLの、発現ベクターへのクローニング:

ヒト-マウスキメラ抗体を構築するために、抗VISTA抗体クローンの、重および軽鎖可変領域をコードするDNA配列を、pMABDZ_IgG1_CHおよびpMABDZ_IgG1_CL (InvivoGen、USA) の真核生物発現ベクターへとサブクローニングした。

40

【0729】

代替的に、ヒト-マウスキメラ抗体を構築するために、抗VISTA抗体クローンの、重および軽鎖可変領域をコードするDNA配列を、pFUSE-CHIg-hG1およびpFUSE2ss-CLIg-hk (InvivoGen、USA) の真核生物発現ベクターへとサブクローニングした。pFUSE-CHIg-hG1によりコードされるヒトIgG1定常領域は、CH3領域内に、ヒトIgG1定常領域 (IGHG1; UniProt: P01857-1、v1; 配列番号210) と比べた置換である、D356E、L358M (EU番号付けに従い番号付けされた位置) を含む。pFUSE2ss-CLIg-hkは、ヒトIgG1軽鎖カッパ定常領域 (IGCK; UniProt: P0183

50

4 - 1、v 2) をコードする。

【0730】

製造元のプロトコールに従い、Seq Amp 酵素 (Clontech (商標)、USA) を使用して、可変領域を、シグナルペプチドと共に、クローニングベクターから増幅した。VH または VL 内の、適切な領域と重複する、15 ~ 20 bp に加えて、5' 末端における、制限部位として、6 bp を有する、フォワードおよびリバースプライマーを使用した。DNA インサートおよび pFUSE ベクターを、製造元により推奨される制限酵素で消化して、フレームシフトが、導入されていないことを確認し (例えば、VH には、EcoRI および NheI であり、VL には、AgeI および BsiWI である)、T4 リガーゼ酵素 (Thermo Scientific、USA) を使用して、そのそれぞれのプラスミドへとライゲーションした。DNA インサートの、ベクターに対する、3 : 1 のモル比を、ライゲーションのために使用した。

10

2.2 哺乳動物細胞内の、抗体の発現

製造元の指示書に従い、1) Expi293 一過性発現系キット (Life Technologies、USA)、または 2) HEK293-6E 一過性発現系 (CNRC-NRC、Canada) を使用して、抗体を発現させた。

1) Expi293 一過性発現系 :

細胞株の維持 :

HEK293F 細胞 (Expi293F) は、Life Technologies、Inc (USA) から得た。細胞は、37 °C、8% CO₂、振とう型プラットフォームを伴う、80% の加湿式インキュベーター内の、50 IU/ml のペニシリン 50 μg/ml のストレプトマイシン (Gibco、USA) を補充した、無血清、無タンパク質の既知組成培地 (Expi293 発現培地、Thermo Fisher、USA) 中で培養した。

20

トランスフェクション :

Expi293F 細胞に、その製造元のプロトコールに従い、ExpiFectamine 293 試薬キット (Gibco、USA) を使用して、発現プラスミドをトランスフェクトした。略述すると、培養物をスピンドウンすることにより、抗生物質を除去するように、維持状態の細胞を、培地交換にかけ、細胞ペレットを、トランスフェクションの1日前に、抗生物質を伴わない新鮮培地中に再懸濁させた。トランスフェクション日に、各トランスフェクションのために、1 ml 当たりの生存細胞 2.5×10^6 個を、シェーカーフラスコ内に播種した。細胞へと添加する前に、血清低減培地である、Opti-MEM (Gibco、USA) 中、室温で、25 分間にわたり、DNA-ExpiFectamine 複合体を形成した。トランスフェクションの16 ~ 18 時間後に、転写促進因子を、トランスフェクトされた細胞へと添加した。トランスフェクションの4日後に、等量の培地を、トランスフェクタントの上にかき、細胞の凝集を防止した。トランスフェクタントを、4000 × g で、15 分間にわたる、7 日目により採取し、0.22 μm の滅菌フィルターユニットを通して濾過した。

30

2) HEK293-6E 一過性発現系

細胞株の維持 :

HEK293-6E 細胞は、National Research Council Canada から得た。細胞は、37 °C、5% CO₂、振とう型プラットフォームを伴う、80% の加湿式インキュベーター内の、0.1% の Kolliphor-P188 および 4 mM の L-グルタミン (Gibco、USA) および 25 μg/ml の G-418 を補充した、無血清、無タンパク質、既知組成の Freestyle F17 培地 (Invitrogen、USA) 中で培養した。

40

トランスフェクション :

HEK293-6E 細胞に、その製造元のプロトコールに従い、PEIpro (商標) (Polypius、USA) を使用して、発現プラスミドをトランスフェクトした。略述すると、遠心分離により、抗生物質を除去するように、維持状態の細胞を、培地交換にか

50

け、細胞ペレットを、トランスフェクションの1日前に、抗生剤を伴わない新鮮培地と共に再懸濁させた。トランスフェクション日に、各トランスフェクションのために、1 ml 当たりの生存細胞 $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 個を、シェーカーフラスコ内に播種した。DNA と PEI pro (商標) とを、1 : 1 の比で混合し、細胞へと添加する前に、RT で、5 分間にわたり、F17 培地中で、複合体を形成させた。トランスフェクションの 24 ~ 48 時間後に、0.5% (w/v) の Tryptone N1 を、トランスフェクタントへとフィードした。トランスフェクタントを、 $4000 \times g$ で、15 分間にわたる、6 ~ 7 日目により採取し、上清を、 $0.22 \mu m$ の滅菌フィルターユニットを通して濾過した。

【0731】

細胞に、以下の組合せのポリペプチドをコードするベクターをトランスフェクトした。

10

【0732】

20

30

40

50

【表 4 - 1】

抗原結合性分子	ポリペプチド	抗体
[1]	4M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 212) + 4M2-C12 VL-Cκ (配列番号 213)	抗 VISTA クローンである、4M2-C12 IgG1
[2]	4M2-B4 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 214) + 4M2-B4 VL-Cκ (配列番号 215)	抗 VISTA クローンである、4M2-B4 IgG1
[3]	V4H1 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 216) + V4H1 VL-Cκ (配列番号 217)	抗 VISTA クローンである、V4H1 IgG1
[4]	V4H2 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 218) + V4H2 VL-Cκ (配列番号 219)	抗 VISTA クローンである、V4H2 IgG1
[5]	2M1-B12 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 220) + 2M1-B12 VL-Cκ (配列番号 221)	抗 VISTA クローンである、2M1-B12 IgG1
[6]	4M2-C9 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 222) + 4M2-C9 VL-Cκ (配列番号 223)	抗 VISTA クローンである、4M2-C9 IgG1
[7]	2M1-D2 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 224) + 2M1-D2 VL-Cκ (配列番号 225)	抗 VISTA クローンである、2M1-D2 IgG1
[8]	4M2-D9 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 226) + 4M2-D9 VL-Cκ (配列番号 227)	抗 VISTA クローンである、4M2-D9 IgG1
[9]	1M2-D2 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 228) + 1M2-D2 VL-Cκ (配列番号 229)	抗 VISTA クローンである、1M2-D2 IgG1
[10]	5M1-A11 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 230) + 5M1-A11 VL-Cκ (配列番号 231)	抗 VISTA クローンである、5M1-A11 IgG1
[11]	4M2-D5 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 232) + 4M2-D5 VL-Cκ (配列番号 233)	抗 VISTA クローンである、4M2-D5 IgG1

10

20

30

40

【 0 7 3 3 】

50

【表 4 - 2】

[12]	4M2-A8 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 234) + 4M2-A8 VL-C κ (配列番号 235)	抗 VISTA クローンである、4M2-A8 IgG1	
[13]	9M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 236) + 9M2-C12 VL-C κ (配列番号 237)	抗 VISTA クローンである、9M2-C12 IgG1	
[14]	13D5p VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 238) + 13D5p VL-C κ (配列番号 239)	抗 VISTA クローンである、13D5p IgG1	10
[15]	13D5-1 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 240) + 13D5-1 VL-C κ (配列番号 241)	抗 VISTA クローンである、13D5-1 IgG1	
[16]	13D5-13 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 242) + 13D5-13 VL-C κ (配列番号 243)	抗 VISTA クローンである、13D5-13 IgG1	20

2.3 抗体の精製

アフィニティー精製、緩衝液交換、および保管：

トランスフェクトされた細胞により、培養物上清へと分泌された抗体は、液体クロマトグラフィーシステムである、AKTA Start (GE Healthcare、UK) を使用して精製した。具体的には、上清を、HiTrap プロテイン G カラム (GE Healthcare、UK) へと、5 ml / 分の結合速度でロードするの続き、カラムを、10 カラム容量の洗浄緩衝液 (20 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0) で洗浄した。結合した mAb を、溶出緩衝液 (0.1 M のグリシン、pH 2.7) により溶出させ、溶出液を、適量の中和緩衝液 (1 M のトリス、pH 9) を含有する回収チューブへと分画した。カットオフ分子量 (MWCO) 30 K タンパク質濃縮器 (Thermo Fisher、USA) または MWCO 3, 5 K 透析カセット (Thermo Fisher、USA) を使用して、精製された mAb を含有する、中和溶出緩衝液を、PBS へと交換した。0.22 μ m のフィルターを通すことにより、モノクローナル抗体を滅菌し、アリコート分割し、保管のために、-80 で凍結させた。

2.4 抗体純度解析

サイズ除外クロマトグラフィー (SEC)：

抗体純度を、AKTA Explorer 液体クロマトグラフィーシステム (GE Healthcare、UK) 上の、PBS ランニング緩衝液中で、Superdex 200 10/30 GL カラム (GE Healthcare、UK) を使用する、サイズ除外クロマトグラフィー (SEC) により解析した。500 μ l の PBS pH 7.2 中に、150 μ g の抗体を、室温、0.75 ml / 分の流量で、カラムへと注入した。タンパク質を、それらの分子量に従い溶出させた。

【0734】

抗 VISTA 抗体クローンである、V4 (実施例 2.2 の [1]) についての結果を、図 10 に示す。

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 (SDS-PAGE)：

抗体純度もまた、標準的な方法に従う、還元条件下および非還元条件下における、SDS-PAGE により解析した。略述すると、Mini-Protean Electro

10

20

30

40

50

phoresisシステム (Bio-Rad、USA) を使用して、タンパク質を分解するのに、4% ~ 20% のTGXタンパク質ゲル (Bio-Rad、USA) を使用した。非還元条件のために、ゲルへとロードする前に、2倍濃度のLaemmli試料緩衝液 (Bio-Rad、USA) と混合することにより、タンパク質試料を変性させ、95 で、5 ~ 10分間にわたり煮沸した。還元条件のために、5% のβ-メルカプトエタノール (ME) または40mMのDTT (ジチオトレイトール) を含有する、2倍濃度の試料緩衝液を使用した。電気泳動は、150Vの一定電圧下、SDSランニング緩衝液 (25mMのトリス、192mMのグリシン、1%のSDS、pH8.3) 中、1時間にわたり行った。

ウェスタンブロット:

10

タンパク質試料 (30 μg) を、上記で記載した通りに、SDS-PAGEにより分画し、ニトロセルロース膜へと転写した。次いで、膜をブロッキングし、4 で、一晩にわたり、抗体による免疫ブロットにかけた。次いで、PBS-Tween中、3回にわたり洗浄した後、膜を、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート二次抗体と共に、室温で、1時間にわたりインキュベートした。結果は、化学発光による、Pierce ECL基質ウェスタンブロット検出システム (Thermo Scientific、USA) によって視覚化し、オートラジオグラフィフィルム (Kodak XARフィルム) へと曝露した。

【0735】

検出のために使用される一次抗体は、ヤギ抗マウスIgG (H+L) 抗体 (LI-COR; 型番: 926-32210) であった。

20

【0736】

抗VISTA抗体クローンである、V4 (実施例2.2の[1]) についての結果を、図11に示す。V4は、高濃度で、容易に発現され、精製され、加工された。

【0737】

実施例3

生物物理的特徴付け

3.1 フローサイトメトリーによる、細胞表面における抗原結合についての解析

野生型HEK293細胞 (高レベルのVISTAを発現させない)、およびヒトVISTAをコードするベクターをトランスフェクトされたHEK293細胞 (すなわち、HEK293 HER O/E細胞) を、20 μg/mlの抗VISTA抗体またはアイソタイプ対照抗体と共に、4 で、1時間にわたりインキュベートした。WO2015/097536において記載された、抗VISTA抗体クローンである、VSTB112を、陽性対照として、解析に組み入れた。

30

【0738】

細胞を、FACS緩衝液 (5mMのEDTAと、0.5%のBSAとを伴うPBS) で、3回にわたり洗浄し、FITCコンジュゲート抗FC抗体 (Invitrogen、USA) 中、2 ~ 8 で、40分間にわたり再懸濁させた。細胞を再度洗浄し、MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec、Germany) を使用して、フローサイトメトリー解析のために、200 μLのFACSフロー緩衝液 (5mMのEDTAを伴うPBS) 中に再懸濁させた。収集の後、Flowlogi cソフトウェアを使用して、全ての生データを解析した。前方および側方散乱のプロファイルを使用して、細胞にゲートをかけ、蛍光強度中央値 (MFI) の値を、天然および過剰発現細胞集団について決定した。

40

【0739】

結果を、図1A ~ 1D、図2、および図24に示す。抗VISTA抗体は、ヒトVISTAに、高度の特異性で結合することが示された。

【0740】

別個の実験では、13D5p (実施例2.2の[14]) を、カニクイザルVISTAまたはマウスVISTAをコードするベクターをトランスフェクトされた細胞に結合する

50

、その能力について解析した。13D5pは、カニクイザルVISTAおよびマウスVISTAとの交差反応性を呈することが見出された。

3.2 Octet QK384システムを使用する、グローバルアフィニティー研究

Octet QK384システム (ForteBio) を使用して、バイオレイヤー干渉法 (BLI) 実験を実施した。抗5×HIS (HIS1K) でコーティングされたバイオセンサーチップ (Pall ForteBio, USA) を使用して、Hisタグ付けした、ヒト、カニクイザル、またはマウスVISTAを捕捉した (270 nM)。全ての測定は、25、1000 rpmで攪拌しながら実施した。抗原への結合についての反応速度の測定は、抗VISTA抗体を、異なる濃度 (図に表示の) で、120秒間にわたりロードするのに続き、120秒間の解離時間を置き、バイオセンサーを、アッセイ緩衝液を含有するウェルへと導入することにより実施した。緩衝液効果について、センサーグラムを参照し、次いで、Octet QK384ユーザーソフトウェア (Pall ForteBio, USA) を使用して当てはめた。反応速度応答は、1部位結合モデルを使用するグローバルフィッティングにかけて、会合速度定数 (kon)、解離速度定数 (koff)、および平衡解離定数 (KD) についての値を得た。ソフトウェアにより、信頼できる形で ($R^2 > 0.90$) 当てはめうる曲線だけを、解析に組み入れた。

【0741】

抗VISTA抗体クローンである、V4 (すなわち、実施例2.2の[1]) による結合についての解析のための、代表的なセンサーグラムを、図3A~3Cに示す。

【0742】

抗VISTA抗体クローンである、V4は、ヒトおよびカニクイザルVISTAに、 $K_D = 1 \text{ pM}$ のアフィニティーで結合し、マウスVISTAに、 $K_D = 113 \text{ nM}$ のアフィニティーで結合することが見出された。

3.3 抗体の特異性を決定するためのELISA

ELISAを使用して、抗体の結合特異性を決定した。抗VISTA抗体を、ヒトVISTAポリペプチド、それぞれの、マウスおよびカニクイザルの相同体、ならびにヒトPD-L1およびヒトHER3 (Sino Biological Inc., China) への結合について解析した。

【0743】

ELISAを、標準的なプロトコールに従い行った。略述すると、96ウェルプレート (Nunc, Denmark) を、37 で、2時間にわたり、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) 中に $1 \mu\text{g/ml}$ の標的タンパク質によりコーティングした。トリス緩衝液生理食塩液 (TBS) 中、10%のBSAによる、室温で、1時間にわたるブロッキングの後、被験抗体を、最高濃度を $30 \mu\text{g/ml}$ として系列希釈 (12点の系列希釈) し、プレートへと添加した。室温で、1時間にわたるインキュベーション後、プレートを、0.05%のTween 20を含有するTBS (TBS-T) で、3回にわたり洗浄し、次いで、HRPコンジュゲート抗マウスIgG抗体 (Life Technologies, Inc., USA) と共に、室温で、1時間にわたりインキュベートした。洗浄の後、プレートを、比色検出基質である、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (Turb o-TMB; Pierce, USA) により、室温で、15分間にわたり現像した。2Mの H_2SO_4 で、反応を停止させ、30分以内に、450 nmで、ODを測定した。

【0744】

抗VISTA抗体クローンである、V4 (実施例2.2の[1]) により得られた結果を、図4Aに示す。クローンである、V4は、ヒト、カニクイザル、およびマウスVISTAに結合することが可能であることが見出されたが、ヒトPD-L1またはヒトHER3との交差反応性を呈さなかった (極めて高濃度であってもなお)。

【0745】

抗VISTA抗体クローンである、13D5-1 (実施例2.2の[15]) により得られた結果を、図20に示す。クローンである、13D5-1は、ヒト、カニクイザル、およびマウスVISTAに結合することが可能であることが見出された。

【0746】

抗VISTA抗体クローンである、13D5-13（実施例2.2の[16]）により得られた結果を、図21に示す。クローンである、13D5-13は、ヒトおよびマウスVISTAに結合することが可能であることが見出された。

【0747】

さらなる実験では、抗VISTA抗体クローンである、V4（実施例2.2の[1]）を、ELISAにより、ヒトの、VISTA、PD-1、PD-L1、B7H3、B7H4、B7H6、B7H7、およびCTLA4に結合する能力について解析した。結果を、図4Cに示す。クローンである、V4は、PD-1、PD-L1、B7H3、B7H4、B7H6、B7H7、またはCTLA4のうちのいずれとも交差反応しないことが見出された。

10

3.4 示差走査蛍光測定法による、熱安定性についての解析

略述すると、0.2mg/mLの、3連の抗体反応ミックス、およびSYPRO Orange色素（ThermoFisher）を、25μLのPBS中で調製し、MicroAmp Optical 96ウェル反応プレート（ThermoFisher）のウェルへと移し、MicroAmp Optical Adhesive Film（ThermoFisher）でシーリングした。TAMRAを、レポーターとして選択し、ROXを、受動参照として選択して、溶融曲線解析を、7500 fast Real-Time PCRシステム（Applied Biosystems）において実行した。熱プロファイルは、傾斜率を1.2%として、25 で、2分間の初期ステップと、99 で、2分間の最終ステップとを含んだ。生データの一次微分を、温度の関数としてプロットして、微分溶融曲線を得た。抗体の溶融温度（Tm）は、微分曲線のピークから抽出した。

20

【0748】

抗体クローンである、V4のIgG1フォーマット（すなわち、実施例2.2の[1]）の熱安定性に対する、示差走査蛍光測定解析について得られた生データの一次微分を、図9に示す。Tmを、67.5 であると決定した。

【0749】

実施例4

機能的特徴付け

4.1 VISTAとVSI G-3との相互作用

30

本発明者らは、VSI G-3が、VISTAに対するリガンドとして振る舞うのかどうかについて、Octet QK384システム（ForteBio）を使用する、バイオレイヤー干渉法（BLI）解析により調べた。略述すると、抗ヒトFc捕捉バイオセンサーを使用して、100nMの濃度の、Fcタグ付けVSI G-3を捕捉し、捕捉されたVSI G-3の、3000nMから始まり、3つの系列希釈を後続させる濃度で適用されたVISTAとの会合を測定し、PBS対照と比較した。

【0750】

代表的なセンサーグラムを、図5に示す。VSI G-3と、VISTAとの会合のアフィニティーを、KD 5.28μMであると計算した。

【0751】

40

本発明者らは、次に、抗VISTA抗体が、VISTAとVSI G-3との相互作用を阻害する能力について解析した。

【0752】

略述すると、96ウェルプレート（Nunc、Denmark）を、4 で、16時間にわたり、1倍濃度のPBS中に、1μg/mLの、非タグ付けまたはFcタグ付けVSI G-3（R&D Systems、USA）によりコーティングした。TBS中1%のBSAによる、室温で、1時間にわたるブロッキングの後、15μg/mLのVISTA/ヒトHisタグ付け融合タンパク質（Sino Biological Inc.、China）を、濃度を増大させる、抗VISTA抗体の存在下または非存在下で添加し、室温で、1時間にわたり、インキュベートした。その後、プレートを、TBS-Tで、3回

50

にわたり洗浄し、次いで、HRPコンジュゲート抗His二次抗体と共に、室温で、1時間にわたりインキュベートした。洗浄の後、プレートを、比色検出基質である、Turbo-TMB (Pierce、USA)で現像した。2MのH₂SO₄で、反応を停止させ、450nmで、ODを測定した。

【0753】

抗VISTA抗体クローンである、5M1-A11および9M2-C12 (実施例2.2の[10]および[13])について得られた結果を、図6に示す。抗VISTA抗体は、VISTAとVSI G-3との相互作用の、用量依存性阻害を呈した。

【0754】

さらなる実験では、4M2-C12 IgG1 (実施例2.2の[1])による、VISTAとVSI G-3との相互作用の阻害について解析した。無関係な標的抗原に特異的な抗体、およびヒトIgG1アイソタイプ対照による、VISTA:VSI G-3間相互作用の阻害もまた、対照条件として解析した。結果を、図32に示す。4M2-C12 IgG1は、VISTA:VSI G-3間相互作用を、用量依存的に阻害することが見出された。

【0755】

さらなる実験では、4M2-C12 IgG1 (実施例2.2の[1])による、VISTAとVSI G-3との相互作用の阻害を、VISTA-Fcを、捕捉剤として使用するアッセイにおいて解析した。略述すると、384ウェルプレートのウェルを、0.5 μg/mlのVISTA-Fc 30 μlにより、室温で、1時間にわたりコーティングした。プレートを、PBS-Tで洗浄し、室温で、TBS中に1%のBSAにより、1時間にわたりブロッキングした。4M2-C12 IgG1またはヒトIgG1アイソタイプ対照抗体の系列希釈液を、0.3 μg/mlのVSI G3-Hisと併せて、プレートへと添加した。室温で、1時間にわたるインキュベーションの後、プレートを、PBS-Tで、5回にわたり洗浄し、ヤギ抗HIS-HRPと共に、室温で、1時間にわたりインキュベートした。プレートを、PBS-Tで、5回にわたり洗浄し、Turbo-TMBで現像した。2MのH₂SO₄で、反応を停止させ、450nmで、ODを測定した。

【0756】

結果を、図54に示す。4M2-C12 IgG1は、VISTA:VSI G-3間相互作用を、用量依存的に阻害することが見出された。

4.2 VISTAと、PSGL-1との相互作用

本発明者らは、次に、PSGL-1が、VISTAに対するリガンドとして振る舞うのかどうかについて、フローサイトメトリーベースのアッセイにおいて調べた。

【0757】

略述すると、ヒトVISTAタンパク質を過剰発現させるように修飾された(ヒトVISTAをコードする構築物のトランスフェクションにより)HEK293T細胞100,000個を、HBSS、0.5%のBSA、および2mMのEDTA pH6.0を含む緩衝液中、4で15分間にわたり、濃度を、20 μg/ml、40 μg/ml、または80 μg/mlとする、4M2-C12-hIgG1 (実施例2.2の[1])またはアイソタイプとマッチさせた対照抗体と共にインキュベートした。次いで、15 μg/mlのFcタグ付けヒトPSGL1 (R&D Systems、型番:3345-PS)または同じ量のFcタグ付け無関係な抗原を、細胞へと添加し、次いで、これを、4で、さらに45分間にわたりインキュベートした。その後、細胞を、緩衝液で3回にわたり洗浄し、次いで、FITCコンジュゲート抗PSGL1抗体 (Miltenyi Biotec; 型番:130-104-706)を、1:11の希釈倍率で添加するか、またはAlex488コンジュゲート抗Fc抗体を、1:200の希釈倍率で添加し、細胞を、4で15分間にわたりインキュベートした。次いで、細胞を、緩衝液で3回にわたり洗浄し、フローサイトメトリーにより解析した。

【0758】

結果を、図55に示す。4M2-C12-hIgG1は、PSGL-1の、VISTA

への結合を、用量依存的に阻害することが見出された。

4.3 VISTA 媒介性シグナル伝達の阻害

本発明者らは、抗VISTA抗体クローンである、13D5pが、VISTA媒介性シグナル伝達を阻害しうるのかどうかについて、混合リンパ球反応(MLR)アッセイを使用する解析により調べた。

【0759】

略述すると、製造元の指示書に従い、Septamateキット(Stemcell Technologies、Canada)を使用して、PBMCを、非血縁ドナーから単離した(刺激因子およびエフェクター集団を得るために)。刺激細胞を、37で20分間にわたり、50µg/mLのマイトマイシンC(Sigma Aldrich、USA)により処理し、1倍濃度のPBSにより、5回にわたり洗浄した後で使用した。刺激因子集団を、ウェル1つ当たりの細胞0.5×10⁵個、レスポナー集団を、ウェル1つ当たりの細胞1.0×10⁵個で、20µg/mLの最高濃度から濃度を増大させる、被験抗体の存在下または非存在下において播種した。5日後、上清を採取し、IL-17、IL-2A、およびIFN-のレベルを、標準的なプロトコールに従うELISAにより決定した。

10

【0760】

結果を、図7Aおよび7Bに示す。抗VISTA抗体である、13D5pは、IL-17、IL-2、およびIFN-のレベルの増大を結果としてもたらしることが見出された。図8Aおよび8Bは、抗PD-L1抗体クローンである、MIH5(ThermoFisher Scientific)を使用して、同じアッセイにおいて得られた結果を示す。

20

【0761】

実施例5

in vivoにおける解析

in vivo研究のために、4M2-C12を、マウスIgG2aフォーマットで作製した。分子は、配列番号248に示された配列を有する、重鎖ポリペプチドと、配列番号250に示された配列を有する、軽鎖ポリペプチドとのヘテロマーである。4M2-C12 mIgG2aは、CHO細胞内の、重鎖ポリペプチドをコードする核酸と、軽鎖ポリペプチドをコードする核酸との共発現により作製し、その後、精製した。

30

【0762】

【表5】

抗原結合性分子	ポリペプチド	抗体
[17]	4M2-C12 mIgG2a HC (配列番号 248) + 4M2-C12 CL (配列番号 250)	4M2-C12 mIgG2a

40

5.1 薬物動態解析

約6~8週齢のC57BL/6マウスは、特定の無病原体条件下で飼育し、Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)ガイドラインに準拠して処置した。

【0763】

600µgの抗VISTA抗体を投与し、血液は、3匹のマウスから、心臓穿刺により、ベースライン(-2時間後)、0.5時間後、投与の6時間後、24時間後、96時間後、168時間後、および336時間後に得た。血清中の抗体を、ELISAにより定量した。

【0764】

50

薬物動態解析のためのパラメータ：最大濃度（ C_{max} ）、 $AUC(0 \sim 336 \text{時間})$ 、 $AUC(0 \sim \text{無限大})$ 、半減期（ $t_{1/2}$ ）、クリアランス（ CL ）、定常状態における分布容積（ V_{ss} ）は、非コンパートメントモデルから導出した。

【0765】

抗VISTA抗体クローンである、V4（実施例5の[17]）について得られた結果を、図12に示す。この抗体クローンは、11.7日間の半減期を有することが見出された。

5.2 *in vivo*における、がんを処置する有効性についての解析

約6～8週齢の、雌BALB/cまたはC57BL/6マウスを、InVivos（Singapore）から購入した。動物は、特定の無病原体条件下で飼育し、Institutional Animal Care and Use Committee（IACUC）ガイドラインに準拠して処置した。

10

【0766】

研究で使用される細胞株は、ATCCから得られる、LL2細胞（Lewis肺癌）、4T1細胞（乳がん）、CT26細胞（結腸癌）、Clone-M3細胞（黒色腫）、およびEL4細胞（T細胞白血病/リンパ腫）を含んだ。B16-BL6細胞（黒色腫）は、Creative Bioarrayから得た。細胞株は、供給元の指示書に従い維持し、LL2細胞、B16-BL6細胞、およびEL4細胞は、10%のウシ胎仔血清（FBS）および1%のPen/Strepを補充したDMEM中で培養し、4T1細胞およびCT26細胞は、10%のFBSおよび1%のPen/Strep/Strepを補充したRPMI-1640中で培養した。Clone-M3細胞は、2.5%のFBS、15%のウマ血清、および1%のPen/Strepを補充したF12-K培地中で増殖させた。全ての細胞は、5%のCO₂インキュベーター内、37℃で培養した。

20

【0767】

同系腫瘍モデルは、LL2（ 2×10^5 個）、4T1（ 5×10^5 個）、CT26（ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個）、Clone-M3（ 5×10^5 個）、EL4（ 2×10^5 個）、またはB16-BL6（ 1×10^5 個）細胞を、マウスの右脇腹へと、皮下注入することにより作出した。

【0768】

植込みの3日後、抗VISTA抗体を、3日ごと、合計6回の投与にわたり、腹腔内投与した。対照群には、同じ用量間隔で、溶媒処置を施した。

30

【0769】

腫瘍体積は、デジタル式キャリパーを使用して、毎週3回測定し、式 $[L \times W^2 / 2]$ を使用して計算した。対照アームの腫瘍が、 $> 1.5 \text{ cm}$ の長さで測定されたら、研究の終点到達したと考えた。

5.2.1 CT26細胞モデル

図13は、抗VISTA抗体クローンである、V4（実施例5の[17]）の抗がん効果を、抗PD-L1抗体クローンである、10F.9G2の抗がん効果と、CT26細胞株に由来する、同系マウス結腸癌モデルにおいて比較する実験において得られた結果を示す。モデルは、CT26細胞100,000個の、Balb/cマウス（処置群1つ当たりのマウスの $n = 8$ ）の右脇腹への皮下注入により確立した。

40

【0770】

V4または抗PD-L1抗体を、3日目から、3日ごとに、投与1回当たり300 μg で投与した。投与1回当たり300 μg のV4+300 μg の抗PD-L1抗体による組合せ処置もまた、解析に組み入れた。

【0771】

抗VISTA抗体クローンである、V4は、このモデルにおいて、高度に強力であり、腫瘍増殖を、約60%阻害することが可能であることが見出された。

【0772】

21日目に、腫瘍を採取し、NewmanらNat Methods.（2015）、

50

12(5): 453~457に記載された方法に従う、RNA-seq解析により、Arg1 RNA発現について評価した。結果を、図39に示す。4M2-C12による処置は、21日目の腫瘍内における、Arg1発現の著明な低減と関連した。

【0773】

別の実験では、CT26細胞株に由来する、同系マウス結腸癌モデルは、CT26細胞100,000個の、Balb/cマウス(処置群1つ当たりのマウスのn=8)の右脇腹への皮下注入により確立し、マウスを、3日目から、3日ごとに、投与1回当たり300μgの、アイソタイプ対照抗体、抗PD-L1抗体クローンである、10F.9G2、抗VISTA抗体クローンである、V4(実施例5の[17])、抗TIGIT抗体クローンである、1G9、抗LAG-3抗体クローンである、C9B7W、抗TIM-3抗体クローンは、RMT3-23の投与により処置するか、または300μgの、抗PD-L1抗体クローン10F.9G2の、300μgずつの、他の抗体の各々の組合せ処置もまた、解析に組み入れた。

10

【0774】

15日目に検出された腫瘍増殖の阻害の計算結果を、図14に示す。この実験では、抗VISTA抗体クローンである、V4は、免疫チェックポイント分子に対する他の任意の単剤療法より強力な、腫瘍増殖の阻害剤であることが見出され、抗PD-L1療法と組み合わせると、良好な効能を及ぼすことが見出された。

【0775】

次いで、本発明者らは、CT26腫瘍を、同じ方式で確立する、さらなる実験を実施し、マウスに、隔週で、300μgの、抗VISTA抗体クローンである、V4、200μgの、抗PD-L1抗体クローンである、10F.9G2、300μgの、抗VISTA抗体クローンである、V4+200μgの、抗PD-L1抗体クローンである、10F.9G2、または対照条件としてのPBSを投与した。実験の終了時に、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、NewmanらNat Methods.(2015)、12(5): 453~457において記載された方法に従い、腫瘍を、RNA-seqにより解析して、MDS C、CD8+ T細胞、およびTregの相対数を決定した。

20

【0776】

結果を、図15に示す。抗VISTA抗体クローンである、V4(単独の、または抗PD-L1処置と組み合わせた)による処置は、MDS Cの数を低減し、CD8 T細胞:Treg比を増大させることが見出された。抗VISTA抗体による処置と関連する、腫瘍微小環境内の、遺伝子発現の変化についての解析もまた、食作用過程(例えば、アクチンフィラメントベースの運動)に参与する遺伝子の発現の上方調節、およびアルギナーゼ1の発現の下方調節(免疫抑制性でない環境を結果としてもたらす)を明らかにした。

30

【0777】

さらなる実験では、CT26細胞株に由来する、同系マウス結腸癌モデルを、上記で記載した通りに、Balb/cマウスにおいて確立し、マウスに、3日目から、3日ごとに、(i)600μgの、抗VISTA抗体クローンである、13D5-1、(ii)200μgの、抗PD-L1抗体クローンである、10F.9G2、(iii)600μgの、抗VISTA抗体クローンである、13D5-1+200μgの、抗PD-L1抗体クローンは、10F.9G2、または(iv)等容量のPBS(陰性対照としての)を投与した。

40

【0778】

結果を、図22に示す。抗VISTA抗体クローンである、13D5-1(単独の、または抗PD-L1処置と組み合わせた)は、このモデルにおいて、腫瘍増殖を阻害することが可能であることが見出された。

5.2.2 LL2細胞モデル

LL2モデルは、LL2細胞200,000個の、Balb/cマウス(処置群1つ当たりのマウスのn=8)の右脇腹への皮下注入により確立し、その後、マウスに、隔週で、600μgの、抗VISTA抗体クローンである、V4(実施例5の[17])、また

50

は陰性対照としての、等容量の溶媒を投与した。

【0779】

実験の結果を、図16に示す。抗VISTA抗体クローンである、V4は、このモデルにおいて、高度に強力であり、腫瘍増殖を、約44%阻害することが可能であることが見出された。

5.2.3 B16-BL6細胞モデル

B16-BL6モデルは、B16-BL6細胞200,000個の、C57BL/6マウス(処置群1つ当たりのマウスのn=8)の右脇腹への皮下注入により確立し、その後、マウスに、隔週(合計6回の投与にわたる)で、600μgの抗VISTA抗体クローンである、V4(実施例5の[17])、200μgの抗PD-1抗体である、RMP1-14(Bio X Cell)、600μgの抗VISTA抗体クローンである、V4+200μgの抗PD-1抗体、または陰性対照としての、等容量の溶媒を投与した。

10

【0780】

実験の結果を、図17に示す。抗VISTA抗体クローンである、V4は、このモデルにおいて、抗PD-1抗体処置と組み合わせると、高度に強力であることが見出された。

5.2.4 4T1細胞モデル

4T1細胞株に由来する、同系マウス乳癌モデルは、Balb/cマウスにおける、4T1細胞250,000個の、右脇腹への皮下注入により確立した。

【0781】

その後、マウスに、3日目から、3日ごとに(合計6回の投与にわたり)、300または600μgの、抗VISTA抗体クローンである、13D5-1、アイソタイプ対照抗体、または陰性対照としての、等容量の溶媒を投与した。

20

【0782】

実験の結果を、図23に示す。抗VISTA抗体クローンである、13D5-1は、このモデルにおいて、高度に強力であり、腫瘍増殖を、約70%阻害することが可能であることが見出された。

5.3 安全性についての薬理学、毒性学、および免疫毒性

抗VISTA抗体クローンである、V4、ならびにヒト化バージョンである、V4H1およびV4H2を、IMGTDomainGapAlign(Ehrenmannら、Nucleic Acids Res.、38、D301~307(2010))およびIEDB脱免疫化(Dhandara、Immunology. (2018)、153(1):118~132)ツールを使用して、コンピュータにより、安全性および免疫原性について解析した。

30

【0783】

抗VISTA抗体クローンである、V4H1およびV4H2は、ヒト重鎖および軽鎖に対して、ヒト化されたと考えられるのに十分な(すなわち、>85%の)相同性を有し、潜在的な免疫原性ペプチドの数が、安全であると考えられるのに十分なほど少なく、潜在的な開発可能性問題を引き起こさず、他の特性を所有しなかった。

【0784】

本発明者らまた、実施例5.2に記載される実験の経過中に、マウスを秤量し、肉眼剖検による徴候についても解析したが、抗VISTA抗体クローンである、V4で処置されたマウスは、PBSで処置された対照マウスとの差違を呈さなかった。図44は、実施例5.2.1に記載された研究の経過中に得られた結果を示す。

40

【0785】

本発明者らは、マウスに、900μgの、抗VISTA抗体クローンである、V4、または等容量のPBSの単回投与用量を注射する実験において、血液毒性についてさらに調べた。

【0786】

血液試料を得、HM5 Hematology Analyserを使用して、異なる種類の白血球の数について解析した。結果を、図18に示すが、多数の異なる細胞型は、C

50

Charles Riverによる参照範囲内にあり、V4処置群と、PBS処置群との間で異ならず、異なる群間で、臨床徴候、肉眼剖検、または体重の差違は検出されなかった。

【0787】

マウスはまた、肝毒性および腎毒性の相関因子についても解析され、結果を、図19に示す。検出されたレベルは、Charles Riverによる参照範囲内にあり、V4処置群と、PBS処置群との間で異ならなかった。

5.4 進行性充実性腫瘍の処置

ヒトにおける第一段階

標準治療による処置の後で、疾患の進行または処置の不耐容を示すが、十分な臓器機能およびECOG PSを示す、進行性または転移性の充実性腫瘍を伴う患者を、安全性補正型「Minimal Anticipated Biological Effect Level」(MABEL)法に従い計算された用量における、抗VISTA抗体である、V4(実施例2.2の[1])、V4H1(実施例2.2の[3])、またはV4H2(実施例2.2の[4])の静脈内注射により処置する。投与後28日間にわたり、患者をモニタリングする。

【0788】

次いで、Common Terminology Criteria for Adverse Events(CTCAE)に従い、患者を評価して、処置の安全性および忍容性を決定し、分子の薬物動態を決定した。

【0789】

抗VISTA抗体による処置は、安全かつ忍容性であることが見出される。

用量漸増：単剤療法

標準治療による処置の後で、疾患の進行または処置の不耐容を示すが、十分な臓器機能およびECOG PSを示す、進行性または転移性の充実性腫瘍を伴う患者(n=18~24)を、3+3モデルベースの、escalation with overdose control(EWOC)型用量漸増に従う、抗VISTA抗体である、V4(実施例2.2の[1])、V4H1(実施例2.2の[3])、またはV4H2(実施例2.2の[4])の静脈内注射により処置する。

【0790】

次いで、CTCAE(Common Terminology Criteria for Adverse Events)に従い、患者を評価して、処置の安全性および忍容性を決定し、分子の薬物動態および処置の有効性を評価した。最大耐量(MTD)および最大投与量(MAD)もまた決定した。

用量漸増：組合せ療法

標準治療による処置の後で、疾患の進行または処置の不耐容を示すが、十分な臓器機能およびECOG PSを示す、進行性または転移性の充実性腫瘍を伴う患者(n=9)を、抗PD-1または抗PD-L1抗体(3mg/kg)を伴う、3+3モデルベースの漸増に従い、抗VISTA抗体である、V4(実施例2.2の[1])、V4H1(実施例2.2の[3])、またはV4H2(実施例2.2の[4])により処置する。

【0791】

次いで、CTCAE(Common Terminology Criteria for Adverse Events)に従い、患者を評価して、処置の安全性および忍容性を決定し、分子の薬物動態および処置の有効性を評価した。

用量拡大

処置された患者を、全応答率、腫瘍マーカーの発現、循環腫瘍細胞、無増悪生存期間、全生存期間、安全性、および忍容性について解析する。

【0792】

抗VISTA抗体は、安全かつ忍容性であり、がん細胞の数/比率を低減し、腫瘍細胞マーカーの発現を低減し、無増悪生存期間を延長し、かつ、全生存期間を延長することが可能であることが見出される。

10

20

30

40

50

5.5 リンパ腫の処置

ヒトにおける第一段階

リンパ腫（NHLおよびHL）を伴う患者であって、第一選択の化学療法から利益を得なかった患者、同種幹細胞移植を施されたことがなく、リツキシマブ（NHL）およびニボルマブまたはペムブロリズマブ（HL）に应答する可能性が高い患者を、安全性補正型「Minimal Anticipated Biological Effect Level」（MABEL）法に従い計算された用量における、抗VISTA抗体である、V4（実施例2.2の[1]）、V4H1（実施例2.2の[3]）、またはV4H2（実施例2.2の[4]）の静脈内注射により処置する。投与後28日間にわたり、患者をモニタリングする。

【0793】

次いで、Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE）に従い、患者を評価して、処置の安全性および忍容性を決定し、分子の薬物動態を決定した。

【0794】

抗VISTA抗体による処置は、安全かつ忍容性であることが見出される。

用量漸増：単剤療法

リンパ腫（NHLおよびHL）を伴う患者であって、第一選択の化学療法から利益を得なかった患者、同種幹細胞移植を施されたことがなく、リツキシマブ（NHL）およびニボルマブまたはペムブロリズマブ（HL）に应答する可能性が高い患者を、3+3モデルベースの、escalation with overdose control（EWOC）型用量漸増に従う、抗VISTA抗体である、V4（実施例2.2の[1]）、V4H1（実施例2.2の[3]）、またはV4H2（実施例2.2の[4]）の静脈内注射により処置する。

【0795】

次いで、Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE）に従い、患者を評価して、処置の安全性および忍容性を決定し、分子の薬物動態および処置の有効性を査定した。最大耐量（MTD）および最大投与量（MAD）もまた決定した。

用量漸増：組合せ療法

リンパ腫（NHLおよびHL）を伴う患者であって、第一選択の化学療法から利益を得なかった患者、同種幹細胞移植を施されたことがなく、リツキシマブ（NHL）およびニボルマブまたはペムブロリズマブ（HL）に应答する可能性が高い患者を、抗PD-L1抗体を伴う、3+3モデルベースの漸増に従う、抗VISTA抗体である、V4（実施例2.2の[1]）、V4H1（実施例2.2の[3]）、またはV4H2（実施例2.2の[4]）の静脈内注射により処置する。

【0796】

次いで、Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE）に従い、患者を評価して、処置の安全性および忍容性を決定し、分子の薬物動態および処置の有効性を査定した。

用量拡大

処置された患者を、全应答率、がん細胞マーカーの発現、循環がん細胞、無増悪生存期間、全生存期間、安全性、および忍容性について解析する。

【0797】

抗VISTA抗体は、安全かつ忍容性であり、がん細胞の数/比率を低減し、腫瘍細胞マーカーの発現を低減し、無増悪生存期間を延長し、かつ、全生存期間を延長することが可能であることが見出される。

【0798】

実施例6

異なるFc領域を含む、VISTA結合性抗体の作製および特徴付け

10

20

30

40

50

6.1 異なるFc領域を含む、VISTA結合性抗体の作製および特徴付け

4M2-C12を、マウスIgG2a LALA PGフォーマットで作製した。分子は、配列番号249に示された配列を有する、重鎖ポリペプチドと、配列番号250に示された配列を有する、軽鎖ポリペプチドとのヘテロマーである。重鎖配列は、配列番号253に従い番号付けされた4および5位における、CH2領域内の、ロイシン(L)からアラニン(A)への置換と、配列番号253に従い番号付けされた99位における、プロリン(P)からグリシン(G)への置換とを含む。これらの置換は、文献において、L234A、L235A、およびP329Gと称され、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Lora、J. Biol. Chem (2017)、292(9): 3900~3908の、マウスIgG2a Fcにおいて記載されている。4M2-C12 mIgG2a LALA PGは、CHO細胞内の、重鎖ポリペプチドをコードする核酸と、軽鎖ポリペプチドをコードする核酸との共発現により作製し、その後、精製した。

10

【0799】

【表6】

抗原結合性分子	ポリペプチド	抗体
[18]	4M2-C12 mlgG2a LALA PG HC (配列番号249) + 4M2-C12 CL (配列番号250)	4M2-C12 mlgG2a LALA PG

20

4M2-C12はまた、マウスIgG2a NQフォーマットでも作製した。分子は、配列番号258に示された配列を有する、重鎖ポリペプチドと、配列番号250に示された配列を有する、軽鎖ポリペプチドとのヘテロマーである。重鎖配列は、配列番号253に従う、67位における、CH2領域内の、アスパラギン(N)からグルタミン(Q)への置換を含む。この置換は、文献において、N297Qと称され、例えば、Lora、J. Biol. Chem (2017)、292(9): 3900~3908の、マウスIgG2a Fcにおいて記載されている。4M2-C12 mIgG2a NQは、CHO細胞内の、重鎖ポリペプチドをコードする核酸と、軽鎖ポリペプチドをコードする核酸との共発現により作製し、その後、精製した。

30

【0800】

【表7】

抗原結合性分子	ポリペプチド	抗体
[19]	4M2-C12 mlgG2a NQ HC (配列番号258) + 4M2-C12 CL (配列番号250)	4M2-C12 mlgG2a NQ

40

4M2-C12を、マウスIgG1フォーマットで作製した。分子は、配列番号266に示された配列を有する、重鎖ポリペプチドと、配列番号250に示された配列を有する、軽鎖ポリペプチドとのヘテロマーである。4M2-C12 mIgG1は、CHO細胞内の、重鎖ポリペプチドをコードする核酸と、軽鎖ポリペプチドをコードする核酸との共発現により作製し、その後、精製した。

【0801】

50

【表 8】

抗原結合性分子	ポリペプチド	抗体
[20]	4M2-C12 mlgG1 HC (配列番号 266) + 4M2-C12 CL (配列番号 250)	4M2-C12 mlgG1

6.2 異なるFc領域を含むVISTA結合性抗体の、Fc受容体への結合についての解析

10

異なる抗体フォーマットの4M2-C12の、ヒト、カニクイザル、およびマウスのVISTAタンパク質への結合は、ELISAを介して査定し、マウスFc受容体およびマウスFcRnへの結合は、Pall ForteBio Octet QK 384システムを使用する、BLIにより査定した。

【0802】

ヒスチジンでタグ付けされた、mFcR1V(50036-M08H)、mFcRII(50326-M08H)、mFcRIIb(50030-M08H)、およびmFcRn(CT009-H08H)は、Sino Biologicalから得た。抗5xHIS(HIS1K)バイオセンサーは、ForteBio(18-5120)から購入した。

20

【0803】

反応速度実験のために、抗5xHISバイオセンサーを、PBS緩衝液(pH7.2)中で、60秒間にわたりインキュベートして、第1のベースラインを得、その後、120秒間にわたり、PBS(pH7.2)中に200nMのmFcR1V(hFcRIIaのオーソログ)、160nMのmFcRII(hFcRIIaのオーソログ)、75nMのmFcRIIb(hFcRIIbのオーソログ)、または120nMのmFcRnをロードした。ローディングの後、バイオセンサーを、PBS緩衝液(Fc受容体については、pH7.2とし、FcRnについては、pH5.8とする)中で、60秒間にわたりインキュベートして、第2のベースラインを得、PBS(Fc受容体については、pH7.2とし、FcRnについては、pH5.8とする)中に被験抗体の、2倍ずつ6点の系列希釈液(mFc受容体への結合については、2000nM~62.5nMとし、FcRnへの結合については、500nM~15.6nMとする)と共に、60秒間にわたりインキュベートして、会合曲線を得た。最後に、バイオセンサーを、PBS(mFcRについては、pH7.2とし、mFcRnについては、pH5.8とする)中で、120秒間にわたりインキュベートして、解離曲線を得た。反応速度およびアフィニティー定数は、会合および解離データの、1:1に結合モデルへのグローバルフィッティングにより計算した。

30

【0804】

4M2-C12-mIgG1の、異なるマウスFc受容体およびマウスFcRnへの結合についての解析の結果を、図25A~25Dに示す。

40

【0805】

4M2-C12-mIgG2aの、異なるマウスFc受容体およびマウスFcRnへの結合についての解析の結果を、図26A~26Dに示す。2つの個別の実験(1および2; 29A~29Cを参照されたい)を実施したが、図26A~26Dは、実験2において得られた結果を示す。異なるFc受容体について検出された結合のレベルは、学術文献において報告されたレベルと同等であった。

【0806】

4M2-C12-mIgG2a LALA PGの、異なるマウスFc受容体およびマウスFcRnへの結合についての解析の結果を、図27A~27Dに示す。mFcRI

50

V、mFc R I I I、およびmFc R I I bへの結合のレベルは、無視できる / 検出不能のレベルであり、mFc R nへの結合のレベルは、4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 aによる、mFc R nへの結合のレベルと同等であった。

【0807】

4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 a N Qの、異なるマウスFc 受容体およびマウスFc R nへの結合についての解析の結果を、図28A ~ 28Dに示す。

【0808】

4 M 2 - C 1 2 - m I g G 1、4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 a、4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 a L A L A P Gおよび4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 a N Qについて決定された、異なるFc受容体への結合についての、 K_{on} 、 K_{dis} 、および K_D 値を、図29A ~ 29Cの表にまとめる。

10

【0809】

実施例7

異なるFc領域を含む、VISTA結合性抗体についての、*in vivo*における解析
4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 aおよび4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 a L A L A P G (実施例6.1を参照されたい)を、*in vivo*の、同系EL4 T細胞白血病/リンパ腫モデルにおいて、がんを処置する有効性について評価した。

【0810】

EL4細胞は、10%のウマ血清(FBS)および1%のPen/Strepを補充したDMEM中で培養した。細胞は、5%のCO₂インキュベーター内、37℃で培養した。

20

【0811】

約6週齢のC57BL/6マウスは、Invivos (Singapore) から得た。動物は、特定の無病原体条件下で飼育し、Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) ガイドラインに準拠して処置した。C57BL/6マウスの右脇腹に、EL4 T細胞白血病/リンパ腫細胞 2×10^5 個を接種した。腫瘍の植込み後、腫瘍が、 $350 \sim 400 \text{ mm}^3$ のサイズに到達したら、マウスを、以下の処置群：用量を 25 mg/kg とする、a) 溶媒対照(PBS)、b) 4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 a (実施例5の[17])、またはc) 4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 a - L A L A P G (実施例6の[18])へと無作為化した。処置を、3日ごと、合計5回の投与にわたり、腹腔内投与した。

30

【0812】

腫瘍体積は、デジタル式キャリパーを使用して、毎週3回測定し、式 $[L \times W^2 / 2]$ を使用して計算した。溶媒対照処置群の腫瘍が、 $> 1.5 \text{ cm}$ の長さで測定されたら、研究の終点に到達したと考えた。

【0813】

結果を、図30A ~ 30Cに示す。研究の最終日(植込み後23日目)までに、4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 aおよび4 M 2 - C 1 2 - m I g G 2 a L A L A P G処置群のいずれにおける平均値腫瘍体積も、信頼できる測定のためのサイズを下回った($< 30 \text{ mm}^3$)。対照的に、溶媒(PBS)処置群内のマウスにおける平均腫瘍体積は、18日目までに、 2000 mm^3 を超え、全ての動物を安楽死させた。

40

【0814】

したがって、4 M 2 - C 1 2は、m I g G 2 aおよびm I g G 2 a L A L A P Gのいずれのフォーマットでも、強力な腫瘍増殖の阻害を呈することが見出された。

【0815】

高度に確立されたEL4腫瘍保有マウスの、抗VISTA抗体である、4 M 2 - C 1 2による処置は、単剤療法として、極めて効果的であることが見出され、腫瘍の除去を結果としてもたらした。

【0816】

4 M 2 - C 1 2の生物学的活性は、マウスFc 受容体のエンゲージメントに依存しないことが見出されたことから、4 M 2 - C 1 2が、VISTA媒介性シグナル伝達の阻害

50

を通して、その生物学的活性を及ぼすことが強く示唆される。

【0817】

実施例 8

抗体が結合する V I S T A のエピトープについての解析

抗 V I S T A 抗体が、V I S T A への結合について、互いと競合するのかどうかを決定するように、それらを評価した。

【0818】

V S T B 1 1 2 は、いくつかの領域内で、V I S T A に結合することが示唆されている。メジャーエピトープは、配列番号 1 の 5 9 ~ 6 8 位および 8 6 ~ 9 7 位 (すなわち、配列番号 2 7 1 および 2 7 2) に対応することが提起されている。マイナーエピトープは、配列番号 1 の 7 1 ~ 8 4 位および 1 5 0 ~ 1 6 6 位 (すなわち、配列番号 2 7 3 および 2 7 4) に対応することが提起されている (例えば、W O 2 0 1 7 / 1 3 7 8 3 0 A 1、例えば、段落 [0 3 0 2] を参照されたい)。V S T B 1 1 2 については、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、W O 2 0 1 5 / 0 9 7 5 3 6 A 2 において記載されている。

10

【0819】

I G N 1 7 5 A は、成熟タンパク質の、最初の 3 2 アミノ酸内で (すなわち、配列番号 1 の 3 3 ~ 6 4 位 (すなわち、配列番号 2 7 5) 内で)、V I S T A に結合すると考えられる。I G N 1 7 5 A については、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、W O 2 0 1 4 / 1 9 7 8 4 9 A 2 において記載されている。

20

【0820】

Octet QK384 システム (ForteBio) を使用する B L I により、エピトープピニング実験を実施した。略述すると、P B S 中のヒト V I S T A - H i s 組換えタンパク質 (4 . 7 μ g / m l) を、5 分間にわたり、抗 5 × H I S センサー (H I S 1 K、ForteBio) へと固定化した。P B S 中のベースラインのシグナルを 3 0 秒間にわたり測定してから、P B S 中の 4 0 0 n M の飽和抗体を、1 0 分間にわたり、1 0 0 0 r p m の攪拌速度でロードし、P B S を使用して、1 2 0 秒間にわたる解離ステップにかけた。その後、バイオセンサーを、P B S 中に 3 0 0 n M の競合抗体により、5 分間にわたり、1 0 0 0 r p m の攪拌速度で処理するのに続き、P B S を使用して、1 2 0 秒間にわたる解離ステップにかけた。

30

【0821】

実験では、以下の抗原結合性分子：

- ・ I g G 1 フォーマットにおける、4 M 2 - C 1 2 (V 4) (実施例 2 . 2 の [1])
- ・ I g G 1 フォーマットにおける、4 M 2 - C 1 2 の、ヒト化 / アフィニティー成熟型変異体 (V 4 - C 1) (実施例 1 3 の [2 1])
- ・ I G N 1 7 5 A I g G 1 (I G N 1 7 5 A H C (配列番号 2 6 7) + I G N 1 7 5 A L C (配列番号 2 6 8) を含む)
- ・ V S T B 1 1 2 I g G 1 (V S T B 1 1 2 H C (配列番号 2 6 9) + V S T B 1 1 2 L C (配列番号 2 7 0) を含む)

について解析した。

40

【0822】

以下の抗原 / 飽和抗体 / 競合抗体の組合せについて調べた：

【0823】

50

【表 9】

抗原	飽和抗体	競合抗体
ヒト VISTA	V4-C1 IgG1	IGN175A IgG1
ヒト VISTA	V4-C1 IgG1	V4-C1 IgG1
ヒト VISTA	V4-C1 IgG1	VSTB112 IgG1
ヒト VISTA	VSTB112 IgG1	IGN175A IgG1
ヒト VISTA	IGN175A IgG1	V4-C1 IgG1
ヒト VISTA	VSTB112 IgG1	V4-C1 IgG1
ヒト VISTA	IGN175A IgG1	IGN175A IgG1
なし(PBS)	V4-C1 IgG1	IGN175A IgG1

結果を、図 3 1 A および 3 1 B に示す。

【0824】

V4 および V4-C1 IgG1 は、VISTA への結合について、IGN175A と競合しないことが見出された。VSTB112 は、VISTA への結合について、V4、V4-C1、および IGN175A と、部分的に競合することが見出された。競合抗体の添加時における、応答 (nm 単位) の変化を、下記に示す。

【0825】

【表 10】

飽和抗体	競合抗体		
	IGN175A	V4-C1 IgG1	VSTB112
IGN175A	0.0454	1.4362	-
V4-C1 IgG1	1.0661	-0.0158	-0.0124
VSTB112	0.1392	0.1579	-

結果は、4M2-C12 と IGN175A とが、VISTA の、局所的に遠く離れている領域に結合し、VSTB112 が、4M2-C12 および IGN175A に対して近位の領域内で、VISTA に結合することを指し示す。

【0826】

V1-C1 と IGN175A とが、VISTA への結合について競合しないという事実は、VSTB112 が、VISTA への結合について、IGN175A と競合するという観察と併せて、4M2-C12 の CDR を含む抗体が、IGN175A が結合する、VISTA のエピトープと同一ではなく、VSTB112 が結合する、VISTA のエピトープともまた同一でない、VISTA のエピトープに結合することを指し示す。

【0827】

VISTA についての配列、4M2-C12 を惹起するのに使用される免疫原、種交差反応性データの解析から、本発明者らは、4M2-C12 およびその派生体は、配列番号 322 に示される配列 (配列番号 1 の 76 ~ 81 位に対応する) に結合すると結論づけた。

【0828】

実施例 9

VISTA 結合性抗体が、T 細胞の増殖を、VISTA 媒介性阻害からレスキューする能力についての解析

抗 VISTA 抗体が、VISTA 媒介性シグナル伝達の阻害作用からレスキューする能力を、in vitro アッセイにおいて解析した。

【0829】

略述すると、96ウェルプレートを、濃度比を、1:1(2.5 µg/mlの抗CD3:2.5 µg/mlのVISTA/対照Ig)、または2:1(2.5 µg/mlの抗CD3:1.25 µg/mlのVISTA/対照Ig)とする、抗CD3およびVISTA-Igまたは対照Igでコーティングした。無関係な抗原Igを、対照条件として使用した。プレートを、4 で、一晩にわたりインキュベートした。

【0830】

PBMCは、新たに回収された血液試料から精製し、human Pan T Cell Isolated Kit (Miltenyi Biotec)を使用して、T細胞について、さらにエンリッチした。次いで、エンリッチされたT細胞集団を、CFSEで標識付けした。

10

【0831】

ウェルを、PBSで、3回にわたり洗浄し、CFSEで標識付けされたT細胞100,000個を、最終濃度を20 µg/mlまたは50 µg/mlとする、4M2-C12 IgG1(実施例2.2の[1])の存在下で、もしくは最終濃度を20 µg/mlとする、VSTB112の存在下で、または添加される抗体の非存在下で、各ウェルの、10%のFBSを補充した、完全RPMI 1640培地へと添加した。

【0832】

5日後、細胞を採取し、蛍光コンジュゲート抗CD4抗体および抗CD8抗体で標識付けし、Macsqunt Analyzer 10を使用するフローサイトメトリーにより解析した。

20

【0833】

実験の結果を、図33A~33Dに示す。4M2-C12は、CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞のいずれもが増殖する能力を回復させることが見出された。

【0834】

重要なことに、4M2-C12は、T細胞の増殖の回復において、VSTB112より効果的であることが見出された。

【0835】

実施例10

VISTA結合性抗体が、LPSに应答する、THP1細胞による、IL-6の産生を促進する能力についての解析

30

VISTA結合性抗体が、LPS刺激に应答する、THP1細胞による、IL-6の産生を促進する能力を、in vitroアッセイにおいて解析した。

【0836】

略述すると、未分化THP1細胞を、96ウェルプレート内の、FBSまたはpen/strepを伴わないRPMI培地中に、2連で(ウェル1つ当たりの細胞100,000個)播種した。その後、細胞を、2000 µg/ml~7.8 µg/mlの範囲の、異なる濃度の4M2-C12 IgG1(実施例2.2の[1])、または1000 µg/ml~7.8 µg/mlの範囲の、異なる濃度のVSTB112の存在下で、LPS(最終濃度を100 µg/mlとする)およびMnCl₂(100 µM)により処理した。3日後、細胞培養物上清を回収し、IL-6 Human ELISA Kit (Invitrogen)を使用して、IL-6のレベルを決定するために、ELISAにより解析した。

40

【0837】

結果を、図34Aおよび34Bに示す。4M2-C12は、LPSで刺激されたTHP1細胞によるIL-6の産生を、VSTB112より大幅に促進することが見出された。

【0838】

実施例11

in vivoにおける、VISTA結合性抗体が、IL-6の産生を促進する能力についての解析

50

4 M 2 - C 1 2 による処置に应答する、I L - 6 の産生を、i n v i v o において調べた。

【 0 8 3 9 】

略述すると、C 5 7 B L / 6 マウス (n = 3) に、単一の 6 0 0 μ g の、4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 a (実施例 5 の [1 7]) の単回投与の用量を投与し、血液試料を、マウスから、投与の 2 時間前、ならびに投与の 0 . 5 時間後、6 時間後、2 4 時間後、9 6 時間後、1 6 8 時間後、および 3 3 6 時間後に採取した。

【 0 8 4 0 】

M o u s e I L - 6 E L I S A K i t (A b c a m ; a b 1 0 0 7 1 2) を使用して、血清を、I L - 6 含有物について解析した。

10

【 0 8 4 1 】

結果を、図 3 5 に示す。I L - 6 は、4 M 2 - C 1 2 m I g G 2 a を投与した 0 . 5 時間後に、血清中で検出した。

【 0 8 4 2 】

実施例 1 2

単独の、または抗 P D - 1 / P D - L 1 抗体と組み合わせた、V I S T A 結合性抗体についての、i n v i v o における解析

1 2 . 1 C T 2 6 細胞モデル

T 細胞白血病 / リンパ腫の同系モデルは、C T 2 6 細胞 1 × 1 0 ⁵ 個を、B a l b / c マウスの右脇腹へと、皮下注入することにより作出した。

20

【 0 8 4 3 】

マウス (処置群 1 つ当たり 7 匹) に、

- ・ 6 0 0 μ g の 4 M 2 - C 1 2 I g G 2 a (実施例 5 の [1 7])
- ・ 2 0 0 μ g の抗 P D - 1 抗体 (クローンである、R M P 1 - 1 4 (B i o x c e l l))
- ・ 6 0 0 μ g の 4 M 2 - C 1 2 I g G 2 a + 2 0 0 μ g の抗 P D - 1 抗体
- ・ P B S だけ

を、3 日ごと、合計 7 回の投与にわたり、腹腔内投与した。

【 0 8 4 4 】

腫瘍体積は、デジタル式キャリパーを使用して、毎週 3 回測定し、式 [L × W ² / 2] を使用して計算した。対照アームの腫瘍が、> 1 . 5 c m の長さで測定されたら、研究の終点に到達したと考えた。

30

【 0 8 4 5 】

結果を、図 3 6 A および 3 6 B に示す。抗 V I S T A 抗体である、4 M 2 - C 1 2 および抗 P D - 1 による組合せ療法は、いずれかの薬剤が、単剤療法として使用される場合より大きな程度で、腫瘍増殖を阻害した。

【 0 8 4 6 】

腫瘍浸潤性 C D 4 5 + 細胞についての免疫プロファイリングを企図した。略述すると、実験の 2 2 日目に、腫瘍を採取し、単一の細胞懸濁液へと加工し、免疫細胞表面タンパク質 (C D 4 5、C D 4、C D 8、C D 2 5、C D 1 1 b、L y 6 G、および L y 6 C) に特異的な抗体で染色した。

40

【 0 8 4 7 】

試料を、フローサイトメトリーにより解析し、以下の、異なる免疫細胞表面タンパク質についての、それらの染色に基づき、以下の免疫細胞サブセット：

- ・ C D 4 細胞 : C D 4 5 + C D 4 + ;
- ・ C D 8 T 細胞 : C D 4 5 + C D 8 + ;
- ・ T r e g 細胞 : C D 4 5 + C D 4 + C D 2 5 + ;
- ・ 顆粒球型 M D S C (g - M D S C) : C D 4 5 + C D 1 1 b + L y 6 G + L y 6 C 1 0 / -
- ・ 単球型 M D S C (m - M D S C) : C D 4 5 + C D 1 1 b + L y 6 G - L y 6 C h i

50

/ +

へと分類した。

【0848】

表示の表現型を有する、腫瘍浸潤性CD45+細胞の百分率を、下記にまとめる：

【0849】

【表11】

処置群	CD4細胞	CD8細胞	Treg	g-MDSC	m-MDSC
PBS	1.03%	5.99%	0.09%	33.08%	9.8%
4M2-C12 IgG2a	1.66%	6.51%	0.11%	26.4%	8.34%
抗PD-1抗体	1.05%	7.21%	0.14%	46.2%	15.25%
4M2-C12 IgG2a + 抗PD-1抗体	1.55%	9.98%	0.22%	15.66%	14.04%

10

g-MDSCであった腫瘍浸潤性CD45+細胞の百分率を、図37に示す。4M2-C12(単独の、または抗PD-1と組み合わせた)による処置は、腫瘍浸潤性CD45+細胞の中の、g-MDSCの比率を、著明に低減した。

【0850】

血液は、18日目に、マウスから得、血清を、MACSPlex cytokine 10 Kit for mouse (Miltenyi Biotec)を使用する解析により、異なる多様なサイトカインのレベルについて解析した。

20

【0851】

結果を、図38A~38Eに示す。

12.2 B16-BL6細胞モデル

図40Aおよび40Bは、上記の実施例5.2.3に記載された研究(結果は、図17に示される)の、18日間への拡張の結果を示す。抗VISTA抗体である、4M2-C12および抗PD-1による組合せ療法は、いずれかの薬剤が、単剤療法として使用される場合より大きな程度で、腫瘍増殖を阻害した。

【0852】

腫瘍浸潤性CD45+細胞についての免疫プロファイリングを企図した。略述すると、実験の18日目に、腫瘍を採取し、単一の細胞懸濁液へと加工し、免疫細胞表面に特異的な抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析し、上記の実施例12.1に記載した通りに、細胞を、免疫細胞サブセットへと分類した。

30

【0853】

表示の表現型を有する、腫瘍浸潤性CD45+細胞の百分率を、下記にまとめる：

【0854】

【表12】

処置群	CD4細胞	CD8細胞	Treg	g-MDSC	m-MDSC
PBS	2.72%	8.79%	1.42%	2.06%	6.68%
4M2-C12 IgG2a	2.84%	10.7%	1.58%	1.65%	13.94%
抗PD-1抗体	0.95%	3.43%	0.51%	36.65%	14.12%
4M2-C12 IgG2a + 抗PD-1抗体	3.58%	10.6%	0.82%	5.45%	14.44%

40

g-MDSCであった腫瘍浸潤性CD45+細胞の百分率を、図41に示す。

12.3 EL4細胞モデル

T細胞白血病/リンパ腫の同系モデルは、EL4細胞2x10⁵個を、C57BL/6

50

マウスの右脇腹へと、皮下注入することにより確立した。

【0855】

マウス（処置群1つ当たり7匹）に、

- ・ 600 μg の 4M2 - C12 IgG2a（実施例5の[17]）
- ・ 200 μg の抗PD-1抗体（クローンである、RMP1-14（Bioxcell））
- ・ 600 μg の 4M2 - C12 IgG2a + 200 μg の抗PD-1抗体
- ・ PBS だけ

を、3日ごと、合計5回の投与にわたり、腹腔内投与した。

【0856】

腫瘍体積は、デジタル式キャリパーを使用して、毎週3回測定し、式 [L × W 2 / 2] を使用して計算した。対照アームの腫瘍が、> 1.5 cm の長さで測定されたら、研究の終点に到達したと考えた。

10

【0857】

結果を、図42に示す。抗VISTA抗体である、4M2 - C12および抗PD-1による組合せ療法は、いずれかの薬剤が、単剤療法として使用される場合より大きな程度で、腫瘍増殖を阻害した。

【0858】

腫瘍浸潤性CD45+細胞についての免疫プロファイリングを企図した。略述すると、実験の16日目に、腫瘍を採取し、単一の細胞懸濁液へと加工し、免疫細胞表面に特異的な抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析し、上記の実施例12.1に記載した通りに、細胞を、免疫細胞サブセットへと分類した。

20

【0859】

表示の表現型を有する、腫瘍浸潤性CD45+細胞の百分率を、下記にまとめる：

【0860】

【表13】

処置群	CD4細胞	CD8細胞	Treg	g-MDSC	m-MDSC
PBS	3.71%	0.55%	0.18%	19.41%	0.88%
4M2-C12 IgG2a	7.4%	1.84%	0.19%	14.51%	0.94%
抗PD-1抗体	4.35%	3.04%	0.09%	20.91%	0.81%
4M2-C12 IgG2a + 抗PD-1抗体	6.53%	2.18%	0.35%	10.16%	0.33%

30

g - M D S Cであった腫瘍浸潤性CD45+細胞の百分率を、図43に示す。4M2 - C12（単独の、または抗PD-1と組み合わせた）による処置は、腫瘍浸潤性CD45+細胞の中の、g - M D S Cの比率を、著明に低減した。

12.4 結論

PD-1 / PD-L1によるシグナル伝達の阻害が、CT26、B16 - BL6、およびEL4モデルにおいて、腫瘍浸潤性CD45+細胞の中の、g - M D S Cの比率を増大させるのに対し、4M2 - C12による処置は、g - M D S Cの拡大を抑制する。

40

【0861】

実施例13

VISTA結合性抗体についての、さらなる特徴付け

さらなるVISTA結合性抗原結合性分子を作製した。

【0862】

50

【表 1 4】

抗原結合性分子	ポリペプチド	抗体
[21]	V4-C1 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 311) + V4-C1 VL-Cκ (配列番号 312)	抗 VISTA クローンである、V4-C1 IgG1
[22]	V4-C9 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 313) + V4-C9 VL-Cκ (配列番号 314)	抗 VISTA クローンである、V4-C9 IgG1
[23]	V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 315) + V4-C24 VL-Cκ (配列番号 316)	抗 VISTA クローンである、V4-C24 IgG1
[24]	V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 315) + V4-C26 VL-Cκ (配列番号 317)	抗 VISTA クローンである、V4-C26 IgG1
[25]	V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 315) + V4-C27 VL-Cκ (配列番号 318)	抗 VISTA クローンである、V4-C27 IgG1
[26]	V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 315) + V4-C28 VL-Cκ (配列番号 319)	抗 VISTA クローンである、V4-C28 IgG1
[27]	V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 315) + V4-C30 VL-Cκ (配列番号 320)	抗 VISTA クローンである、V4-C30 IgG1
[28]	V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (配列番号 315) + V4-C31 VL-Cκ (配列番号 321)	抗 VISTA クローンである、V4-C31 IgG1

10

20

30

40

V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、およびV4-C31を、IMGT DomainGapAlign (Ehrenmannら、Nucleic Acids Res.、38、D301~307 (2010)) およびIEDB脱免疫化 (Dhandara、Immunology. (2018)、153(1):118~132) ツールを使用して、コンピュータにより、安全性および免疫原性について解析した。

【0863】

V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、およびV4-C31は、ヒト重鎖およびヒト軽鎖に対して、ヒト化され

50

たとえるのに十分な（すなわち、 $> 85\%$ の）相同性を有し、潜在的な免疫原性ペプチドの数が、安全であると考えられるに十分なほど少なく（図53を参照されたい）、潜在的な開発可能性問題を引き起こしうる、他の特性を所有しなかった。

13.1 BLIによる、結合アフィニティーの解析

V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、およびV4-C31（すなわち、[21]~[28]）の、ヒトおよびマウスのVISTAタンパク質ならびにヒトPD-L1への結合を、Pall Forte Bio Octet QK 384システムを使用する、BLIにより査定した。

【0864】

略述すると、抗5×HISバイオセンサーを、PBS緩衝液（pH7.2）中で、60秒間にわたりインキュベートして、第1のベースラインを得、その後、120秒間にわたり、PBS（pH7.2）中に180nMのhVISTA、180nMのmVISTA、または250nMのhPD-L1をロードした。ローディングの後、バイオセンサーを、pH7.2のPBS緩衝液中で、60秒間にわたりインキュベートして、第2のベースラインを得、PBS pH7.2中の、被験抗体の、2倍ずつ6点の系列希釈液（500nM~15.6nM）と共に、120秒間または900秒間にわたりインキュベートして、会合曲線を得た。最後に、バイオセンサーを、PBS pH7.2中で、120秒間にわたりインキュベートして、解離曲線を得た。反応速度およびアフィニティー定数は、会合および解離データの、1:1に結合モデルへのグローバルフィッティングにより計算した。

【0865】

V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、またはV4-C31のうちのいずれも、ヒトPD-L1への、著明な結合を呈さなかった（図45C）。

【0866】

この実験において、V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、およびV4-C31の、ヒトVISTAおよびマウスVISTAへの結合について計算された、反応速度および熱力学定数を、図45Dに示す。

【0867】

V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、およびV4-C31による、マウスVISTAタンパク質への結合を、VSTB112 IgG1（VSTB112 HC（配列番号269）+VSTB112 LC（配列番号270）を含む）についての査定を含む、別個の実験において解析した。

【0868】

VSTB112は、マウスVISTAタンパク質への著明な結合を呈さなかった（図46A）。この実験において、V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、およびV4-C31の、マウスVISTAへの結合について計算された、反応速度および熱力学定数を、図46Bに示す。

【0869】

さらなる実験では、V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、およびVSTB112 IgG1の、ヒトVISTAおよびマウスVISTAへの結合について解析し、反応速度および熱力学定数の計算値を、図47Cに示す。

【0870】

別の実験では、V4（実施例2.2の[1]）およびVSTB112 IgG1（VSTB112 HC（配列番号269）+VSTB112 LC（配列番号270）を含む）の、ヒトVISTA、マウスVISTAおよびヒトCD47への結合について解析した。抗5×HISバイオセンサーを、PBS緩衝液（pH7.2）中で、60秒間にわたりインキュベートして、第1のベースラインを得、その後、120秒間にわたり、PBS（pH7.2）中に180nMのhVISTA、180nMのmVISTA、または300nMのhCD47をロードした。ローディングの後、バイオセンサーを、pH7.2のPB

10

20

30

40

50

S緩衝液中で、60秒間にわたりインキュベートして、第2のベースラインを得、PBS pH 7.2中の、被験抗体の系列希釈液(1500 nM ~ 46.9 nM)と共に、120秒間にわたりインキュベートして、会合曲線を得た。最後に、バイオセンサーを、PBS pH 7.2中で、120秒間にわたりインキュベートして、解離曲線を得た。反応速度およびアフィニティー定数は、会合および解離データの、1:1に結合モデルへのグローバルフィッティングにより計算した。

【0871】

V4も、VSTB112も、ヒトCD47への結合を呈さなかった。VSTB112が、マウスVISTAタンパク質への著明な結合を呈さなかったのに対し、V4は、これを呈した。反応速度および熱力学定数の計算値を、図48Bに示す。

10

13.2 ELISAによる結合アフィニティーの解析

ELISAを使用して、異なる抗体の、ヒトVISTAおよびマウスVISTAへの結合について評価した。ELISAは、上記の実施例3.3に記載した通りに実施した。

【0872】

実験では、以下の抗体：

- ・4M2-C12 IgG1 (実施例2.2の[1]；図では、「V4pr」と称される)
- ・V4-C1 IgG1 (実施例13の[21])
- ・V4-C9 IgG1 (実施例13の[22])
- ・V4-C24 IgG1 (実施例13の[23])
- ・V4-C26 IgG1 (実施例13の[24])
- ・V4-C27 IgG1 (実施例13の[25])
- ・V4-C28 IgG1 (実施例13の[26])
- ・V4-C30 IgG1 (実施例13の[27])
- ・V4-C31 IgG1 (実施例13の[28])
- ・VSTB112 IgG1 (VSTB112 HC (配列番号269) + VSTB112 LC (配列番号270)を含む)
- ・アテゾリズマブ
- ・ヒトIgG1アイソタイプ対照

20

について解析した。

30

【0873】

得られた結果を、図49Aおよび49Bに示し、抗体の、表示のタンパク質への結合についてのELISAから計算されたEC50 (nM) 値を、図49Cにまとめる。

【0874】

V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、V4-C31、VSTB112、およびアイソタイプ対照抗体の、ヒトVISTAまたはマウスVISTAへの結合について解析する、さらなる実験を実施した。結果を、図50Aおよび50Bに示し、抗体の、表示のタンパク質への結合についてのELISAから計算されたEC50 (nM) 値を、図50Cにまとめる。

【0875】

V4-C1、V4-C9、V4-C24、V4-C26、V4-C27、VSTB112、およびアイソタイプ対照抗体の、ヒトVISTAまたはマウスVISTAへの結合について解析する、さらなる実験を実施した。結果を、図51Aおよび51Bに示し、抗体の、表示のタンパク質への結合についてのELISAから計算されたEC50 (nM) 値を、図51Cにまとめる。

40

【0876】

V4、V4-C24、V4-C26、V4-C27、V4-C28、V4-C30、およびV4-C31、ならびにアイソタイプ対照抗体の、ヒトの、VISTA、PD-L1、B7H3、B7H4、B7H6、B7H7、PD-1、およびCTLA-4への結合について解析する、さらなる実験を実施した。結果を、図56A~56Gに示す。V4-C

50

24、V4 - C26、V4 - C27、V4 - C28、V4 - C30、およびV4 - C31の各々は、ヒトVISTAへの強い結合を呈し、タンパク質のB7ファミリーの他のメンバーに対する交差反応性を呈さなかった。

【0877】

さらなる実験では、V4（図57では、「V4P」と称される）、V4 - C24、V4 - C26、V4 - C27、V4 - C28、V4 - C30、およびV4 - C31を、ヒトVISTA、マウスVISTA、ラットVISTA、およびカニクイザルVISTAへの結合について解析した。得られた結果を、図57A～57Hに示し、抗体の、表示のタンパク質への結合についてのELISAから計算されたEC50（M）値を、図57Iにまとめる。

10

【0878】

V4、ならびにV4由来クローンである、V4 - C24、V4 - C26、V4 - C27、V4 - C28、V4 - C30、およびV4 - C31の全ては、ヒトVISTA、マウスVISTA、ラットVISTA、およびカニクイザルVISTAに結合することが見出された。

13.3 フローサイトメトリーによる、VISTA発現細胞への結合についての解析

抗VISTA抗体を、本質的に、上記の実施例3.1に記載した通りに、VISTA発現細胞に結合する、それらの能力について解析した。

【0879】

略述すると、トランスフェクト細胞、またはヒトVISTAもしくはマウスVISTAをコードするベクターをトランスフェクトされたHEK293細胞を、1 μg/mlの抗VISTA抗体またはアイソタイプ対照抗体と共に、4℃で1時間にわたりインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、10 μg/mlのFITCコンジュゲート抗ヒトFc抗体と共に、4℃で1時間にわたりインキュベートした。細胞を、再度洗浄し、次いで、フローサイトメトリーにより解析した。

20

【0880】

実験では、以下の抗体：

- ・4M2 - C12 IgG1（実施例2.2の[1]；図では、「V4P」と称される）
- ・V4 - C24 IgG1（実施例13の[23]）
- ・V4 - C26 IgG1（実施例13の[24]）
- ・V4 - C27 IgG1（実施例13の[25]）
- ・V4 - C28 IgG1（実施例13の[26]）
- ・V4 - C30 IgG1（実施例13の[27]）
- ・V4 - C31 IgG1（実施例13の[28]）
- ・VSTB112 IgG1（VSTB112 HC（配列番号269）+VSTB112

30

2 LC（配列番号270）を含む）

- ・ヒトIgG1アイソタイプ対照

について解析した。

【0881】

結果を、図58A～58Cに示す。

40

13.4 示差走査蛍光測定法による、熱安定性についての解析

異なる抗体の熱安定性を、上記の実施例3.4に記載した通りに、示差走査蛍光測定解析により評価した。

【0882】

V4 - C1、V4 - C9、V4 - C24、V4 - C26、V4 - C27、V4 - C28、V4 - C30、V4 - C31（すなわち、[21]～[28]）、およびVSTB112の熱安定性に対する、示差走査蛍光測定解析（3連の）について得られた生データの一次微分を、図52A～52Iに示し、結果を、図52Jにまとめる。

【0883】

- V4 - C1、V4 - C9、V4 - C24、V4 - C26、V4 - C27、V4 - C28

50

、V4 - C30、およびV4 - C31は、Fab領域に対する溶融温度(T_m)が、V4と比較して高く(67.5)、したがって、熱安定性が改善されていることが見出された。

【0884】

実施例14

免疫組織化学における、VISTA結合性抗体の使用

抗VISTA抗体である、4M2 - C12 mIgG2a(実施例5の[17])を、ヒトVISTAタンパク質を検出するために、免疫組織化学で使用される、その能力について評価した。

【0885】

切片の加工は、Bond試薬(Leica Biosystems)を使用して実施した。正常ヒト脾臓または正常ヒト卵巣に由来する、市販のパラフィン切片を、Bond Dewax溶液中で脱パラフィン処理し、再水和させた。次いで、切片を、ステップの間の、1倍濃度のBond洗浄液による、4~5回にわたるすすぎを伴う、以下の処理:(i)100で、40分間にわたる、Bond Epitope Retrieval溶液を伴う処理による抗原の露出;(ii)室温で、15分間にわたる、3.5%(v/v)のH₂O₂を伴う処理による、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング;(iii)室温で、30分間にわたる、10%のヤギ血清を伴う処理によるブロッキング;(iv)4で、一晩にわたる、9.37mg/ml溶液の希釈率を1:50とする、4M2 - C12 mIgG2aを伴うインキュベーション;(v)室温で、5分間にわたる、HRP - ポリマーコンジュゲートヤギ抗マウス抗体を伴うインキュベーション、および(vi)室温で、7分間にわたる、Bond Mixed DAB Refineによる現像に続く、反応を停止させる、脱イオン水によるすすぎにかけた。

【0886】

切片を、ヘマトキシリンにより、室温で5分間にわたり対比染色し、脱イオン水および1倍濃度のBond洗浄液ですすぎ、次いで、乾燥させ、合成の封入剤中でマウンティングし、高解像度で走査した。

【0887】

結果を、図59Aおよび59Bに示す。抗VISTA抗体は、脾臓の細胞質を染色したが、正常卵巣切片(対照)内の細胞は染色しなかった。

【0888】

実施例15

さらにVISTA結合性抗体が、T細胞の増殖および炎症促進性サイトカインの産生を、VISTA媒介性阻害からレスキューする能力についての解析

抗VISTA抗体を、T細胞を、VISTA媒介性抑制から解放する能力について特徴付けた。

【0889】

96ウェルプレートを、濃度を2.5μg/mlとする、抗CD3でコーティングし、4で、一晩にわたりインキュベートした。PBMCを、血液試料から単離し、T細胞を、PBMCからエンリッチし、上記の通りに、CSFEで標識付けし、次いで、CSFEで標識付けされたT細胞を、ヒトVISTAをコードする構築物をトランスフェクトしたHEK293-6E細胞と共に、2%のFBSを補充したRPMI 1640培地中に、2:1の比で共培養した。

【0890】

次いで、細胞を、濃度を0μg/ml(対照)、20μg/ml、または50μg/mlとする、4M2 - C12 - hIgG1(実施例2.2の[1])またはVSTB112で処置した。

【0891】

5日間後、細胞を採取し、フローサイトメトリーにより解析して、CSFE希釈プロファイルにより、細胞増殖を決定した。細胞培養物上清もまた採取し、INFレベルおよ

10

20

30

40

50

びTNF α レベルを、ELISAにより解析した。

【0892】

結果を、図60A~60Dに示す。図60Aおよび60Bは、4M2-C12-hIgG1が、T細胞を、増殖の、VISTA媒介性阻害から、用量依存的に解放したことを示す。図60Cおよび60Dは、4M2-C12-hIgG1が、T細胞を、INFおよびTNF α の産生の、VISTA媒介性阻害から解放したことを示す。

【0893】

さらなる実験では、未分化THP1細胞を、96ウェルプレート内の、FBSまたはpen/strepを伴わないRPMI培地中に、2連で播種し、細胞を、2000 μ g/ml~7.8 μ g/mlの濃度の範囲の、系列希釈された濃度の4M2-C12-hIgG1(実施例2.2の[1])、またはVSTB112の存在下で、LPS(100 μ g/ml)により刺激した。

10

【0894】

24時間後、細胞培養物上清を回収し、ELISAにより、IL-6およびTNF α について解析した。細胞はまた、固定し、透過処理し、フローサイトメトリーを介して、VISTAの存在についても解析した。

【0895】

結果を、図61A~61Cに示す。4M2-C12-hIgG1は、IL-6およびTNF α の、LPSで刺激されたTHP1細胞からの産生を、用量依存的に、VSTB112より、はるかに大きな程度で増大させることが見出された。

20

【0896】

さらなる実験では、未分化THP1細胞を、96ウェルプレート内の、FBSまたはpen/strepを伴わないRPMI培地中に、2連で播種し、細胞を、2000 μ g/ml~7.8 μ g/mlの濃度の範囲の、4M2-C12-hIgG1(実施例2.2の[1])、または4M2-C12-hIgG4(下記に示される[29])の存在下で、LPS(100 μ g/ml)およびMnCl₂(100 μ M)により刺激した。24時間後、細胞培養物上清を回収し、ELISAにより、IL-6について解析した。

【0897】

【表15】

抗原結合性分子	ポリペプチド	抗体
[29]	4M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 IgG4 (配列番号 330) + 4M2-C12 VL-C κ (配列番号 213)	抗VISTAクローンである、4M2-C12 IgG4

30

結果を、図62に示す。LPSで刺激されたTHP1細胞による、IL-6の産生の増大は、ヒトIgG1フォーマットにおける4M2-C12を伴う処置により誘導されるIL6レベルと、ヒトIgG4フォーマットにおける4M2-C12を伴う処置により誘導されるIL6レベルとの間で、有意差が観察されなかったため、Fc非依存的であることが見出された。

40

【0898】

実施例16

薬理学、毒性学、および免疫毒性についての、さらなる解析

急性投与研究では、ラットに、10mg/kg、25mg/kg、100mg/kg、または250mg/kgの、4M2-C12-hIgG1(実施例2.2の[1])または4M2-C12-hIgG4(実施例15の[29])の単回投与を行った。

【0899】

血液は、ベースライン(-2時間後)、投与の0.5時間後、6時間後、24時間後、

50

96時間後、168時間後、および336時間後に、ラットから得た。血清中の抗体を、ELISAにより定量した。

【0900】

薬物動態解析のためのパラメータ：最大濃度（ C_{max} ）、AUC（0～336時間）、AUC（0～無限大）、半減期（ $t_{1/2}$ ）、クリアランス（CL）、定常状態における分布容積（ V_{ss} ）は、非コンパートメントモデルから導出した。

【0901】

結果を、図63A～63Dに示す。

【0902】

別個の実験では、BALB/Cマウスに、50mg/kgの4M2-hIgG1（実施例2.2の[1]）、または等容量のPBSの単回投与を行った。血液試料は、96時間後に得、HM5 Hematology Analyserを使用して、異なる種類の白血球の数について解析した。血液試料はまた、肝毒性および腎毒性の相関因子についても解析した。

10

【0903】

代表的な結果を、図64A～64Cの表に示す。

【0904】

さらなる実験では、Sprague Dawleyラットに、250mg/kgの4M2-hIgG1（実施例2.2の[1]）、または等容量のPBSの単回投与を行った。血液試料は、6、24、96、および168時間後に得、HM5 Hematology Analyserを使用して、異なる種類の白血球の数について解析した。血液試料はまた、肝毒性、腎毒性、および脾毒性の相関因子についても解析した。

20

【0905】

代表的な結果を、図65A～65Cの表に示す。

【0906】

4M2-hIgG1の投与は、著明な毒性と関連しないことが見出され、血中の細胞型の細胞数を、著明には変更しなかった。

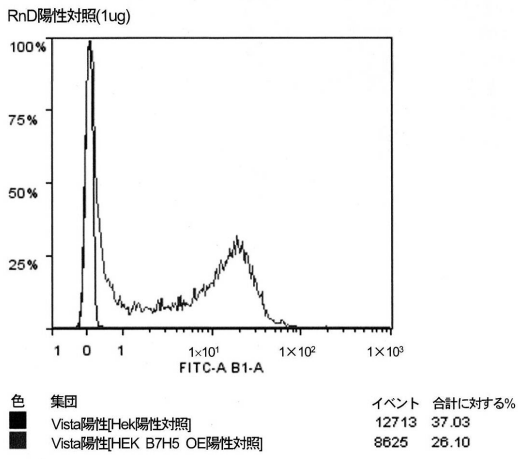
30

40

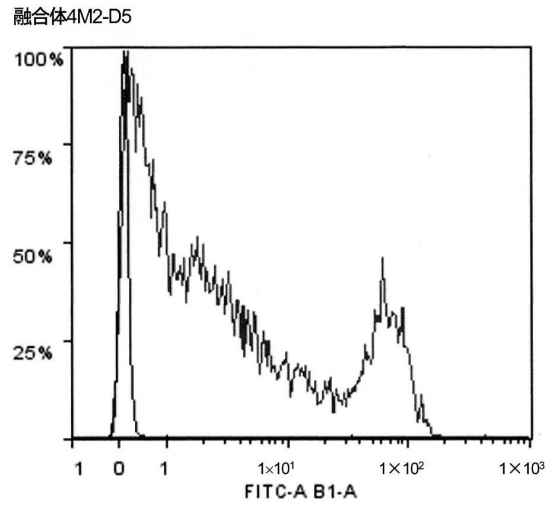
50

【図面】

【図 1 A】

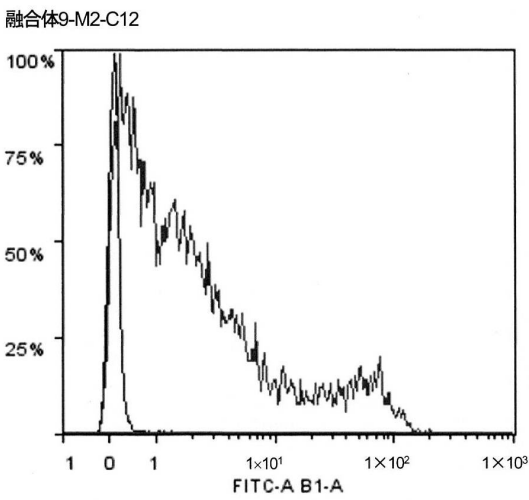


【図 1 B】

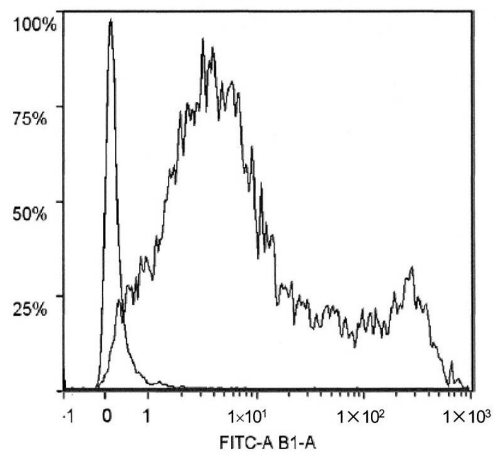


10

【図 1 C】



【図 1 D】



20

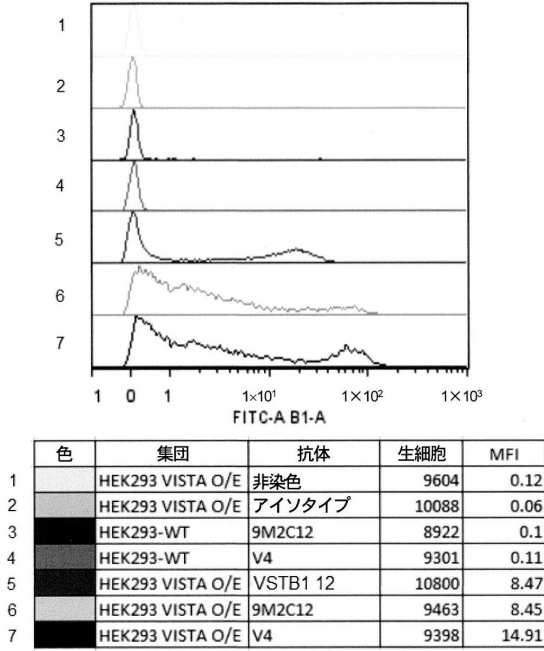
色	集団	抗体	合計に対する%
■	HEK293	V4	2.25
■	HEK293 VISTA O/E	V4	61.54

30

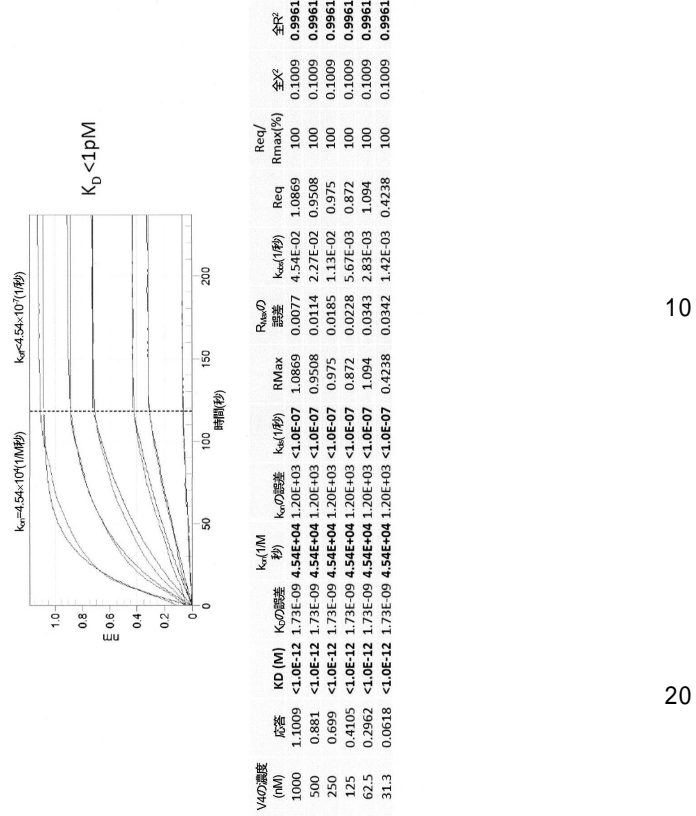
40

50

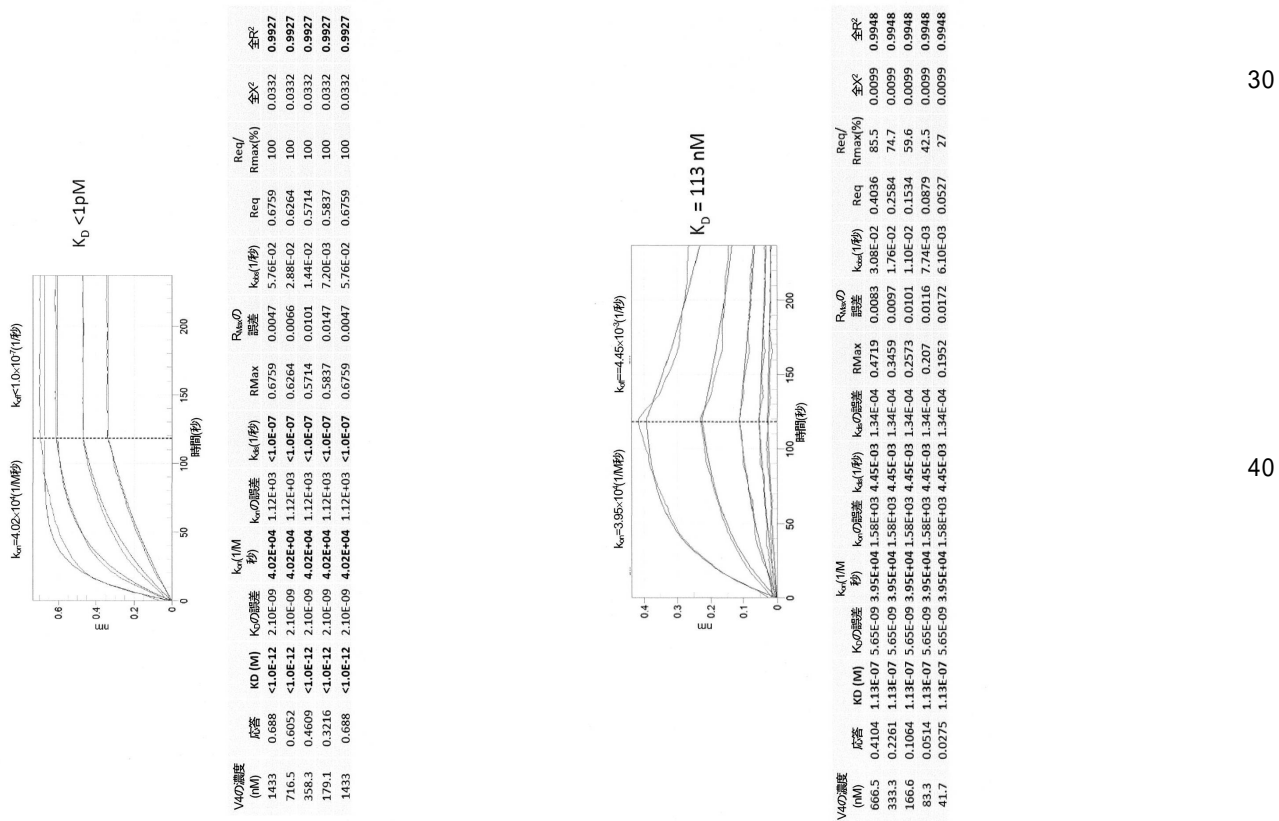
【 図 2 】



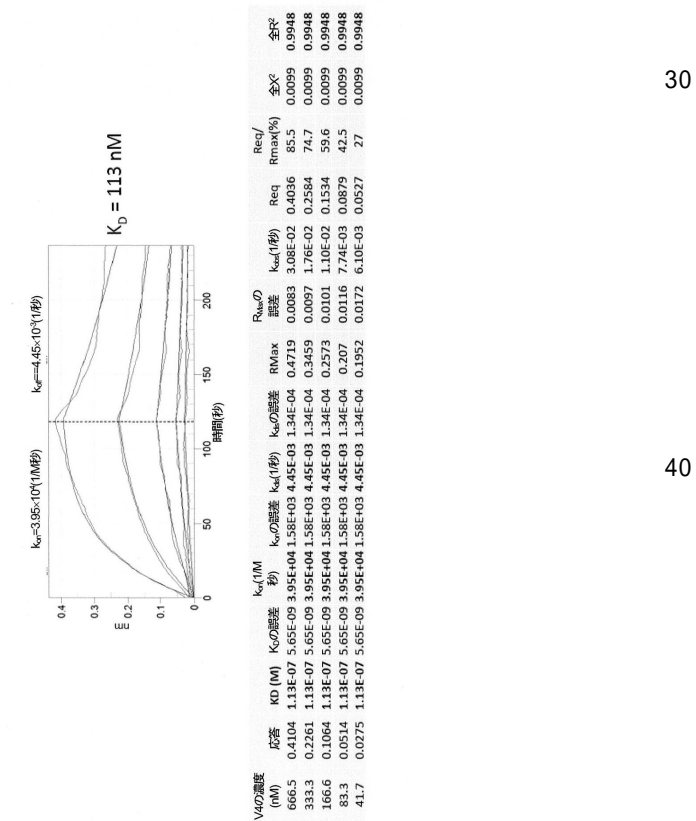
【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 3 C 】



10

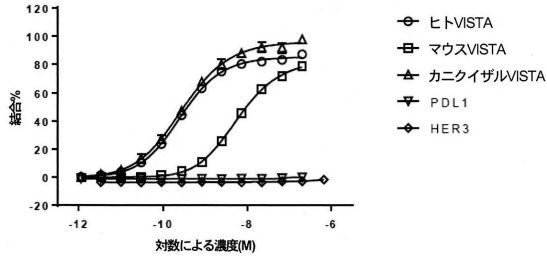
20

30

40

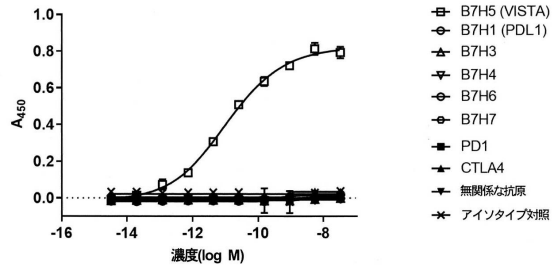
50

【 図 4 A 】



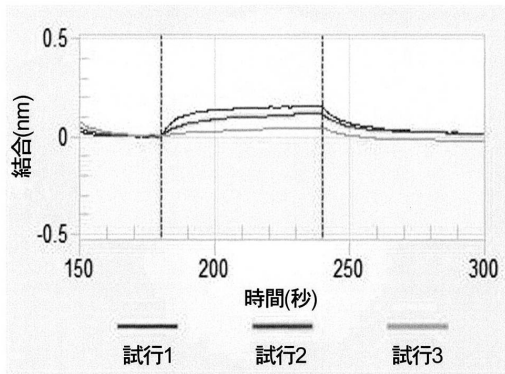
	ヒトVISTA	マウスVISTA	カニクイザルVISTA	PDL1	HER3
EC ₅₀ (M)	2.56×10 ⁻¹⁰	5.93×10 ⁻⁹	2.82×10 ⁻¹⁰	該当なし	該当なし

【 図 4 B 】

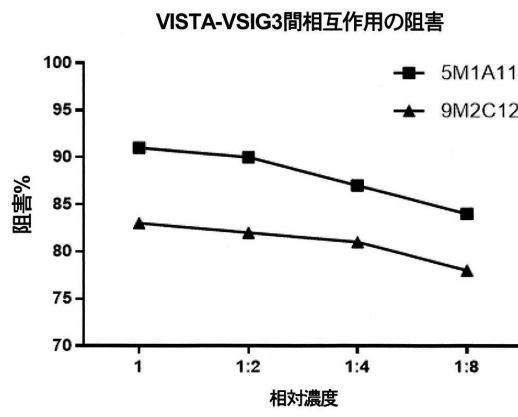


10

【 図 5 】

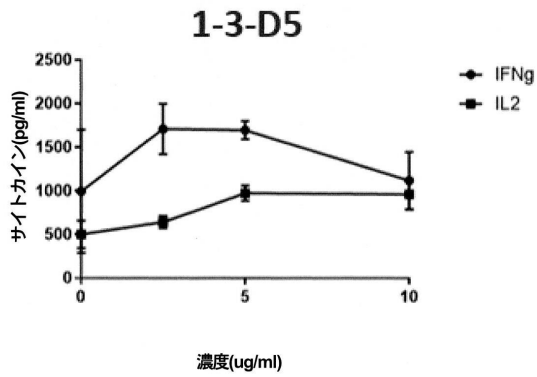


【 図 6 】

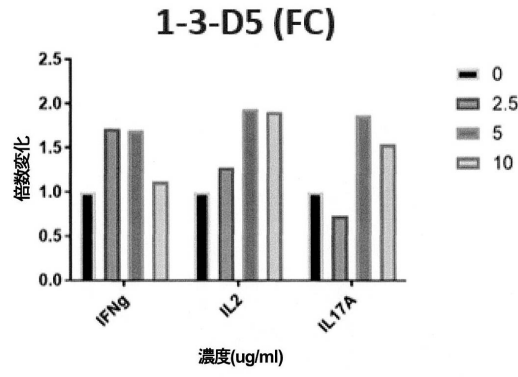


20

【 図 7 A 】



【 図 7 B 】

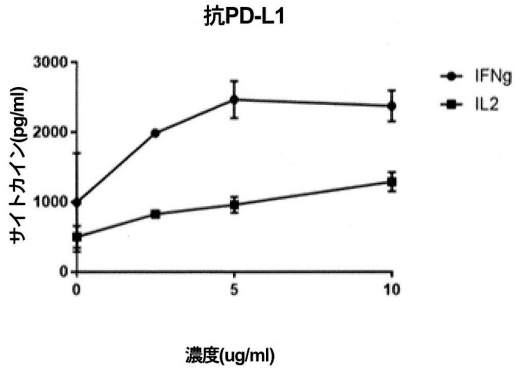


30

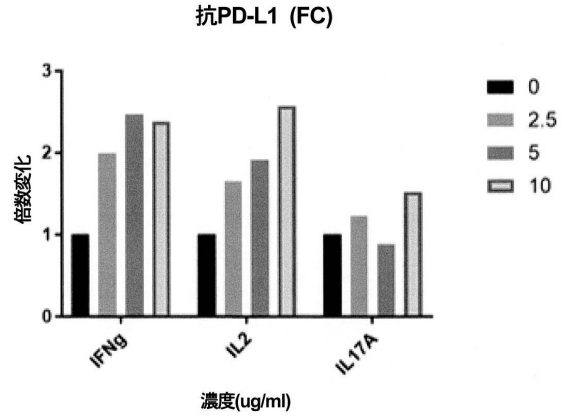
40

50

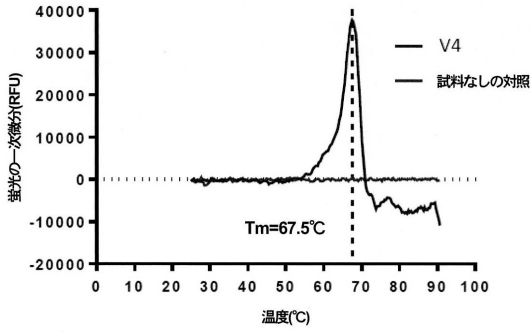
【 図 8 A 】



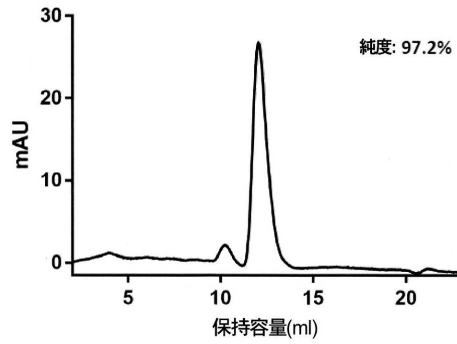
【 図 8 B 】



【 図 9 】



【 図 10 】



10

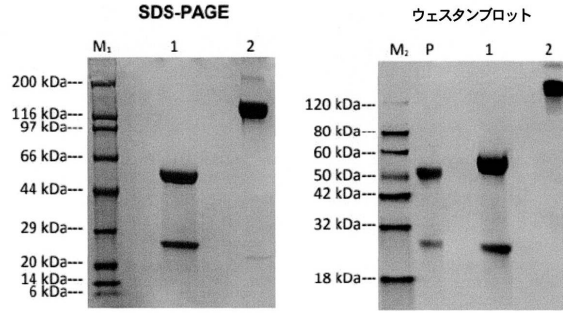
20

30

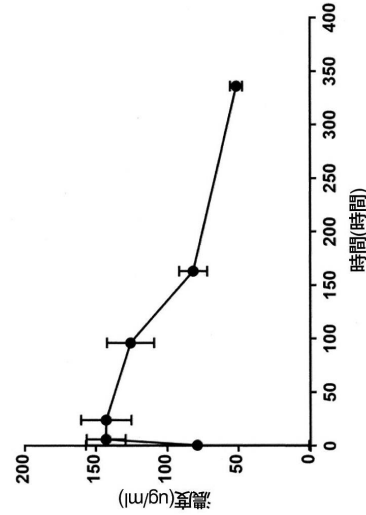
40

50

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



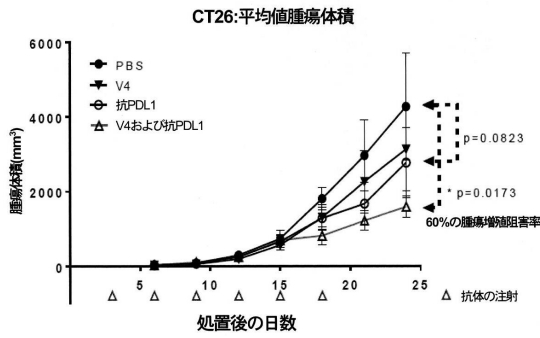
アーク	V4P						
用量	25mg/kg	Cmax (ug/ml)	143.05	Tmax(時間)	6.00	AUC _{0-∞} (ug・時間/ml)	31382.88
						AUC ₀₋₄₀₀ (ug・時間/ml)	47118.67
						T _{1/2} (時間)	211.79
						CL (ml/時間)	0.01
						Vd (ml/kg)	3.64

CL

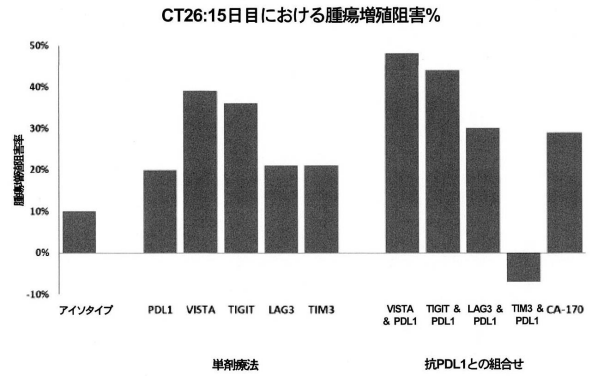
10

20

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

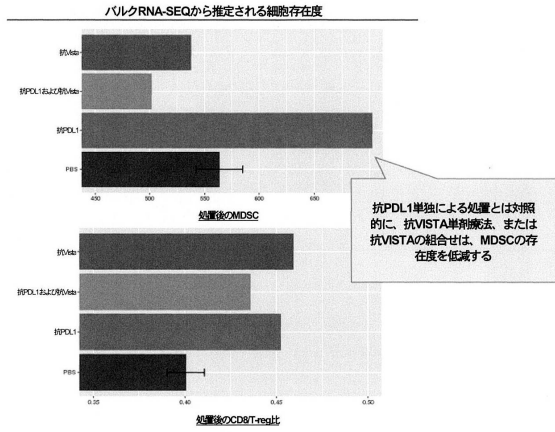


30

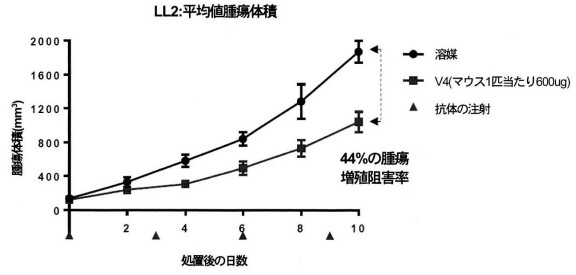
40

50

【 図 1 5 】

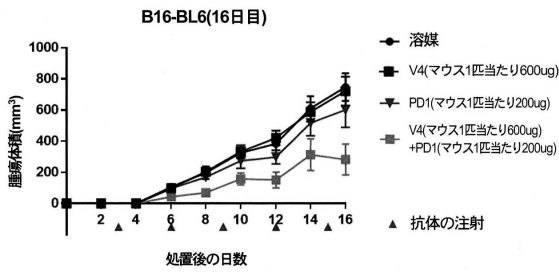


【 図 1 6 】

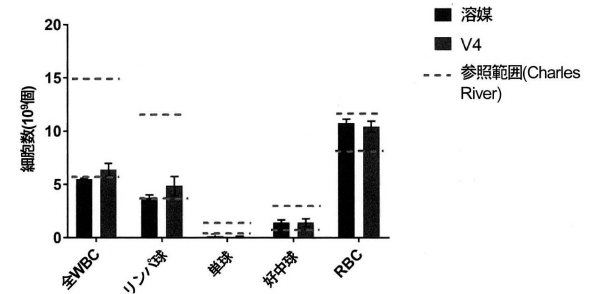


10

【 図 1 7 】

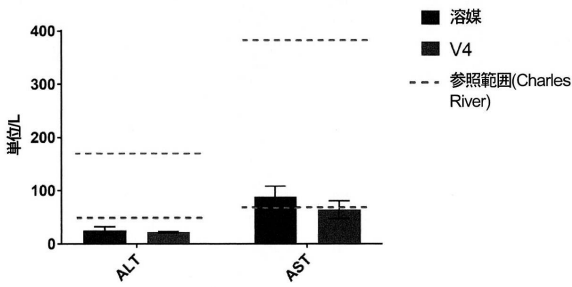


【 図 1 8 】

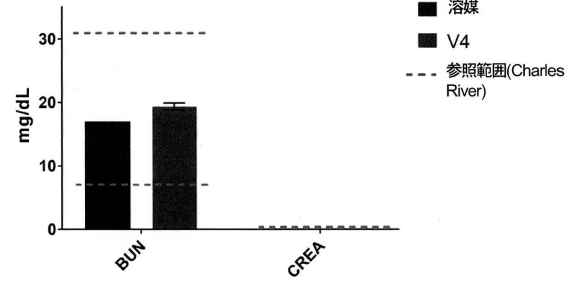


20

【 図 1 9 A 】



【 図 1 9 B 】

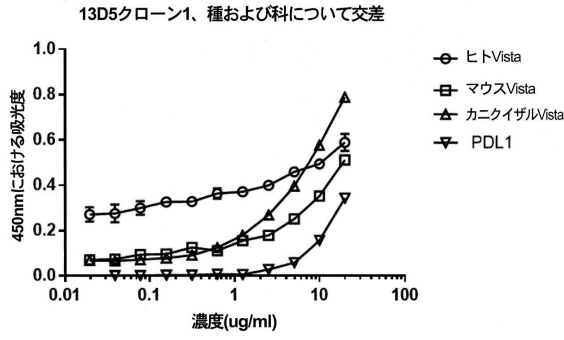


30

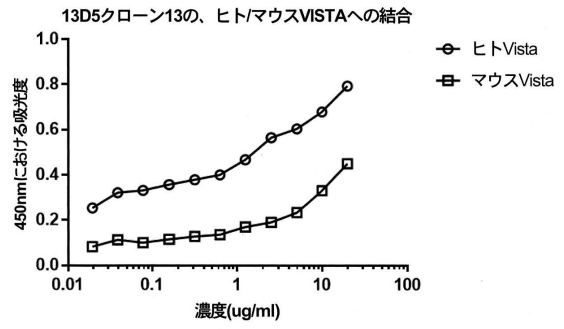
40

50

【 図 2 0 】

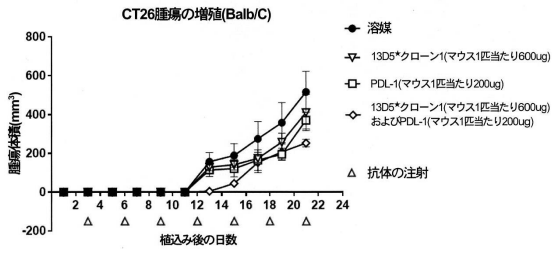


【 図 2 1 】

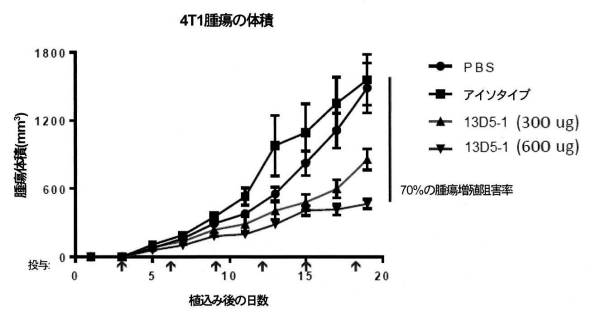


10

【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



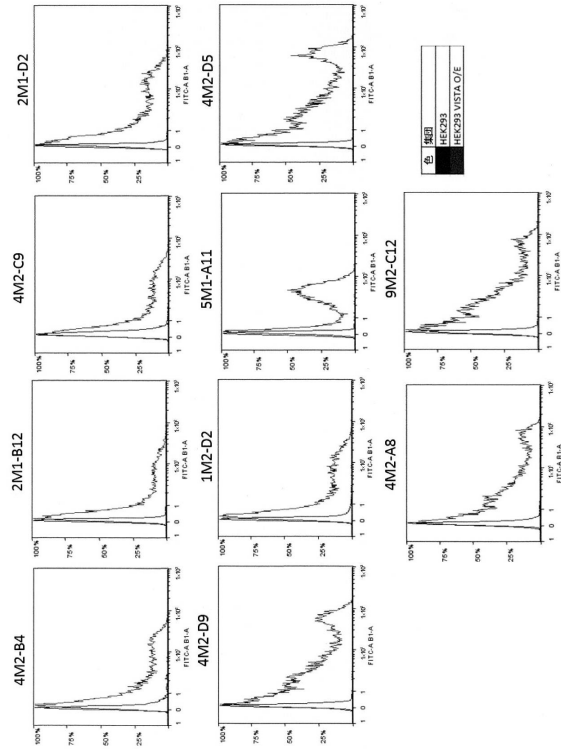
20

30

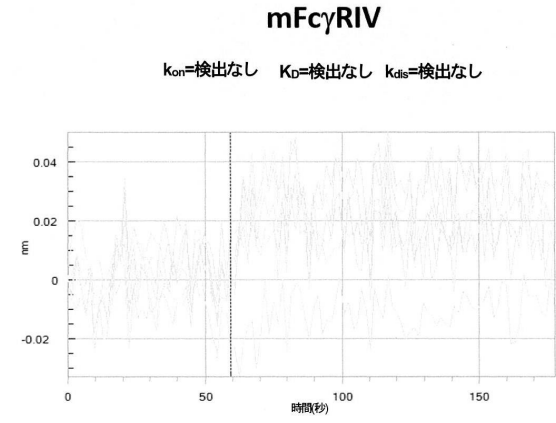
40

50

【 2 4 】



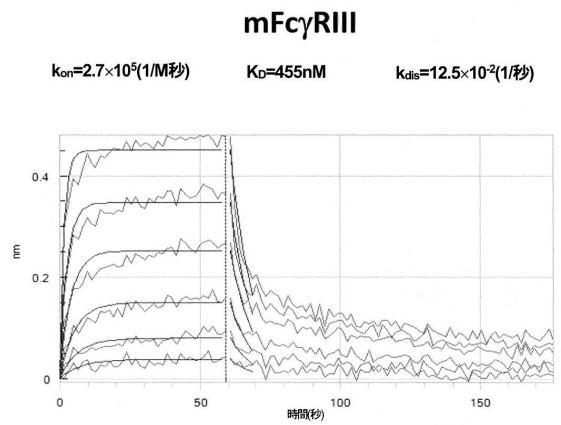
【 2 5 A 】



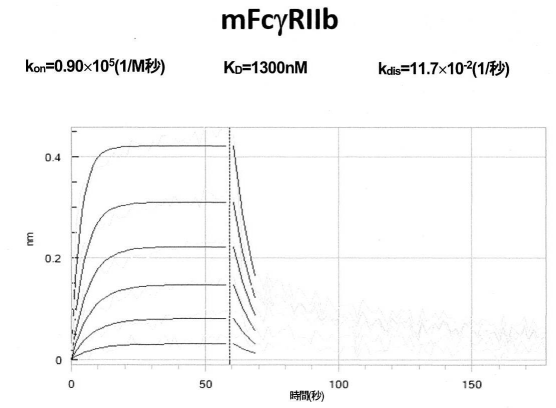
10

20

【 2 5 B 】



【 2 5 C 】

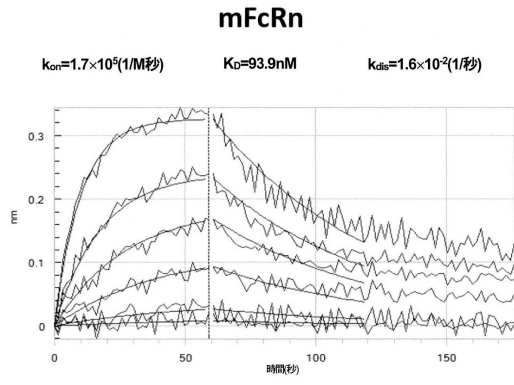


30

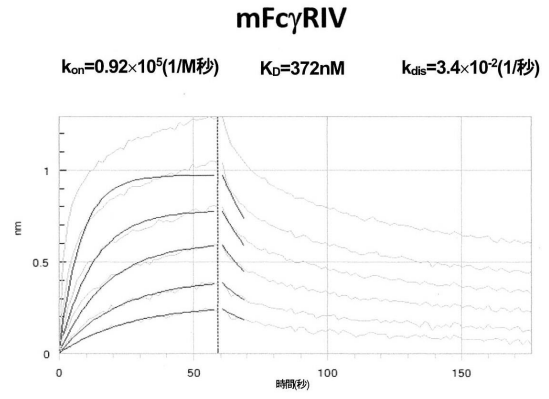
40

50

【 2 5 D 】

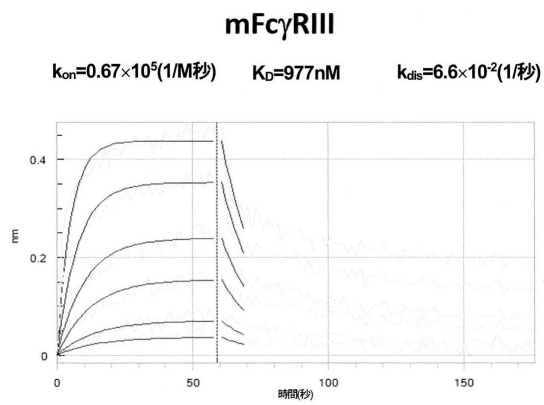


【 2 6 A 】

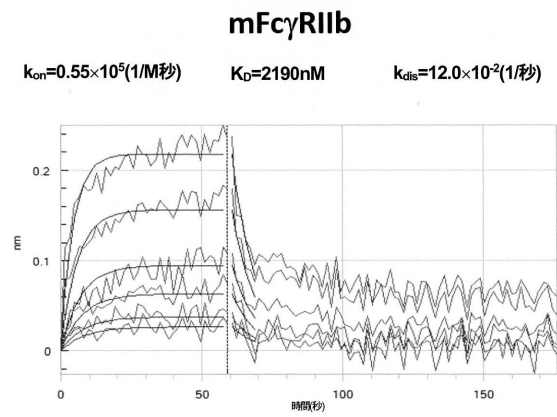


10

【 2 6 B 】



【 2 6 C 】



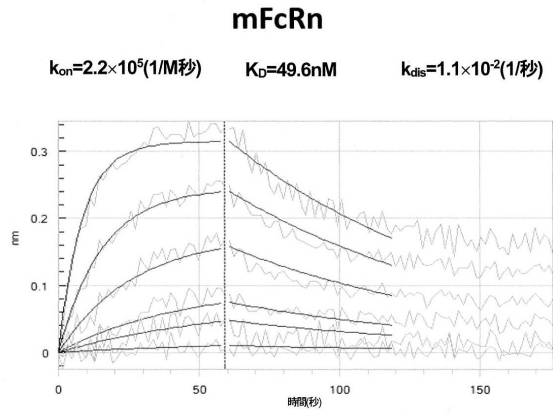
20

30

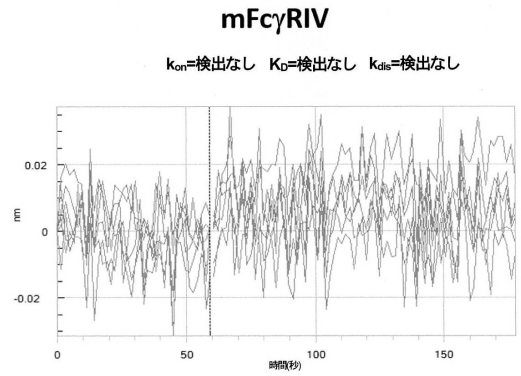
40

50

【 図 2 6 D 】

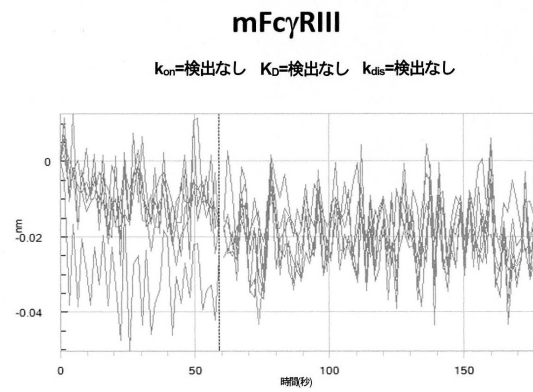


【 図 2 7 A 】

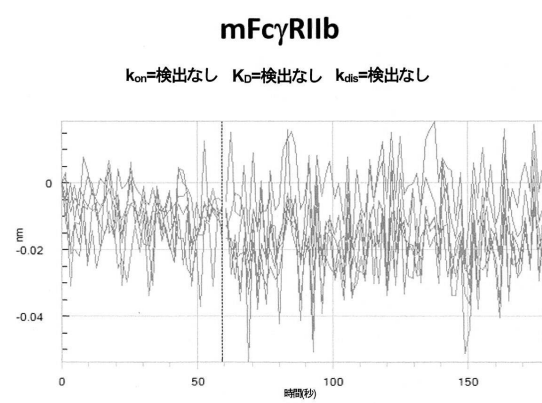


10

【 図 2 7 B 】



【 図 2 7 C 】



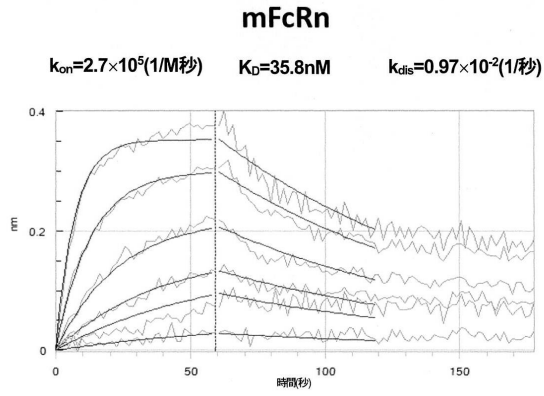
20

30

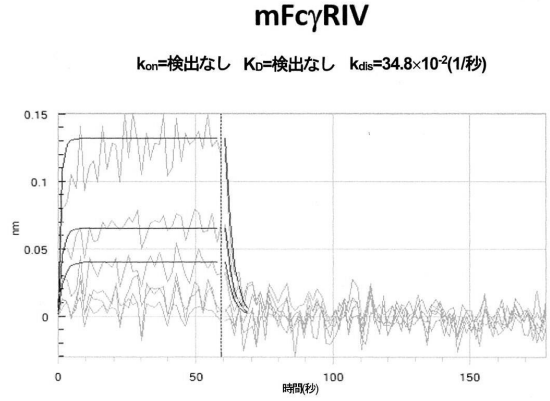
40

50

【 図 2 7 D 】

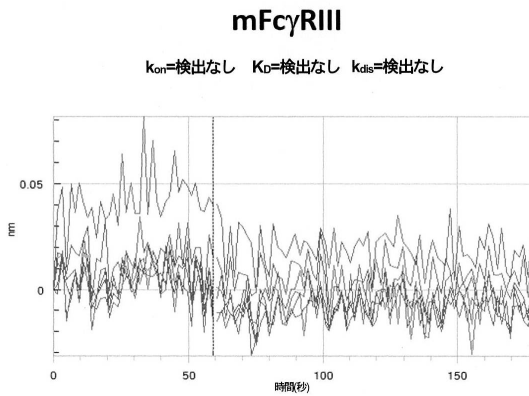


【 図 2 8 A 】

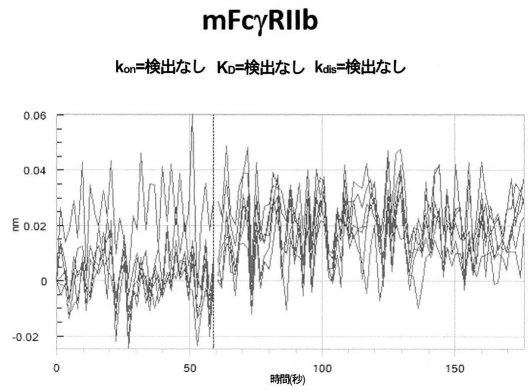


10

【 図 2 8 B 】



【 図 2 8 C 】



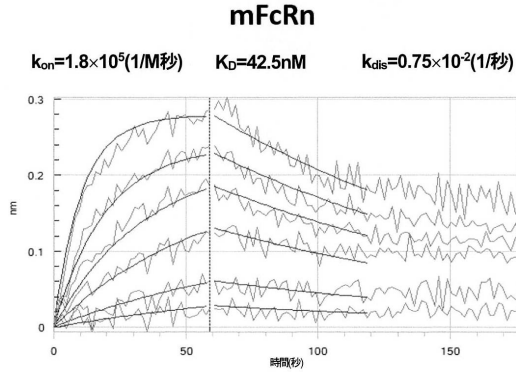
20

30

40

50

【図 28 D】



【図 29 A】

$k_{on}(1/M秒)$ の計算値

受容体	4M2-C12 mIgG2a の $k_{on}(1/M秒)$		4M2-C12 mIgG1 の $k_{on}(1/M秒)$	4M2-C12 mIgG2a LALA_PG の $k_{on}(1/M秒)$	4M2-C12 mIgG2a NQ の $k_{on}(1/M秒)$
	1	2			
mFcRn	1.9×10^5	2.2×10^5	1.7×10^5	2.7×10^5	1.8×10^5
mFcγRIV	0.96×10^5	0.92×10^5	ND	ND	ND
mFcγRIII	0.55×10^5	0.67×10^5	2.7×10^5	ND	ND
mFcγRIIb	0.51×10^5	0.55×10^5	0.90×10^5	ND	ND

ND = 低結合アフィニティーにより決定なし

【図 29 B】

$k_{dis}(1/秒)$ の計算値

受容体	4M2-C12 mIgG2a の $k_{dis}(1/秒)$		4M2-C12 mIgG1 の $k_{dis}(1/秒)$	4M2-C12 mIgG2a LALA_PG の $k_{dis}(1/秒)$	4M2-C12 mIgG2a NQ の $k_{dis}(1/秒)$
	1	2			
mFcRn	0.59×10^2	1.1×10^2	1.6×10^2	0.97×10^2	0.75×10^2
mFcγRIV	2.5×10^2	3.4×10^2	ND	ND	34.8×10^2
mFcγRIII	4.4×10^2	6.6×10^2	12.5×10^2	ND	ND
mFcγRIIb	4.5×10^2	12.0×10^2	11.7×10^2	ND	ND

ND = 低結合アフィニティーにより決定なし

【図 29 C】

$K_D(nM)$ の計算値

受容体	遺伝子	機能	結合アフィニティー	報告された K_D (nM)	4M2-C12 mIgG2a K_D (nM)		4M2-C12 mIgG1 K_D (nM)	4M2-C12 mIgG2a LALA_PG K_D (nM)	4M2-C12 mIgG2a NQ K_D (nM)
					1	2			
mFcRn	FCGRT	リサイクリング(アフィニティーの増大、半減期の延長)	中程度	mIgG1: 1157 mIgG2a: 490 mIgG2b: 545 mIgG3: 140	hIgG1: 72 hIgG2: 63 hIgG3: 230 hIgG4: 116	31.5	49.5	35.8	42.5
mFcγRIV	CD16-2	細胞の活性化	高	mIgG1: ND mIgG2a: 34.5 mIgG2b: 59 mIgG3: ND	hIgG1: 280 hIgG2: 0 hIgG3: 170 hIgG4: 26000	258	372	検出なし	検出なし
mFcγRIII	CD16	細胞の活性化	低	mIgG1: 3200 mIgG2a: 1460 mIgG2b: 1555 mIgG3: ND	hIgG1: 9300 hIgG2: 9700 hIgG3: 1300 hIgG4: 21000	794	977	検出なし	検出なし
mFcγRIIb	CD32	細胞阻害	低	mIgG1: 301 mIgG2a: 2390 mIgG2b: 448 mIgG3: ND	hIgG1: 1100 hIgG2: 7900 hIgG3: 700 hIgG4: 11000	876	2190	検出なし	検出なし

ND = 低結合アフィニティーにより決定なし

10

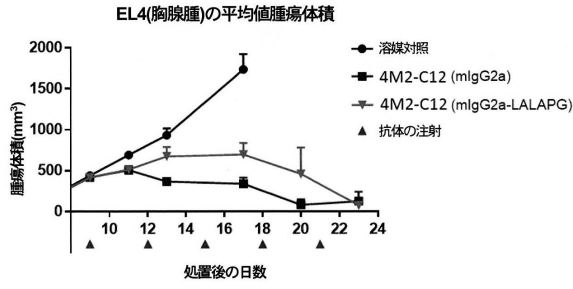
20

30

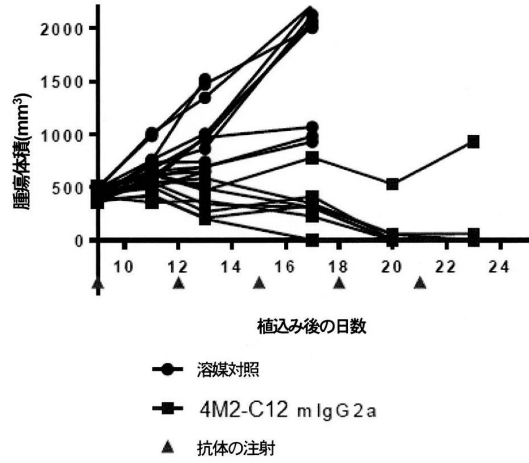
40

50

【 図 3 0 A 】

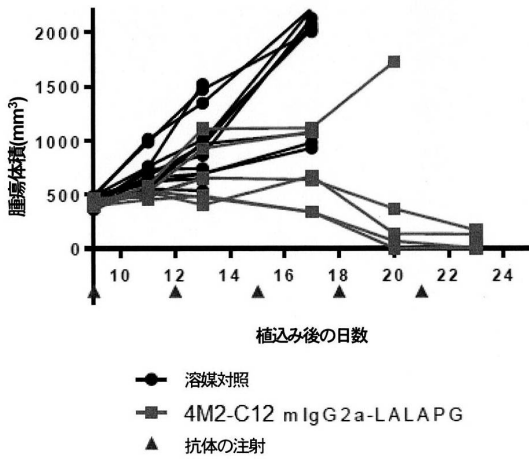


【 図 3 0 B 】

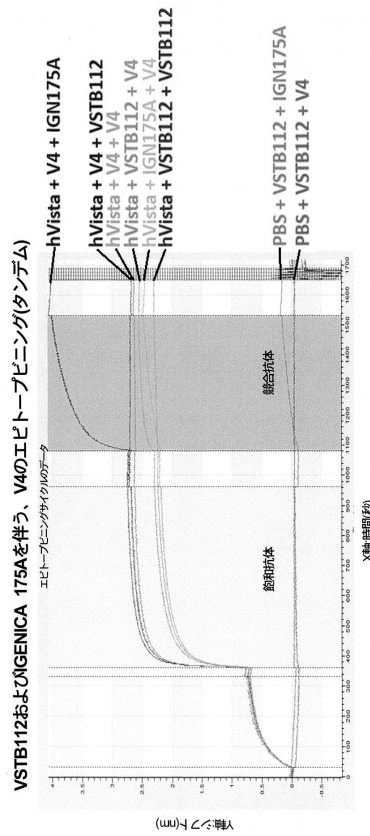


10

【 図 3 0 C 】



【 図 3 1 A 】



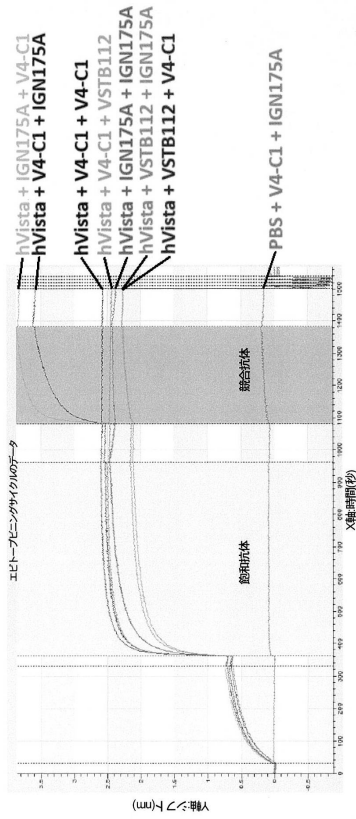
20

30

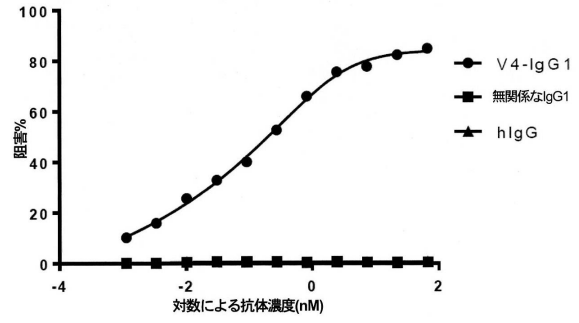
40

50

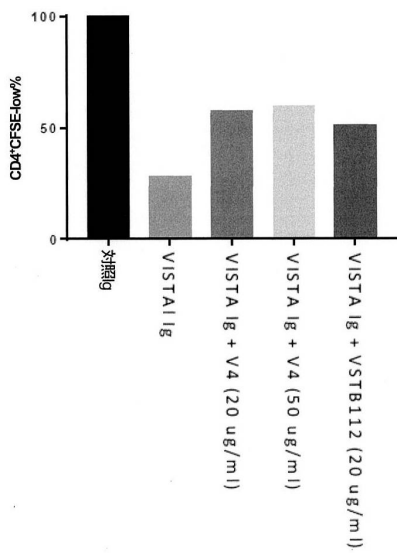
【 図 3 1 B 】



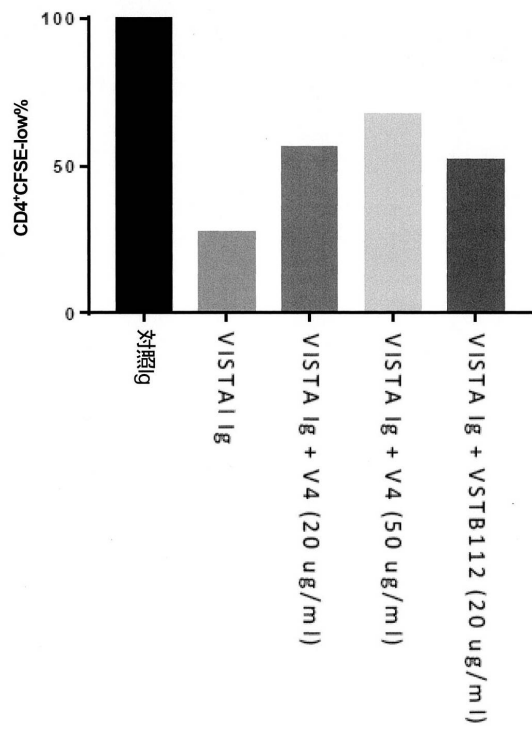
【 図 3 2 】



【 図 3 3 A 】



【 図 3 3 B 】



10

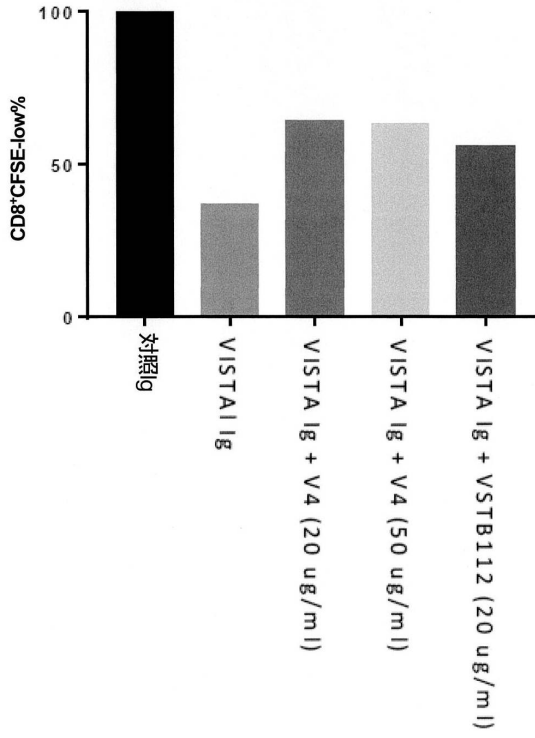
20

30

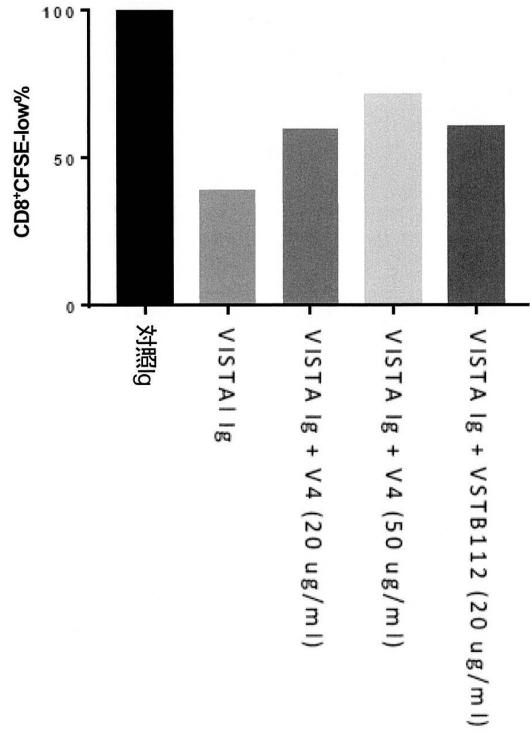
40

50

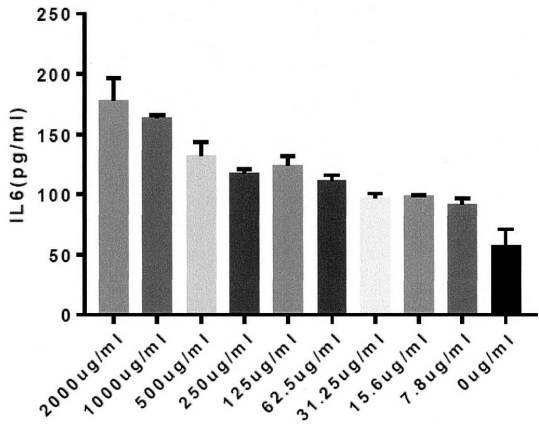
【 3 3 C 】



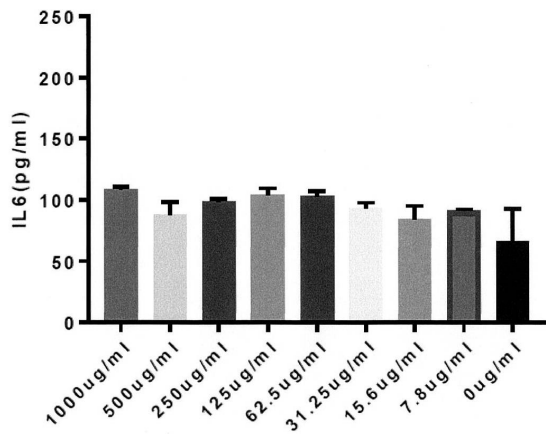
【 3 3 D 】



【 3 4 A 】



【 3 4 B 】



10

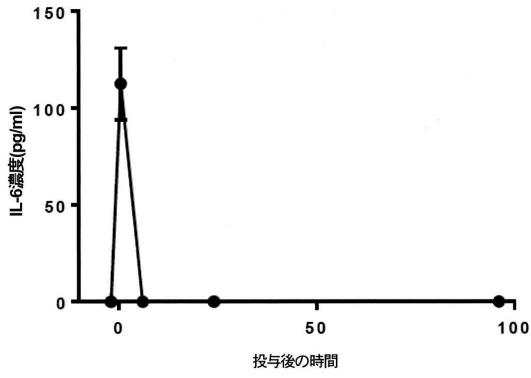
20

30

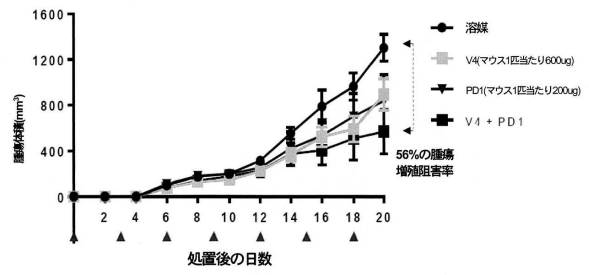
40

50

【図 3 5】

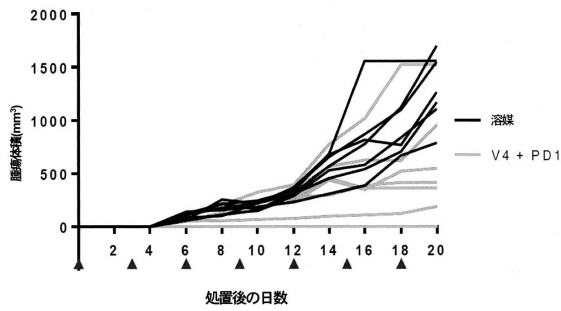


【図 3 6 A】

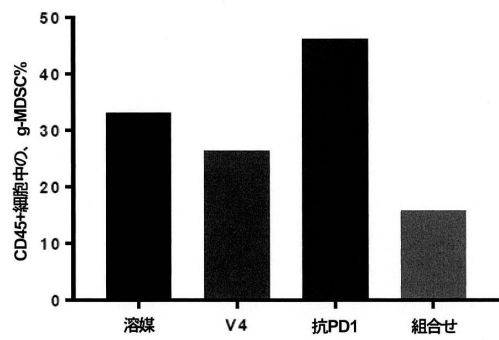


10

【図 3 6 B】

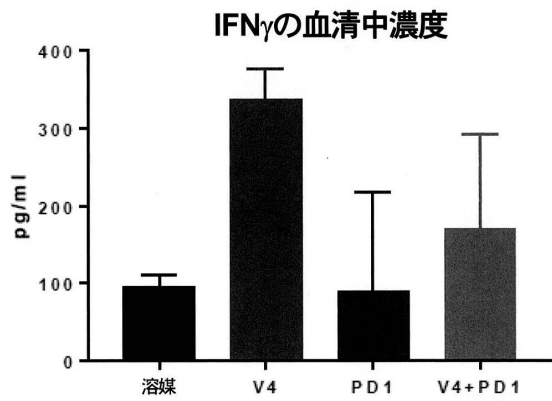


【図 3 7】

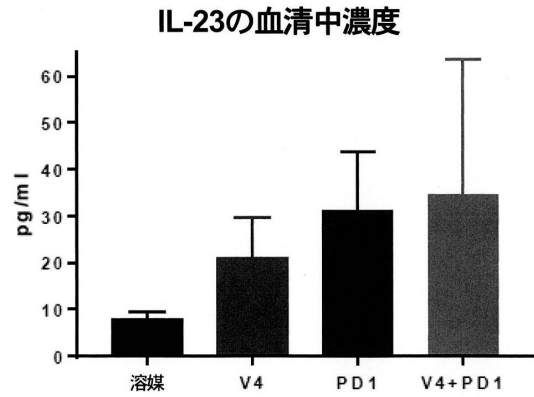


20

【図 3 8 A】



【図 3 8 B】

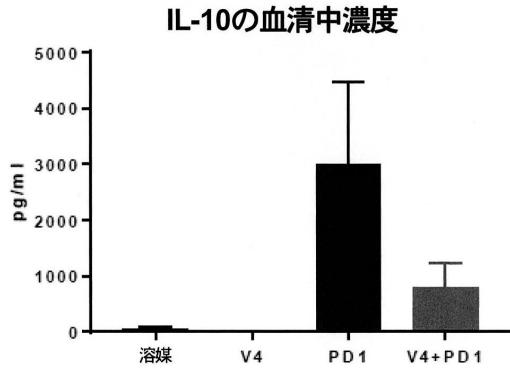


30

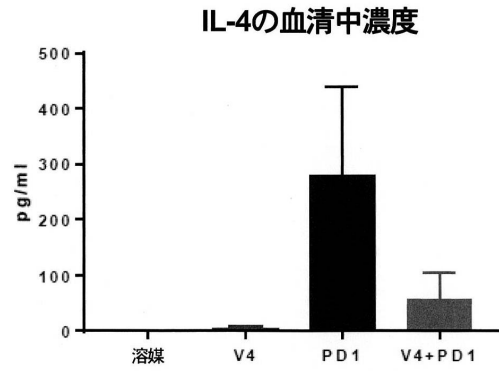
40

50

【図38C】

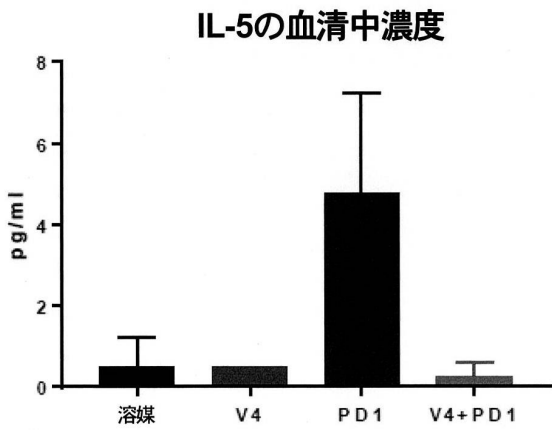


【図38D】

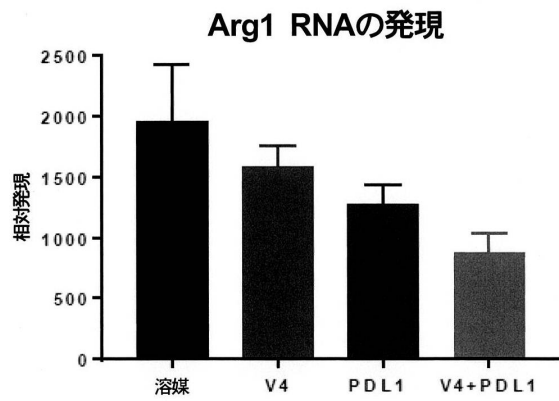


10

【図38E】

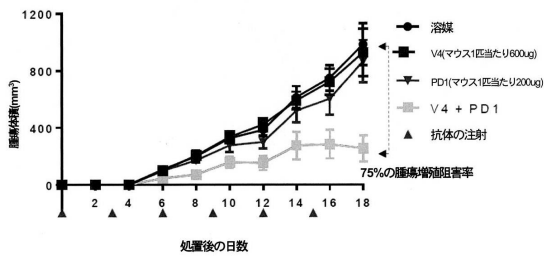


【図39】

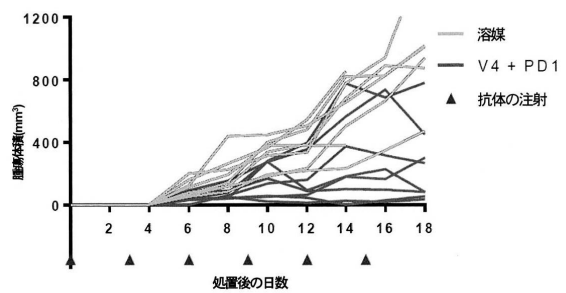


20

【図40A】



【図40B】

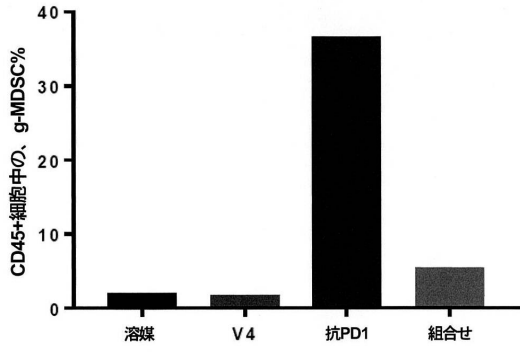


30

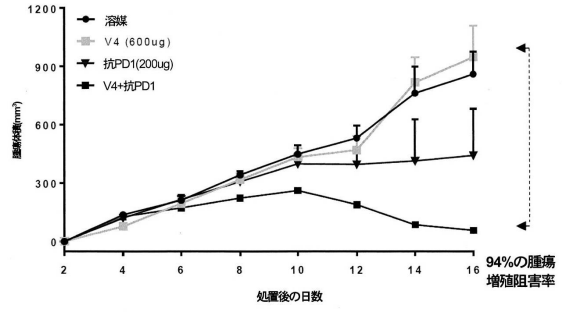
40

50

【図 4 1】

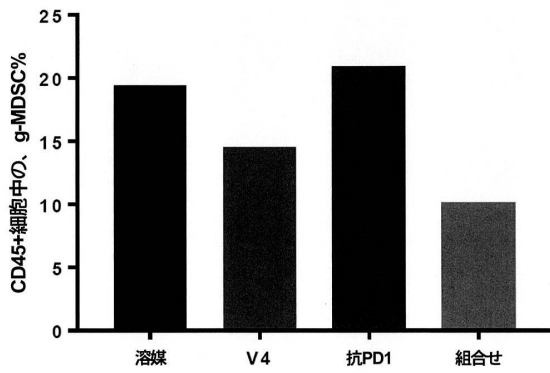


【図 4 2】

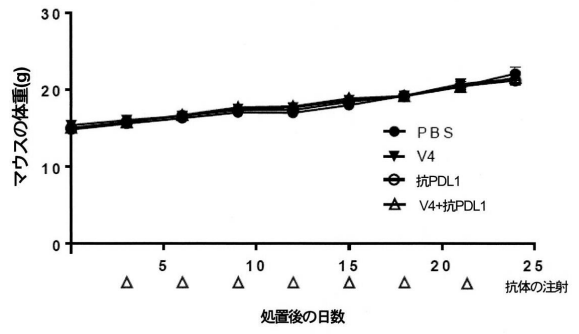


10

【図 4 3】



【図 4 4】




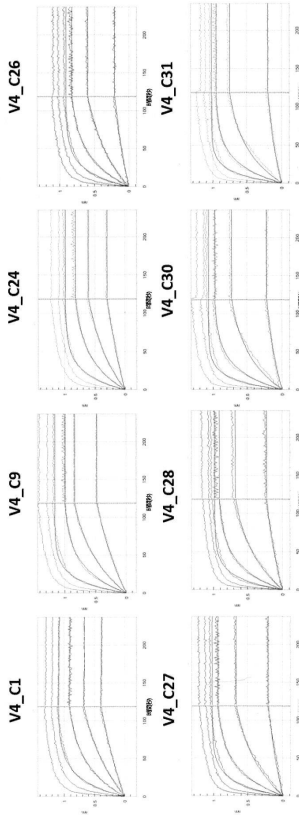
20


30

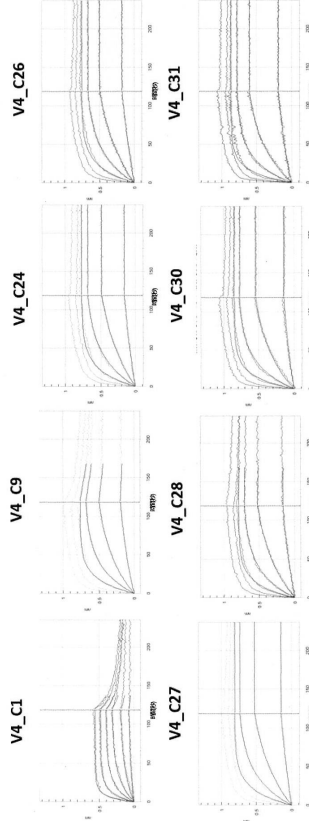
40

50

【 4 5 A】




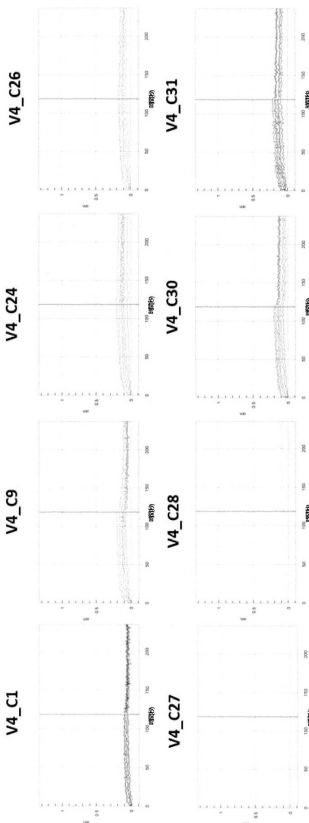
【 4 5 B】




10

20

【 4 5 C】



【 4 5 D】

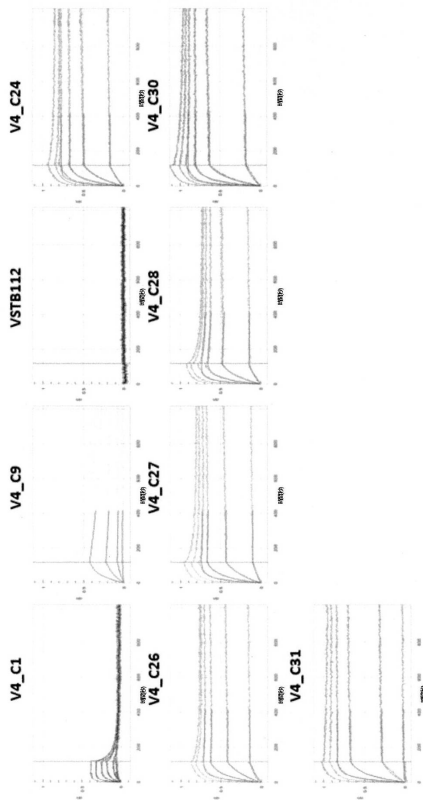
抗体	マウスVISTA			ヒトVISTA		
	K _D (nM)	K _{on} (1/分秒)	K _{off} (1/秒)	K _D (nM)	K _{on} (1/分秒)	K _{off} (1/秒)
V4_C1	60.7	2.43×10 ⁵	14.3×10 ³	<0.001	3.43×10 ⁵	<1.0×10 ⁷
V4_C9	3.81	3.11×10 ⁵	1.18×10 ³	<0.001	3.33×10 ⁵	<1.0×10 ⁷
V4_C24	<0.001	4.01×10 ⁵	<1.0×10 ⁷	<0.001	3.84×10 ⁵	<1.0×10 ⁷
V4_C26	<0.001	4.03×10 ⁵	<1.0×10 ⁷	<0.001	4.04×10 ⁵	<1.0×10 ⁷
V4_C27	<0.001	4.26×10 ⁵	<1.0×10 ⁷	<0.001	4.65×10 ⁵	<1.0×10 ⁷
V4_C28	0.17	4.75×10 ⁵	0.082×10 ³	<0.001	5.07×10 ⁵	<1.0×10 ⁷
V4_C30	0.005	5.05×10 ⁵	0.0028×10 ³	<0.001	5.93×10 ⁵	<1.0×10 ⁷
V4_C31	<0.001	5.70×10 ⁵	<1.0×10 ⁷	<0.001	6.23×10 ⁵	6.23×10 ⁵

30

40

50

【 図 4 6 A 】



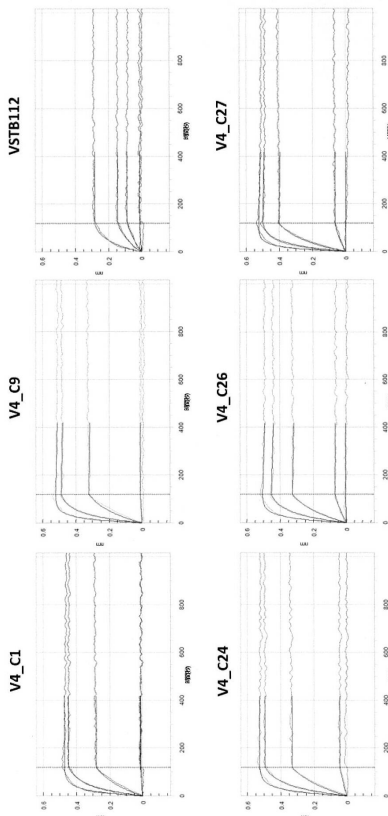
【 図 4 6 B 】

抗体	マウスVISTA		
	K_D (nM)	K_{on} (1/M秒)	K_{off} (1/秒)
V4_C1	66.7	3.30×10^5	22.0×10^{-3}
V4_C9	4.26	1.57×10^5	0.67×10^{-3}
V5TB112	センシングなし	センシングなし	センシングなし
V4_C24	<0.001	4.62×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$
V4_C26	0.183	4.13×10^5	0.076×10^{-3}
V4_C27	0.137	3.98×10^5	0.055×10^{-3}
V4_C28	0.489	5.20×10^5	0.25×10^{-3}
V4_C30	<0.001	5.33×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$
V4_C31	<0.001	3.44×10^5	$<1.0 \times 10^{-7}$

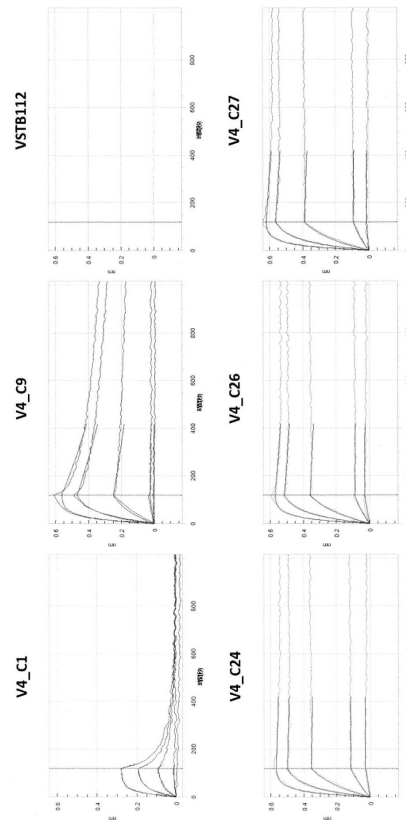
10

20

【 図 4 7 A 】



【 図 4 7 B 】



30

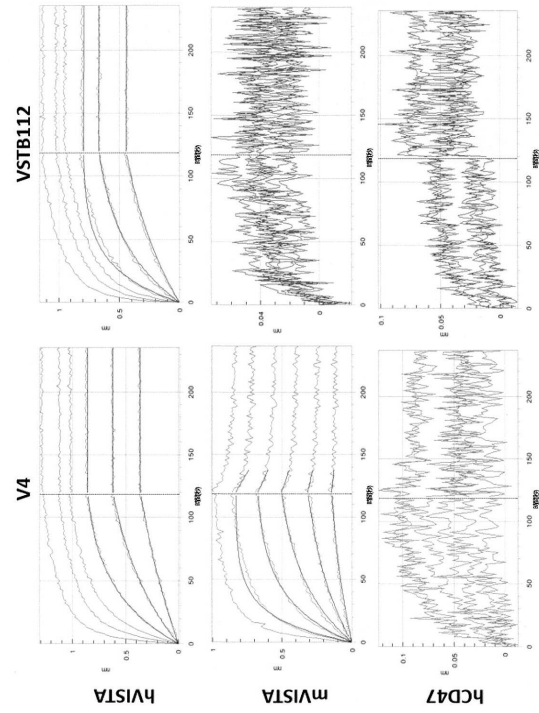
40

50

【図 4 7 C】

抗体	ヒトVISTA			マウスVISTA		
	K _D (nM)	K _{on} (1/M秒)	K _{dis} (1/秒)	K _D (nM)	K _{on} (1/M秒)	K _{dis} (1/秒)
V4_C1	<0.001	3.91×10 ⁶	<1.0×10 ⁻⁷	58.5	2.77×10 ⁶	16.2×10 ⁻³
V4_C9	0.125	4.50×10 ⁶	0.056×10 ⁻³	2.88	3.61×10 ⁶	1.04×10 ⁻³
VSTB112	<0.001	1.79×10 ⁶	<1.0×10 ⁻⁷	該当なし	該当なし	該当なし
V4_C24	<0.001	3.73×10 ⁶	<1.0×10 ⁻⁷	0.202	3.78×10 ⁶	0.076×10 ⁻³
V4_C26	0.241	4.07×10 ⁶	0.098×10 ⁻³	0.530	3.82×10 ⁶	0.20×10 ⁻³
V4_C27	0.119	5.11×10 ⁶	0.061×10 ⁻³	0.395	3.92×10 ⁶	0.16×10 ⁻³

【図 4 8 A】



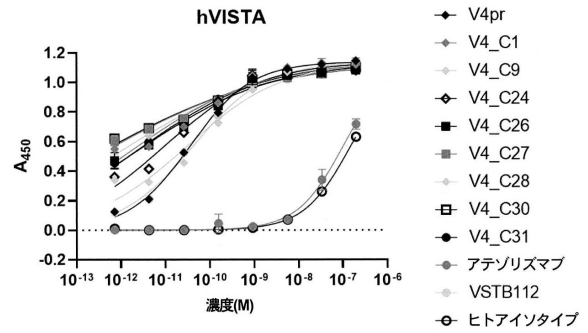
10

20

【図 4 8 B】

抗体	ヒトVISTA			マウスVISTA		
	K _D (nM)	K _{on} (1/M秒)	K _{dis} (1/秒)	K _D (nM)	K _{on} (1/M秒)	K _{dis} (1/秒)
V4	<0.001	128×10 ⁹	<0.01×10 ⁻⁶	108	60.9×10 ⁹	656×10 ⁻⁶
VSTB112	<0.001	210×10 ⁹	<0.01×10 ⁻⁶	センシングなし	センシングなし	センシングなし

【図 4 9 A】

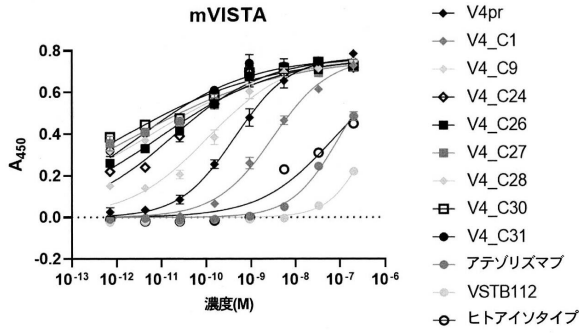


30

40

50

【 図 4 9 B 】

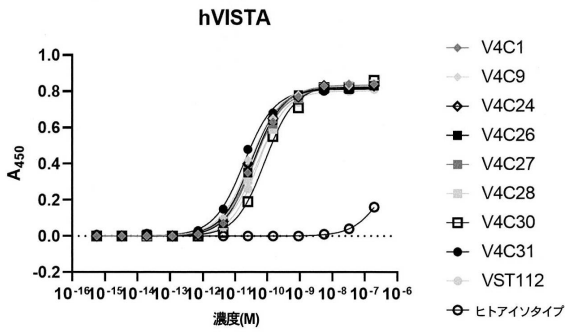


【 図 4 9 C 】

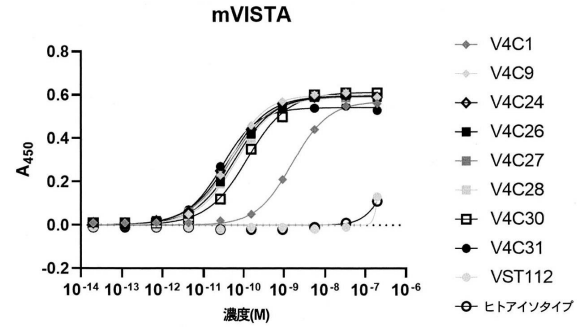
	V4pr	V4_C1	V4_C9	V4_C24	V4_C26	V4_C27	V4_C28	V4_C30	V4_C31	ATZ	VSTB112	アイソタイプ
hVISTA	0.036	0.0024	0.031	0.010	0.0034	<0.0007	0.0015	<0.0007	0.0032	102	0.042	152
mVISTA	0.43	3.1	0.11	0.017	0.0089	0.0023	0.0045	0.0013	0.0030	97	>200	77

10

【 図 5 0 A 】



【 図 5 0 B 】

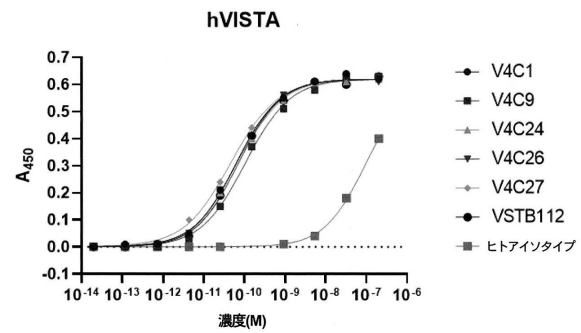


20

【 図 5 0 C 】

	V4_C1	V4_C9	V4_C24	V4_C26	V4_C27	V4_C28	V4_C30	V4_C31	VSTB112	アイソタイプ
hVISTA	0.042	0.030	0.032	0.038	0.037	0.053	0.088	0.020	0.054	> 200
mVISTA	1.60	0.044	0.042	0.058	0.047	0.064	0.123	0.028	> 200	> 200

【 図 5 1 A 】

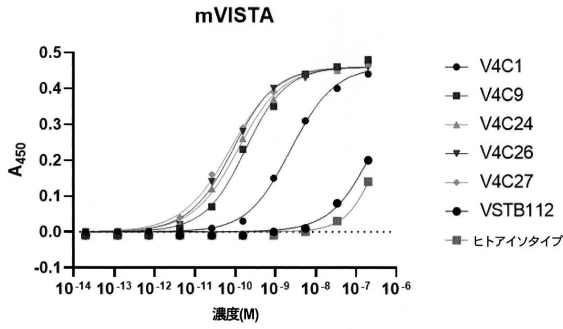


30

40

50

【 図 5 1 B 】

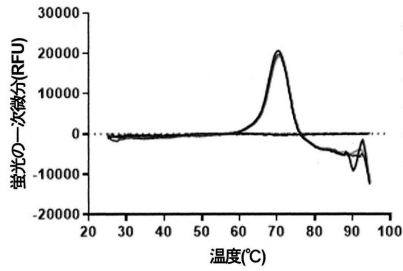


【 図 5 1 C 】

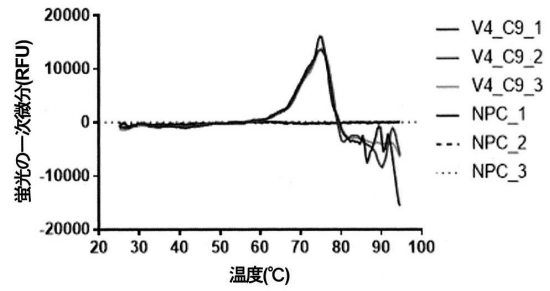
	V4C24	V4C26	V4C27	V4C1	V4C9	VSTB112	ヒトアインタイプ
hVISTA	0.073	0.064	0.047	0.065	0.107	0.072	98.5
mVISTA	0.116	0.086	0.073	2.44	0.180	>200	>200

10

【 図 5 2 A 】

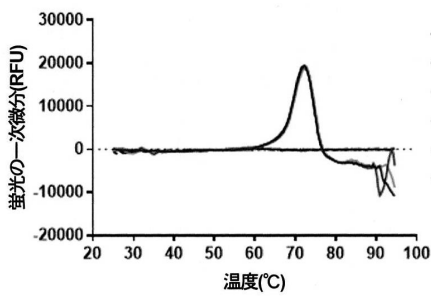


【 図 5 2 B 】

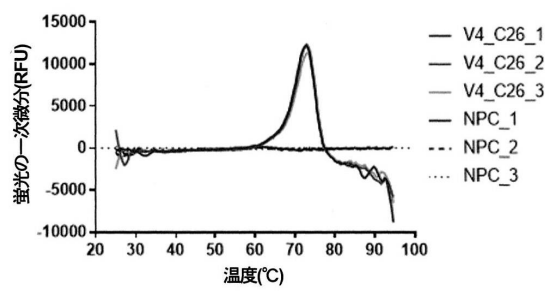


20

【 図 5 2 C 】



【 図 5 2 D 】

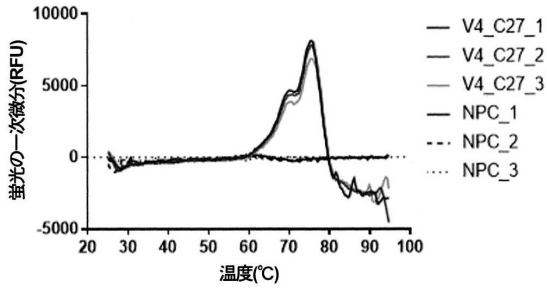


30

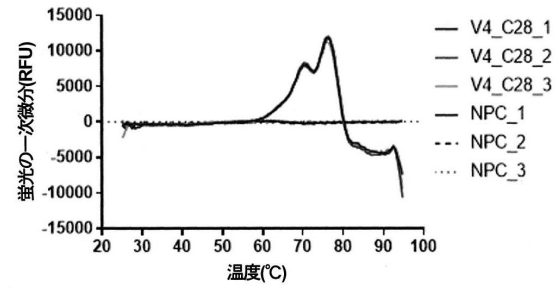
40

50

【 図 5 2 E 】

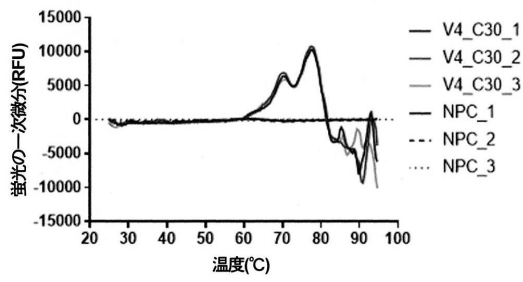


【 図 5 2 F 】

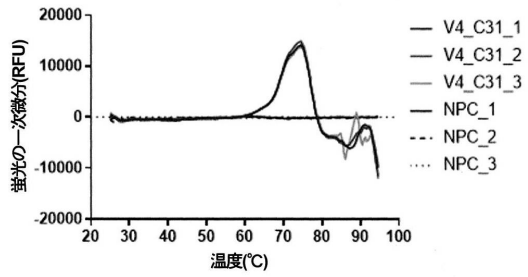


10

【 図 5 2 G 】

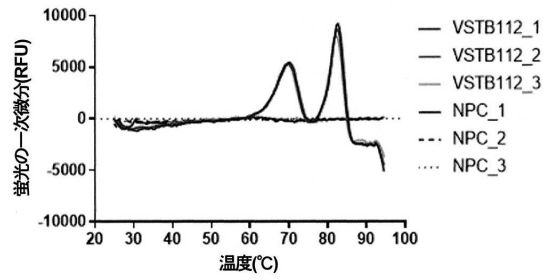


【 図 5 2 H 】



20

【 図 5 2 I 】



【 図 5 2 J 】

抗体	Tm		シオルダー
	Fc	Fab	
	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	
V4p		67.5	63°Cにおけるシオルダー
V4_C1		70.5	
V4_C9		75.1	72°Cにおけるシオルダー
V4_C24		72.3	
V4_C26		72.9	
V4_C27		75.6	
V4_C28		76.3	
V4_C30		77.5	
V4_C31		74.5	71.5°Cにおけるシオルダー
VSTB112	69.9	82.3	

30

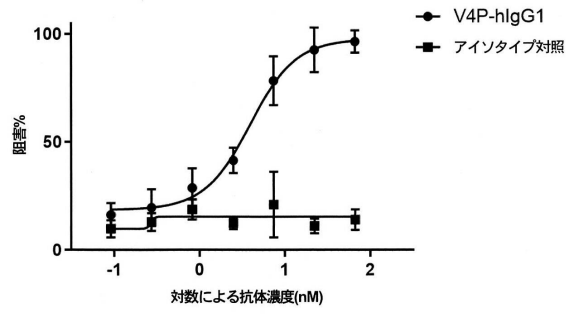
40

50

【 図 5 3 】

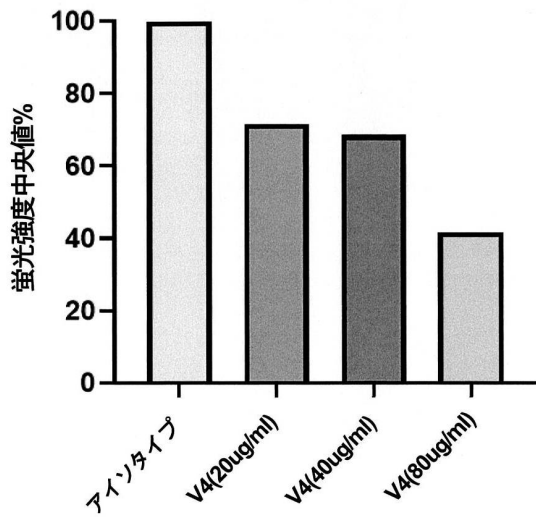
抗体	同一性%(ヒト)		潜在的な免疫原性ペプチド	
	HC	LC	HC	LC
V4	69.7	63.2	2	3
V4_C1	86.9	85.3	6	3
V4_C9	86.9	86.3	4	3
V4_C24	85.9	85.3	2	3
V4_C26	85.9	85.3	2	2
V4_C27	85.9	85.3	2	3
V4_C28	85.9	85.3	2	3
V4_C30	85.9	84.2	2	3
V4_C31	85.9	83.2	2	2

【 図 5 4 】

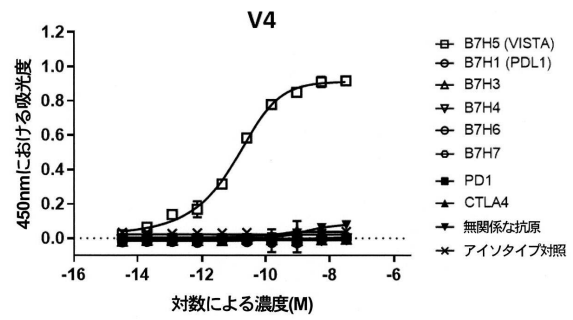


10

【 図 5 5 】



【 図 5 6 A 】



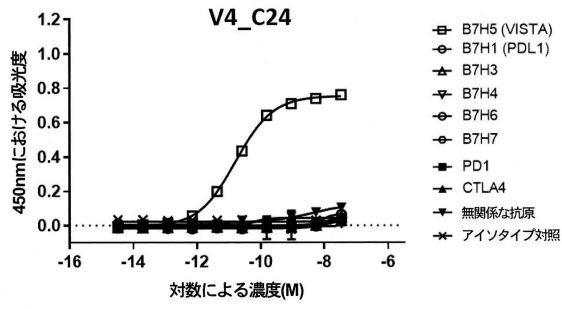
20

30

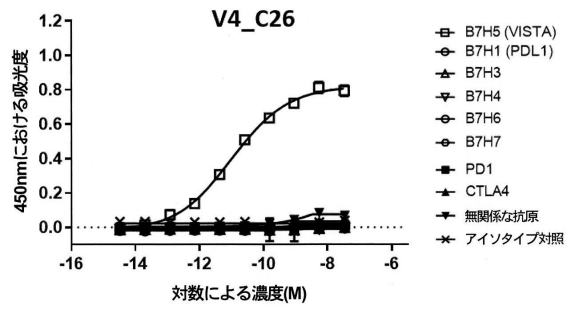
40

50

【 図 5 6 B 】

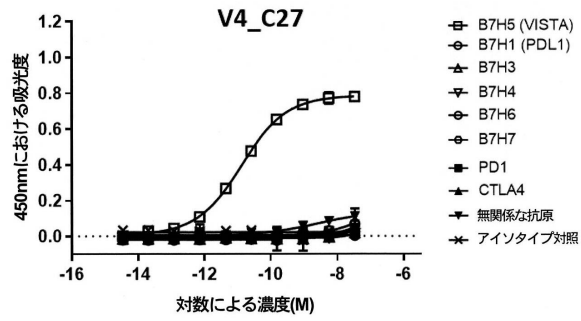


【 図 5 6 C 】

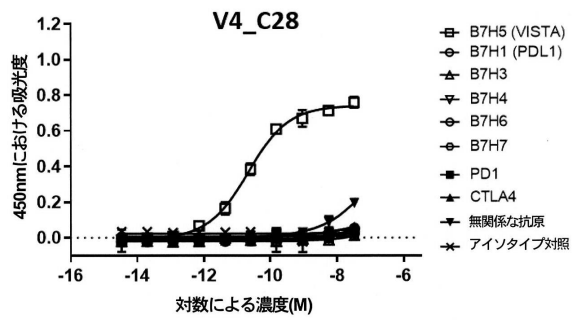


10

【 図 5 6 D 】

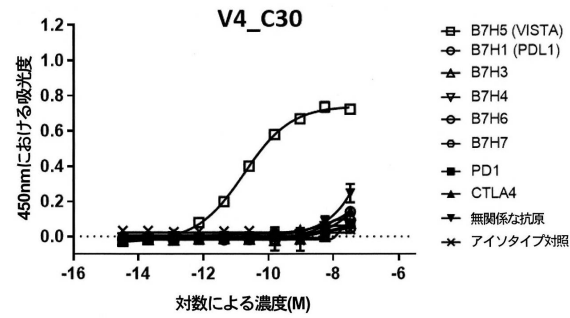


【 図 5 6 E 】

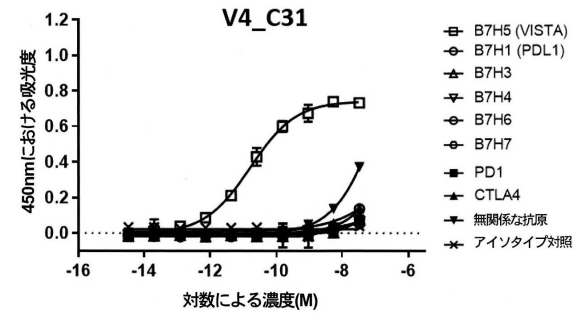


20

【 図 5 6 F 】



【 図 5 6 G 】

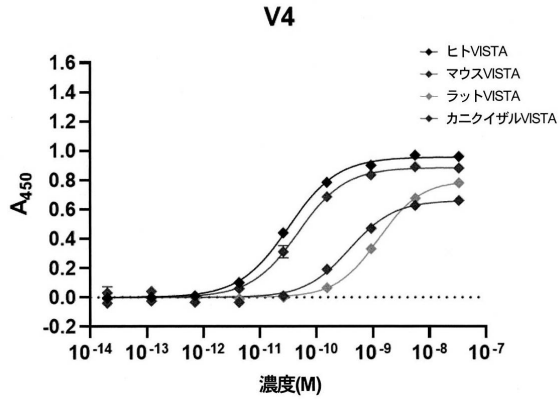


30

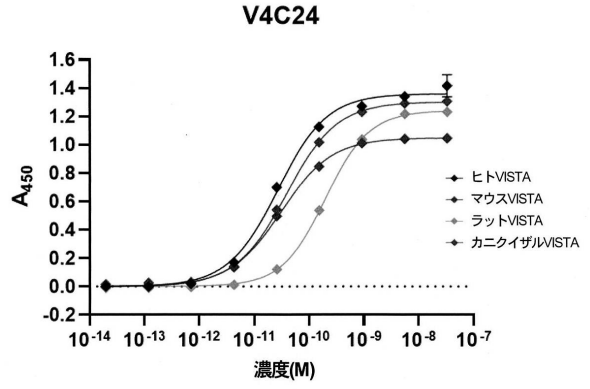
40

50

【 図 5 7 A 】

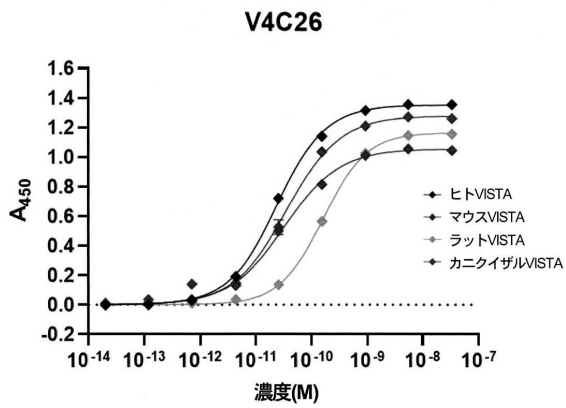


【 図 5 7 B 】

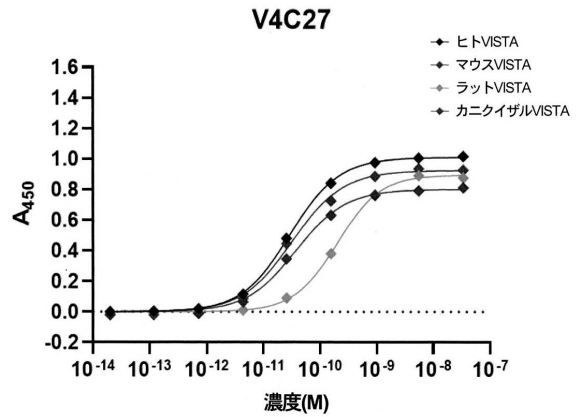


10

【 図 5 7 C 】



【 図 5 7 D 】



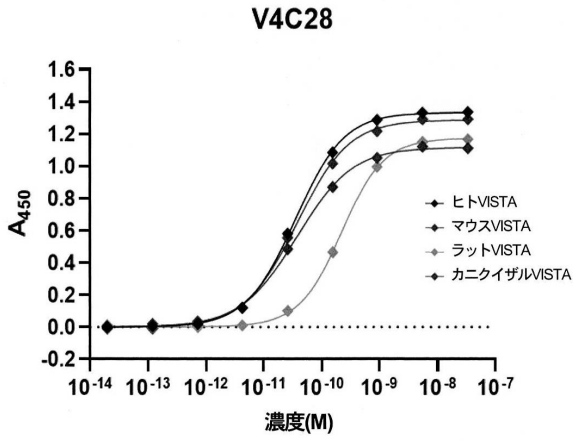
20

30

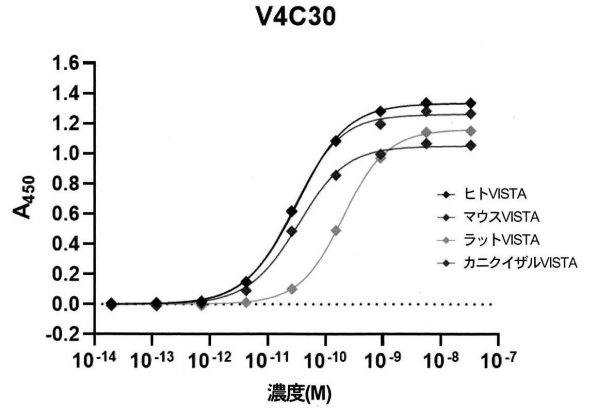
40

50

【 図 5 7 E 】

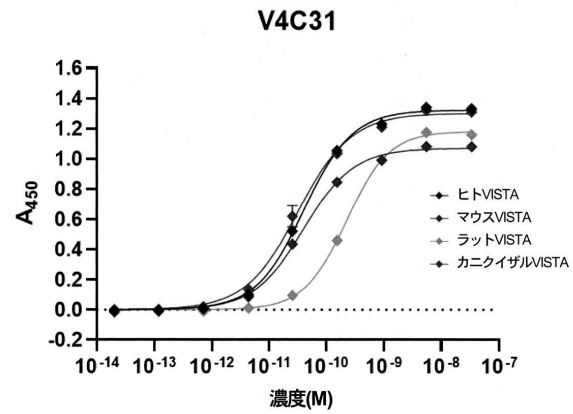


【 図 5 7 F 】

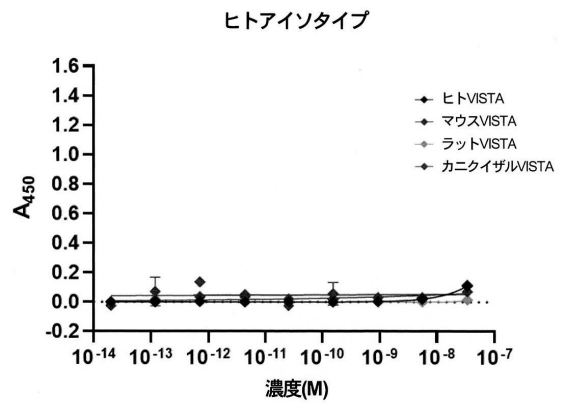


10

【 図 5 7 G 】



【 図 5 7 H 】



20

30

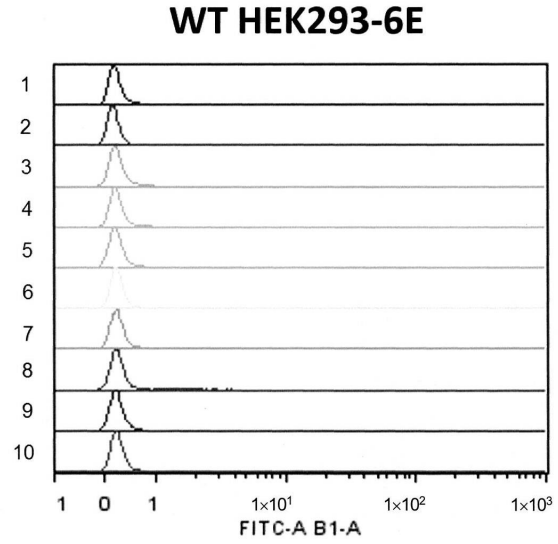
40

50

【図57I】

EC ₅₀ (M)	ヒトVISTA	マウスVISTA	ラットVISTA	カニクイザルVISTA
V4	3.19×10 ⁻¹¹	3.87×10 ⁻¹⁰	1.25×10 ⁻⁹	4.72×10 ⁻¹¹
V4C24	2.68×10 ⁻¹¹	3.04×10 ⁻¹¹	2.01×10 ⁻¹⁰	3.85×10 ⁻¹¹
V4C26	2.41×10 ⁻¹¹	3.25×10 ⁻¹¹	1.60×10 ⁻¹⁰	3.56×10 ⁻¹¹
V4C27	2.95×10 ⁻¹¹	3.74×10 ⁻¹¹	1.96×10 ⁻¹⁰	3.24×10 ⁻¹¹
V4C28	3.46×10 ⁻¹¹	3.65×10 ⁻¹¹	2.17×10 ⁻¹⁰	3.67×10 ⁻¹¹
V4C30	3.18×10 ⁻¹¹	3.26×10 ⁻¹¹	2.06×10 ⁻¹⁰	2.72×10 ⁻¹¹
V4C31	4.08×10 ⁻¹¹	4.00×10 ⁻¹¹	2.24×10 ⁻¹⁰	3.21×10 ⁻¹¹
アイソタイプ	>3.3×10 ⁻⁸	>3.3×10 ⁻⁸	>3.3×10 ⁻⁸	>3.3×10 ⁻⁸

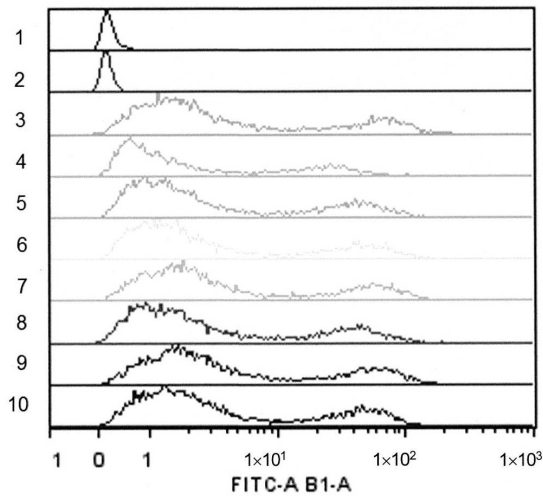
【図58A】



10

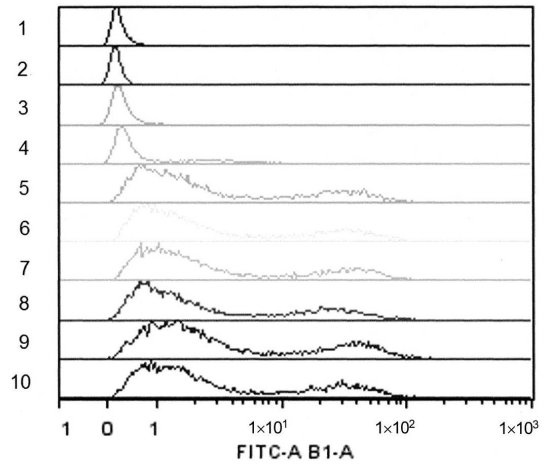
【図58B】

ヒトVISTAを過剰発現するHEK293-6E



【図58C】

マウスVISTAを過剰発現するHEK293-6E



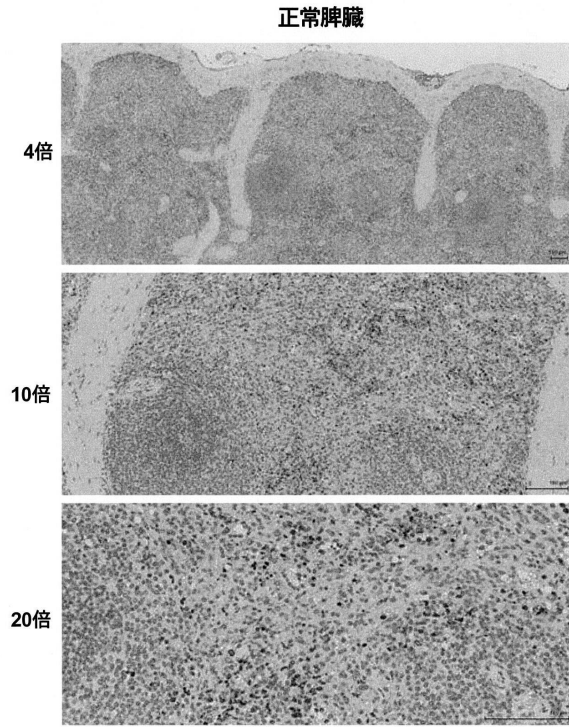
20

30

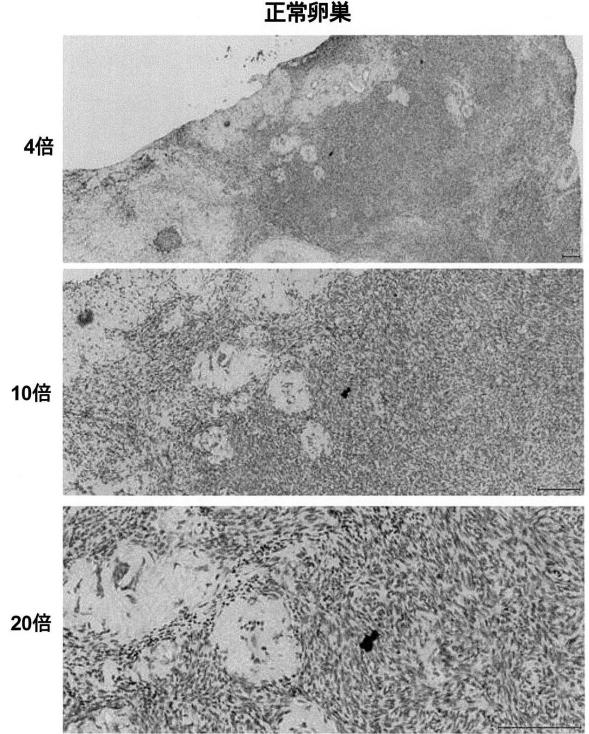
40

50

【 図 5 9 A 】



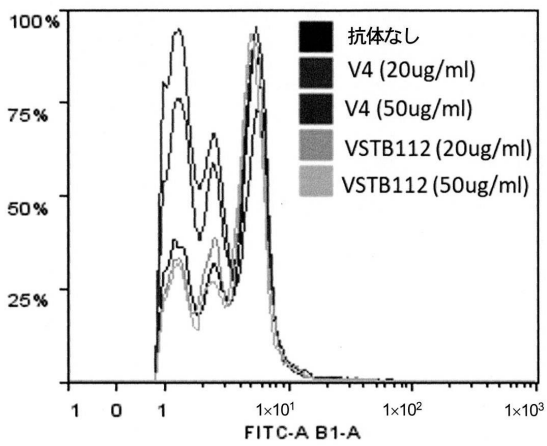
【 図 5 9 B 】



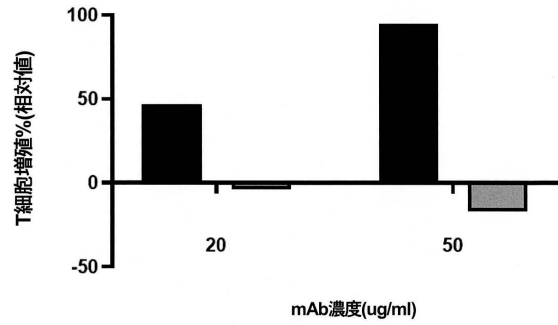
10

20

【 図 6 0 A 】



【 図 6 0 B 】

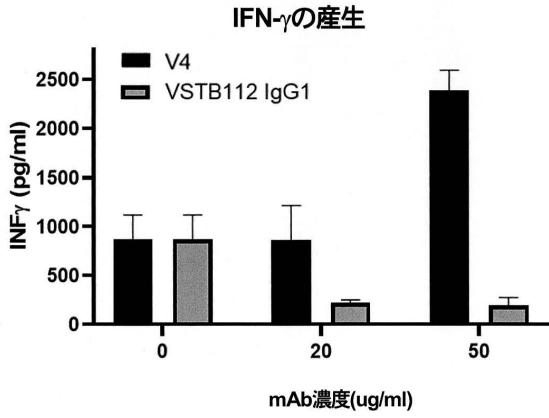


30

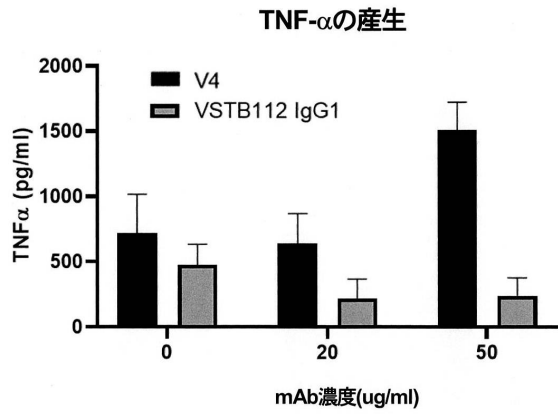
40

50

【図60C】

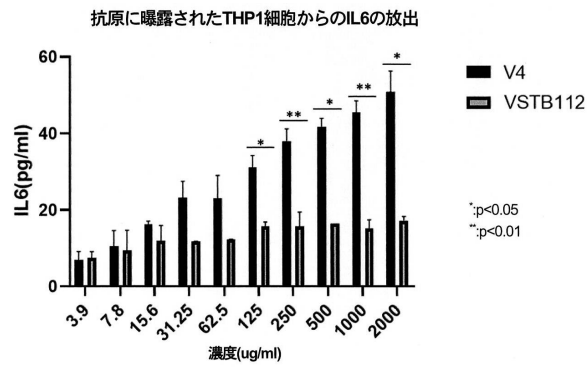


【図60D】

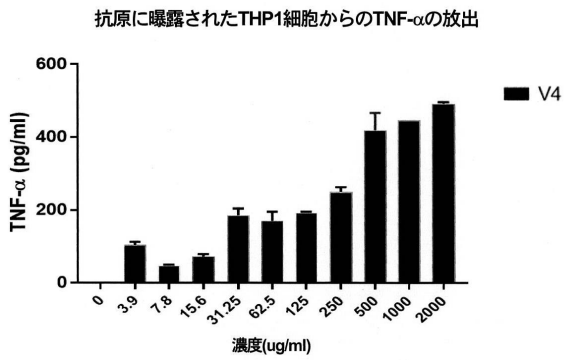


10

【図61A】



【図61B】



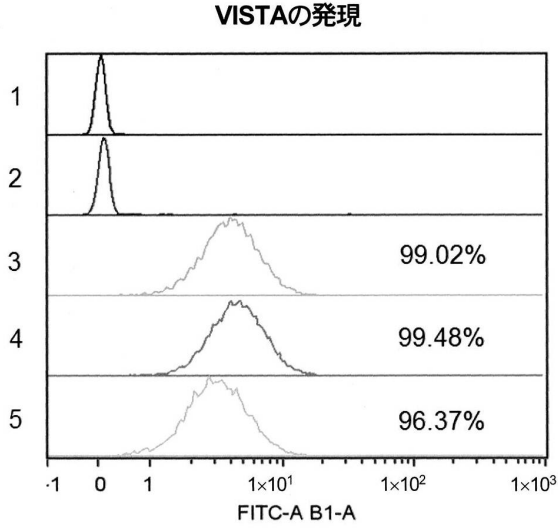
20

30

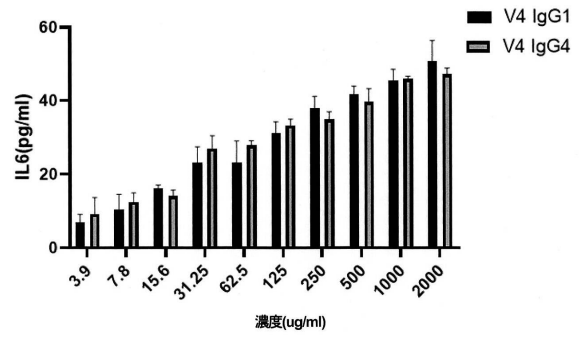
40

50

【 図 6 1 C 】

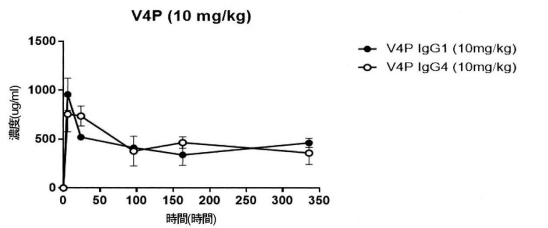


【 図 6 2 】



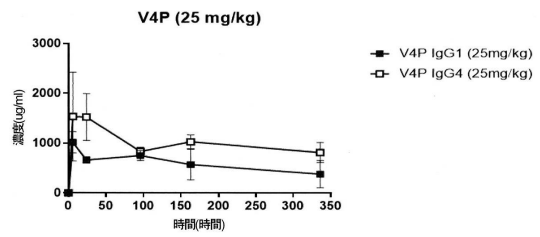
10

【 図 6 3 A 】



アーム	用量	Cmax (ug/ml)	Tmax (時間)	AUC0-336 (ug×時間/ml)	AUC0-(ug×時間/ml)	T _{1/2} (時間)	CL (ml/時間)	Vd (ml/kg)
V4P hlgG1	10 mg/kg	1264.925	6.000	163820.857	535540.716	494.683	0.005	3.631
V4P hlgG4	10 mg/kg	756.632	6.000	157719.024	325944.397	324.881	0.008	3.726

【 図 6 3 B 】



アーム	用量	Cmax (ug/ml)	Tmax (時間)	AUC0-336 (ug×時間/ml)	AUC0-(ug×時間/ml)	T _{1/2} (時間)	CL (ml/時間)	Vd (ml/kg)
V4P hlgG1	25 mg/kg	917.691	6.000	168137.409	624496.133	637.687	0.010	9.622
V4P hlgG4	25 mg/kg	1532.665	6.000	343433.514	790153.226	380.006	0.008	4.467

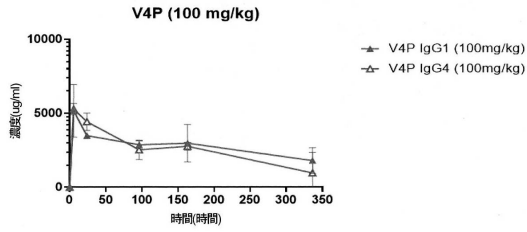
20

30

40

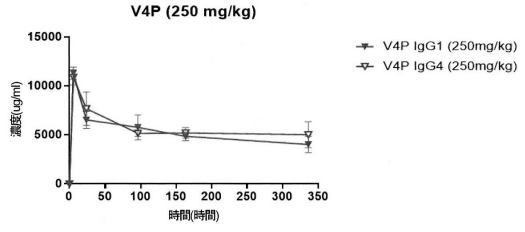
50

【 図 6 3 C 】



アーム	用量	Cmax (ug/ml)	Tmax (時間)	AUC0-336 (ug×時間/ml)	AUC _∞ (ug×時間/ml)	T _{1/2} (時間)	CL (ml/時間)	Vd (ml/kg)
V4P IgG1	100 mg/kg	5158.909	6.000	951642.588	1826917.880	340.466	0.014	6.425
V4P IgG4	100 mg/kg	5286.726	6.000	876440.678	1078777.776	144.581	0.023	4.644

【 図 6 3 D 】



アーム	用量	Cmax (ug/ml)	Tmax (時間)	AUC0-336 (ug×時間/ml)	AUC _∞ (ug×時間/ml)	T _{1/2} (時間)	CL (ml/時間)	Vd (ml/kg)
V4P IgG1	250mg/kg	11293.381	6.000	1806847.108	4415613.763	448.196	0.014	9.049
V4P IgG4	250mg/kg	1532.665	6.000	343433.514	790153.226	380.006	0.008	4.467

10

【 図 6 4 A 】

処置アーム	用量	赤血球						
		RBC数(10 ⁹ 個/L)	ヘモグロビン (g/dl)	ヘマトクリット (%)	貧血パラメータ			血小板数 (10 ⁹ 個/L)
					MCV (fml)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	
溶液	0	10.73	16.3	45.67	43	15.2	35.7	774
V4P	50 mg/kg	11.02	17.2	47.64	43	15.6	36	720

【 図 6 4 B 】

処置アーム	用量	白血球			
		WBC数 (10 ⁹ 個/L)	リン球数 (10 ⁹ 個/L)	単球数 (10 ⁹ 個/L)	好中球数 (10 ⁹ 個/L)
溶液	0	5.57	3.4	0.05	1.7
V4P	50 mg/kg	5.98	4.22	0.05	1.71

【 図 6 4 C 】

処置アーム	用量	生化学			
		肝臓(U/L)		腎臓(mg/dL)	
		ALT	ALP	CREA	BUN
溶液	0	29	102	17	0.2
V4P	50 mg/kg	23	50	19	0.2

【 図 6 5 A 】

処置アーム	時間 (時間)	赤血球						
		RBC数 (10 ⁹ 個/L)	ヘモグロビン (g/dl)	ヘマトクリット (%)	貧血パラメータ			血小板数 (10 ⁹ 個/L)
					MCV (fml)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	
溶液	0	7.94	14.97	45.50	57.33	18.87	32.87	223.3
	6	8.58	16.15	48.57	56.50	18.90	17.80	886.5
	24	8.25	15.70	46.55	56.33	19.03	33.73	427.0
	96	7.97	13.37	45.39	56.67	16.80	29.50	229.0
	168	8.27	15.87	46.96	57.00	19.20	33.80	244.7
V4 IgG1	0	7.65	14.30	43.82	57.33	18.60	41.73	172.3
	6	8.03	14.77	45.04	56.33	18.50	32.90	99.00
	24	8.14	14.73	45.84	56.33	18.17	32.23	305.7
	96	7.97	13.93	45.02	56.33	17.50	30.97	269.3
	168	8.15	15.50	45.53	55.67	19.03	34.03	151.1
V4 IgG4	0	7.94	14.23	46.23	58.00	17.83	30.63	247.0
	6	10.51	20.40	61.26	58.33	19.40	33.30	427.3
	24	8.04	14.90	45.31	56.00	18.50	32.83	293.3
	96	6.77	12.23	38.43	57.00	18.07	31.70	183.7
	168	7.69	13.73	43.65	57.00	17.97	31.53	303.0

20

30

40

50

【表 6 5 B】

処置アーム	時間 (時間)	白血球			
		WBC数(10 ⁹ 個/L)	リンパ球数 (10 ⁹ 個/L)	単球数 (10 ⁹ 個/L)	好中球数 (10 ⁹ 個/L)
対照	0	14.86	12.53	0.40	1.93
	6	10.88	8.63	0.21	2.03
	24	9.85	8.15	0.20	1.50
	96	11.68	8.94	0.59	2.15
	168	15.82	12.28	1.22	2.32
V4 IgG1	0	9.02	7.52	0.55	0.94
	6	8.79	5.84	0.35	2.60
	24	10.38	8.66	0.16	1.57
	96	10.89	8.91	0.35	1.63
	168	19.90	17.23	0.82	1.73
V4 IgG4	0	8.42	7.38	0.08	0.96
	6	18.20	10.76	0.62	6.82
	24	7.44	5.73	0.48	1.23
	96	7.32	5.56	0.15	1.61
	168	10.05	8.44	0.34	1.28

【表 6 5 C】

処置アーム	時間 (時間)	生化学									
		肝臓(L)		腎臓(mg/dL)		血糖		電解質		その他	
		ALT (U/L)	ALP (U/L)	CREA (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GU (mg/dL)	AMY (U/L)	NA (meq/L)	K (meq/L)	P (mg/dL)	CA (mg/dL)
対照	0	52.33	246.0	0.33	21.33	173.7	549.3	137.3	7.90	8.47	11.33
	6	28.67	210.7	0.37	10.33	195.7	517.7	134.0	6.00	8.20	10.87
	24	36.67	258.0	0.40	13.33	182.0	564.3	137.7	6.73	7.77	11.27
	96	32.33	218.3	0.10	12.67	178.3	532.0	134.0	5.50	8.07	10.93
	168	40.33	283.0	0.27	13.00	190.0	633.3	135.7	6.37	7.90	11.13
V4 IgG1	0	31.00	259.0	0.27	11.67	175.3	619.0	137.3	7.23	8.33	11.33
	6	35.67	261.7	0.33	12.00	140.3	590.0	139.3	8.43	9.97	11.63
	24	33.67	257.3	0.20	12.33	154.0	639.0	136.3	7.57	8.10	11.90
	96	35.67	235.7	0.23	11.50	181.7	648.0	135.7	6.67	8.33	11.20
	168	38.67	269.7	0.23	13.33	179.7	657.0	136.7	7.00	8.20	11.33
V4 IgG4	0	38.33	277.0	0.30	11.67	171.3	622.3	135.3	7.23	8.43	11.23
	6	57.00	217.0	0.20	10.00	138.7	469.0	144.3	44.03	8.20	11.15
	24	34.67	275.0	0.33	12.33	158.3	633.0	134.7	6.70	8.07	11.10
	96	36.00	196.3	0.23	11.67	172.0	585.7	138.0	8.90	9.23	11.53
	168	36.00	229.3	0.30	14.00	179.0	644.7	136.3	6.90	7.67	11.23

10

20

【配列表】

0007118332000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 38/16 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 49/16 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 G 0 1 N 33/574 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/04 (2006.01)
 C 0 7 K 14/725 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C 1 2 N 5/078 (2010.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)

F I

C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 38/16
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 49/16
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 43/00 1 0 7
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 G 0 1 N 33/574 A
 C 1 2 Q 1/04
 C 0 7 K 14/725
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 5/078
 A 6 1 K 35/76

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 16/180,949

(32)優先日 平成30年11月5日(2018.11.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 ボイド・カーカップ, ジェローム・ダグラス

シンガポール国シンガポール 1 1 7 6 0 4, リサーチ・リンク 1, ナンバー05-37, ケア・
 オブ・ハミングバード・バイオサイエンス・ホールディングス・プライベート・リミテッド

(72)発明者 イングラム, ピアーズ

シンガポール国シンガポール 1 1 7 6 0 4, リサーチ・リンク 1, ナンバー05-37, ケア・
 オブ・ハミングバード・バイオサイエンス・ホールディングス・プライベート・リミテッド

(72)発明者 タッカー, ディッティ

シンガポール国シンガポール 1 1 7 6 0 4, リサーチ・リンク 1, ナンバー05-37, ケア・
 オブ・ハミングバード・バイオサイエンス・ホールディングス・プライベート・リミテッド

(72)発明者 ウー, ズヒハオ

シンガポール国シンガポール 1 1 7 6 0 4, リサーチ・リンク 1, ナンバー05-37, ケア・
 オブ・ハミングバード・バイオサイエンス・ホールディングス・プライベート・リミテッド

(72)発明者 パシュケヴィチ, コンラッド

シンガポール国シンガポール 1 1 7 6 0 4, リサーチ・リンク 1, ナンバー05-37, ケア・
 オブ・ハミングバード・バイオサイエンス・ホールディングス・プライベート・リミテッド

(72)発明者 サンセノン, ヴィセンテ

シンガポール国シンガポール 1 1 7 6 0 4, リサーチ・リンク 1, ナンバー05-37, ケア・
 オブ・ハミングバード・バイオサイエンス・ホールディングス・プライベート・リミテッド

(72)発明者 グァン, シュ

シンガポール国シンガポール 1 1 7 6 0 4, リサーチ・リンク 1, ナンバー05-37, ケア・
 オブ・ハミングバード・バイオサイエンス・ホールディングス・プライベート・リミテッド

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第2015/097536 (WO, A2)

国際公開第2017/137830 (WO, A1)

国際公開第2014/039983 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

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

P u b M e d