

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7277047号
(P7277047)

(45)発行日 令和5年5月18日(2023.5.18)

(24)登録日 令和5年5月10日(2023.5.10)

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N Z N A	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/02		
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06		

請求項の数 36 (全196頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-505334(P2019-505334)	(73)特許権者	518363118 イミュネクスト インコーポレイテッド アメリカ合衆国 0 3 7 5 6 ニューハン プシャー、レバノン、メディカル セン ター ドライブ 1
(86)(22)出願日	平成29年4月14日(2017.4.14)	(73)特許権者	518363945 ザ トラスティーズ オブ ダートマス カ レッジ アメリカ合衆国 0 3 7 5 5 ニューハン プシャー、ハノーバー、ロベ フェリー ロード 1 1
(65)公表番号	特表2019-523287(P2019-523287 A)	(74)代理人	110000855 弁理士法人浅村特許事務所
(43)公表日	令和1年8月22日(2019.8.22)	(72)発明者	モロイ、マイケル アメリカ合衆国、ニューハンブシャー、 最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/US2017/027800		
(87)国際公開番号	WO2017/181139		
(87)国際公開日	平成29年10月19日(2017.10.19)		
審査請求日	令和2年4月14日(2020.4.14)		
(31)優先権主張番号	62/323,193		
(32)優先日	平成28年4月15日(2016.4.15)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/343,355		
(32)優先日	平成28年5月31日(2016.5.31)		
	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 抗ヒトV I S T A抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

それを必要とする個人において、自己免疫状態、アレルギー状態、または炎症状態を治療または予防するための医薬組成物であって、T細胞活性化のヒトIgVドメイン抑制因子(ヒトV I S T A)に特異的に結合する抗原結合領域を含む、単離されたモノクローナル抗体または組み換えモノクローナル抗体を含み、前記モノクローナル抗体は、V I S T AのT細胞免疫への効果のうちの1つ以上を刺激するかまたは促進し、

前記モノクローナル抗体は、C D 3 2 A結合ヒトIgG2定常領域またはヒトIgG2のFc領域を含み、

(i) 配列番号130、131、および132のV_HCDR、ならびに配列番号133、134、および135のV_LCDRを含み、

10

(ii) 配列番号150、151、および152のV_HCDR、ならびに配列番号153、154、および155のV_LCDRを含み、

(iii) 配列番号200、201、および202のV_HCDR、ならびに配列番号203、204、および205のV_LCDRを含み、

(iv) 配列番号370、371、および372のV_HCDR、ならびに配列番号373、374、および375のV_LCDRを含み、

(v) 配列番号380、381、および382のV_HCDR、ならびに配列番号383、384、および385のV_LCDRを含み、

(vi) 配列番号400、401、および402のV_HCDR、ならびに配列番号403

20

、404、および405のV_LC_DRを含み、
 (vii) 配列番号470、471、および472のV_HC_DR、ならびに配列番号473、474、および475のV_LC_DRを含み、
 (viii) 配列番号500、501、および502のV_HC_DR、ならびに配列番号503、504、および505のV_LC_DRポリペプチドを含み、
 (ix) 配列番号740、741、および742のV_HC_DR、ならびに配列番号743、744、および745のV_LC_DRを含み、または
 (x) 配列番号770、771、および772のV_HC_DR、ならびに配列番号773、774、および775のV_LC_DRを含み、

前記ヒトIgG2定常領域またはヒトIgG2のFc領域が、ヒトIgG1Fc領域に置き換えられると、VISTAのT細胞免疫への効果のうちの一つ以上と拮抗するアンタゴニスティックなモノクローナル抗ヒトVISTA抗体を生じる、医薬組成物。

【請求項2】

前記単離されたまたは組換えモノクローナル抗体が、
 (i) 配列番号136のV_Hポリペプチドおよび配列番号138のV_Lポリペプチドを含み、
 (ii) 配列番号156のV_Hポリペプチドおよび配列番号158のV_Lポリペプチドを含み、
 (iii) 配列番号206のV_Hポリペプチドおよび配列番号208のV_Lポリペプチドを含み、
 (iv) 配列番号376のV_Hポリペプチドおよび配列番号378のV_Lポリペプチドを含み、
 (v) 配列番号386のV_Hポリペプチドおよび配列番号388のV_Lポリペプチドを含み、
 (vi) 配列番号406のV_Hポリペプチドおよび配列番号408のV_Lポリペプチドを含み、
 (vii) 配列番号476のV_Hポリペプチドおよび配列番号478のV_Lポリペプチドを含み、
 (viii) 配列番号506のV_Hポリペプチドおよび配列番号508のV_Lポリペプチドを含み、
 (ix) 配列番号746のV_Hポリペプチドおよび配列番号748のV_Lポリペプチドを含み、または
 (x) 配列番号776のV_Hポリペプチドおよび配列番号778のV_Lポリペプチドを含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記ヒトIgG2定常領域またはヒトIgG2のFc領域が、Fcガンマ受容体に結合するネイティブのヒトIgG2を含む、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記ヒトIgG2定常領域またはヒトIgG2のFc領域が、さらにhFcRI(CD64)、FcγRIIA、およびFcRIIA(CD16A)またはFcRIIB(CD16B)のうちの一つ以上に結合する、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項5】

治療の前、同時、および/または後に、個体の細胞によるVISTAタンパク質発現または体液中のVISTAタンパク質発現をアッセイすることを含む、請求項1~4のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記治療された個体の造血細胞におけるVISTAレベルをアッセイすることを含む、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記治療された個体における骨髓系統細胞および/またはリンパ球、単球、もしくは好

10

20

30

40

50

中球、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、またはナチュラルキラーT（NK T）細胞のうちのいずれか1つ以上から選択される、造血細胞におけるVISTAレベルをアッセイすることを含み、請求項1～6のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記抗ヒトVISTAモノクローナル抗体が、37℃で表面プラズモン共鳴によって決定されるとき、1nM以下のヒトVISTAの親和性または K_D を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

関節リウマチ、GVHD、乾癬、IBDもしくは大腸炎、または他の炎症性もしくは自己免疫腸障害、狼瘡、または慢性もしくは急性感染症に関連する炎症もしくは肝毒性を治療または予防するために使用される、請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項10】

前記感染症は、肝炎ウイルスによって引き起こされる、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

狼瘡、または狼瘡様状態もしくは狼瘡様症状を治療または予防するための、あるいは狼瘡または狼瘡様状態に関連する病理学的症状を逆戻りさせ、安定化し、低減するための請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記狼瘡または狼瘡様状態が、「全身性エリテマトーデス」（「SLE」）、皮膚（cutaneous）狼瘡または皮膚（skin）狼瘡、薬物性狼瘡、および新生児狼瘡から選択される、請求項11に記載の医薬組成物。

20

【請求項13】

前記狼瘡または狼瘡様状態が、全身性エリテマトーデス（「SLE」）である、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項14】

自己免疫または炎症状態に関連する腎臓炎症、炎症性腎臓損傷、またはタンパク尿を治療または予防を治療または予防するための、請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項15】

炎症によって誘導された脾腫またはリンパ増殖を伴う炎症状態を治療または予防する、請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項16】

コルチコステロイド、他の抗炎症剤、抗マラリア薬、抗凝血剤、ACTH、メトトレキサート、シクロホスファミドなどの他の免疫抑制剤、およびペリムマブなどの他の免疫抑制抗体から任意で選択される他の薬物と組み合わせて使用される、請求項1～15のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項17】

急性または慢性GVHDの発症を予防するための、請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項18】

受容者内に移植される臓器、組織、または免疫細胞とイクスピボで接触させて急性または慢性GvHD反応を予防するための、請求項1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項19】

前記移植された細胞、組織、または臓器が、同種または異種である、請求項18に記載の医薬組成物。

【請求項20】

前記移植が、血液の悪性もしくは遺伝性、または他の疾患を治療するための、同種細胞を含む、請求項18または19に記載の医薬組成物。

【請求項21】

前記血液の疾患は、再生不良性貧血、骨髄線維症、または化学療法および放射線治療後

50

の骨髄不全を含む、請求項 2.0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2.2】

TNF - アルファアンタゴニスト、IL - 6 アンタゴニスト、ヒドロキシクロロキン、コルチコステロイド、メトトレキサート、シクロホスファミド、スルファサラジン、レフルノミド、金チオリンゴ酸ナトリウム、シクロスポリン、B 細胞枯渇および阻害抗体から選択される 1 以上と組み合わせて使用される、請求項 1 ~ 2.1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2.3】

乾癬または別の炎症性皮膚状態を治療または予防するための請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 2.4】

前記乾癬または別の炎症性皮膚状態が、尋常性乾癬、膿疱性乾癬、逆乾癬、滴状乾癬、乾癬性紅皮症、薬物性乾癬から選択されるか、または尋常性乾癬を含む、請求項 2.3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2.5】

IL - 12 アンタゴニスト、IL - 17 アンタゴニスト、IL - 23 アンタゴニスト、TNF - アルファアンタゴニスト、IL - 6 アンタゴニスト、ヒドロキシクロロキン、コルチコステロイド、ACTH、メトトレキサート、シクロホスファミド、スルファサラジン、レフルノミド、金チオリンゴ酸ナトリウム、シクロスポリン、レチノイド、ビタミン D 模倣物、シクロスポリン、ヒドロキシカルバミド、またはフマル酸エステルから選択される別の薬物と組み合わせて使用される、請求項 1 ~ 2.4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 2.6】

関節炎状態もしくは関節炎様状態を治療するための請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2.7】

前記関節炎または関節炎様状態が、関節リウマチ（「RA」）、乾癬性関節炎（「PsA」）、および骨関節炎（「OA」）から選択される、請求項 2.6 に記載の医薬組成物。

【請求項 2.8】

それを必要とする対象において、関節炎、または自己免疫もしくは炎症状態に関連する関節痛を治療または予防するための請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 2.9】

ヒト患者における、急性もしくは慢性感染症に関連する炎症および/または肝毒性および/またはサイトカイン応答を治療するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3.0】

硬変症またはアルコールもしくは薬物乱用に関連する肝毒性または肝損傷を予防または治療するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3.1】

前記治療される患者が、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、D 型肝炎、E 型肝炎、または G 型肝炎を有する、請求項 2.9 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 3.2】

全身性経路の投与様式、または非全身性経路の投与様式によって投与される、請求項 1 ~ 3.1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3.3】

注射、局所的、吸入、または経口により投与される、請求項 1 ~ 3.2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3.4】

静脈内、皮下、動脈内、筋肉内、非経口、脊髄、または上皮投与によって投与される、請求項 1 ~ 3.3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

50

【請求項 35】

アゴニスティックな抗PD-1抗体もしくは抗体断片、アゴニスティックな抗PD-L1抗体もしくはそのアゴニスティックな抗体断片、アゴニスティックなPD-L1ポリペプチドまたはそのアゴニスティックな断片、アゴニスティックなPD-1ポリペプチドまたはそのアゴニスティックな断片、あるいは前述のいずれかを含む融合タンパク質の少なくとも1種と共に投与される、請求項1～34のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

前記VISTAアゴニステックなモノクローナル抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、またはキメラ抗体である、請求項1～35のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2016年4月15日に出願された米国仮出願第62/323,193号、2016年5月31日に出願された同第62/343,355号、2016年8月9日に出願された同第62/372,362号、2016年9月9日に出願された同第62/385,627号、2016年11月22日に出願された同第62/425,184号、2016年7月19日に出願された同第62/363,929号、2016年7月21日に出願された同第62/365,085号、2016年9月9日に出願された同第62/385,805号、2016年7月19日に出願された同第62/363,931号、2016年7月21日に出願された同第62/365,102号、2016年9月9日に出願された同第62/385,871号、2016年7月19日に出願された同第62/363,917号、2016年7月21日に出願された同第62/365,081号、2016年9月9日に出願された同第62/385,888号、2016年7月19日に出願された同第62/364,073号、2016年7月21日に出願された同第62/365,166号、2016年9月9日に出願された同第62/385,893号、2016年7月19日に出願された同第62/363,925号、2016年7月21日に出願された同第62/365,087号、2016年9月9日に出願された同第62/385,785号、2016年10月11日に出願された同第62/406,632号に対して優先権を主張し、これらの各々および全ては、参照により本明細書に組み込まれる。本出願は、参照により組み込まれ、優先権も主張される、2017年4月____日に出願されたPCT出願_____「ANTI-HUMAN VISTA ANTIBODIES AND USE THEREOF」(代理人番号43260.2214)に関する。

20

30

【0002】

本発明は、新規抗ヒトVISTA抗体および抗体断片、すなわち、抗ヒトVISTA(T細胞活性化(1)の免疫グロブリンV領域含有抑制因子)(「VISTA」)抗体および抗体断片の特定に関する。より具体的には、本出願は、新規ヒトVISTAアゴニスト、すなわち、免疫、特にT細胞免疫へのヒトVISTAの抑制効果を刺激するか、または促進する抗ヒトVISTA抗体および抗体断片を提供する。また、本発明は、CD4⁺もしくはCD8⁺T細胞増殖、CD4⁺もしくはCD8⁺T細胞活性化へのVISTAの抑制効果、および免疫サイトカイン、特に炎症誘発性サイトカインの産生へのVISTAの抑制効果など、VISTAの免疫への抑制効果を強化するか、または模倣するためのかかるアゴニストの使用にも関する。本発明はまた、特に、自己免疫、炎症、アレルギー障害、敗血症、GVHDなどの、T細胞免疫および炎症誘発性サイトカインの発現の予防もしくは阻害が治療的に有益である状態の治療、または癌などのいくつかの状態の炎症性副作用の軽減における、予防薬または治療薬としてのこれらのアゴニスティック抗体および抗体断片の特定の使用にも関する。

40

【背景技術】

50

【0003】

免疫陰性チェックポイント調節因子（NCR）経路は、ヒト免疫関連疾患の治療において特別な臨床標的であることが証明されている。腫瘍免疫を強化するためにモノクローナル抗体（mAb）を使用した2つのNCR、CTLA-4およびPD-1の遮断は、癌の治療に革命を起こし、ヒト疾患の臨床的に検証された標的としてこれらの経路を確立した。NCR経路をもたらずNCRリガンドの可溶性バージョンも、自己免疫を治療するための免疫抑制薬（すなわち、関節リウマチのAMP-110/B7-H4-Ig）として診療所に配置された。

【0004】

VISTA（参照1を参照のこと）は、その最も近い系統学的近縁種がPD-L1である、NCRリガンドである。VISTAは、PD-L1に対して相同性を有するが、造血区画に限定される独特の発現パターンを示す。具体的には、VISTAは、CD11b^{high}骨髓細胞上に構成的かつ高度に発現し、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞上により低いレベルで発現する。PD-L1同様、VISTAは免疫を強く抑制するリガンドであり（参照1）、PD-L1同様、VISTAの遮断は、前臨床腫瘍学モデルにおいて、癌に対する治療免疫を獲得することを可能にする（参照2を参照のこと）。VISTAの遮断は、免疫、特にCD8⁺およびCD4⁺媒介T細胞免疫を強化するが、VISTAの細胞外ドメインの可溶性Ig融合タンパク質（VISTA-Ig）での治療は、免疫を抑制し、自己免疫疾患の複数のマウスモデルの進行を停止させることが示されている。

【0005】

はっきりとした科学的証拠は、VISTAが強いT細胞抑制を誘導するリガンドであることを示した。多数のアntagオニスティックな抗ヒトVISTA抗体は、Dartmouth CollegeおよびJanssenを含む異なるグループによって報告されている。これらの抗体は、癌および感染などの、VISTAのT細胞免疫への免疫抑制効果の抑制が望ましい状態の治療において有用である。しかしながら、本発明者らの知る限りでは、ヒトVISTAの作用を刺激する抗ヒトVISTA抗体または抗体断片は、これまでは特定されていない。かかるアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体および抗体断片は、免疫、特にT細胞免疫の抑制が望ましい状態、および/またはVISTAの発現が異常に下方制御される状態の治療に望ましいであろう。

【発明の概要】

【0006】

ヒトVISTAおよびその変異型に特異的に結合する新規抗体および抗体断片、例えば、ヒトVISTAに特異的に結合し、ヒトVISTAの免疫への作用を促進するか、または模倣するキメラ、ヒト、ヒト化、もしくは多重特異性抗ヒトVISTA抗体を提供することが、本発明の目的である。

【0007】

アゴニスティックな抗体または抗体断片が、図4に示されるCDRならびに可変重ポリペプチドおよび可変軽ポリペプチドを有する抗ヒトVISTA抗体のうちのいずれか1つと同じかまたは重なるエピトープに結合する、ヒトVISTAに特異的に結合する抗原結合領域を含むアゴニスティックな抗体またはその抗体断片を提供することが、本発明の具体的な目的である。

【0008】

本発明の具体的な目的は、抗体または抗体断片が、図4に示される配列を有する抗ヒトVISTA抗体のうちのいずれか1つのCDRポリペプチドを有する可変重配列および可変軽配列を含む、ヒトVISTAに特異的に結合する抗原結合領域を含むアゴニスティックな抗体またはその抗体断片を使用する治療方法および予防方法を提供することである。

【0009】

本発明の具体的な目的は、抗体または抗体断片が、VSTB49～VSTB116から選択される抗ヒトVISTA抗体のCDRポリペプチドを有する可変重配列および可変軽配列を含む、ヒトVISTAに特異的に結合する抗原結合領域を含むアゴニスティックな

10

20

30

40

50

抗体またはその抗体断片を使用する治療方法および予防方法を提供することである。

【0010】

本発明の具体的な目的は、VSTB49～VSTB116の可変重ポリペプチド配列および可変軽ポリペプチド配列に対して少なくとも90%、95%、または96～99%の配列同一性を有する可変重ポリペプチドおよび/または可変軽ポリペプチドを含むVSTB49～VSTB116から選択される抗ヒトVISTA抗体のCDRを含む、アゴニスティックな抗体またはその抗体断片を使用する治療方法および予防方法を提供することである。

【0011】

本発明の具体的な目的は、VSTB49～VSTB116の可変重ポリペプチド配列および可変軽ポリペプチド配列に対して同一である可変重ポリペプチドおよび/または可変軽ポリペプチドを含むVSTB49～VSTB116のうちのいずれか1つと同じCDRを含む、アゴニスティックな抗体またはその抗体断片を使用する治療方法および予防方法を提供することである。

10

【0012】

本発明の具体的な目的は、図4に開示されるCDRならびに可変重ポリペプチドおよび可変軽ポリペプチドを含む抗ヒトVISTA抗体のうちのいずれか1つとしてCDRポリペプチドを有する可変重配列および可変軽配列を含むヒトVISTAに特異的に結合する抗原結合領域を含む、キメラ、ヒト、ヒト化、多重特異性(例えば二重特異性)抗ヒトVISTA抗体または抗体断片である、アゴニスティックな抗体またはその抗体断片を使用する治療方法および予防方法を提供することである。

20

【0013】

新規免疫抑制剤、すなわち、抗ヒトVISTA抗体および抗体断片、例えば、ヒトIgG2定常ドメインまたはIgG2Fc領域を含有するものを用いた治療および予防方法を提供することが、本発明の別の具体的な目的であり、任意で、ヒトIgG2定常ドメインまたはIgG2Fc領域のFcR結合能力は、ヒトVISTAの免疫への効果、例えば、T細胞活性、分化、および増殖へのヒトVISTAの抑制効果、ならびに炎症誘発性サイトカインの発現へのヒトVISTAの抑制効果を刺激するか、誘発するか、または模倣する、野生型ヒトIgG2定常ドメインまたはIgG2Fc領域と比較して維持されるか、または強化される。

30

【0014】

VISTAのT細胞免疫への抑制効果を強化するか、または模倣する、すなわち、CD4+またはCD8+T細胞増殖、CD4+またはCD8+T細胞活性化、ならびに免疫サイトカイン、特に、IL-2、IL-4、IL-6、IL-17、TNF-、および/またはGM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)などの炎症誘発性サイトカインの産生へのVISTAの抑制、ならびにKC(ケラチノサイト走化性因子)またはMIP-2(マクロファージ炎症性タンパク質2)などのケモカインまたは走化性因子の発現へのVISTAの促進効果を抑制する、新規免疫抑制抗体および抗体断片を提供することが、本発明の具体的な目的である。

【0015】

特定のエピトープ特異性の、またはヒトVISTAへの結合に関して特定の抗ヒトVISTA抗体と競合する、新規免疫抑制抗ヒトVISTA抗体またはアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体および抗体断片を提供することが、本発明の具体的な目的である。

40

【0016】

VISTAの免疫への抑制効果、例えば、T細胞免疫へのVISTAの抑制効果、すなわち、CD4+またはCD8+T細胞増殖、CD4+またはCD8+T細胞活性化の抑制効果を刺激し(強化する、誘発する、または模倣する)、かつ/またはIL-2、IL-4、IL-6、IL-17、TNF-、および/もしくはGM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)などの炎症誘発性サイトカインの産生、ならびにKC(ケラチノサイト走化性因子)またはMIP-2(マクロファージ炎症性タンパク質2)などの

50

ケモカインまたは走化性因子の発現へのV I S T Aの促進効果を抑制する、特定のエピトープ特異性の、またはヒトV I S T Aへの結合に関して特定の抗ヒトV I S T A抗体と競合する、新規免疫抑制抗ヒトV I S T A抗体またはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体および抗体断片を提供することが、本発明の具体的な目的である。

【 0 0 1 7 】

また、本発明は、特に免疫反応の予防または阻害または減少が治療的に望ましく、なお特に、T細胞免疫、またはより具体的にはC D 4 +もしくはC D 8 +媒介T細胞免疫の予防または阻害または減少が、自己免疫、炎症、アレルギー性障害、敗血症、G V H Dなどの治療的に有益である状態の治療に、および/または移植もしくは細胞療法レシピエント、例えば、C A R - Tレシピエントの治療に、あるいは癌などのいくつかの状態の炎症性副作用の軽減における予防薬または治療薬としての、アゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体および抗体断片を用いた治療または予防方法の提供にも関する。

10

【 0 0 1 8 】

本発明による診断にまたは治療的に有効な量のアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体またはアンタゴニスト抗ヒトV I S T A抗体、例えば、静脈内、皮下、または筋肉内投与可能な組成物などのヒト治療に使用するのに適した、例えば図4に示される配列を有する抗体のいずれかと同じC D Rを含有するものを含む診断用組成物または医薬組成物を提供することが、本発明の別の具体的な目的である。

【 0 0 1 9 】

別の免疫アゴニスト、例えば、P D - 1またはP D - L 1アゴニストと共に本発明によるアゴニスト抗体を使用する診断または治療方法を提供することが、本発明の別の具体的な目的であり、例えば、P D - 1もしくはP D - L 1アゴニストは、抗P D - 1抗体もしくは抗体断片、抗P D - L 1抗体もしくは抗体断片、一価もしくは多量体であり得るP D - L 1ポリペプチドまたはその断片、一価もしくは多量体であり得るP D - 1ポリペプチドまたはその断片、あるいは前述のいずれかを含む複合体または融合タンパク質から選択される。

20

【 0 0 2 0 】

本発明の別の具体的な目的は、インビトロまたはインビボで、免疫細胞、例えばヒト免疫細胞を、本発明によるアゴニスト抗体と接触させる方法を提供することであり、例えば、接触させた細胞は、炎症、アレルギー、もしくは自己免疫状態、例えば、G V H D、慢性もしくは急性肝炎、R A、I B D、乾癬、または狼瘡を有する対象など、ヒト対象に注入される。

30

【 0 0 2 1 】

本発明の別の具体的な目的は、抗体または抗体断片がV I S T Aの免疫への作用のうちの1つ以上を刺激するかまたは促進する、T細胞活性化のヒトI g Vドメイン抑制因子(ヒトV I S T A)に特異的に結合する抗原結合領域、例えば、ヒトI g G 2定常領域またはヒトI g G 2 F c領域を含む、治療または予防有効量の単離された抗体またはその抗体断片を、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に投与することを含む、治療または予防方法を行う方法を提供することであり、任意に、抗体のヒトI g G 2定常領域またはF c領域は、ヒトC D 3 2 Aを含むF cガンマ受容体に結合し、例えば、I g G 2定常領域またはF c領域は、1つ以上のF c受容体に結合するネイティブのヒトI g G 2、任意に、h F c R I (C D 6 4)、F c y R I I Aもしくはh F c y R I I B (C D 3 2 もしくはC D 3 2 A)、およびF c R I I I A (C D 1 6 A) またはF c R I I I B (C D 1 6 B) のうちの1つ以上を含む。

40

【 0 0 2 2 】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、図4の配列を有する抗ヒトV I S T A抗体のうちのいずれかによって結合されるエピトープを含むか、またはそれと重なるV I S T Aエピトープと

50

競合するか、またはそれに結合する。

【 0 0 2 3 】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、L L D S G L Y C C L V V E I R H H H S E H R V H (配列番号 9 2) の残基を含むエピトープのより多くの残基のうちの 1 つに結合するか、またはそれと相互作用する V I S T A エピトープと競合するか、またはそれに結合する。

【 0 0 2 4 】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、7 9 E V Q T C S E R R P I R 9 0 (配列番号 6 8)、4 8 N V T L T C R L L G P V 6 0、1 5 3 H H H S E H R V H G A M 1 6 4、5 2 L T C R L L G P V 6 0、5 6 L L G P V D K G H D V T F Y K 7 0、1 1 3 L A Q R H G L E S A S D H H G 1 2 7、1 5 3 H H H S E H R V H G A M 1 6 4、9 3 T F Q D L H L H H G G H Q A A 1 0 7、1 4 6 C L V V E I R H H H S E H 1 5 8、5 3 T C R L L G P V D K G 6 3、1 2 3 S D H H G 1 2 7、および/または 1 5 3 H H H S E H R V H G A M 1 6 4 のうちの 1 つ以上の残基を含む V I S T A エピトープと競合するか、またはそれに結合する。

【 0 0 2 5 】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、7 9 E V Q T C S E R R P I R 9 0 (配列番号 6 8) の 1 つ以上の残基を含む V I S T A エピトープと競合するか、またはそれに結合する。

【 0 0 2 6 】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、ヒト V I S T A の免疫への少なくとも 1 つの効果、例えば、T 細胞免疫、単球の活性化、T 細胞増殖の誘導；サイトカイン発現の誘導または抑制、単球生存の増加、細胞発現 V I S T A における抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) の誘導；および細胞発現 V I S T A における抗体依存性細胞食作用 (A D C P) の誘導のうちのいずれか 1 つ以上へのヒト V I S T A の抑制効果を促進するか、または強化し、例えば、単離された抗体または抗体断片は、ヒト V I S T A に特異的に結合する抗原結合領域を含み、この抗体または抗体断片は、図 4 に示される C D R ならびに可変重ポリペプチドおよび可変軽ポリペプチドを有する抗ヒト V I S T A 抗体のうちのいずれか 1 つと同一の C D R ポリペプチドを有する可変重配列および可変軽配列を含み、かつ/または V S T B 4 9 ~ V S T B 1 1 6 から選択される抗体と同じ C D R を含み、かつ/または V S T B 4 9 ~ V S T B 1 1 6 のうちのいずれか 1 つから選択される抗ヒト V I S T A 抗体の配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する可変重ポリペプチドおよび/もしくは可変軽ポリペプチドを含み、その可変重ポリペプチド配列および/または可変軽ポリペプチド配列は、図 4 に示され、かつ/または V S T B 4 9 ~ V S T B 1 1 6 のうちのいずれか 1 つから選択される抗ヒト V I S T A 抗体の配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する可変重ポリペプチドおよび/もしくは可変軽ポリペプチドを含み、その可変重ポリペプチド配列および可変軽ポリペプチド配列は、図 4 に示されるか、または V S T B 4 9 ~ V S T B 1 1 6 のうちのいずれか 1 つから選択される抗ヒト V I S T A 抗体の配列と少なくとも 9 6 ~ 9 9 % の配列同一性を有する可変重ポリペプチドおよび/もしくは可変軽ポリペプチドを含み、かつ/または V S T B 4 9 ~ V S T B 1 1 6 のうちのいずれか 1 つから選択

10

20

30

40

50

される抗ヒトV I S T A抗体の配列と同一の可変重ポリペプチドおよび/もしくは可変軽ポリペプチドを含み、その可変重ポリペプチド配列および可変軽ポリペプチド配列は、図4に示され、かつ/またはヒト定常ドメイン、例えば、欠失、置換、もしくは付加変異により、または前述のいずれかの組み合わせによって任意に修飾される、I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4から選択される、例えばヒト定常ドメインを含み、かつ/または単離された抗体または抗体断片は、F a b、F (a b ') 2、またはs c F v抗体断片を含むか、またはそれである。

【0027】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、例えば、ヒトV I S T Aの抑制効果T細胞免疫、単球の活性化、T細胞増殖の抑制；サイトカイン発現の誘導または抑制、単球生存の増加、細胞発現V I S T Aにおける抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(A D C C)の抑制；および細胞発現V I S T Aの抗体依存性細胞食作用(A D C P)の抑制、から選択される、ヒトV I S T Aの免疫への効果のうち少なくとも1つを促進するか、または強化する、例えば、ヒトI g G 2定常領域またはF c領域を含む抗体であり、例えば、単離された抗体または抗体断片は、ヒトV I S T Aの免疫への抑制効果、例えば、T細胞免疫、単球の活性化、T細胞増殖；サイトカイン発現、単球生存、細胞発現V I S T Aにおける抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(A D C C)；および細胞発現V I S T Aにおける抗体依存性細胞食作用(A D C P)のうちいずれか1つ以上へのヒトV I S T Aへの効果を促進するかまたは強化する。

【0028】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、T細胞免疫および/または炎症誘発性サイトカイン発現を阻害する。

【0029】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、ヒトF c領域、例えば、ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4、もしくは前述のいずれかのキメラを含み、かつ/あるいは単離された抗体または抗体断片は、キメラ、ヒト、多重特異性、もしくはヒト化抗体または抗体断片を含み、かつ/あるいは単離された抗体または抗体断片は、変異したヒトI g G 2定常ドメインもしくはF c領域を含み、かつ/あるいは単離された抗体または抗体断片は、ヒトI g G 2定常ドメインもしくはその断片、またはh l g G 1、h I g G 3、h I g G 4、I g A、I g D、I g E、もしくはI g Mを含み、該抗体のヒンジ全体または実質的にヒンジ全体およびC H 1ドメイン、ならびに任意に軽鎖定常領域全体または実質的に軽鎖定常領域全体が、h l g G 2の対応する軽鎖全体または実質的に軽鎖全体、ならびにヒンジおよびC H 1ドメイン(「H 2領域」または「H 2ドメイン」)で置換されており、かつ/あるいは単離された抗体または抗体断片は、(i) I g G 2のF c領域を含み、1 2 7位の重鎖システイン残基および2 1 4位の軽鎖システイン残基(番号はK a b a tによる)のいずれかまたは両方が、欠失しているかまたは異なるアミノ酸残基に変更されており、結果として、それらの残基が変更されていない抗体と比較して、得られた変性抗体のアゴニスティックな特性が増加しており、(i i) 該抗体のH 2領域の2 1 4位のシステイン残基が、変異しているかもしくは別のアミノ酸で置換されており、かつ/または重鎖の1 2 7位、2 3 2位、もしくは2 3 3位のシステイン残基のうち1つ以上が欠失しているか、もしくは別のアミノ酸で置換されており、(i i i) 少なくとも

10

20

30

40

50

も1つのシステイン残基が欠失しているか、または別のアミノ酸に変更されているヒトIgG2定常ドメインを含み、(i v) V S T B 9 5 (図4に示される可変重配列および可変軽配列)と同じ、ヒトV I S T A上のエピトープと競合するか、またはそれと結合する。

【0030】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、

配列番号100、101、および102のV_HCDR、ならびに配列番号103、104、および105のV_LCDRを含み、

10

配列番号110、111、および112のV_HCDR、ならびに配列番号113、114、および115のV_LCDRを含み、

配列番号120、121、および122のV_HCDR、ならびに配列番号123、124、および125のV_LCDRを含み、

配列番号130、131、および132のV_HCDR、ならびに配列番号133、134、および135のV_LCDRを含み、

配列番号140、141、および142のV_HCDR、ならびに配列番号143、144、および145のV_LCDRを含み、

配列番号150、151、および152のV_HCDR、ならびに配列番号153、154、および155のV_LCDRを含み、

20

配列番号160、161、および162のV_HCDR、ならびに配列番号163、164、および165のV_LCDRを含み、

配列番号170、171、および172のV_HCDR、ならびに配列番号173、174、および175のV_LCDRを含み、

配列番号180、181、および182のV_HCDR、ならびに配列番号183、184、および185のV_LCDRを含み、

配列番号190、191、および192のV_HCDR、ならびに配列番号193、194、および195のV_LCDRを含み、

配列番号200、201、および202のV_HCDR、ならびに配列番号203、204、および205のV_LCDRを含み、

30

配列番号210、211、および212のV_HCDR、ならびに配列番号213、214、および215のV_LCDRを含み、

配列番号220、221、および222のV_HCDR、ならびに配列番号223、224、および225のV_LCDRを含み、

配列番号230、231、および232のV_HCDR、ならびに配列番号233、234、および235のV_LCDRを含み、

配列番号240、241、および242のV_HCDR、ならびに配列番号243、244、および245のV_LCDRを含み、

配列番号250、251、および252のV_HCDR、ならびに配列番号253、254、および255のV_LCDRを含み、

40

配列番号260、261、および262のV_HCDR、ならびに配列番号263、264、および265のV_LCDRを含み、

配列番号270、271、および272のV_HCDR、ならびに配列番号273、274、および275のV_LCDRを含み、

配列番号280、281、および282のV_HCDR、ならびに配列番号283、284、および285のV_LCDRを含み、

配列番号290、291、および292のV_HCDR、ならびに配列番号293、294、および295のV_LCDRを含み、

配列番号300、301、および302のV_HCDR、ならびに配列番号303、304、および305のV_LCDRを含み、

50

配列番号 310、311、および 312 の V_HCDR、ならびに配列番号 313、314、および 315 の V_LCDR を含み、

配列番号 320、321、および 322 の V_HCDR、ならびに配列番号 323、324、および 325 の V_LCDR を含み、

配列番号 330、331、および 332 の V_HCDR、ならびに配列番号 333、334、および 335 の V_LCDR を含み、

配列番号 340、341、および 342 の V_HCDR、ならびに配列番号 343、344、および 345 の V_LCDR を含み、

配列番号 350、351、および 352 の V_HCDR、ならびに配列番号 353、354、および 355 の V_LCDR を含み、

配列番号 360、361、および 362 の V_HCDR、ならびに配列番号 363、364、および 365 の V_LCDR を含み、

配列番号 370、371、および 372 の V_HCDR、ならびに配列番号 373、374、および 375 の V_LCDR を含み、

配列番号 380、381、および 382 の V_HCDR、ならびに配列番号 383、384、および 385 の V_LCDR を含み、

配列番号 390、391、および 392 の V_HCDR、ならびに配列番号 393、394、および 395 の V_LCDR を含み、

配列番号 400、401、および 402 の V_HCDR、ならびに配列番号 403、404、および 405 の V_LCDR を含み、

配列番号 410、411、および 412 の V_HCDR、ならびに配列番号 413、414、および 415 の V_LCDR を含み、

配列番号 420、421、および 422 の V_HCDR、ならびに配列番号 423、424、および 425 の V_LCDR を含み、

配列番号 430、431、および 432 の V_HCDR、ならびに配列番号 433、434、および 435 の V_LCDR を含み、

配列番号 440、441、および 442 の V_HCDR、ならびに配列番号 443、444、および 445 の V_LCDR を含み、

配列番号 450、451、および 452 の V_HCDR、ならびに配列番号 453、454、および 455 の V_LCDR を含み、

配列番号 460、461、および 462 の V_HCDR、ならびに配列番号 463、464、および 465 の V_LCDR を含み、

配列番号 470、471、および 472 の V_HCDR、ならびに配列番号 473、474、および 475 の V_LCDR を含み、

配列番号 480、481、および 482 の V_HCDR、ならびに配列番号 483、484、および 485 の V_LCDR を含み、

配列番号 490、491、および 492 の V_HCDR、ならびに配列番号 493、494、および 495 の V_LCDR ポリペプチドを含み、

配列番号 500、501、および 502 の V_HCDR、ならびに配列番号 503、504、および 505 の V_LCDR ポリペプチドを含み、

配列番号 510、511、および 512 の V_HCDR、ならびに配列番号 513、514、および 515 の V_LCDR ポリペプチドを含み、

(配列番号 520、521、および 522 の V_HCDR、ならびに配列番号 523、524、および 525 の V_LCDR ポリペプチドを含み、

配列番号 530、531、および 532 の V_HCDR、ならびに配列番号 533、534、および 535 の V_LCDR ポリペプチドを含み、

配列番号 540、541、および 542 の V_HCDR、ならびに配列番号 543、544、および 545 の V_LCDR ポリペプチドを含み、

配列番号 550、551、および 552 の V_HCDR、ならびに配列番号 553、554、および 555 の V_LCDR ポリペプチドを含み、

10

20

30

40

50

配列番号 560、561、および 562 の V_HCDR 、ならびに配列番号 563、564、および 565 の V_LCDR を含み、

配列番号 570、571、および 572 の V_HCDR 、ならびに配列番号 573、574、および 575 の V_LCDR を含み、

配列番号 580、581、および 582 の V_HCDR 、ならびに配列番号 583、584、および 585 の V_LCDR を含み、

配列番号 590、591、および 592 の V_HCDR 、ならびに配列番号 593、594、および 595 の V_LCDR を含み、

配列番号 600、601、および 602 の V_HCDR 、ならびに配列番号 603、604、および 605 の V_LCDR を含み、

配列番号 610、611、および 612 の V_HCDR 、ならびに配列番号 613、614、および 615 の V_LCDR を含み、

配列番号 620、621、および 622 の V_HCDR 、ならびに配列番号 623、624、および 625 の V_LCDR を含み、

配列番号 630、631、および 632 の V_HCDR 、ならびに配列番号 633、634、および 635 の V_LCDR を含み、

配列番号 640、641、および 642 の V_HCDR 、ならびに配列番号 643、644、および 645 の V_LCDR を含み、

配列番号 650、651、および 652 の V_HCDR 、ならびに配列番号 653、654、および 655 の V_LCDR を含み、

配列番号 660、661、および 662 の V_HCDR 、ならびに配列番号 663、664、および 665 の V_LCDR を含み、

配列番号 670、671、および 672 の V_HCDR 、ならびに配列番号 673、674、および 675 の V_LCDR を含み、

配列番号 680、681、および 682 の V_HCDR 、ならびに配列番号 683、684、および 685 の V_LCDR を含み、

配列番号 690、691、および 692 の V_HCDR 、ならびに配列番号 693、694、および 695 の V_LCDR を含み、

配列番号 700、701、および 702 の V_HCDR 、ならびに配列番号 703、704、および 705 の V_LCDR を含み、

配列番号 710、711、および 712 の V_HCDR 、ならびに配列番号 713、714、および 715 の V_LCDR を含み、

配列番号 720、721、および 722 の V_HCDR 、ならびに配列番号 723、724、および 725 の V_LCDR を含み、

配列番号 730、731、および 732 の V_HCDR 、ならびに配列番号 733、734、および 735 の V_LCDR を含み、

配列番号 740、741、および 742 の V_HCDR 、ならびに配列番号 743、744、および 745 の V_LCDR を含み、

配列番号 750、751、および 752 の V_HCDR 、ならびに配列番号 753、754、および 755 の V_LCDR を含み、

配列番号 760、761、および 762 の V_HCDR 、ならびに配列番号 763、764、および 765 の V_LCDR を含み、

配列番号 770、771、および 772 の V_HCDR 、ならびに配列番号 773、774、および 775 の V_LCDR を含み、

配列番号 780、781、および 782 の V_HCDR 、ならびに配列番号 783、784、および 785 の V_LCDR を含み、

配列番号 790、791、および 792 の V_HCDR 、ならびに配列番号 793、794、および 795 の V_LCDR を含み、

配列番号 800、801、および 802 の V_HCDR 、ならびに配列番号 803、804、および 805 の V_LCDR を含み、

10

20

30

40

50

配列番号 810、811、および 812 の V_H CDR、ならびに配列番号 813、814、および 815 の V_L CDR を含む。

【0031】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の単離されたアゴニスティックな抗ヒト VISTA 抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、この単離された抗体または抗体断片は、

- 配列番号 106 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 108 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 116 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 118 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 126 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 128 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 136 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 138 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 146 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 148 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 156 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 158 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 166 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 168 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 176 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 178 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 186 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 188 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 196 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 198 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 206 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 208 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 216 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 218 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 226 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 228 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 236 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 238 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 246 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 248 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 256 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 258 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 266 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 268 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 276 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 278 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 286 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 288 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 296 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 298 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 306 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 308 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 316 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 318 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 326 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 328 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 336 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 338 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 346 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 348 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 356 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 358 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 366 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 368 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 376 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 378 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 386 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 388 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 396 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 398 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 406 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 408 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 416 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 418 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 426 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 428 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 436 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 438 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 446 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 448 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 456 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 458 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 466 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 468 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 476 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 478 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 486 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 488 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 496 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 498 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 506 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 508 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 516 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 518 の V_L ポリペプチドを含み、
- 配列番号 526 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 528 の V_L ポリペプチドを含み、

10

20

30

40

50

配列番号 5 3 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 5 3 3 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 5 4 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 5 4 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 5 5 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 5 5 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 5 6 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 5 6 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 5 7 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 5 7 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 5 8 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 5 8 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 5 9 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 5 9 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 0 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 0 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 1 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 1 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 2 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 2 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 3 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 3 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 4 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 4 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 5 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 5 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 6 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 6 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 7 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 7 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 8 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 8 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 6 9 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 6 9 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 0 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 0 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 1 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 1 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 2 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 2 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 3 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 3 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 4 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 4 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 5 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 5 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 6 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 6 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 7 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 7 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 8 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 8 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 7 9 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 7 9 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 8 0 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 8 0 8 の V_L ポリペプチドを含み、
 配列番号 8 1 6 の V_H ポリペプチドおよび配列番号 8 1 8 の V_L ポリペプチドを含む。

10

20

【 0 0 3 2 】

30

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、単離されたアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体またはヒト I g G 2 定常ドメインを含む前述のうちのいずれかによる抗体を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、任意に、少なくとも 1 つのシステイン残基は、欠失しているかまたは別のアミノ酸残基に変更されている。

【 0 0 3 3 】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、単離された抗体または抗体断片は、以下の免疫阻害効果：(i) 免疫応答の減少、(i i) T 細胞活性化の減少、(i i i) 細胞傷害性 T 細胞活性の減少、(i v) ナチュラルキラー (N K) 細胞活性の減少、(v) T 細胞活性の減少、(v i) 炎症誘発性サイトカイン分泌の減少、(v i i) I L - 2 分泌の減少、(v i i i) インターフェロン - 産生の減少、(i x) T h 1 応答の減少、(x) T h 2 応答の減少、(x i) 細胞数および/もしくは制御性 T 細胞の活性の減少、(x i i) 制御性細胞活性および/もしくは骨髄由来抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉系間質細胞、T I E 2 発現単球のうちの 1 つ以上の増加、(x i i i) 制御性細胞活性および/もしくは骨髄由来抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉系間質細胞、T I E 2 発現単球のうちの 1 つ以上の活性の増加、(x i i i) M 2 マクロファージの増加、(x i v) M 2 マクロファージ活性の増加、(x v) N 2 好中球の増加、(x v i) N 2 好中球活性の増加

40

50

、(x v i i) T細胞活性化阻害の増加、(x v i i i) C T L活性化阻害の増加、(x i x) N K細胞活性化阻害の増加、(x x) T細胞枯渇の増加、(x x i) T細胞応答の減少、(x x i i) 細胞傷害性細胞活性の減少、(x x i i i) 抗原特異的メモリー応答の減少、(x x i v) 細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(x x v) 細胞への細胞傷害性効果もしくは細胞増殖抑制効果の減少、(x x v i) 直接細胞死滅の減少、(x x v i i) T h 1 7活性の減少、ならびに/または(x x v i i i) 補体依存性細胞傷害および/もしくは抗体依存性細胞媒介性細胞傷害の減少、のうちのいずれか1つ、またはそれらのうちの少なくとも1つの組み合わせを媒介するが、但し、前記抗V I S T A抗体または抗原結合断片は、(i) ~ (x x v i i i)のうちの1つ以上と逆の効果を誘発し得ることを条件とし、任意で、自己免疫、アレルギー、炎症、移植、または敗血症を治療するために使用される、請求項1 ~ 3 4のいずれか一項に記載のアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片。

10

【0034】

本発明の別の具体的な目的は、関節リウマチを治療または予防するために、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

【0035】

本発明の別の具体的な目的は、GVHDを治療または予防するために、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

20

【0036】

本発明の別の具体的な目的は、乾癬を治療または予防するために、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

【0037】

本発明の別の具体的な目的は、IBDもしくは大腸炎、または別の炎症性もしくは自己免疫腸障害を治療または予防するために、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

30

【0038】

本発明の別の具体的な目的は、狼瘡を治療または予防するために、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

【0039】

本発明の別の具体的な目的は、慢性もしくは急性感染症もしくは炎症、またはそれに関連する肝毒性、例えば、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、またはE型肝炎を治療または予防するために、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

40

【0040】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、本方法は、以下の免疫阻害効果：(i) 免疫応答

50

の減少、(i i) T細胞活性化の減少、(i i i) 細胞傷害性 T細胞活性の減少、(i v) ナチュラルキラー (NK) 細胞活性の減少、(v) T細胞活性の減少、(v i) 炎症誘発性サイトカイン分泌の減少、(v i i) I L - 2分泌の減少、(v i i i) インターフェロン - 産生の減少、(i x) T h 1 応答の減少、(x) T h 2 応答の減少、(x i) 細胞数および/もしくは制御性 T細胞の活性の減少、(x i i) 制御性細胞活性および/もしくは骨髄由来抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉系間質細胞、T I E 2 発現単球のうちの一つ以上の増加、(x i i i) 制御性細胞活性および/もしくは骨髄由来抑制細胞 (M D S C)、i M C、間葉系間質細胞、T I E 2 発現単球のうちの一つ以上の活性の増加、(x i i i) M 2 マクロファージの増加、(x i v) M 2 マクロファージ活性の増加、(x v) N 2 好中球の増加、(x v i) N 2 好中球活性の増加、(x v i i) T細胞活性化阻害の増加、(x v i i i) C T L 活性化阻害の増加、(x i x) N K 細胞活性化阻害の増加、(x x) T細胞枯渇の増加、(x x i) T細胞応答の減少、(x x i i) 細胞傷害性細胞活性の減少、(x x i i i) 抗原特異的メモリー応答の減少、(x x i v) 細胞のアポトーシスもしくは溶解の阻害、(x x v) 細胞への細胞傷害性効果もしくは細胞増殖抑制効果の減少、(x x v i) 直接細胞死滅の減少、(x x v i i) T h 1 7 活性の減少、ならびに/または(x x v i i i) 補体依存性細胞傷害および/もしくは抗体依存性細胞媒介性細胞傷害の減少、のうちのいずれか一つ、またはそれらのうちの少なくとも一つの組み合わせをインビトロおよび/またはインビボでもたすが、但し、該抗 V I S T A 抗体または抗原結合断片は、(i) ~ (x x v i i i) のうちの一つ以上と逆の効果を誘発し得ることを条件とし、任意に、自己免疫、アレルギー、炎症、移植、または敗血症を治療するために使用される、アゴニスティックな抗体または抗体断片に対する治療または予防を必要とする対象への投与を含む。

10

20

【 0 0 4 1 】

本発明の別の具体的な目的は、アレルギー、自己免疫、移植、遺伝子治療、炎症、癌、G V H D、もしくは敗血症の治療または予防に、あるいは炎症、自己免疫、もしくはヒト対象において前述のいずれかに関連するアレルギー性副作用を治療または予防するために、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

30

【 0 0 4 2 】

本発明の別の具体的な目的は、C T L A - 4、P D - 1、P D L - 1、L A G - 3、T I M - 3、B T L A、B 7 - H 4、B 7 - H 3、V I S T A のうちの一つ以上を標的とする免疫阻害抗体もしくは融合タンパク質、および/または C D 4 0、C D 1 3 7、O X 4 0、G I T R、C D 2 7、C D 2 8、もしくは I C O S のうちの一つ以上を標的とするアゴニスティックな抗体または融合タンパク質から選択される別の免疫調節抗体または融合タンパク質を投与することを更に含む、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

40

【 0 0 4 3 】

本発明の別の具体的な目的は、治療の前、同時、および/または後に、個体の細胞による V I S T A タンパク質または体液中の V I S T A タンパク質、例えば、造血細胞ならびに/または骨髄系統細胞および/もしくはリンパ球、単球、もしくは好中球、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、またはナチュラルキラー T (N K T) 細胞のうちのいずれか一つ以上から選択される、造血細胞に対する V I S T A タンパク質をアッセイすることを含む、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

50

【 0 0 4 4 】

本発明の別の具体的な目的は、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法を提供することであり、このアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体または断片は、V S T B 4 9 ~ V S T B 1 1 6 および任意に変異されていてもよいヒトI g G 2 F c領域から選択される抗体と同じC D Rを含み、任意に、I g G 2 定常領域またはF c領域は、天然F c R結合および/もしくはC D 3 2 Aに結合する能力を保持し、かつ/あるいはアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体または断片は、3 7 で表面プラズモン共鳴によって決定されるとき、5 0 M以下のヒトV I S T Aの親和性またはK_Dを含むか、あるいはアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体または断片は、3 7 で表面プラズモン共鳴によって決定されるとき、1 n M以下のヒトV I S T Aの親和性またはK_Dを含む。

10

【 0 0 4 5 】

本発明の別の具体的な目的は、インビトロまたはインビボで免疫抑制を誘発するために、前述のいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片の使用方法を提供することである。

【 0 0 4 6 】

本発明の別の具体的な目的は、図4の可変配列を有する抗体のうちのいずれかから選択される、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

20

【 0 0 4 7 】

本発明の別の具体的な目的は、免疫抑制性もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片の投与により、自己免疫、アレルギー、および炎症の治療または予防を必要とする対象、例えば、急性または慢性のヒト自己免疫、アレルギー、および炎症状態を有する個体において、治療または予防方法を更に提供することが目的であり、該免疫抑制性もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片、例えば、ヒトV I S T Aの免疫への作用、例えば、T細胞活性、分化、および増殖へのヒトV I S T Aの抑制効果、ならびにサイトカインレベル、およびB細胞免疫のうちの少なくとも1つを刺激する。

30

【 0 0 4 8 】

本発明の別の具体的な目的は、狼瘡または狼瘡様状態もしくは狼瘡様症状を治療または予防するために使用される、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする患者に、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、治療または予防方法、あるいは免疫抑制性もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片の投与により、狼瘡または狼瘡様状態に関連する病理学的症状、例えば、「全身性エリテマトーデス」または(「S L E」)、皮膚(c u t a n e o u s)狼瘡または皮膚(s k i n)狼瘡、薬物誘導性狼瘡、および新生児狼瘡を反転させ、安定化し、低減する方法を提供することである。

40

【 0 0 4 9 】

本発明の別の具体的な目的は、免疫抑制性もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片の投与により、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする対象において、自己免疫または炎症状態に関連する腎臓炎症、炎症性腎臓損傷、またはタンパク尿を治療または予防するために使用される、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を、治療を必要とする患者に投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

【 0 0 5 0 】

50

本発明の別の具体的な目的は、免疫抑制性もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片の投与により、自己免疫、アレルギー、または炎症状態の治療または予防を必要とする対象において、炎症誘導性脾腫またはリンパ球増殖を伴う炎症状態を治療または予防するために使用される、治療または予防有効量の、前述のうちのいずれかによる単離されたアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を、治療を必要とする患者に投与することを含む、治療または予防方法を提供することである。

【0051】

本発明の別の具体的な目的は、本発明による免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片の投与により、治療を必要とする対象において、I L - 9発現を促進し、かつ/またはL I X / C X C L 5発現を低減させる方法を提供すること

10

【0052】

本発明の別の具体的な目的は、本発明による免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片の投与により、任意に、コルチコステロイド、他の抗炎症剤、抗マalaria薬、抗凝血剤、A C T H、メトトレキサート、シクロホスファミドなどの他の免疫抑制剤、およびペリムマブなどの他の免疫抑制抗体から任意に選択される、狼瘡の治療に使用される別の薬物の投与を更に含む、狼瘡または狼瘡様状態の病理学的副作用のうちの少なくとも1つを治療、阻害、または予防する方法であって、該症状は、タンパク尿、自己抗体、サイトカインの発現および炎症に関連する他の因子の増加、腎臓の炎症、すなわち、ループス腎炎、肺における腎臓損傷増加血圧、すなわち、肺高血圧症、呼吸困難、神経系および脳の炎症、頭部血管における炎症、動脈硬化もしくは冠動脈疾患、皮膚発疹、皮膚病変、脱毛、または前述の任意の組み合わせを含む方法を提供すること

20

【0053】

本発明の別の具体的な目的は、ヒト患者に、本発明による免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、ヒト患者において、G v H D合併症、例えば、急性または慢性G V H Dの発生を予防するための方法を提供することである。

【0054】

本発明の別の具体的な目的は、ヒト患者に免疫抑制またはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片を投与することを含む、ヒト患者におけるG v H Dの合併症、例えば急性または慢性G V H Dにおける治療方法を提供することである。

30

【0055】

本発明の別の具体的な目的は、急性または慢性G v H D反応を予防するために、レシピエント内に移植される器官、組織、または免疫細胞を、免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または抗体断片と接触させることにより、レシピエント内に移植される該器官、組織、または免疫細胞を治療するための方法を提供することであり、例えば、移植される細胞、組織、または器官は、同種または異種、例えば、同種骨髄もしくは造血細胞、または骨髄系列細胞の同種前駆体であり、かつ/または該免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体または該抗体断片は、移植の前、同時、もしくは

40

【0056】

本発明の別の具体的な目的は、骨髄移植レシピエントである対象における日和見感染への感受性を低減するための方法であって、同種骨髄または造血幹細胞移植を受けた対象を選択することと、対象に、V I S T Aアゴニスト抗体を含む治療有効量の医薬組成物および有効量の日和見感染の抗原を投与することであって、この医薬組成物および抗原が対象における日和見感染への感受性を低減する、投与することとを含み、任意に、免疫抑制薬を投与すること、または移植細胞、組織、または器官を、免疫抑制薬と接触させることを

50

更に含み、かつ/またはTNF-アルファアンタゴニスト、IL-6アンタゴニスト、ヒドロキシクロロキン、コルチコステロイド、他の抗炎症剤、抗凝血剤、ACTH、ならびにメトトレキサート、シクロホスファミド、スルファサラジン、レフルノミド、金チオリンゴ酸ナトリウム、シクロスポリン、B細胞枯渇および阻害抗体、ならびに他の免疫調節抗体などの他の免疫抑制剤から任意に選択される別の薬物の投与または使用を更に含む、方法を提供することである。

【0057】

本発明の別の具体的な目的は、本発明による免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体または抗体断片の投与により、乾癬もしくは別の炎症性皮膚状態、例えば、免疫細胞、例えばT細胞の浸潤を伴う状態を治療もしくは予防する、治療もしくは予防する方法、または乾癬もしくは別の炎症性皮膚状態に関連する病理学的症状、例えば免疫細胞の浸潤を伴う症状を反転させ、安定化し、低減する方法であって、任意に、該乾癬または別の炎症性皮膚状態、例えば免疫細胞の浸潤を伴う状態が、尋常性乾癬、膿疱性乾癬、逆乾癬、滴状乾癬、乾癬性紅皮症、薬物誘導性乾癬から選択されるか、または尋常性乾癬を含む、方法を提供することである。

10

【0058】

本発明の別の具体的な目的は、免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体または抗体断片の投与により、CD3+T細胞の組織への浸潤を治療もしくは予防、阻害、反転、または予防する方法であって、該浸潤がそれを必要とする対象における自己免疫状態または炎症状態の病理に関連する、方法を提供することである。

20

【0059】

本発明の別の具体的な目的は、任意に、IL-12アンタゴニスト、IL-17アンタゴニスト、IL-23アンタゴニスト、TNF-アルファアンタゴニスト、IL-6アンタゴニスト、ヒドロキシクロロキン、コルチコステロイド、他の抗炎症剤、ACTH、および他の免疫抑制剤、例えば、メトトレキサート、シクロホスファミド、スルファサラジン、レフルノミド、金チオリンゴ酸ナトリウム、シクロスポリン、レチノイド、ビタミンD類縁体、シクロスポリン、ヒドロキシカルバミド、フマル酸ジメチルなどのフマレート、ならびに他の免疫調節抗体から選択される、任意に別の薬物の投与を含むか、または乾癬もしくは別の炎症性皮膚状態の治療に使用される、免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体または抗体断片の投与により、乾癬または別の炎症性皮膚状態の病理学的副作用のうちの少なくとも1つを治療、阻害、または予防する方法であって、該症状が、重度のかゆみ、皮膚斑、発赤、他の皮膚変色もしくは不均一、発疹、皮膚膿疱、皮膚鱗屑、爪甲点状凹窩もしくは変色、または前述のいずれかの組み合わせを含む、方法を提供することである。

30

【0060】

本発明の別の具体的な目的は、免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体または抗体断片の投与により、関節炎もしくは関節炎様状態、または関節炎および関節炎様症状を治療もしくは予防する、治療もしくは予防する方法、または関節炎もしくは関節炎様状態に関連する病理学的症状を反転させ、安定化し、低減する方法であって、例えば、関節炎および関節炎様状態が関節リウマチ(「RA」)、乾癬性関節炎(「PA」)、および変形性関節症(「OA」)から選択される、方法を提供することである。

40

【0061】

本発明の別の具体的な目的は、免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体または抗体断片の投与により、関節炎、または自己免疫もしくは炎症状態に関連する関節痛の治療もしくは予防、治療もしくは予防を必要とする対象において、それを治療もしくは予防する、治療もしくは予防する方法を提供することである。

【0062】

本発明の別の具体的な目的は、免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体または抗体断片の投与により、関節炎または関節炎様状態の病理学的副作用のうちの少なくとも1つの治療、阻害、または予防する方法であって、該症状が、関節損傷、関節

50

痛、肺もしくは心臓の炎症、赤血球数の減少、発熱、急性もしくは慢性疲労、血管炎、肺線維症などの線維症、腎アミロイドーシス、粥状動脈硬化、心筋梗塞、脳卒中、または前述のいずれかの組み合わせを含む、方法を提供することである。

【0063】

本発明の別の具体的な目的は、ヒト患者に、免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトVIST A抗体または抗体断片を投与することを含む、ヒト患者において、急性もしくは慢性感染症および炎症、ならびに/または急性もしくは慢性感染症に関連するサイトカイン応答を予防または治療するための方法を提供することである。

【0064】

本発明の別の具体的な目的は、ヒト患者に、免疫抑制もしくはアゴニスティックな抗ヒトVIST A抗体または抗体断片を投与することを含む、ヒト患者において、急性もしくは慢性肝炎感染症および炎症、ならびに/または急性もしくは慢性肝炎感染症に関連するサイトカイン応答を予防または治療するための方法を提供することである。

10

【0065】

本発明の別の具体的な目的は、ヒト患者に、アゴニスティックな抗ヒトVIST A抗体または抗体断片を投与することを含む、ヒト患者において、例えば、急性もしくは慢性感染症および炎症、ならびに/または急性もしくは慢性感染症、または硬変、またはアルコール乱用もしくは薬物乱用に関連するサイトカイン応答に関連する肝毒性または肝損傷を予防または治療するための方法であって、治療される患者がA型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、またはG型肝炎を有する、方法を提供することである。

20

【0066】

本発明の別の具体的な目的は、アゴニスティックな抗VIST A抗体が全身または非全身経路の投与様式により投与される、例えば、アゴニスティックな抗VIST A抗体が、注射により、局所的に、吸引、または経口的に投与され、かつ/またはアゴニスティックな抗VIST A抗体が、静脈内、皮下、動脈内、筋肉内、非経口、脊髄、または表皮投与（例えば、注射または注入により）により投与され、かつ/またはアゴニスティックな抗VIST A抗体が、全身もしくは非全身経路の投与様式により投与され、かつ/またはアゴニスティックな抗VIST A抗体が、静脈内、皮下、動脈内、筋肉内、非経口、脊髄、または表皮投与（例えば、注射または注入により）により投与される前述の請求項など、前述のいずれかによる治療または予防方法を提供することである。

30

【0067】

本発明の別の具体的な目的は、アゴニスティックな抗VIST A抗体が別の免疫アゴニスト、例えば、アゴニスティックな抗PD-1抗体もしくは抗体断片、アゴニスティックな抗PD-L1抗体もしくは抗体断片、一価もしくは多量体であり得るアゴニスティックなPD-L1ポリペプチドまたはその断片、一価もしくは多量体であり得るアゴニスティックなPD-1ポリペプチドまたはその断片、あるいは前述のいずれかを含む複合体または融合タンパク質とともに投与され、これらのアゴニストが別個にもしくは組み合わせで、かついずれの順序で投与され得る、前述のいずれかによる治療もしくは予防方法、組成物、または抗体もしくは抗体断片を提供することである。

【0068】

本発明の別の具体的な目的は、アゴニスティックな抗VIST A抗体が、ヒト、ヒト化、多重特異性、またはキメラである、前述のいずれかによる治療もしくは予防方法、または抗体もしくは抗体断片を提供することである。

40

【0069】

本発明の別の具体的な目的は、アゴニスティックな抗VIST A抗体が、任意に変異されていてもよいヒトIgG2定常領域またはFc領域を含む、前述のいずれかによる治療もしくは予防方法、組成物、または抗体もしくは抗体断片を提供することである。

【0070】

ヒトIgG2定常ドメインもしくはその断片、またはhIgG1、hIgG3、hIgG4、IgA、IgD、IgE、もしくはIgMを含み、抗体のヒンジ全体または実質的

50

にヒンジ全体およびC H 1ドメイン、ならびに任意で軽鎖定常領域全体または実質的に軽鎖定常領域全体が、h 1 g G 2の対応する軽鎖全体または実質的に軽鎖全体、ならびにヒンジおよびC H 1ドメイン(「H 2領域」または「H 2ドメイン」)で置換されている、前述のいずれかに記載の治療または予防方法または抗体またはその抗体断片を提供することが、本発明の別の具体的な目的である。

【0071】

本発明の別の具体的な目的は、アゴニスティックな抗V I S T A抗体が、127位の重鎖システイン残基および214位の軽鎖システイン残基(番号はK a b a tによる)のいずれかまたは両方が、欠失しているかまたは異なるアミノ酸残基に変更されており、結果として、それらの残基が変更されていない抗体と比較して、得られた変性抗体のアゴニスティックな特性が増加している、ヒトI g G 2定常ドメインまたはその断片を含み、かつ/あるいはV I S T Aアゴニスト抗体が、該抗体のH 2領域の214位のシステイン残基が、変異しているかもしくは別のアミノ酸で置換されており、かつ/または重鎖の127位、232位、もしくは233位のシステイン残基のうちの1つ以上が欠失しているか、もしくは別のアミノ酸で置換されている、ヒトI g G 2定常ドメインまたはその断片を含み、かつ/あるいはV I S T Aアゴニスト抗体が、少なくとも1つのシステイン残基が欠失しているか、または別のアミノ酸に変更されている、ヒトI g G 2定常ドメインまたはその断片を含み、かつ/あるいはアゴニストが、図4の抗体のいずれかと同じC D Rを有する抗体を含む、前述のいずれかによる治療もしくは予防方法、または抗体もしくは抗体断片を提供することである。

【0072】

本発明の別の具体的な目的は、アゴニスティックな抗V I S T A抗体が、1E 8、G A 1、G G 8のうちのいずれかとしてヒトV I S T A上の、または図4に示される配列を有する他の抗体のうちのいずれか上の同じエピトープと競合するか、またはそれに結合する、前述のいずれかによる治療もしくは予防方法、または前述のいずれかによる抗体もしくは抗体断片を提供することである。

【0073】

本発明の別の具体的な目的は、アゴニスティックな抗V I S T A抗体が、1E 8、G A 1、G G 8、I N X 8 0 0、I N X 0 1、I N X 8 0 2、I N X 9 0 0 - 9 1のうちのいずれかによって結合されるヒトV I S T A上のエピトープの残基のうちの1つ以上を含むヒトV I S T A上の、または図4に示される配列を有する他の抗体のうちのいずれか上のエピトープに結合する、前述のいずれかによる治療もしくは予防方法、または前述のいずれかによる抗体もしくは抗体断片を提供することである。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1A - D】抑制性V I S T A m A bを特定するために使用され得るインビトロおよびインビボスクリーニングアッセイを示す。A)精製されたT細胞を、示されるm A bの存在下で72時間、抗C D 3の上で平板培養した。H 3組み込みによって増殖を測定した。B)精製されたD O 1 1 . 1 0 T細胞を、示される抗体の存在下で6日間、I S QパルスA P Cにより刺激した。増殖をC T V希釈色素を使用して測定した。c)G V H Dは、C 5 7 B L / 6細胞を照射されたB A L B / cレシピエントに移入することにより誘発された。移入後0、2、および4日目に200 μ gの抗体をマウスにI . P .注射し、生存を分析した。D)C o n A (1 5 m p k)の投与3時間前に、10 m p kの示される抗体でマウスを処置し、L u m i n e xにより6で血漿中のI L - 2を分析した。

【図2A - F】アゴニストV I S T A抗体が複数の自己免疫疾患モデルにおいて免疫抑制性であることを示す。A)25週目から開始して実験の終わり終了まで、8G 8またはH a m I g (2 0 0 μ g)のいずれかで、3X / 週でN Z B / W F 1マウスを処置した。「X」は、対照処置群全てが 殺された時点を示す。B)15 m g / k g (m p k)のC o n Aの投与3時間前に、200 μ gの抗体でマウスを処置し、生存を80時間追跡した。C)コラーゲンI I m A b、続いてL P Sで順次マウスを処置し、足の腫れを測定す

ることによって関節炎を測定した。8 G 8 および Ham - I g を 1 日毎に 3 × 投与した (2 0 0 μ g)。D) マウスの耳にイミキモドを毎日適用した。1 4 日目に、8 G 8 または Ham - I g (2 0 0 μ g) を 1 日毎に投与し、耳の厚さをキャリパスで測定した。E、F) マウスの背中にイミキモドを毎日適用した。9 日目にマウスを安楽死させ、皮膚を切片し、I H C により C D 3 発現に関して染色した。

【図 3】WT および h v - K I マウスにおける V I S T A の発現を示す。C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、T r e g (C D 4 + F o x P 3 +)、および単球 C D 1 1 b +、L y 6 C +、L y 6 G - を、WT および V I S T A K I マウスのリンパ節から単離し、それぞれ、マウスまたはヒトタンパク質に対して V I S T A 抗体で染色した。

【図 4】I N X 8 0 0、I N X 8 0 1、および I N X 9 0 0 ~ I N X 9 1 9 のものを含む、異なる抗ヒト V I S T A 抗体の配列を含有する。 10

【図 5】異なるサイトカイン、ケモカイン、および走化性因子の発現への抗ヒト V I S T A 抗体の効果を評価する C o n A 肝炎モデルにおける例示的な抗ヒト V I S T A 抗体、すなわち、I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 の効果を示す。

【図 6】インビボ移植片対宿主病 (G V H D) 動物モデルにおける例示的な抗ヒト V I S T A 抗体、すなわち、I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 の効果を示す。

【図 7】例示的なアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体、すなわち、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 の C D 3 駆動 T 細胞免疫応答への効果を示す。

【図 8】例示的なアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体、すなわち、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 の特定の T 細胞集団の数または総 T 細胞数への効果を示す。 20

【図 9】C o n A アッセイにおける例示的な抗ヒト V I S T A 抗体の、ならびに選択炎症誘発性サイトカイン、および炎症マーカー、すなわち、I L - 2、インターフェロン、および I L - 1 2 p 7 0 の発現への効果を比較する。

【図 1 0 A - C】異なる I g G 2 アイソフォームを示す。(A) ジスルフィドシャフリングは、A / B の移行とともに、アイソフォーム A および B をもたらす (図は Z h a n g , A ら、2 0 1 5 から)。(B) アイソフォームは R P - H P L C により区別可能である。(C) I N X 9 0 1 の観察された R P - H P L C クロマトグラム。

【図 1 1】I g G 2 A または B のアイソフォームの化学濃縮を示す。(黒色線、上部) クロマトグラムは B 形態を画定する優勢な最左ピークを示す。(赤色線、下部) クロマトグラムは A 形態を画定する優勢な右ピークを示す。 30

【図 1 2】ジスルフィドシャフリングに関して I N X 9 0 1 F c サイレント変異型を比較する。(上部) I g G 2 骨格上の I N X 9 0 1 は、A、A / B、および B のアイソフォームの予想される混合物を示す。(中央) サイレント I g G 1 骨格上の I N X 9 0 1 S i は、単一アイソフォームとして存在する。(下部) I N X 9 0 1 H S i は、天然 I g G 2 に等しいジスルフィドシャフリングを可能にする、I g G 2 からの C H 1 / ヒンジを有する I g G 1 サイレント F c 領域を有する。

【図 1 3】生化学的に歪められた I N X 9 0 1 形態は、依然として M L R におけるサイトカイン産生を減少させることができる。7 2 時間の時点でのサイトカイン産生に関して、2 つの別個の M L R の上清を L u m i n e x 分析により分析した。I N X 9 0 1 親、A 歪み、および B 歪みは全て、用量依存様式で T N F および I L - 2 の産生を減少させた。 40

【図 1 4】遺伝的にロックされた I N X 9 0 1 形態は、依然として M L R におけるサイトカイン産生を減少させることができるが、F c サイレント変異型は減少させることができない。7 2 時間の時点でのサイトカイン産生に関して、各 M L R の上清を L u m i n e x 分析により分析した。I N X 9 0 1 親、A ロック、および B ロックは全て、用量依存様式で T N F および I L - 2 の産生を減少させた。F c ドメインを発現停止させる変異を含有する S i および H S i 変異型は、サイトカイン産生を一貫して抑制しなかった。

【図 1 5】遺伝的にロックされた I N X 9 0 8 形態は、依然として M L R におけるサイトカイン産生を減少させることができるが、F c サイレント変異型は減少させることができない。7 2 時間の時点でのサイトカイン産生に関して、各 M L R の上清を L u m i n e x 分析により分析した。I N X 9 0 8 親、A ロック、および B ロックは全て、用量依存様式 50

でTNF およびIL-2の産生を減少させた。Fcドメインを発現停止させる変異を含有するSiおよびHSi変異型は、サイトカイン産生を一貫して抑制しなかった。

【図16】アゴニスト抗ヒトVISTA抗体によって結合された直鎖および不連続のエピトープを特定するために使用されるPeptscan(登録商標)技術を概略的に記載する。

【図17】アゴニスト抗ヒトVISTA抗体が同じコア配列に結合することを示す。

【図18】本発明による異なる抗ヒトVISTA抗体のエピトープ分析を要約する。

【図19】アゴニスト抗ヒトVISTA抗体によって結合されるエピトープを示し、結合に関与する重要な残基を更に特定する。

【図20】末梢血におけるCD4T細胞の変化。100 μ lの血液における絶対数(左側のグラフ)、CD45+細胞の出現頻度(中央のグラフ)CD4+細胞の出現頻度(右側のグラフ)の100(1群当たりn=8、SEM、統計的に対応のないT検定、等しいSDなし)。

10

【図21】末梢血におけるCD4T細胞活性化状態の変化。(1群当たりn=8、SEM、統計的に対応のないT検定、等しいSDなし)(MFI:蛍光強度の中央値)。

【図22】INX901処置は、大腸炎進行と関連する体重減少を予防する。(1群当たりn=8、SEM)。

【図23】INX901処置は、結腸の短縮を予防した。(1群当たりn=8または4、SEM、統計的に対応のないT検定、等しいSDなし)。

【図24】INX901処置は、大腸炎の発生を予防した。各マウス群の結腸のH&E染色切片の代表的な写真。倍率:上部の写真は4xであり、下部は20xである。矢印は、大量の炎症性浸潤物を有する領域を示す。INX901処置結腸試料におけるそれらの完全な不在に留意する。

20

【図25】INX901処置が結腸へのCD3+T細胞動員を防止したことを示す。各マウス群の結腸のCD3染色切片の代表的な写真。倍率:上部の写真は4xであり、下部は20xである。

【図26】INX901処置が結腸への骨髄(CD11b+)細胞動員を防止した。各マウス群の結腸のCD11b染色切片の代表的な写真。倍率:上部の写真は4xであり、下部は20xである。

【図27】脾臓CD4T細胞における変化を示す。脾臓を46日目に収集し(最後の抗体投与の40日後)、フローサイトメトリーにより分析した(1群当たりn=8または4、SEM、統計的に対応のないT検定、等しいSDなし)。

30

【図28】IMQD処置マウスからの皮膚切片のH&E分析を示す。ハムスターIg画像は左側であり、8G8処置群は右側である。

【図29】IMQD処置マウスからの皮膚切片のIHC分析を示す。ハムスターIg画像は左側であり、8G8処置群は右側である。

【図30】視野内のCD3+細胞のIMQD処置マウスからの皮膚切片の定量分析を示す。

【図31】ハムスターIgおよび8G8処置マウスの脾臓における免疫学的集団の定量分析を示す。8日目に脾臓を撮影し、分析した。

【図32】対照Ig、INX800、またはINX801で処置されたマウスの6時間時点の32のサイトカインのパネルからのIL-2のLuminesx分析を示す。示される抗体の各々で、マウスを-3時間で前処置した。0時間で、15mg/kgのConAをマウスに投薬し、その後殺し、6時間時点で出血させた。

40

【図33】対照Ig、INX800、またはINX801で処置されたマウスの6時間時点の32のサイトカインのLuminesx分析を示す。示される抗体の各々で、マウスを-3時間で前処置した。0時間で、15mg/kgのConAをマウスに投薬し、その後殺し、6時間時点で出血させた。

【図34】実験14からのConA処置マウスおよびナイーブマウスからのALC計数を示す。10mpkで、示される抗体の各々で、マウスを-3時間で前処置した。0時間で、15mg/kgのConAをマウスに投薬する(実験14)か、または全く投薬せず(ナイーブ)、その後、フローサイトメトリーによるALC計数のために6時間で出血させ

50

た。

【図35】Ham-Ig、8G8、または13F3で処置されたマウスの6時間時点の32のサイトカインのパネルからの血清IL-2のLuminex分析を示す。示される抗体の各々で、マウスを-3時間で前処置した。0時間で、15mg/kgのConAをマウスに投薬し、その後殺し、6時間時点で出血させた。

【図36】30mg/kgのConA処置マウスのカプラン・マイヤー曲線を示す。示される抗体の各々で、マウスを-3時間で前処置した。0時間で、30mg/kgのConAをマウスに投薬し、その後生存分析のために追跡した。

【図37】対照Ig、INX800、またはINX903で処置されたマウスの6時間時点からの血漿におけるIL-2発現を示す。示される抗体の各々で、マウスを-3時間で前処置した。0時間で、15mg/kgのConAをマウスに投薬し、その後殺し、6時間時点で出血させた。

10

【図38A-B】対照Ig、INX800、INX903、またはアンタゴニストで処置されたマウスの6時間時点からの血漿におけるIL-2およびMIP-1発現を示す。示される抗体の各々で、マウスを-3時間で前処置した。0時間で、15mg/kgのConAをマウスに投薬し、その後殺し、6時間時点で出血させた。

【図39】CIA関節炎モデルの実験プロトコルを含む。

【図40】コラーゲン誘導関節炎モデルにおけるアゴニスティックな抗マウスVISTA抗体8G8の効果を示す。示されるように、処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(各群においてn=10)。8G8処置は、疾患の重症度を著しく低減した(相互作用項 $P < 0.000005$)。

20

【図41】実施例9のCIA関節炎モデル実験の実験プロトコルを含む。

【図42】実施例8の実験のCIA疾患進行のスコア化を示す。示されるように、処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(各群においてn=10)。8G8処置は、疾患の重症度を著しく低減した(相互作用項 $P < 0.000005$)。

【図43】CIA疾患進行のスコア化を示す。処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群においてn=9、INX903処置群においてn=8; 1匹のマウスは疾患のいずれの徴候も示さなかったため、対照群から外された)。INX903処置は、疾患の重症度を著しく低減した(相互作用項 $P < 0.01$)。

【図44】CIA疾患進行のスコア化を示す。処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(各群においてn=10)。8G8処置は、疾患の重症度を著しく低減した(相互作用項 $P < 0.0001$)。

30

【図45】INX800処置でのCIA疾患進行のスコア化を示す。処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群においてn=9、INX800処置群においてn=8)。

【図46】INX901処置でのCIA疾患進行のスコア化を示す。処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群においてn=9、INX901処置群においてn=10)。

【図47】INX902処置でのCIA疾患進行のスコア化を示す。処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群においてn=9、INX902処置群においてn=7)。

40

【図48A-B】急性GvHD疾患モデルにおける8G8、13F3、または対照ハムスターIgG抗体で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率を示す。

【図49】急性GvHD疾患モデルにおけるINX抗VISTA抗体または対照Igで処置されたレシピエントマウスの体重および生存率を示す。A:疾患のピークにおける群別(1群当たりN=5~8匹のマウス)の平均体重減少、B:群別(1群当たりN=5~8匹のマウス)の平均体重減少、C:生存率。

【図50A-C】急性GvHD疾患モデルにおけるINX901、INX902、INX903、およびINX904、または対照Igで処置された生存マウスのキメラ現象およびドナーT細胞数を示す。A)-ヒトVISTA処置マウス(左側のパネル)またはB

50

a 1 b / c 対照マウス (右側のパネル) における血液 C D 1 1 b 細胞におけるドナー (H 2 K b 、 垂直) またはレシピエント (H 2 K d 、 水平) 発現の代表的なプロット B) - ヒト V I S T A 処置マウスの血液中のドナー由来 C D 1 1 b の百分率。 C) キメラ - ヒト V I S T A 処置マウスまたは D D E 1 対照マウスにおける 2 5 u L の血液中のドナー由来 T 細胞数。

【図 5 1 A - B】 x e n o - G v H D 疾患モデルにおいて I N X 9 0 1 または対照 A B で処置された N S G マウスの体重を示す。 5 1 A : 群別 (N = 6) の平均 5 1 B : 個々のマウスの体重。どくろは、マウスが死亡した状態で発見されたか、または示される日に安楽死されたかのいずれかであったことを示す。

【図 5 2】 x e n o - G v H D 疾患モデルにおいて I N X 9 0 1 または対照 A B で処置された N S G マウスにおける T 細胞拡大を示す。図は、マウス末梢循環における全 C D 4 5 + 細胞の % での値がヒト C D 3 + T 細胞を構成したことを示す。

【図 5 3 A - C】急性 G v H D 疾患モデルにおける 8 G 8 抗体または対照ハムスター I g G で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率を示す、 5 3 A : 群別 (1 群当たり N = 8 匹のマウス) の平均体重減少、 5 3 B : 群別 (1 群当たり N = 8 匹のマウス) の個々の体重減少、および 5 3 C : 生存率。

【図 5 4 A - B】急性 G v H D 疾患モデルにおいて様々な用量の I N X 9 0 2 または対照 I g で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率を示す ; 5 4 A は、 I N X 9 0 2 処置マウスの群別 (1 群当たり N = 8 匹のマウス) の平均体重減少を示し、 5 4 B は、 I N X 9 0 2 処置マウスの生存率を示す。

【図 5 5 A - B】急性 G v H D 疾患モデルにおいて様々な用量の I N X 9 0 2 または対照 I g で処置された生存マウスのキメラ現象を示す ; 5 5 A は、 I N X 9 0 2 処置マウスの血液中のドナー由来 C D 1 1 b の百分率を示し、 5 5 B は、 I N X 9 0 2 処置マウスまたは D D E 1 対照マウスの 2 5 u L の血液中のドナー由来 T 細胞数を示す。

【図 5 6 A - D】急性 G v H D 疾患モデルにおいて様々な用量の I N X 9 0 3 および I N X 9 0 1 抗体または対照 I g で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率を示す ; 5 6 A は、群別 (1 群当たり N = 8 匹のマウス) の平均体重減少を示し、 5 6 B は、 I N X 9 0 3 処置マウスの生存率を示し、 5 6 C は、 I N X 9 0 1 処置マウスの群別 (1 群当たり N = 8 匹のマウス) の平均体重減少を示し、 5 6 D は、 I N X 9 0 1 処置マウスの生存率を示す。

【図 5 7 A - B】急性 G v H D 疾患モデルにおいて様々な用量の I N X 9 0 1 および I N X 9 0 1 、 または対照 I g で処置された生存マウスのキメラ現象を示す ; 5 7 A : I N X 9 0 3 処置マウスの血液中のドナー由来 C D 1 1 b の百分率、 5 7 B : I N X 9 0 1 処置マウスの血液中のドナー由来 C D 1 1 b の百分率。

【図 5 8 A - C】急性 G v H D 疾患モデルにおいて I N X 抗体または対照 I g で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率を示す ; 5 8 A は群別 (1 群当たり N = 8 匹のマウス) の平均体重減少を示し、 5 8 B は、群別 (1 群当たり N = 8 匹のマウス) の個々の体重減少を示し、 1 6 C は生存率を示す。

【図 5 9】 G v H D が h V - K I マウスからの T 細胞および B M を照射 B a 1 b / c レシピエントに移入することによって誘導されたことを示す。体重減少によりマウスを疾患について追跡し、最初の開始体重の 2 0 % 超を失った場合、マウスを 殺した。

【図 6 0】アゴニスト抗 V I S T A 抗体 8 G 8 が N Z B W F - 1 マウスにおいてタンパク尿の発症を遅延することを示す。実験において、 1 6 週齢の雌の N Z B W F - 1 マウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、 c h e m s t r i p s を使用して記録され、 m g / d L として定量化された。 3 2 週目に、 3 0 0 u g の対照 I g G (黒色線、 n = 5) または 3 0 0 u g の 8 G 8 (赤色線、 n = 5) のいずれかで、 1 週間に 3 回 i . p . 注射によりマウスを処置した。 3 3 週目に、対照 I g G で処置されたマウスは、健康不良のため 殺された。

【図 6 1】対照 I g および 8 G 8 処置 N Z B W F - 1 マウスの血清中の L I X / C X C L 5 および I L - 9 レベルが検出されたことを示す。対照 I g G (n = 5) および 8 G 8 マ

10

20

30

40

50

ウス ($n = 5$) から血清を 33 週目に収集し、Bio-plex 200 Systems を使用して、32 plex 実行でケモカインおよびサイトカインを評価し、Bio Plex manager 6.0 ソフトウェアにより分析した。データは平均 \pm SEM として示され、統計的有意性は対応のないスチューデント t 検定によって決定された。図 7 において、** は群間の有意性 ($p < 0.01$) を示す。

【図 6 2】8G8 が NZBWF - 1 マウスにおいてタンパク尿の発生を低減することを示す。実験において、22 週齢の雌の NZBWF - 1 マウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstrips を使用して記録され、mg/dL として定量化された。28 週目に、300 μ g の対照 IgG (黒色線、 $n = 6$) または 300 μ g の 8G8 (赤色線、 $n = 6$) のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p. 注射によりマウスを処置した。

10

【図 6 3】VISTA アゴニスト 8G8 が、15 週齢の雌の MRL/lpr マウスをタンパク尿に関して毎週監視した実験において、MRL/lpr マウスにおけるタンパク尿の発生を低減することを示す。タンパク尿値は、chemstrips を使用して記録され、mg/dL として定量化された。16 週目に、300 μ g のハムスター Ig (黒色線、 $n = 8$) または 300 μ g の 8G8 (赤色線、 $n = 8$) のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p. 注射によりマウスを処置した。21 週目のデータは、chemstrips の技術的問題により廃棄された。(A) 平均タンパク尿は標準誤差棒で示される。(B) 各時間点における疾患発生率は、100 mg/dL 以上のタンパク尿を示した各群におけるマウスのパーセントとして計算された。

20

【図 6 4】VISTA アゴニスト 8G8 (抗マウス VISTA アゴニスト抗体) が、300 μ g の対照 Ig / ハムスター Ig または 300 μ g の 8G8 のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p. 注射により処置されたマウスから脾臓を 23 週目で採取した実験において、MRL/lpr マウスにおける脾腫を低減することを示す。脾腫は、8G8 処置マウスと比較して、対照 Ig 処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な脾臓を示す。

【図 6 5】VISTA アゴニスト 8G8 (抗マウス VISTA アゴニスト抗体) が、300 μ g の対照 Ig / ハムスター Ig または 300 μ g の 8G8 のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p. 注射により処置されたマウスから頸部リンパ節を 23 週目で採取した実験において、MRL/lpr マウスにおける頸部リンパ節のリンパ球増殖を低減することを示す。リンパ球増殖は、8G8 処置マウスと比較して、対照 Ig 処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な頸部リンパ節を示す。

30

【図 6 6 A - B】8G8 (抗マウス VISTA アゴニスト抗体) が、9 週齢の雌の MRL/lpr マウスをタンパク尿に関して毎週監視した実験において、MRL/lpr マウスにおけるタンパク尿の発生を低減することを示す。タンパク尿値は、chemstrips を使用して記録され、mg/dL として定量化された。11 週目に、200 μ L の PBS (黒色点線、 $n = 8$) または 10 mg/kg のハムスター Ig (黒色実線、 $n = 8$) または 8G8 (赤色線、 $n = 8$) のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p. 注射によりマウスを処置した。(A) 平均タンパク尿は標準誤差棒で示される。(B) 各時間点における疾患発生率は、100 mg/dL 以上のタンパク尿を示した各群におけるマウスのパーセントとして計算された。

40

【図 6 7】実施例で参照される DDE 1 移入実験の実験設計を示す。INX 903 (抗ヒト VISTA アゴニスト Ab 含有 VSTB 95 抗体可変領域 (図 4 を参照されたい) および野生型ヒト IgG 2 定常領域)。実験において、処置は DDE 1 移入後 0、2、および 6 日目に施された。各時点で、1 群当たり 4 匹のマウスと 1 匹のナイーブマウスを分析した。脾臓をフローサイトメトリー用に処理し、ELISA による抗 dsDNA IgG の検出のために心臓血液から血清を回収した。

【図 6 8】DDE 1 移入実験の結果が含まれる。結果は、ドナーおよび宿主細胞集団がそれらの MHC クラス I 対立遺伝子によって区別可能であることを示す。宿主 B6D2F1 細胞は H-2Kb および H-2Kd の両方を発現する一方で、ドナー DDE 1 細胞は H-2Kb のみを発現する。

50

【図69A-C】DDE1移入実験の更なる結果が含まれる。図は、SLE進行中のB細胞活性化がINX903処置によって防止されることを示す。パネルAは、レシピエントB細胞のMHCII I A^d発現のヒストグラムプロットを含有する。パネルBは、実験期間中のレシピエントB細胞および脾臓細胞の総数、ならびに実験期間中のレシピエントB細胞のMHCクラスII I A^d MFIを示す(n=4、SEM)。パネルCは、14日目の脾臓の大きさを示す。

【図70】DDE1移入実験の更なる結果が含まれる。特に、図の結果は、SLEにおける抗dsDNA自己抗体産生がINX903処置によって防止されることを示す。血清中の抗dsDNA IgG力価は、D7およびD14で、ナイーブマウス(n=2)およびHuIgG2またはINX903処置マウスにおいてELISAにより測定された(n=4、SEM)。

10

【図71】DDE1移入実験の更なる結果が含まれる。図のデータは、INX903処置されたCD4T細胞において、1日目でCD69発現が減少したことを示すことを示す(n=4)。

【図72】DDE1移入実験の更なる結果が含まれる。図のデータは、細胞周期に変化がないにもかかわらず、INX903処置マウスにおけるCD4T細胞の数が減少することを示す(n=4)。

【図73】INX903処置に応答して、経時的に総ドナーCD4T細胞の数が減少することも示す(n=4、SEM)。

【図74A-B】8G8がMRL/lprマウスにおいてタンパク尿の発生を低減することを示す。示されるように、15週齢の雌のMRL/lprマウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstripsを使用して記録され、mg/dLとして定量化された。16週目に、300ugのハムスターIg(黒色線、n=8)または300ugの8G8(赤色線、n=8)のいずれかで、1週間に3回i.p.注射によりマウスを処置した。21週目のデータは、chemstripsの技術的問題により廃棄された。(A)平均タンパク尿は標準誤差棒で示される。(B)各時間点における疾患発生率は、100mg/dL以上のタンパク尿を示した各群におけるマウスのパーセントとして計算された。

20

【図75】8G8の投与がMRL/lprマウスにおいて脾腫を低減することを示す。300ugの対照Ig/ハムスターIgまたは300ugの8G8のいずれかで、1週間に3回i.p.注射により処置したマウスから脾臓を23週目に採取した。脾腫は、8G8処置マウスと比較して、対照Ig処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な脾臓を示す。

30

【図76】8G8の投与がMRL/lprマウスにおいて頸部リンパ節のリンパ球増殖を低減することを示す。300ugの対照Ig/ハムスターIgまたは300ugの8G8のいずれかで、1週間に3回i.p.注射により処置したマウスから頸部リンパ節を23週目に採取した。リンパ球増殖は、8G8処置マウスと比較して、対照Ig処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な頸部リンパ節を示す。

【図77】8G8の投与がNZBWF-1マウスにおいてタンパク尿の発生を低減することを示す実験結果が含まれる。

40

【図78】8G8の投与が免疫複合体NZBWF-1マウスに影響を及ぼさないことを示す実験結果が含まれる。

【発明を実施するための形態】

【0075】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者に一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料が本発明および本発明の試験において使用され得るが、好適な方法および材料が本明細書に記載される。材料、方法、および実施例は単に例示であり、限定することを意図していない。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医薬および薬化学に関して利用される名称、ならびにそれらの実験手順およ

50

び技法は、当該技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。標準的な技法は、化学合成、化学分析、医薬調製物、製剤、および送達、ならびに患者の治療のために使用され得る。

【0076】

本明細書の説明および後の特許請求の範囲を通して使用される場合、「a」、「an」、および「the」の意味は、文脈が別途明らかに示さない限り、複数の指示対象を含む。

【0077】

本明細書で使用される場合、「活性化受容体」は、抗原、複合抗原（例えば、MHC分子の文脈において）、Ig融合タンパク質、リガンド、または抗体に結合する免疫細胞受容体を広く指す。活性化受容体は、T細胞受容体（TCR）、B細胞受容体（BCR）、サイトカイン受容体、LPS受容体、補体受容体、およびFc受容体であるが、これらに限定されない。例えば、T細胞受容体は、T細胞上に存在し、CD3分子に関連する。T細胞受容体は、MHC分子の文脈において抗原によって（ならびにポリクローナルT細胞活性化試薬によって）刺激される。TCRを介したT細胞活性化は、多数の変化、例えば、タンパク質リン酸化、膜脂質変化、イオン流、環状ヌクレオチド変更、RNA転写変化、タンパク質合成変化、および細胞体積変化をもたらす。例えば、T細胞受容体は、T細胞上に存在し、CD3分子に関連する。T細胞受容体は、MHC分子の文脈において抗原によって（ならびにポリクローナルT細胞活性化試薬によって）刺激される。TCRを介したT細胞活性化は、多数の変化、例えば、タンパク質リン酸化、膜脂質変化、イオン流、環状ヌクレオチド変更、RNA転写変化、タンパク質合成変化、および細胞体積変化をもたらす。

10

20

【0078】

本明細書で使用される場合、「アジュバント」は、それ自体いずれの特定の抗原効果を有することなく、免疫系を刺激し、ワクチンへの応答を増加させるために使用される薬剤を指す。

【0079】

本明細書において、「アゴニスト」は、特定の分子の免疫への効果を強化または模倣する分子、一般的には抗体または融合タンパク質を指す。一般的に本出願において、これは、ヒトVISTAの免疫への効果、特にT細胞免疫（CD4+および/またはCD8+T細胞免疫）へのVISTAの抑制効果、炎症誘発性サイトカインの発現、ならびに特定のケモカインおよび走化性因子の発現のVISTAの効果強化するか、または模倣する抗ヒトVISTAアゴニスト抗体および抗体断片を指す。

30

【0080】

本明細書の疾患の「診断に役立つ」または「検出に役立つ」は、対象が特定の疾患状態もしくは特定の疾患状態の発症に特有の細胞を有するか、あるいはVISTAの発現を特徴とする免疫抑制、または例えば慢性および非慢性疾患を有する個体において、自己免疫応答、炎症応答、もしくはアレルギー応答中など、VISTAレベルの減少を有する細胞を特徴とする異常な免疫上方制御などの免疫機能障害を含むかどうかを評価するために、特定のマーカーポリペプチドの発現レベルまたは発現RNAが単独でまたは1つ以上の他のマーカーに関連して検出されることを意味する。

40

【0081】

本明細書で使用される場合、「アレルギー疾患」は、アレルギー反応を伴う疾患を広く指す。より具体的には、「アレルギー疾患」は、アレルゲンが、そのアレルゲンへの曝露と病理学的変化の発症との間に強力な相関性があり、その病理学的変化が免疫学的機序を有すると証明されていることが特定される疾患として定義される。本明細書において、免疫学的機序は、白血球がアレルゲン刺激に免疫応答を示すことを意味する。

【0082】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物を広く指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝子コードによりコードされる

50

もの、ならびに後に修飾されるそれらのアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、 α -カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリン）である。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸（すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基に結合される炭素）、およびR基（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）と同じ塩基性化学構造を有する化合物を指す。類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）、または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ化学構造を保持する。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と類似の様式で機能する化学化合物を指す。

【0083】

本明細書で使用される場合、「アネルギー」もしくは「寛容」、または「長期の抗原特異的T細胞抑制」もしくは「延長された免疫抑制」は、活性化受容体媒介刺激に対する屈折度を広く指す。屈折度は一般的に、抗原特異的であり、寛容性抗原 (tolerizing antigen) への曝露を中止した後も持続する。例えば、T細胞におけるアネルギー（無応答性とは反対に）は、サイトカイン産生、例えばIL-2の欠如を特徴とする。T細胞アネルギーは、T細胞が抗原に曝露され、第2のシグナル（共刺激シグナル）の不在下で第1のシグナル（T細胞受容体またはCD-3媒介シグナル）を受けるときに生じる。これらの条件下で、細胞が同じ抗原に再曝露（再曝露が共刺激分子の存在下で生じる場合であっても）されることによりサイトカインを産生することができなくなり、よって増殖できなくなる。しかしながら、アネルギーT細胞は、無関係の抗原への応答を高めることができ、サイトカイン（例えばIL-2）とともに培養される場合、増殖することができる。例えば、T細胞アネルギーは、ELISAまたは指標細胞株を使用する増殖アッセイにより測定されるとき、Tリンパ球によるIL-2産生の欠如によっても観察され得る。代替的に、レポーター遺伝子構築物が使用され得る。例えば、アネルギーT細胞は、5' IL-2 遺伝子エンハンサーの制御下で異種プロモーターにより、またはエンハンサー内に見出され得るAPI配列の多量体により誘導されるIL-2 遺伝子転写を開始することができない (Kang et al. (1992) Science 257: 1134)。共刺激シグナルの調節は、免疫細胞のエフェクター機能の調節をもたらす。

【0084】

本明細書において、「アンタゴニスト」は、分子、一般的には、特定の分子の免疫への作用を遮断するか、または減少させる抗体または融合タンパク質を指す。一般的に、本出願において、これは、ヒトVISTAの免疫への効果、特にT細胞免疫（CD4+および/またはCD8+ T細胞免疫）へのVISTAの抑制効果、炎症誘発性サイトカインの発現、ならびに特定のケモカインおよび走化性因子の発現のVISTAの効果遮断するか、または減少させる抗ヒトVISTAアンタゴニスト抗体および抗体断片を指す。

【0085】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、抗体の「抗原結合部分」（「抗体部分」、「抗原結合断片」、「抗体断片」とも互換的に使用される）、ならびに全抗体分子を広く指す。本明細書で使用される場合、「抗原結合部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片（例えば、VISTAまたはその特定の部分）を指す。本明細書で言及される場合、「抗体」という用語は、全ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびに任意の抗原結合断片（すなわち、「抗原結合部分」）またはその単鎖、ならびに二重特異性抗体および多重特異性抗体、例えば、複数の抗原または複数の抗原エピトープに結合するものを含む。「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続される少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖、またはその抗原結合部分を含む糖タンパク質を指す。各重鎖は、少なくとも1つの重鎖可変領域（本明細書でV_Hと略される）および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3つのドメインC_{H1}、C_m、およびC_m-で構成される。各軽鎖は、少なくとも1つの軽鎖可変領域（本明細書でV_Lと略される）および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメインC_L-で構成される。V_HおよびV_L領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ば

10

20

30

40

50

れるより保存的な領域が散在する、相補性決定領域 (C D R) と呼ばれる超可変性の領域に更に細分化され得る。各 V H および V L は、 F R 1、 C D R 1、 F R 2、 C D R 2、 F R 3、 C D R 3、 および F R 4 の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配置される 3 つの C D R および 4 つの F R で構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞 (例えば、エフェクター細胞) および古典的補体系の第 1 成分 (C 1 q) を含む、免疫グロブリンの宿主組織または因子への結合を媒介し得る。より一般的に、「抗体」という用語は、1 つ以上の非共有結合相互作用が分子構造とエピトープとの間の複合体を安定させる、エピトープに適合し、それを認識する特定の形状を有する任意のポリペプチド鎖含有分子構造を含むことを意図する。原型抗体分子は免疫グロブリンであり、全ての源、例えば、ヒト、ゲッ歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、他の哺乳類、ニワトリ、他の鳥類などからの全ての種類の免疫グロブリン I g G、I g M、I g A、I g E、I g D などが、「抗体」と見なされる。

【 0 0 8 6 】

抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実施され得る。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される抗原結合断片の非限定的な例としては、(a) V L、V H、C L、および C H 1 ドメインからなる一価の断片である F a b 断片、(b) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された 2 つの F a b 断片を含む二価の断片である F (a b ')₂ 断片、(c) V H および C H 1 ドメインからなる F d 断片、(d) 抗体の単一アームの V L および V H ドメインからなる F v 断片、(e) V H ドメインからなる d A b 断片 (W a r d , e t a l . (1 9 8 9) N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 - 5 4 6)、ならびに (f) 単離された相補性決定領域 (C D R) が挙げられる。更に、F v 断片 V L および V H の 2 つのドメインは別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、それらが V L 領域および V H 領域が対合して一価の分子を形成する単一タンパク質鎖 (単一鎖 F v (s c F v) として知られる) として作製されることを可能にする合成リンカーによって組換え方法を使用して接合され得る。例えば、B i r d , e t a l . (1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 - 4 2 6、H u s t o n , e t a l . (1 9 8 8) P r o c N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3、および O s b o u r n , e t a l . (1 9 9 8) N a t . B i o t e c h n o l . 1 6 : 7 7 8 を参照されたい。単一鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることが意図される。特定の s c F v の任意の V H および V L 配列は、完全な I g G 分子または他のアイソタイプをコードする発現ベクターを生成するために、ヒト免疫グロブリン定常領域 c D N A またはゲノム配列に連結され得る。V H および V L はまた、タンパク質化学または組換え D N A 技術のいずれかを使用して、免疫グロブリンの F a b、F v、または他の断片の生成に使用することもできる。ダイアボディなどの他の形態の単一鎖抗体のも包含される。ダイアボディは、V H および V L ドメインが単一のポリペプチド鎖上で発現するが、同じ鎖上の 2 つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用し、それにより、ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合させ、2 つの抗原結合部位を創出する、二価の二重特異性抗体である。例えば、H o l l i g e r , e t a l . (1 9 9 3) P r o c N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8、P o l j a k , e t a l . (1 9 9 4) S t r u c t u r e 2 : 1 1 2 1 - 1 1 2 3 を参照されたい。また更に、抗体またはその抗原結合部分 (抗原結合断片、抗体断片、抗体部分) は、抗体または抗体部分と 1 つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合または非共有結合によって形成される、より大きい免疫接着分子の一部であり得る。免疫接着分子の例としては、四量体 s c F v 分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用 (K i p r i y a n o v , e t a l . (1 9 9 5) H u m . A n t i b o d i e s H y b r i d o m a s 6 : 9 3 - 1 0 1)、ならびに二価およびピオチン化 s c F v 分子を作製するためのシステム残基、マーカーペプチド、および C 末端ポリヒスチジンタグの使用が挙げられる。K i p r i y a n o v , e t a l . (1 9 9 4) M o l . I m m u n o l . 3 1 : 1 0 4 7 - 1 0 5 8。F a b および F (a b ')₂ 断片などの抗体部分は、それぞれ、全抗体のバ

10

20

30

40

50

パインまたはペプシン消化などの従来技法を使用して全抗体から調製され得る。更に、抗体、抗体部分、および免疫接着分子は、本明細書に記載される標準的な組換えDNA技法を使用して得ることができる。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、異種抗体、同種抗体、同系抗体、またはそれらの修飾形態、例えば、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、または多重特異性抗体であり得る。

【0087】

「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」は、本明細書において「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換的に使用され、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンまたはその断片を指す。

【0088】

本明細書で使用される場合、「抗原」は、その抗原のエピトープに結合することが可能な抗体を産生するように動物を誘導することが更に可能な抗体によって結合されることが可能な分子または分子の一部を広く指す。抗原は、1つのエピトープを有するか、または2つ以上のエピトープを有し得る。本明細書に言及される特定の反応は、抗原が高度に選択的な様式でその対応する抗体と反応し、他の抗原によって誘起され得る多数の他の抗体とは反応しないことを示す。目的の特定の抗原に対する所望の強化された免疫応答の場合、抗原としては、保護免疫応答が誘発され得る感染性疾患抗原が例示的であるが挙げられるが、これに限定されない。

【0089】

本明細書で使用される場合、「抗原提示細胞」は、プロフェッショナルな抗原提示細胞（例えば、Bリンパ球、単球、樹状細胞、およびランゲルハンス細胞）、ならびに他の抗原提示細胞（例えば、ケラチノサイト、内皮細胞、星状細胞、線維芽細胞、および乏突起膠細胞）を広く指す。

【0090】

本明細書で使用される場合、「アンチセンス核酸分子」は、mRNA配列に相補的な、または遺伝子のコード鎖に相補的なタンパク質をコードする「センス」核酸に相補的（例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的）であるヌクレオチド配列を広く指す。したがって、アンチセンス核酸分子は、センス核酸分子に水素結合し得る。

【0091】

本明細書で使用される場合、「アポトーシス」は、当該技術分野で既知の技法を使用して特徴付けることができるプログラムされた細胞死を広く指す。アポトーシス細胞死は、細胞萎縮、膜小胞形成、および細胞断片化となるクロマチン凝集を特徴とし得る。アポトーシスを受ける細胞は、ヌクレオソーム間DNA切断の特徴的なパターンも提示する。

【0092】

本明細書で使用される場合、「自己免疫」または「自己免疫疾患または状態」は、個体自体の組織またはその共分離もしくは顕在化から生じ、それに対して指向される疾患もしくは障害、またはそれからの結果として生じる状態または障害を広く指し、含む。本明細書において、自己免疫状態は、炎症状態またはアレルギー状態、例えば、関節リウマチなどの組織破壊に潜在的に関連する自己抗原に対する宿主免疫反応を特徴とする慢性疾患を含む。

【0093】

本明細書で使用される場合、「B細胞受容体」(BCR)は、B細胞上に見出される膜Ig(mIg)と他の膜貫通ポリペプチド(例えば、IgAおよびIg)との間の複合体を広く指す。mIgのシグナル伝達機能は、オリゴマー抗原または多量体抗原による受容体分子の架橋によって引き起こされる。B細胞は、抗免疫グロブリン抗体によっても活性化され得る。BCR活性化により、B細胞においてチロシンリン酸化を含む多数の変化が生じる。

【0094】

本明細書で使用される場合、「癌」は、悪性成長または腫瘍(例えば、未制御の細胞成長)を生じる異常かつ無制御の細胞分裂を特徴とする任意の腫瘍性疾患(侵襲性または転

10

20

30

40

50

移性に関わらず)を広く指す。本明細書で使用される場合、「癌」または「癌性」という用語は、本明細書に記載される非限定的な例である悪性成長または腫瘍を生じる異常かつ無制御の細胞分裂を特徴とする任意の腫瘍性疾患(侵襲性、非侵襲性、または転移性に関わらず)を包含すると理解されたい。これには、未制御細胞成長を典型的に特徴とする哺乳動物における任意の生理学的状態が含まれる。癌の例は実施例において例示される。更なる癌としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されない。かかる癌のより具体的な例としては、扁平上皮細胞癌、肺癌(小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌を含む)、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌(gastric cancer)もしくは胃癌(stomach cancer)(胃腸癌を含む)、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌(kidney cancer)もしくは腎臓癌(renal cancer)、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、および様々な種類の頭頸部癌、ならびにB細胞リンパ腫(低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL);小リンパ球性(SL)NHL;中悪性度/濾胞性NHL;中悪性度びまん性NHL;高悪性度免疫芽球性NHL;高悪性度リンパ芽球性NHL;高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL;巨大腫瘍病変NHL;マントル細胞リンパ腫;AIDS関連リンパ腫およびワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症を含む);慢性リンパ性白血病(CLL);急性リンパ性白血病(ALL);有毛細胞白血病;慢性骨髄芽球白血病;多発性骨髄腫および移植後リンパ増殖性障害(PTLD)が挙げられる。本発明による治療に適している他の癌としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ性悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。かかる癌のより具体的な例としては、直腸結腸癌、膀胱癌、卵巣癌、黒色腫、扁平上皮細胞癌、肺癌(小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌を含む)、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌(gastric cancer)もしくは胃癌(stomach cancer)(胃腸癌を含む)、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌(kidney cancer)もしくは腎臓癌(renal cancer)、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、および様々な種類の頭頸部癌、ならびにB細胞リンパ腫(低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL);小リンパ球性(SL)NHL;中悪性度/濾胞性NHL;中悪性度びまん性NHL;高悪性度免疫芽球性NHL;高悪性度リンパ芽球性NHL;高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL;巨大腫瘍病変NHL;マントル細胞リンパ腫;AIDS関連リンパ腫およびワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症を含む);慢性リンパ性白血病(CLL);急性リンパ性白血病(ALL);有毛細胞白血病;慢性骨髄芽球性白血病;および移植後リンパ増殖性障害(PTLD)、ならびに母斑症に関連する異常な血管増殖、浮腫(脳腫瘍に関連するものなど)、およびメグズ症候群が挙げられる。好ましくは、癌は、結腸直腸癌、乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫(NHL)、腎細胞癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、軟組織肉腫、カボジ肉腫、カルチノイド癌腫、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、および多発性骨髄腫からなる群から選択される。例示的な実施形態において、癌は、初期または進行性(転移性を含む)膀胱、卵巣、または黒色腫である。別の実施形態において、癌は、結腸直腸癌である。本発明の治療に適している癌性状態は、VISTAを発現するかまたは発現しない癌を含み、更に非転移性または非浸潤性、ならびに浸潤性または転移性の癌を含み、免疫、間質、もしくは疾患細胞によるVISTAの発現は、抗腫瘍応答および抗浸潤性免疫応答を抑制する。本発明の方法は、血管形成腫瘍の治療に特に適している。本発明による癌は、VISTAを発現するかまたは発現しない癌を含み、更に非転移性または非浸潤性、ならびに浸潤性または転移性の癌を含み、免疫、間質、もしくは疾患細胞によるVISTAの発現は、抗腫瘍応答および抗浸潤性免疫応答、ならびに血管形成腫瘍を特徴とするものを抑制する。

【0095】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「キメラ抗体」は、抗原結合部位（可変領域）が異なるもしくは変更されたクラス、エフェクター機能、および/または種の定常領域、または新しい特性をキメラ抗体に付与する完全に異なる分子に連結されるように、定常領域またはその一部が変更、置換、または交換される、例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物、可変領域、またはその一部が、異なるもしくは変更された抗原特異性を有する可変領域で変更されるか、置換されるか、または交換される、抗体分子を広く指す。

【0096】

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

10

【0097】

本明細書で使用される場合、「保存的に修飾された変異型」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用され、特定の核酸配列に関して、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードするそれらの核酸を指すか、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す、保存的に修飾された変異型を広く指す。遺伝子コードの縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。「サイレント変異」は、保存的に修飾された核酸変異の一種である。ポリペプチドをコードする本明細書の全ての核酸配列は、全ての可能な核酸のサイレント変異も説明する。当業者は、機能的に同一の分子を得るために、核酸における各コドン（通常メチオニンの唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンのコドンであるTGGを除く）が修飾され得ることを認識する。

20

【0098】

本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」、「超可変領域」、または「CDR」は、抗体の軽鎖または重鎖の可変領域に見出される超可変領域または相補性決定領域（CDR）のうちの一つ以上を広く指す。Kabat, et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest National Institutes of Health, Bethesda, Md.* を参照されたい。これらの表現は、Kabat, et al. (1983) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. of Health and Human Services* によって定義される超可変領域、または抗体の3次元構造の超可変ループを含む。Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917。各鎖におけるCDRはフレームワーク領域によって近接して保持され、他の鎖からのCDRは抗原結合部位の形成に寄与する。CDR内で、抗体-抗原相互作用においてCDRによって使用される重要接触残基を表す選択性決定領域（SDR）として記載された選択アミノ酸がある。（Kashmiri *Methods* 36:25-34 (2005)）。

30

【0099】

本明細書で使用される場合、「対照量」は、マーカーの試験量と比較される任意の量またはその量の範囲であり得るマーカーを広く指す。例えば、マーカーの対照量は、特定の疾患もしくは状態を有する患者、またはかかる疾患もしくは状態を有しない個人におけるマーカーの量であり得る。対照量は、絶対量（例えばマイクログラム/ml）または相対量（例えばシグナルの相対強度）のいずれかであり得る。

40

【0100】

本明細書で使用される場合、「共刺激受容体」は、免疫細胞、例えばCD28またはICOSに共刺激シグナルを伝達する受容体を広く指す。本明細書で使用される場合、「阻害性受容体」という用語は、免疫細胞、例えばT細胞またはNK細胞に負のシグナルを伝達する受容体を含む。

【0101】

本明細書で使用される場合、「共刺激」は、増殖またはエフェクター機能を誘導する第2の非活性化受容体媒介シグナル（「共刺激シグナル」）を提供する共刺激分子の能力を

50

広く指す。例えば、共刺激シグナルは、サイトカイン分泌（例えば、T細胞 - 受容体媒介シグナルを受けたT細胞において）をもたらす細胞受容体媒介シグナルを受けた免疫細胞（例えば、活性化受容体を介して）は、本明細書で「活性化免疫細胞」と称され得る。T細胞に関して、T細胞への共刺激シグナルの伝達は、シクロサポリンAによって阻害されないシグナル伝達経路を伴う。加えて、共刺激シグナルは、T細胞においてサイトカイン分泌（例えば、IL-2および/またはIL-10）を誘導し、かつ/またはT細胞における抗原への無応答性の誘導、アネルギーの誘導、または細胞死の誘導を阻止することができる。

【0102】

本明細書において「共刺激ポリペプチド」または「共刺激分子」は、T細胞上の細胞表面分子との相互作用時にT細胞応答を調節するポリペプチドを指す。

10

【0103】

本明細書で使用される場合、「共刺激シグナル伝達」は、抗原特異的T細胞応答中の抗原提示細胞上の共刺激ポリペプチドとT細胞上のそれらの受容体との間の相互作用に起因するシグナル伝達活性である。単一の仮説によって限定されることを望むものではないが、抗原特異的T細胞応答は、1) T細胞受容体(TCR)のMHCの文脈において提示される抗原ペプチドとの会合(シグナル1)、および(2)異なる共刺激受容体/リガンド対間の接触により送達される第2の抗原依存シグナル(シグナル2)の、2つのシグナルによって媒介されると考えられる。単一の仮説によって限定されることを望むものではないが、この「第2のシグナル」は、T細胞応答の種類(活性化対阻害)、ならびにその応答の強度および持続時間の決定に重要であり、タンパク質のB7ファミリーなどの共刺激分子からの正および負の両方のシグナルによって制御される。

20

【0104】

本明細書において「B7」ポリペプチドは、B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H5、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-S3、および生物学的に活性な断片、ならびに/またはそれらの変異型を含むがこれらに限定されない、T細胞を共刺激するタンパク質のB7ファミリーのメンバーを意味する。代表的な生物学的に活性な断片としては、T細胞を共刺激する細胞外ドメインまたは細胞外ドメインの断片が挙げられる。

【0105】

本明細書で使用される場合、「細胞質ドメイン」は、細胞の細胞質に及ぶタンパク質の一部を広く指す。

30

【0106】

本明細書で使用される場合、「診断」は、病理学的状態の存在または性質を特定することを広く指す。診断方法は、それらの感度および特異度が異なる。診断アッセイの「感度」は、陽性の試験結果を有する疾患のある個体の割合(「真陽性」のパーセント)である。アッセイによって検出されない疾患のある個体は、「偽陰性」である。罹患がなく、アッセイにおいて陰性の試験結果を有する対象は、「真陰性」と称される。診断アッセイの「特異度」は1-偽陽性率であり、ここで、「偽陽性」率は、陽性の試験結果を有する疾患がないものの割合として定義される。特定の診断方法は、状態の確定診断を提供しない場合があるが、その方法が診断に役立つ陽性表示を提供する場合、それは十分である。

40

【0107】

本明細書で使用される場合、「診断すること」または「診断に役立つ」は、疾患もしくは症状を分類すること、ならびに/または個体が疾患状態を有する可能性を決定すること(例えば、VISTA発現の不在もしくは存在、および/または免疫による発現の増加もしくは減少、および/または推定疾患細胞に基づく)、疾患の重症度を決定すること、疾患の進行を監視すること、疾患の転帰および/もしくは回復の見込みを予測することを広く指す。「検出すること」という用語は、任意に、前述のいずれをも包含し得る。本発明による疾患の診断は、いくつかの実施形態において、対象から得られた生体試料において、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルを決定することによって影響を

50

受ける場合があり、決定されたレベルは、疾患素因、または疾患の存在もしくは不在と相関し得る。「対象から得られた生体試料」は、対象から物理的に除去されていない試料を任意に含んでもよいことに留意するべきである。

【0108】

本明細書で使用される場合、「有効量」は、疾患を治療するために患者に投与されるとき、疾患のかかる治療をもたらすのに十分である化合物、抗体、抗原、または細胞の量を広く指す。有効量は、予防に有効な量であり、かつ/または防止に有効な量である。有効量は、徴候/症状の発生を防止する、徴候/症状の発生の重症度を減少させる、徴候/症状の発生を排除する、徴候/症状の発生の発達を遅延する、徴候/症状の発生の発達を防止する、および/または徴候/症状の発生の予防をもたらすのに有効な量である、減少に有効な量であってもよい。「有効量」は、治療される患者の疾患およびその重症度、ならびに年齢、体重、病歴、感受性、および既存の状態に応じて異なり得る。「有効量」という用語は、本発明の目的に関して、「治療有効量」と同義である。

10

【0109】

本明細書で使用される場合、「細胞外ドメイン」または「ECD」は、細胞の表面に及ぶタンパク質の一部を広く指す。

【0110】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」は、原核生物、酵母、真菌、植物、昆虫、または哺乳類細胞を含む任意の細胞において、インピトロまたはインピボで、構成的または誘導的に本発明の核酸配列を発現する目的に関して、任意の組換え発現系を広く指す。本用語は、直鎖または環状発現系を含む。本用語は、エピソームのままであるか、または宿主細胞ゲノムに組み込まれる発現系を含む。発現系は、自己複製する能力を有しても有さなくてもよい、すなわち、細胞において一過性の発現のみを駆動する。本用語は、組換え核酸の転写に必要な最小要素のみを含有する組換え発現カセットを含む。

20

【0111】

本明細書で使用される場合、「ファミリー」は、本発明のポリペプチドおよび核酸分子を広く指し、共通の構造ドメインもしくはモチーフを有し、かつ本明細書に定義される十分なアミノ酸もしくはヌクレオチド配列相同性を有する、2つ以上のポリペプチドまたは核酸分子を意味することを意図する。ファミリーメンバーは、天然であるか、または天然に存在しなくてもよく、同じまたは異なる種のいずれかからであってもよい。例えば、ファミリーは、ヒト起源の第1のポリペプチド、ならびにヒト起源の他の異なるポリペプチドを含有し得るか、または代替的に、非ヒト起源（例えばサル由来のポリペプチド）の相同体を含有し得る。ファミリーのメンバーはまた、共通の機能特徴を有してもよい。

30

【0112】

本明細書で使用される場合、「Fc受容体」(FcR)は、免疫グロブリン分子(Ig)のFc部分の細胞表面受容体を広く指す。Fc受容体は免疫応答に関与する多くの細胞上に見出される。今までに特定されたヒトFcRの中では、IgG(FcRと指定される)、IgE(FcεRI)、IgA(FcαR)、および重合IgM/A(FcμR)を認識するものである。FcRは、FcεRI(マスト細胞)、FcεRII(多くの白血球)、FcαR(好中球)、およびFcμR(腺上皮、肝細胞)の細胞型において見出される。(Hogg Immunol. Today 9: 185 - 86 (1988))。広く研究されたFcRは、細胞性免疫防御の中心であり、自己免疫疾患の原因に関与する炎症のメディエーターおよび加水分解酵素の放出の刺激に関与する。(Unkles, Annu. Rev. Immunol. 6: 251 - 87 (1988))。マクロファージ/単球、多核白血球、およびナチュラルキラー(NK)細胞FcRはIgGによって媒介される特定の認識の要素を付与するため、FcRは、エフェクター細胞とIgを分泌するリンパ球との間に重要な連結を提供する。ヒト白血球は、IgGのための少なくとも3つの異なる種類のFcR: hFcRI(CD64)(単球/マクロファージ上に見出される)、hFcγRIIAまたはhFcγRIIB(CD32またはCD32A)(単球、好中球、好酸球、血小板、おそらくB細胞、およびK562細胞株上に見出され

40

50

る)、およびFc R I I I A (C D 1 6 A) またはFc R I I I B (C D 1 6 B) (NK細胞、好中球、好酸球、およびマクロファージ上に見出される)を有する。

【0113】

本明細書で使用される場合、「フレームワーク領域」または「FR」は、抗体の軽鎖および重鎖の可変領域内のフレームワーク領域のうちの1つ以上を広く指す。Kabata, et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest National Institutes of Health, Bethesda, Md. を参照されたい。これらの表現は、抗体の軽鎖および重鎖の可変領域内のCDR間に介在するそれらのアミノ酸配列領域を含む。

【0114】

「移植片対宿主病」(GVHD): 本明細書で使用される場合、移植された髄の機能的免疫細胞がレシピエントを「外来」と認識し、宿主組織に対して免疫応答を産生する、同種骨髄移植または造血幹細胞移植の一般的な合併症を指す。1959 Billingham Criteria によると、GVHDが生じるためには3つの基準を満たす必要がある: 1) 生存可能で機能的な免疫細胞での免疫適格移植片の投与、2) レシピエントは免疫学的に組織不適合性である、3) レシピエントは免疫不全であり、したがって移植された細胞を破壊または不活性化することができない。臨床的に、移植片対宿主病は急性および慢性形態に分けられる。疾患の急性または劇症型(aGVHD)は通常、移植後の最初の100日以内に観察され、関連罹患率および死亡率のため、移植の有効性にとって主要な課題である。移植片対宿主病の慢性形態(cGVHD)は通常100日後に生じる。cGVHDの中等度~重度の症例の出現は長期生存に悪影響を及ぼす。骨髄移植後、汚染物質としてまたは宿主に意図的に導入されるかのいずれかで移植片に存在するT細胞は、宿主の組織を抗原的に外来と認識した後に移植レシピエントの組織を攻撃する。T細胞は、TNFアルファおよびインターフェロン-ガンマ(IFN)を含む過剰のサイトカインを産生する。広範囲の宿主抗原、その中でもヒト白血球抗原(HLA)が移植片対宿主病を開始し得る。しかしながら、移植片対宿主病は、HLA同一同胞がドナーであるときであっても生じ得る。古典的に、急性移植片対宿主病は、肝臓、皮膚および粘膜、ならびに消化管への選択的損傷を特徴とする。更なる研究は、移植片対宿主疾患が免疫系(骨髄および胸腺など)自体、および特発性肺炎の形態で肺を含む器官を標的とする。慢性移植片対宿主病はまた上記の器官も攻撃するが、その長期経過にわたって結合組織および外分泌線への損傷も引き起こし得る。

【0115】

本明細書で使用される場合、「異種」は、核酸が自然界において互いに同じ関係で見出されない2つ以上のサブ配列を含むことを示す核酸の部分の部分を広く指す。例えば、新たな機能性核酸を作製するために配置された無関係の遺伝子(例えば、1つの源からのプロモーターおよび別の源からのコード領域)からの2つ以上の配列を有する核酸は、典型的に、組換えにより産生される。同様に、異種タンパク質は、タンパク質が自然界において互いに同じ関係で見出されない2つ以上のサブ配列を含む(例えば、融合タンパク質)ことを示す。

【0116】

本明細書で使用される場合、「高親和性」は、標的抗原または受容体に関して少なくとも10⁻⁶M、より好ましくは10⁻⁷M、更により好ましくは少なくとも10⁻⁸M、および更により好ましくは少なくとも10⁻⁹M、10⁻¹⁰M、10⁻¹¹M、もしくは10⁻¹²MのKDを有する抗体または融合タンパク質を広く指す。本明細書のIgG抗体または融合タンパク質の「高親和性」は、標的抗原または受容体に関して少なくとも10⁻⁶M以下、より好ましくは10⁻⁷M以下、好ましくは10⁻⁸M以下、より好ましくは10⁻⁹M以下、および更により好ましくは10⁻¹⁰M、10⁻¹¹M、もしくは10⁻¹²M以下のKDを有する抗体を指す。特に抗体に関して、「高親和性」結合は、異なる抗体アイソタイプに関して異なってもよい。例えば、IgMアイソタイプの「高親和性」結合は、10⁻⁷M以下、より好ましくは10⁻⁸M以下のKDを有する抗体を

10

20

30

40

50

指す。

【0117】

本明細書で使用される場合、「相同性」は、核酸配列と参照核酸配列との間またはポリペプチド配列と参照ポリペプチド配列との間の類似度を広く指す。相同性は、部分的または完全であり得る。完全な相同性は、核酸またはアミノ酸の配列が同一であることを示す。部分的に相同の核酸またはアミノ酸配列は、参照核酸またはアミノ酸配列と同一ではないものである。相同性の程度は、デフォルトパラメータを使用して、例えば、National Center of Biotechnology Information (NCBI) の BlastP ソフトウェアを使用して、配列比較によって決定され得る。「配列同一性」という用語は、「相同性」と互換的に使用され得る。

10

【0118】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」は、本発明の組換え発現ベクターなど、本発明の核酸分子が導入される細胞を広く指す。宿主細胞は、原核細胞（例えば E. coli）、または酵母、昆虫（例えば SF9）などの真核細胞、両生類、または CHO、HeLa、HEK-293 などの哺乳類細胞、例えば、培養された細胞、外植片、およびインビボ細胞であり得る。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書において互換的に使用される。かかる用語は、特定の対象細胞だけでなく、かかる細胞の子孫または潜在的な子孫も指すことを理解するべきである。ある特定の修飾は、変異または環境の影響のいずれかによって続く世代において生じ得るため、子孫は、実際には、親細胞と同一ではないが、依然として本明細書で使用される用語の範囲内に含まれる。

20

【0119】

「ヒトモノクローナル抗体」は、フレームワークおよび CDR 領域の両方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。一実施形態において、ヒトモノクローナル抗体は、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、ヒト重鎖導入遺伝子および不死化細胞に融合された軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスから得られる、B細胞を含むハイブリドーマによって産生される。これは、完全ヒトモノクローナル抗体、ならびにそのコンジュゲートおよびその変異型を含み、例えば、これは治療薬または診断薬などのエフェクター剤に結合される。

【0120】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」は、ヒト細胞によって作製されるであろう抗体によく似ているように変更された可変領域および定常領域を有する非ヒト細胞によって作製される抗体を含むことを広く指す。例えば、非ヒト抗体のアミノ酸を変更することにより、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に見出されるアミノ酸を組み込む。本発明のヒト化抗体は、例えば CDR において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発により、またはインビボでの体細胞変異により導入される変異）を含み得る。本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳類種の生殖系列に由来する CDR 配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体も含む。

30

【0121】

本明細書で使用される場合、「ハイブリダイゼーション」は、鎖が互いに逆平行に配置されたとき、相補ヌクレオチド間の水素結合の形成による相補（部分的相補を含む）ポリヌクレオチド鎖の物理的相互作用を広く指す。

40

【0122】

本明細書で使用される場合、「IgVドメイン」および「IgCドメイン」は、Igスーパーファミリーメンバードメインを広く指す。これらのドメインは、Ig折り畳みと呼ばれる異なる折り畳みパターンを有する構造単位に対応する。Ig折り畳みは、それぞれが全てではないがほとんどのドメインにおいて2つのシート間に保存されたジスルフィド結合を有する5~10個のアミノ酸の逆平行鎖からなる、2つのシートのサンドイッチで構成されている。Ig、TCR、およびMHC分子のIgCドメインは、同じ種類の配列パターンを共有し、Igスーパーファミリー内のCIセットと呼ばれる。他のIgC

50

ドメインは他のセット内にある。I g Vドメインも配列パターンを共有し、Vセットドメインと呼ばれる。I g VドメインはCドメインよりも長く、追加の鎖の対を形成する。

【0123】

本明細書で使用される場合、「免疫細胞」は、造血起源のものであり、免疫応答において役割を果たす細胞を広く指す。免疫細胞としては、B細胞およびT細胞などのリンパ球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびに骨髄細胞、例えば単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、および顆粒球などの骨髄細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0124】

本明細書で使用される場合、「イムノアッセイ」は、抗原に特異的に結合する抗体を使用するアッセイを広く指す。イムノアッセイは、抗原を単離、標的、および/または定量化する特定の抗体の特定の結合特性の使用を特徴とし得る。

10

【0125】

本明細書で使用される場合、「免疫関連疾患（または障害もしくは状態）」は、急性および慢性の器官移植、同種幹細胞移植、自家幹細胞移植、骨髄移植の拒絶、および移植片対宿主病などの移植片の移植拒絶に関連する自己免疫疾患、炎症性障害、および免疫障害を含むがこれらに限定されない群から選択される任意の疾患障害または状態を包含することを理解するべきである。

【0126】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」は、T細胞共刺激の調節によって影響を受けるT細胞媒介および/またはB細胞媒介免疫応答を広く指す。例示的な免疫応答としては、B細胞応答（例えば抗体産生）T細胞応答（例えば、サイトカイン産生および細胞傷害）、およびサイトカイン応答性細胞、例えばマクロファージの活性化が挙げられる。本明細書で使用される場合、免疫応答に関して「下方調節」という用語は、任意の1つ以上の免疫応答の減少を含み、一方で、免疫応答に関して「上方調節」という用語は、任意の1つ以上の免疫応答の増加を含む。1つの種類の免疫応答の上方調節は、別の種類の免疫応答の対応する下方調節につながり得ることを理解する。例えば、ある特定のサイトカイン（例えば、IL-10）の産生の上方調節は、細胞免疫応答の下方調節につながり得る。

20

【0127】

本明細書において「免疫性」、「免疫学的」、または「免疫」応答は、レシピエント患者のペプチドに対して指向される液性（抗体媒介）および/または細胞（抗原特異的T細胞またはそれらの分泌産物によって媒介される）応答の獲得を指す。かかる応答は、免疫原の投与により誘導される能動的応答か、または抗体もしくはプライムされたT細胞の投与により誘導される受動的応答であってもよい。単一の仮説によって限定されることを望むものではないが、細胞免疫応答は、クラスIIまたはクラスIのMHC分子に関してポリペプチドエピトープの提示により誘発されて、それぞれ、抗原特異的CD4⁺Tヘルパー細胞および/またはCD8⁺細胞傷害性T細胞を活性化する。応答はまた、単球、マクロファージ、NK細胞、好塩基球、樹状細胞、星状細胞、ミクログリア細胞、好酸球の活性化、好中球もしくは他の先天性免疫の構成要素の活性化または動員も伴い得る。細胞媒介性免疫学的応答の存在は、増殖アッセイ（CD4⁺T細胞）またはCTL（細胞傷害性Tリンパ球）アッセイによって決定され得る。免疫原の保護効果または治療効果への液性および細胞応答の相対的寄与は、抗体およびT細胞を免疫化した同系動物から別個に単離し、第2の対象において保護効果または治療効果を測定することによって区別することができる。

30

【0128】

「免疫原性剤」または「免疫原」は、任意でアジュバントとともに、哺乳動物への投与において、それ自体に対して免疫学的応答を誘導することができる部分である。

【0129】

本明細書で互換的に使用される「炎症性障害」、「炎症状態」、および/または「炎症」は、慢性または急性炎症性疾患を広く指し、炎症性自己免疫疾患および炎症性アレルギー

40

50

一状態を明確に含む。これらの状態としては、病原体、損傷細胞、または刺激剤などの有害刺激に対する調節不全の免疫応答を特徴とする炎症異常の例が挙げられる。炎症性障害は、多種多様なヒト疾患の基礎をなす。炎症プロセスにおける病因の非免疫疾患としては、癌、アテローム性動脈硬化、および虚血性心疾患が挙げられる。炎症に関連する障害の例としては、慢性前立腺癌、糸球体腎炎、過敏症、骨盤内炎症性疾患、再灌流傷害、サルコイドーシス、血管炎、間質性膀胱炎、低補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、筋炎、抗シンテターゼ症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、PAPA症候群、ブラウ症候群、痛風、成人および若年性スティル疾患、クリオピリン関連周期熱症候群(cryopyrinopathy)、マックル-ウェルズ症候群、家族性低温誘導性自己炎症性症候群、新生児発症多臓器系炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児神経、皮膚、関節症候群、全身型若年性特発性関節炎、高IgD症候群、シュニッツラー症候群、TNF受容体関連周期性症候群(TRAPS)、歯肉炎、歯周炎、肝炎、硬変、腓炎、心筋炎、血管炎、胃炎、痛風、痛風関節炎、ならびに乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹、およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚障害が挙げられる。

10

【0130】

本明細書で使用される場合、「阻害シグナル」は、免疫細胞上の阻害受容体分子を介して伝達されるシグナルを広く指す。シグナルは、活性化受容体を介して(例えば、TCR、CD3、BCR、もしくはFc分子を介して)シグナルに拮抗し、第2のメッセンジャーの生成、増殖、または免疫細胞におけるエフェクター機能の阻害、例えば、食作用、抗体産生、もしくは細胞傷害の減少、またはメディエーター(例えば、サイトカイン(例えばIL-2)および/もしくはアレルギー応答のメディエーター)を産生する免疫細胞の減退、あるいはアレルギーの獲得をもたらし得る。

20

【0131】

本明細書で使用される場合、「単離された」は、天然に存在するその元の環境から取り除かれた材料を広く指し、したがって、その天然環境から人の手によって変更され、「組換え」ポリペプチドを含む。単離された材料は、例えば、ベクター系に含まれる外因性核酸、宿主細胞内に含有される外因性核酸、またはその元の環境から取り除かれ、したがって、人の手によって変更された任意の材料(例えば、「単離された抗体」)であり得る。例えば、本明細書で使用される場合、「単離された」または「精製された」は、細胞材料、または生物学的物質が由来する細胞もしくは組織源からの他の汚染タンパク質を実質的に含まない、あるいは化学的に合成されるとき、化学物質前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない、タンパク質、DNA、抗体、RNA、またはそれらの生物活性部分を広く指す。本明細書において使用される場合、「単離された」という用語は、化合物が天然に存在するものとは異なる環境にある、例えば、自然界で見出されない濃度までペプチドを濃縮することによってなど、その天然環境から分離された、目的の化合物(例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)を指す。「単離された」は、目的の化合物に関して実質的に濃縮され、かつ/または目的の化合物が部分的または実質的に精製される試料中にある化合物を含む。

30

【0132】

本明細書において使用される場合、「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すことが意図される(例えば、VISTAに特異的に結合する単離された抗体)は、VISTA以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。更に、単離された抗体は、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まなくてもよい。

40

【0133】

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

【0134】

本明細書で使用される場合、「K-assoc」または「Ka」は、特定の抗体-抗原相

50

相互作用の会合速度を広く指す一方で、本明細書で使用される場合、「 K_{diss} 」または「 K_d 」という用語は、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離速度を指す。

【0135】

本明細書で使用される場合、「 K_D 」という用語は、 K_d 対 K_a （すなわち、 K_d/K_a ）の比率から得られる解離定数を指すことが意図され、モル濃度（ M ）として表される。抗体の K_D 値は、プラズモン共鳴（ $BIAcore$ （登録商標））、 $ELISA$ 、および $KINEXA$ などの当該技術分野において十分に確立された方法を使用して決定され得る。抗体の K_D を決定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を使用する、好ましくは $BIAcore$ （登録商標）系などのバイオセンサ系を使用するか、または $ELISA$ によるものである。典型的には、これらの方法は、 25 または 37 で達成される。治療用途のための抗体は一般的に、 25 または 37 で表面プラズモン共鳴により決定されるとき、 50 nM 以下、またはより典型的には 1 nM 以下の K_D を有する。

10

【0136】

本明細書で使用される場合、「ラベル」または「検出可能な部分」は、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、化学的手段、または他の物理的手段によって検出可能な組成物を広く指す。

【0137】

本明細書で使用される場合、「低ストリンジェンシー条件」、「中ストリンジェンシー条件」、「高ストリンジェンシー条件」、または「非常に高いストリンジェンシー条件」は、核酸のハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を広く指す。ハイブリダイゼーション反応を実施するためのガイダンスは、*Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology (5th Ed.)* John Wiley & Sons, NY (2002)に見出すことができる。例示的な具体的なハイブリダイゼーション条件としては、(1)約 45 で $6\times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（ SSC ）、続いて少なくとも 50 で $0.2\times SSC$ 、 0.1% SDS 中で2回洗浄を行う低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件（洗浄の温度は、低ストリンジェンシー条件に関して、 55 まで増加することができる）、(2)約 45 で $6\times SSC$ 、続いて 60 で $0.2\times SSC$ 、 0.1% SDS 中で1回以上洗浄を行う中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、(3)約 45 で $6\times SSC$ 、続いて 65 で $0.2\times SSC$ 、 0.1% SDS 中で1回以上洗浄を行う高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、ならびに(4)非常に高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、 65 で 0.5 M リン酸ナトリウム、 7% SDS 、続いて 65 で $0.2\times SSC$ および 1% SDS で1回以上洗浄を行う、が挙げられるがこれらに限定されない。

20

30

【0138】

本明細書で使用される場合、「狼瘡」は、すべての種類の狼瘡を含むことが意図される。4つの種類の狼瘡があり、以下に論じる。本明細書で使用される場合、「狼瘡様状態」は、腎臓炎症、増加したタンパク尿、および脾腫などの狼瘡と類似する症状を有する炎症状態を含むことが意図される。「全身性エリテマトーデス」または（「 SLE 」）は、軽度または重度であり得、主要器官系に影響を及ぼす可能性がある最も一般的な形態の狼瘡である。これは大半の人々が「狼瘡」と関連付ける状態である。狼瘡は、血液から廃棄物を濾過する能力に影響を及ぼす可能性がある、ループス腎炎と呼ばれる腎臓の炎症をもたらし得る原因不明の自己免疫状態であり、かつまたは重度の場合、透析または腎臓移植を必要とする腎臓損傷をもたらし得る。また、 SLE は、呼吸困難を引き起こし得る、肺高血圧症と呼ばれる肺の血圧の増加をもたらし得る。更なる SLE は、記憶障害、混乱、頭痛、および脳卒中を引き起こし得る神経系および脳の炎症を引き起こし得る。更なる SLE は、脳の血管内での炎症をもたらし得、これは高熱、発作、および行動変化を引き起こし得る。また、 SLE は、心臓発作につながり得る、冠動脈壁上の沈着物の蓄積である、動脈の硬化または冠動脈疾患をもたらし得る。本明細書において、「皮膚狼瘡」は、皮膚にのみに影響を及ぼす狼瘡状態を指す。皮膚に影響を及ぼす3つの種類の狼瘡、慢性皮膚

40

50

エリテマトーデス (C C L E) (別名円板状エリテマトーデス [D L E])、亜急性皮膚エリテマトーデス (S C L E)、および腫脹狼瘡がある。皮膚エリテマトーデスまたは円板状エリテマトーデスは、多くの種類の発疹および病変 (痛み) を引き起こし、円板状発疹と呼ばれる最も一般的なものは、隆起し鱗状で赤いが、痒くない。発疹の領域はディスクまたは円のように見える。皮膚狼瘡の別の一般的な例は、蝶型発疹として知られる頬上および鼻梁にわたる発疹である。他の発疹または痛みは、顔、首、もしくは頭皮 (日光または蛍光灯に曝露される皮膚の領域)、または口内、鼻内、もしくは膈内に現れ得る。脱毛および色素の変化、皮膚の色の变化も皮膚狼瘡の症状である。皮膚狼瘡を有するおよそ 10 パーセントの人々が全身性狼瘡を発生させる。しかしながら、これらの人々は、主要な症状として皮膚発疹を伴って、既に全身性狼瘡を有する可能性がある。「薬物誘導エリテマトーデス」は、SLE を有しない人々に狼瘡様症状を引き起こし得るある特定の薬物によって引き起こされる状態である。一般的に、この形態の狼瘡は一時的であり、通常薬剤が停止されたときから数ヶ月以内に治まる。狼瘡様症状を誘導することが知られている薬剤としては、血圧薬剤ヒドララジンおよびメチルドーパ、プロカインアミドと呼ばれる心臓薬剤、ならびに金属中毒の症例で使用される D - ペニシラミンと呼ばれる薬物が挙げられる。薬物誘導狼瘡の他の原因としては、ミノサイクリン (ざ瘡を治療するために使用される)、結核および抗 T N F の治療であるイソニアジド (関節リウマチを治療するために使用される) が挙げられる。薬物誘導狼瘡の症状は、全身性狼瘡と類似するが、SLE と違い、ほとんど主要器官に影響を及ぼさない。新生児狼瘡は狼瘡の真の形態ではない。これは、狼瘡を有する女性の幼児に影響を及ぼす稀な状態であり、胎内の幼児に作用する母親からの抗体によって引き起こされる。出産時に、幼児は、皮膚発疹、肝臓障害、または低血液細胞数を有し得るが、これらの症状は一般的に、持続作用を伴わず、数ヶ月後に完全に消失する。新生児狼瘡を有する一部の幼児は、重篤な心臓欠陥を有する場合もある。

【 0 1 3 9 】

本明細書で使用される場合、「哺乳動物」は、毛で覆われている皮膚、および女性 / 雌において、幼児を育てるために乳汁を産生する乳腺を特徴とする、ヒトを含む哺乳綱の任意のおよび全ての温血脊椎動物を広く指す。哺乳動物の例としては、アルパカ、アルマジロ、カピバラ、ネコ、ラクダ、チンパンジー、チンキラ、ウシ、イヌ、ヤギ、ゴリラ、ハムスター、ウマ、ヒト、キツネザル、ラマ、マウス、非ヒト霊長類、ブタ、ラット、ヒツジ、トガリネズミ、リス、バク、およびハタネズミが挙げられるが、これらに限定されない。哺乳動物としては、ウシ、イヌ、ウマ、ネコ、マウス、ヒツジ、ブタ、霊長類、およびゲッ歯類の種が挙げられるが、これらに限定されない。哺乳動物は、Mammal Species of the World maintained by the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution in Washington D.C. に列記されている任意のおよび全てのものも含む。

【 0 1 4 0 】

「多重特異性抗体」は、2 つ以上の抗原結合領域を有する抗体を指す。これは二重特異性抗体を含む。これらの抗原結合領域は、異なる抗原または同じ抗原の異なるエピトープに結合し得る。

【 0 1 4 1 】

本明細書で使用される場合、「天然に存在する核酸分子」は、自然界で生じるヌクレオチド配列を有する (例えば、天然のタンパク質をコードする) R N A または D N A を広く指す。

【 0 1 4 2 】

本明細書で使用される場合、「核酸」または「核酸配列」は、単一鎖または二本鎖形態のいずれかのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドオリゴヌクレオチドを広く指す。本用語は、核酸、すなわち、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含むオリゴヌクレオチドを包含する。本用語は、合成骨格を有する核酸様構造も包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列は、その保存的に修飾された変異型 (例えば、縮重コドン

10

20

30

40

50

置換)および相補的配列、ならびに明示的に示される配列も暗黙に包含する。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換的に使用される。

【0143】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結される」は、2つのDNA断片によりコードされるアミノ酸配列がフレーム内にあるように、2つのDNA断片が接合されるときを広く指す。

【0144】

本明細書で使用される場合、「パラトープ」は、抗原(例えば、抗体の抗原結合部位)を認識する抗体の部分を含み得る。パラトープは、抗体のFv領域の小領域(例えば、15~22個のアミノ酸)であり得、抗体の重鎖および軽鎖の部分を含み得る。Goldsbey, et al. Antigen (Chapter 3) Immunology (5th Ed). New York: W. H. Freeman and Company, pages 57-75を参照されたい。

10

【0145】

「患者」または「対象」または「レシピエント」、「個体」または「治療個体」は、本明細書において互換的に使用され、疾患状態を緩和するか、または疾患状態を軽減するか、または疾患状態の発生もしくは再発を予防するかのいずれかの治療を必要とする任意の動物を広く指す。また、本明細書で使用される場合、「患者」は、既往歴、感受性、症状、および徴候の危険因子を有するか、以前に診断を受けたか、疾患の危険にあるか、または疾患の患者集団のメンバーである、任意の動物を広く指す。患者は、ヒト、またはコンパニオン動物、家畜化動物、家畜動物、外来動物、もしくは動物園動物などの臨床患者であってよい。

20

【0146】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、互換的に使用され、修飾(例えば、リン酸化またはグリコシル化)に関わらず、任意の長さのアミノ酸残基のポリマーを広く指す。本用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の類似体もしくは模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。本用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に生じないアミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドは、例えば、糖タンパク質を形成するために炭水化物残基を付加することにより修飾され得る。「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、糖タンパク質ならびに非糖タンパク質を明確に含む。

30

【0147】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」は、核酸の転写を指向する核酸配列のレイを広く指す。本明細書で使用される場合、プロモーターは、ポリメラーゼII型プロモーターの場合、TATA要素などの転写開始部位の近くの必要な核酸配列を含む。プロモーターは任意に、転写開始部位から数千塩基対に位置し得る、遠位のエンハンサー要素またはリプレッサー要素も含む。構成的プロモーターは、大半の環境および発達条件下で活性であるプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、環境または発達制御下で活性であるプロモーターである。

40

【0148】

本明細書で使用される場合、「予防的に有効な量」は、疾患の予防または疾患の再発防止のために患者に投与されるとき、疾患または再発のためにかかる予防をもたらすのに十分である化合物の量を広く指す。予防的に有効な量は、兆候および/または症状の発生を防止するのに有効な量であってよい。「予防的に有効な量」は、治療される患者の疾患、ならびにその重症度および年齢、体重、病歴、状態の素因、既存の状態に応じて異なり得る。

【0149】

50

「予防ワクチン」および/または「予防ワクチン接種」は、癌または感染性状態などの疾患または疾患に関連する症状を防止するために使用されるワクチンを指す。

【0150】

本明細書で使用される場合、「予防」は、徴候および/もしくは症状が患者に存在しない、寛解にある、または患者に以前に存在した療法の過程を広く指す。予防は、患者における疾患の治療後に生じる疾患を防止することを含む。更に、防止は、疾患を発症する可能性がある患者、特に疾患になりやすい患者（例えば、特許集団のメンバー、危険因子を有するもの、または疾患を発症する危険にあるもの）を治療することを含む。

【0151】

本明細書で使用される場合、「組換え」は、産物、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関して、細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが異種核酸もしくはタンパク質の導入または天然核酸もしくはタンパク質の変更によって修飾されているか、あるいは細胞がそのように修飾された細胞に由来するものであることを広く指し、示す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）形態内で見出されない遺伝子を発現するか、またはさもなければ異常に発現されるか、低発現されるか、もしくは全く発現されない天然遺伝子を発現する。

【0152】

本明細書で使用される場合、「組換えヒト抗体」という用語は、(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニックもしくは導入染色体、またはそれから調製されたハイブリドーマ（以下に更に説明される）である、動物（例えばマウス）から単離された抗体、(b) ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトマから単離された抗体、(c) 組み換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、ならびに(d) ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製、発現、創出、または単離された抗体など、組換え手段により調製、発現、創出、または単離される全てのヒト抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、フレームワークおよびCDR領域がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態において、かかる組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（またはヒトIg配列の動物トランスジェニックが使用されるとき、インビボ体細胞変異誘発）を受けることができ、したがって、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_HおよびV_L配列に由来し関連するが、インビボでヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在しない場合がある配列である。

【0153】

本明細書で使用される場合、「シグナル配列」または「シグナルペプチド」は、分泌および膜結合ポリペプチドのN末端で生じ、多数の疎水性アミノ酸残基を含有する、約15個以上のアミノ酸を含有するペプチドを広く指す。例えば、シグナル配列は、少なくとも約10~30個のアミノ酸残基、好ましくは約15~25個のアミノ酸残基、より好ましくは約18~20個のアミノ酸残基、および更により好ましくは約19個のアミノ酸残基を含有し、少なくとも約35~65%、好ましくは約38~50%、より好ましくは約40~45%の疎水性アミノ酸残基（例えば、バリン、ロイシン、イソロイシン、またはフェニルアラニン）を有する。「シグナルペプチド」としても当該技術分野で称される「シグナル配列」は、かかる配列を含有するポリペプチドを脂質二重層に指向する役割を果たし、分泌される際に切断される。

【0154】

本明細書で使用される場合、抗体に「特異的に（または選択的に）結合する」または「〜と特異的に（または選択的に）免疫反応性」または「特異的に相互作用するかまたは結合する」は、タンパク質またはペプチド（または他のエピトープ）を広く指し、いくつかの実施形態において、タンパク質および他の生物の異種集団におけるタンパク質の存在を決定する結合反応を指す。例えば、指定されたイムノアッセイ条件下で、特定された抗体は、バックグラウンド（不特定のシグナル）よりも少なくとも2倍大きい特定のタンパク

10

20

30

40

50

質に結合し、試料中に存在する他のタンパク質に有意な量で実質的に結合しない。典型的には、特定のまたは選択的反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの約10～100回倍超である。

【0155】

本明細書で使用される場合、「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」は、従来のワトソン-クリックまたは他の非伝統的な種類のいずれかによる別の核酸配列と水素結合(複数可)を形成することができる核酸を広く指す。その相補的配列を有する核酸分子の結合自由エネルギーは、核酸の関連機能、例えばRNAi活性を進行させるのに十分である。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は当該技術分野で周知である。(例えば、Turner, et al. CSH Symp. Quant. Biol. LII: 123-33 (1987)、Frier, et al. PNAS 83: 9373-77 (1986)、Turner, et al. J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-85 (1987)を参照されたい)。相補性パーセントは、第2の核酸配列と水素結合を形成することができる(例えば、ワトソン-クリック塩基対合)核酸分子における近接残基の割合を示す(例えば、10のうち少なくとも約5、6、7、8、9、10が少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、および100%(全て含む)相補的である)。「完全に相補的」または100%相補性は、第2の核酸配列における同じ数の近接残基と水素結合する核酸配列の近接残基の全てを広く指す。

10

【0156】

「実質的な相補性」は、非相補的であるように選択されるオーバーハングなどのポリヌクレオチド鎖の領域を除く、少なくとも約90%の相補性を示すポリヌクレオチド鎖を指す。特異的結合は、特異的結合が所望される条件下で、すなわち、インビボアッセイまたは治療処置の場合、生理学的条件下で、またはインビトロアッセイの場合、アッセイが実施される条件下で、オリゴマー化合物の非標的配列への非特異的結合を回避するのに十分な相補度を必要とする。非標的配列は、典型的には、ヌクレオチドが少なくとも5つ異なり得る。

20

【0157】

本明細書で使用される場合、疾患の「徴候」は、疾患の主観的な指標である症状とは対照的に疾患の客観的指標である、患者の検査で判断可能な疾患を示すあらゆる異常を広く指す。

30

【0158】

本明細書で使用される場合、「固体支持体」、「支持体」、および「基材」は、滑らかな支持体(例えば、金属、ガラス、プラスチック、ケイ素、およびセラミック表面)を含むがこれらに限定されない、別の材料を結合することができる固体または半固体構造、ならびに加工材料および多孔質材料を提供する任意の材料を広く指す。

【0159】

本明細書で使用される場合、VISTAの「可溶性外部ドメイン(ECD)」または「外部ドメイン」または「可溶性VISTAタンパク質(複数可)/分子(複数可)」は、非細胞表面結合VISTA分子またはその任意の部分の意味し、これには、VISTAの細胞外ドメインまたはその断片が免疫グロブリン(Ig)部分に融合されて、融合分子に可溶性を付与する、VISTA融合タンパク質もしくはVISTA ECD-Ig融合タンパク質、またはその断片および誘導体、パピローマウイルスE7遺伝子産物、黒色腫関連抗原p97もしくはHIVエンベロープタンパク質などの生物学的に活性なタンパク質もしくは化学的に活性なタンパク質の一部と融合されるかもしくは接合されるVISTAの細胞外ドメインを有するタンパク質、またはその断片および誘導体; VISTA-Igなどのハイブリッド(キメラ)融合タンパク質、またはその断片および誘導体が含まれるが、これらに限定されない。かかる融合タンパク質は以下により詳細に記載される。

40

【0160】

本明細書において「可溶性VISTAタンパク質(複数可)/分子(複数可)」は、タンパク質可溶性を付与するために取り除かれた膜貫通ドメインを有するVISTA分子、

50

またはその断片および誘導体；その断片、部分、または誘導体、および可溶性 V I S T A 変異体分子も含む。本発明の少なくともいくつかの実施形態による方法において使用される可溶性 V I S T A 分子は、シグナル（リーダー）ペプチド配列を含んでも含まなくてもよい。

【 0 1 6 1 】

本明細書における療法または診断の文脈において「対象」または「患者」または「個体」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」という用語は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物、および非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの非哺乳動物、すなわち、トリおよび哺乳類対象を含むがこれらに限定されない、本発明により治療されるのに適したあらゆるものを含み、好ましくは哺乳類である。本発明による治療を必要とする任意の哺乳類対象が適している。両性別およびあらゆる発達段階のヒト対象（すなわち、新生児、乳児、若年、青年、および成人）が本発明により治療され得る。本発明は、動物対象、特に獣医学的目的、ならびに薬物のスクリーニングおよび薬物開発目的のためのマウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、およびウマなどの哺乳類対象にも行われてもよい。「対象」は、「個体」および「患者」と互換的に使用される。

10

【 0 1 6 2 】

本明細書で使用される場合、「化学物質前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質がタンパク質の合成に關与する化学物質前駆体または他の化学物質から分離される V I S T A タンパク質の調製物を広く指す。一実施形態において、「化学物質前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない」という用語は、約 30% 未満（乾燥重量）の化学物質前駆体または非 V I S T A 化学物質、より好ましくは約 20% 未満の化学物質前駆体または非 V I S T A 化学物質、更により好ましくは約 10% 未満の化学物質前駆体または非 V I S T A 化学物質、最も好ましくは約 5% 未満の化学物質前駆体または非 V I S T A 化学物質を有する V I S T A タンパク質の調製物を含む。

20

【 0 1 6 3 】

本明細書で使用される場合、疾患の「症状」は、患者によって経験され、かつ疾患を示す、構造、機能、または感覚における任意の病的徴候または正常からの逸脱を広く指す。

【 0 1 6 4 】

本明細書で使用される場合、「T細胞」は、CD4 + T細胞およびCD8 + T細胞を広く指す。T細胞という用語は、Tヘルパー1型T細胞およびTヘルパー2型T細胞の両方も含む。

30

【 0 1 6 5 】

本明細書で使用される場合、「療法」、「治療的」、「治療すること」、または「治療」は、疾患を治療すること、疾患もしくはその臨床症状の発達を停止または減少させること、および/あるいは疾患を緩和すること、疾患もしくはその臨床症状の退縮をもたらすことを広く指す。療法は、疾患、疾患の徴候および/もしくは症状の予防、治療、救済、減少、軽減、および/またはそれからの解放をもたらすことを包含する。療法は、進行中の疾患兆候および/または症状（例えば、炎症、疼痛）を有する患者における兆候および/または症状の軽減を包含する。療法はまた「予防」も包含する。療法の目的に関して、「減少」という用語は、兆候および/または症状の臨床的に有意な減少を広く指す。療法は、再発もしくは反復の兆候および/または症状（例えば、炎症、疼痛）の治療を含む。療法は、常に出現する兆候および/または症状の排除、ならびに既存の兆候および/または症状の減少、ならびに既存の兆候および/または症状の排除を包含するがこれらに限定されない。療法は、慢性疾患（「維持」）および急性疾患の治療を含む。例えば、療法は、兆候および/または症状（例えば、炎症、疼痛）の再発または反復の治療または予防を含む。

40

【 0 1 6 6 】

本明細書で使用される場合、「Treg細胞」（時折、抑制因子T細胞または誘導性Treg細胞もしくはiTregとも称される）は、免疫系を調節し、自己抗原への寛容を

50

維持するT細胞のサブ集団を指し、自己免疫疾患を抑止することができる。Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺制御性T細胞(Treg)は、正常な条件下で末梢寛容を維持する際に重要である。

【0167】

本明細書で使用される場合、「膜貫通ドメイン」は、形質膜に及ぶ長さが約15個のアミノ酸残基のアミノ酸配列を広く指す。より好ましくは、膜貫通ドメインは、少なくとも約20、25、30、35、40、または45個のアミノ酸残基を含み、形質膜に及ぶ。膜貫通ドメインは、疎水性残基が豊富であり、典型的には、 α ヘリックス構造を有する。一実施形態において、膜貫通ドメインの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%以上のアミノ酸、例えば、ロイシン、イソロイシン、チロシン、またはトリプトファンは、疎水性である。膜貫通ドメインは、例えば、Zagotta, et al. Annu. Rev. Neurosci. 19: 235-263 (1996)に記載されている。

10

【0168】

本明細書で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、動物の細胞のうちの1つ以上が「導入遺伝子」を含む、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスを広く指す。「遺伝子導入」という用語は、トランスジェニック動物が発達する細胞のゲノムに組み込まれ、成熟動物のゲノムに残存する、例えば、トランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織においてコードされた遺伝子産物の発現を指向する、外因性DNAを指す。

20

【0169】

本明細書で使用される場合、「無応答性」は、免疫細胞の刺激、例えば、および活性化受容体またはサイトカインを介した刺激への屈折度を広く指す。無応答性は、例えば、免疫抑制剤または高用量の抗原への曝露のために生じ得る。

【0170】

本明細書で使用される場合、「可変領域」または「VR」は、抗体の抗原への結合に直接関与する抗体の軽鎖および重鎖の各対内のドメインを広く指す。各重鎖は、一端に可変ドメイン(V_H)、続いていくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)、およびそのもう一端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと整合し、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整合する。

30

【0171】

本明細書で使用される場合、「ベクター」は、それが連結される別の核酸分子を輸送することができる核酸分子を広く指す。ベクターの1つの種類は「プラスミド」であり、これは追加のDNAセグメントがライゲーションされ得る環状二本鎖DNAループを指す。ベクターの別の種類はウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲーションされ得る。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自己複製することができる(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳類ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。更に、ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向することができる。本明細書においてベクターは、「組換え発現ベクター」または単に「発現ベクター」と称される。一般的に、組み換えDNA技法において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態である場合が多い。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であるため、互換的に使用されてもよい。しかしながら、本発明は、同等の機能を果たすウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルス)などのかかる他の形態の発現ベクターを含むことが意図されている。技法および手順は、一般的に、当該技術分野で周知の従来の方法により、ならびに本明細書全体を通じて引用され論じられる様々な一般的な参考文献およびより具体的な参考文献に記載されるように実施される。例えば、Sambrook, et al. Molec. Cloning: Lab. M

40

50

annual [3rd Ed] Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)を参照されたい。標準的な技法は、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成および組織培養、ならびに形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）のために使用され得る。酵素反応および精製技法は、製造業者の仕様に従うか、または当該技術分野では一般に達成されるように、または本明細書に記載されるように実施され得る。

【0172】

本出願において使用されるある特定の用語および語句を定義したため、本発明により包含される抗VISTA抗体および抗原結合抗体断片ならびにその産生方法および使用方法を以下に更に記載する。

10

【0173】

本発明は、T細胞活性化のIgVドメイン抑制因子(VISTA)に結合する抗原結合領域を含む抗体および抗体断片に関する。VISTAは、免疫応答を負に抑制するチェックポイント制御因子である。Wang et al., "VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses," J. Exp. Med., 208(3)577-92(2011)を参照されたい。このタンパク質は、正常なヒト好中球、単球、およびT細胞サブセット上に発現される。加えて、カニクイザル細胞は、正常なヒト細胞に類似するパターンでVISTAを発現する。VISTAは、例えば癌患者の末梢血細胞においても発現される。

20

【0174】

本発明によるアゴニスト抗VISTA抗体または抗体断片のVISTAへの結合は、VISTAの免疫への効果のうちの少なくとも1つを刺激するか、誘発するか、または模倣し、それによりVISTAの免疫への抑制効果のうちの少なくとも1つ、例えば、T細胞免疫の抑制または特定の炎症誘発性サイトカインの発現の抑制、またはある特定の走化性因子およびケモカインの発現へのその促進効果を促進する。

【0175】

かかる抗体断片としては、例として、Fab、F(ab')₂、およびscFv抗体断片が挙げられる。これらの抗体または抗体断片は、抗体定常領域、またはその断片もしくは変異型を含み得る。かかる抗体および抗体断片としては、造血細胞および他の細胞上、例えば、骨髄細胞および/もしくはリンパ球、単球、好中球、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、腫瘍細胞、ならびに/または腫瘍微小環境(TME)細胞上に発現されるVISTAタンパク質に結合するものが挙げられる。腫瘍微小環境は、腫瘍の細胞環境である。それは、周囲免疫細胞、線維芽細胞、血管、他の細胞、シグナル伝達分子、および細胞外マトリックスを含む。

30

【0176】

本出願は、図4に示される配列を有する抗ヒトVISTA抗体のうちのいずれかと同じCDRを含むものを含む、新規アゴニスト抗ヒトVISTA抗体を提供する。本発明以前にいくつかのアンタゴニスト抗ヒトVISTA抗体が文献において報告されているが、アゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体または抗体断片は報告されていない。

40

【0177】

以下の実験例に開示されるように、最初に、2つのキメラ抗ヒトVISTA抗体を、未修飾IgG2ヒト定常領域またはIgG2定常領域をそれぞれ含有するアンタゴニスティックであるマウス抗ヒトVISTA抗体(図4の配列を有する1E8)から得、ここで、カップ鎖の127位のシステイン残基がセリン残基に変更された。本明細書に参照される実施例および図に示されるように、両抗体は、少なくとも(i)IL-2、IL-4、IL-6、IL-17、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、および腫瘍壊死因子-アルファ(TNF-)などのある特定の炎症誘発性サイトカインの発現を減少させる能力、ならびにKC(ケラチノサイト由来ケモカイン)またはMIP-2(マクロファージ炎症性タンパク質-2)などのある特定のケモカインまたは走化性因子の

50

発現の減少、(i i) G V H DモデルにおけるT細胞活性を抑制する能力、ならびに(i i i) C D 3由来T細胞応答を抑制する能力に基づく、V I S T Aの免疫への抑制効果を刺激するか、または模倣することが分かった。

【 0 1 7 8 】

加えて、これら2つのアゴニスト抗体の単離後、ヒトI g G 2定常領域またはF c領域を含有する別の10のキメラアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体を得た。これらの抗体は、本明細書において、G G 8、V S T B 9 5 (I N X 9 0 3)、V S T B 1 0 3 (I N X 9 0 4)、V S T B 5 3 (I N X 9 0 5)、V S T B 9 2 (I N X 9 0 8)、V S T B 5 0 (I N X 9 0 0)、V S T B 5 6 (I N X 9 0 1)、V S T B 6 3 (I N X 9 0 2)、V S T B 5 4 (I N X 9 0 6)、およびV S T B 6 6 (I N X 9 0 7) (図4の配列を有する) と称される抗体に由来した。

10

【 0 1 7 9 】

特に、これらのキメラ抗ヒトV I S T A抗体は、図4に示される可変配列と、ヒトI g G 2定常領域とを有する。表1および2(以下参照)に報告されるように、これらの抗ヒトV I S T A抗体は、抗体ビニングの使用によって評価されるとき、群1および群2に指定される2つの異なるエピトープ群に結合することが分かった。図4に記載されるように、群2に対応するエピトープは、ヒトV I S T Aに存在する2つの異なるペプチド、すなわち、N L T L L D S G LおよびV Q T G K D A P S N Cの残基を含む。また、以下の実施例に記載されるように、本発明による他のアゴニスト抗体のエピトープ特異性は、P e p s c a n (登録商標)分析によって決定された。

20

【 0 1 8 0 】

表1および2(以下参照)に示されるように、これらの12の異なる抗ヒトV I S T A抗体は、免疫抑制の少なくとも1つのモデルにおいて、およびいくつかの免疫抑制モデルの多くにおいて免疫抑制性であることがわかった。特に、I N X 9 0 5、I N X 9 0 8、I N X 9 0 1、I N X 9 0 2、およびI N X 9 0 6は、2つの異なるアッセイ形式において免疫抑制性であることが示された。これらの抗体の全てが免疫抑制性であり、V I S T Aの免疫抑制効果を誘発するか、促進するか、または刺激するように思われるが、I N X 9 0 1、I N X 9 0 2、およびI N X 9 0 6、ならびにI N X 9 0 8が最も免疫抑制性であるように思われる。

【 0 1 8 1 】

また、図4に示される他の抗V I S T A抗体の可変配列を含有するヒトI g G 2定常ドメインを含む他のキメラ抗ヒトV I S T A抗体は、それらの免疫抑制特性、ならびに免疫抑制性およびヒトV I S T Aの他の効果を刺激するか、または模倣するそれらの能力についてスクリーニングされる。今までに得られた結果に基づいて、このスクリーニングは、他のアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体を特定するはずである。加えて、本発明によるアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体は、関節炎、狼瘡、もしくはS L E、G V H D、炎症性腸疾患(I B D)もしくは大腸炎、慢性および急性感染性疾患、または肝毒性および乾癬動物モデルを含む、多くの自己免疫および炎症性動物疾患モデルにおいて有効(免疫抑制性)であることが示された。それに基づき、対象抗ヒトV I S T Aアゴニスト抗体は、自己免疫、アレルギー、および炎症状態の治療上の処置および予防的治療に使用するのに十分に適しているはずである。

30

40

【 0 1 8 2 】

記載されるように、図4に示される配列を有するキメラI g G 2抗ヒトV I S T A抗体は、少なくとも1つの免疫抑制モデルにおいて免疫抑制性であることが示された。これらの抗体は更に、特定の種類のT細胞の枯渇をもたらすことによる、または一般にT細胞を枯渇させることによるよりも、特定の免疫調節様式でこれらの免疫抑制効果を誘発する。

【 0 1 8 3 】

実施例に更に示されるように、ヒンジ領域に変異を含有するキメラI g G 2のアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体は、免疫に対して実質的に同じ抑制効果を誘発する、すなわち、I g G 2定常領域内の変異は、試験された実験条件下で抑制の強化を誘発しない

50

ように思われる。むしろ、I g G 2 A および I g G 2 B の形態の両方ならびにそれらの混合物は、同じ免疫抑制効果を誘発した。加えて、そして驚くべきことに、実施例に開示される実験に基づくと、F c R 結合は対象抗ヒト V I S T A 抗体のアゴニスト特性に寄与しているようにみえる。特に、サイレント I g G 2 定常領域を含むことにより、対象のアゴニスト抗体の免疫抑制特性が除去されたことが分かった。これらの結果に基づき、1つ以上の F c R がこれらの抗体のアゴニスティックな特性に影響を及ぼすことが仮定され、特に F c R I I A (C D 3 2 または C D 3 2 A) または F c R I I B (C D 3 2 B) 結合が対象アゴニスト抗体のアゴニスト特性に関与し得ることが仮定されることが仮定される。

【 0 1 8 4 】

これらの同じ方法を用いて、他のアゴニスト抗ヒト V I S T A I g G 2 抗体、例えば、図 4 に示される配列を有する抗ヒト V I S T A 抗体に由来する他のものが得られることが予想される。述べたように、図 4 に含有される配列を有するものを含む、12 のアゴニスト抗ヒト V I S T A 抗体が今までに得られた。これらの結果に基づき、他のアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体が生成され、免疫抑制性であることが示され得ることが予想される。また、同じまたは重なるエピトープに結合し、かつ/または図 4 に示される配列を含有する抗体のうちのいずれかと競合する他のアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体が生成され得ることが予想される。例示的な実施形態において、これらの抗体は、群 1 または群 2 の抗体に対応するエピトープに結合するか、またはかかる抗体を有するヒト V I S T A への結合に関して競合する。

【 0 1 8 5 】

抗体により結合される特定のエピトープ(複数可)を特定するための方法は、当該技術分野で既知である。実施例において、出願人は、本発明によるいくつかの抗 V I S T A 抗体により結合されるエピトープの解明を開示する。したがって、例示的な実施形態において、本発明によるアゴニスト抗ヒト V I S T A 抗体は、A 形態、B 形態、または前述の混合物の I g G 2 定常領域またはその断片を含む。例示的な実施形態において、これらの抗体は、1つ以上の F c R に結合する、例えば、それらは、無傷または野生型ヒト I g G 2 F c 領域として同じ F c R に結合する。他の例示的な実施形態において、抗体は、C D 3 2 (C D 3 2 A および/または C D 3 2 B) に結合する。これは、C D 3 2 (C D 3 2 A および/または C D 3 2 B) に結合する野生型または修飾された I g G 2 定常領域の使用により達成され得る。更に、アゴニスト抗体は、C D 3 2 A および/または C D 3 2 B などの F c R に結合する別の F c ポリペプチドまたは抗原結合領域などの別のポリペプチドを組み込むように修飾され得る。

【 0 1 8 6 】

本発明のアゴニスト抗ヒト V I S T A 抗体に含有される I g G 2 F c 領域または定常領域は、例えば、エフェクター機能を変更するために、例えば、F c R 結合、F c R N 結合、補体結合、グリコシル化などを変更するために、任意で修飾され得る。特に、本発明のアゴニスト抗ヒト V I S T A 抗体に含有される I g G 2 F c 領域または定常領域は、任意で、27 位におけるシステインの変換により、または更に任意で、例えば、ヒンジ領域において、別のシステイン残基または他の残基の別のアミノ酸、例えばセリンへの変換により修飾され得る。他の可能な F c 修飾は以下に開示される。

【 0 1 8 7 】

これらの V I S T A アゴニスト抗体は、T 細胞免疫の抑制または炎症誘発性サイトカインの発現ならびにまたはケモカインおよび走化性因子の発現の増加が治療的にまたは予防的に有益である状態の治療または防止において、疾患状態の治療または防止に使用されるか、またはそれに関連する病理学的作用、例えば炎症の治療、または減少、回復のために使用され得る。これらの状態には、特に、自己免疫、アレルギー、炎症障害、敗血症、G V H D、および C A R - T 細胞もしくは遺伝子治療構築物または細胞含有などの移植細胞、組織、または器官に対する望ましくない T 細胞免疫応答の阻害のためが含まれる。

【 0 1 8 8 】

10

20

30

40

50

述べたように、本発明によるアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体を使用する治療的または予防的に治療され得る例示的な状態は、自己免疫状態、アレルギー状態、炎症状態、GVHD、移植、および敗血症を含む。述べたように、本発明によるアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体は、治療的に有効であり、関節炎、炎症性腸疾患（IBD）、狼瘡、GVHD、慢性急性感染/肝毒性、および乾癬疾患モデルを含む、多くの動物疾患モデルにおいて免疫抑制性であることが示されている。したがって、本発明の抗体は、免疫、特に、T細胞免疫の抑制が治療的に望ましい状態の治療に使用するのに十分に適しているはずである。

【0189】

A．療法および診断におけるアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体および断片の使用
本発明によるアゴニストを含有する組成物は、T細胞免疫を阻害し、これが自己免疫、アレルギー、または炎症状態などの治療的に望ましい状態を治療するために使用され得る。これらの組成物は、V I S T AのT細胞活性化または増殖またはサイトカイン発現または他の効果を抑制することを必要とする対象における、それを行うのに有効な本発明によるアゴニスト抗体または抗体断片の量を含む。かかる自己免疫、炎症、およびアレルギー状態には、例えば、関節炎状態、例えば、RA、乾癬性関節炎、乾癬、強皮症、多発性硬化症、狼瘡、IBD、ITP、糖尿病、GVHD、サルコイドーシス、アレルギー性喘息、肝炎関連肝毒性、およびCAR-T細胞もしくは遺伝子治療構築物または細胞含有などの移植細胞、組織、または器官に対する望ましくないT細胞免疫応答の阻害のためが含まれる。

【0190】

本発明の抗体が単独で、または他の治療薬、特に他の免疫抑制分子とともに使用され得る具体的な状態としては、後天性免疫不全症候群（AIDS）、後天性脾臓萎縮、急性前部ブドウ膜炎、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）、急性痛風性関節炎、急性壊死性出血性白質脳炎、急性もしくは慢性副鼻腔炎、急性化膿性髄膜炎（または他の中枢神経系炎症障害）、急性の重篤な炎症、アジソン病、副腎炎、成人発症型真性糖尿病（II型糖尿病）、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症（AOIH）、無ガンマグロブリン血症、無顆粒球症、脈管炎（血管炎、任意に大型血管炎、任意にリウマチ性多発筋痛症、および巨細胞性（タカヤス）動脈炎を含む）、アレルギー状態、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、アレルギー性過敏性障害、アレルギー性神経炎、アレルギー反応、円形脱毛症、全頭脱毛症、アルポート症候群、肺炎、任意にアレルギー性肺炎もしくは線維性肺炎、アルツハイマー病、アミロイドーシス、筋萎縮性側索硬化症（ALS；ルー・ゲーリッグ病）、好酸球関連障害、任意に好酸球増加症、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、血管拡張症、抗体媒介性腎炎、抗GBM/抗TBM腎炎、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、抗リン脂質症候群（APS）、アフタ、アフタ性口内炎、再生不良性貧血、不整脈、動脈硬化症、動脈硬化障害、関節炎、任意に急性関節炎などの関節リウマチ、もしくは慢性関節リウマチ、進行性慢性関節炎（*arthritis chronica progredient*e）、変形性関節炎、回虫症、アスペルギルス腫、肉芽腫含有好酸球、アスペルギルス症、アスペルミオジェネーシス（*aspermiogenesis*）、喘息、任意に気管支喘息（*asthma bronchiale*）、気管支喘息（*bronchial asthma*）、もしくは自己免疫喘息、毛細血管拡張性運動失調症、失調性硬化症、アテローム性動脈硬化症、自閉症、自己免疫性血管性浮腫、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性糖尿病、自己免疫精巣炎および卵巣炎を含む精巣および卵巣の自己免疫疾患、膠原病に関連する自己免疫障害、自己免疫性自律神経障害、自己免疫性耳疾患、任意に自己免疫性内耳疾患（AGED）、自己免疫性甲状腺炎などの甲状腺炎を含む自己免疫性内分泌疾患、自己免疫性腸疾患症候群、自己免疫性性腺機能不全、自己免疫性難聴、自己免疫性溶血、自己免疫性肝炎、自己免疫性肝臓学的疾患、自己免疫性高脂血症、自己免疫性免疫不全、自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性膵炎、自己免疫性多腺性内分泌障害、多腺性自己免疫症候群1型、自己免疫性網膜症、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、自己免疫性甲状腺疾患

10

20

30

40

50

、自己免疫性蕁麻疹、自己免疫媒介性胃腸疾患、軸索型&神経型ニューロパチー、バロー病、ベーチェット病、良性家族性および虚血再灌流障害、良性リンパ球性血管炎、ベルガー病（IgA腎症）、鳥飼病、失明、ベック病、閉塞性細気管支炎（非移植）vs NSIP、気管支炎、気管支肺アスペルギルス症、ブルトン病、水疱性類天疱瘡、カプラン症候群、心筋症、心血管虚血、キャッスルマン症候群、セリアック病、セリアックスブルー（グルテン腸症）、小脳変性症、脳虚血および血管新生を伴う疾患、シャーガス疾患、チャンネル病、任意にてんかん、CNSのチャンネル病、脈絡網膜炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液障害、慢性活動性肝炎もしくは自己免疫性慢性活動性肝炎、慢性接触性皮膚炎、慢性好酸球性肺炎、慢性疲労症候群、慢性肝炎、慢性過敏性肺炎、慢性過敏性間質性肺炎、慢性炎症性関節炎、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）、慢性難治性炎症、慢性粘膜皮膚カンジダ症、慢性ニューロパチー、任意にIgM多発ニューロパチーもしくはIgM媒介性ニューロパチー、慢性閉塞性気道疾患、慢性肺炎症性疾患、慢性再発性多巣性骨髄炎（CRMO）、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）もしくは亜急性甲状腺炎、チャーグ・ストラウス症候群、癬痕性類天疱瘡/良性粘膜類天疱瘡、CNS炎症性疾患、CNS血管炎、セリアック病、コガン症候群、寒冷凝集素症、ポリープ性大腸炎（colitis polyposa）、潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis）、潰瘍性大腸炎（colitis ulcerosa）、コラーゲン大腸炎などの大腸炎、T細胞の浸潤および慢性炎症応答を伴う状態、先天性心ブロック、先天性風疹感染症、クームス陽性貧血、冠状動脈疾患、コクサッキー心筋炎、CREST症候群（石灰化症、レイノー現象）、クローン病、クリオグロブリン血症、クッシング症候群、毛様体炎、任意に慢性毛様体炎、異虹彩色性毛様体炎、虹彩毛様体炎、もしくはフックス毛様体炎、嚢胞性線維症、サイトカイン誘導性毒性、聴覚消失、変形性関節症、脱髄性疾患、任意に自己免疫脱髄性疾患、脱髄性ニューロパチー、デング熱、疱疹状皮膚炎およびアトピー性皮膚炎、皮膚炎（接触性皮膚炎、皮膚筋炎、急性炎症性要素を伴う皮膚疾患を含む）、デビック病（視神経脊髄炎）、糖尿病性大動脈障害、糖尿病性ニューロパチー、糖尿病性網膜症、ダイヤモンドブラックファン貧血、びまん性間質性肺線維症、拡張型心筋症、円板状狼瘡、白血球遊出を伴う疾患、ドレスラー症候群、デュピュイトラン拘縮、エコーウイルス感染症、アレルギー性湿疹もしくはアトピー性湿疹を含む湿疹、ラスムッセン脳炎ならびに辺縁脳炎および/もしくは脳幹脳炎などの脳炎、脳脊髄炎、任意にアレルギー性脳脊髄炎もしくは脳脊髄炎アレルギー、および実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、動脈内過形成（endarterial hyperplasia）、心内膜炎、内分泌性眼症、子宮内膜症、心内膜心筋線維症、水晶体過敏性眼内炎（endophthalmitis phacoanaphylactica）、眼内炎、アレルギー性腸炎、好酸球増多筋痛症候群、好酸球性筋膜炎、流行性角結膜炎、後天性表皮水疱症（EBA）、上強膜、上強膜炎、エプスタイン・バーウイルス感染症、持続性隆起性紅斑（erythema elevatum et diutinum）、多形性紅斑、らい性結節性紅斑、結節性紅斑、胎児赤芽球症、食道蠕動低下、本態性混合型クリオグロブリン血症、篩状、エバン症候群、実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、第VII因子欠乏症、農夫肺、リウマチ熱（febris rheumatica）、フェルティ症候群、線維筋痛症、線維性肺肺炎、フィラリア症、巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）、食中毒、前面胃萎縮（frontal, gastric atrophy）、巨細胞関節炎（時間的関節炎）、巨細胞肝炎、巨細胞多発性筋痛、糸球体腎炎（glomerulonephritides）、慢性もしくは急性糸球体腎炎（例えば一次GN）などの、ネフローゼ症候群を有する、および有しない糸球体腎炎（GN）、グッドパスチャー症候群、痛風性関節炎、顆粒球輸血関連の症候群、リンパ腫様肉芽腫症を含む肉芽腫症、多発性血管炎を伴う肉芽腫症（GPA）、肉芽腫性ぶどう膜炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、滴状乾癬、発作性血色素尿症（hemoglobinuria paroxysmatica）、ハーマン・リッチ病、橋本病、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、ヘモクロマトーシス、溶血性貧血もしくは免疫性溶血性貧血（自己免疫性溶血性貧血（AIHA）、溶血性貧血を含む）、血友病A、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、妊娠性疱疹、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症、

10

20

30

40

50

痛覚過敏症、低ガンマグロブリン血症、性腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、特発性尿崩症、特発性顔面神経麻痺、特発性甲状腺機能低下症、特発性 I g A 腎症、特発性膜性 G N もしくは特発性膜性腎症、特発性腎炎症候群、特発性肺線維症、特発性スプルー、特発性血小板減少性紫斑病 (I T P)、I g A 腎症、I g E 媒介性疾患、任意にアナフィラキシーおよびアレルギー性もしくはアトピー性鼻炎、I g G 4 関連硬化性疾患、限局性回腸炎、免疫複合体腎炎、サイトカインおよび T リンパ球によって媒介される急性および遅延過敏症を伴う免疫応答、免疫媒介性 G N、免疫調節性リポタンパク質 (成人もしくは急性呼吸促迫症候群 (A R D S) を含む)、封入体筋炎、感染性関節炎、抗精子抗体による不妊症、ブドウ膜の全てまたは一部の炎症、炎症性腸疾患 (I B D)、炎症性増殖過剰皮膚病、炎症性筋障害、インスリン依存性糖尿病 (1 型)、睪炎、間質性膀胱炎、間質性肺疾患、間質性肺線維症、虹彩炎、虚血性再灌流障害、関節炎、若年性関節炎、若年性皮膚筋炎、若年性糖尿病、若年発症型 (I 型) 真性糖尿病 (小児性インスリン依存性真性糖尿病 (I D D M) を含む)、若年発症型関節リウマチ、川崎症候群、乾性角結膜炎、キパノソミアシス (k y p a n o s o m i a s i s)、ランバート・イートン症候群、リーシュマニア症、ハンセン病、白血球減少症、白血球接着不全、白血球破壊性血管炎、白血球減少症、扁平苔癬、硬化性萎縮性、木質性結膜炎、線状 I g A 皮膚、線状 I g A 疾患 (L A D)、レフラー症候群、ルポイド肝炎、狼瘡 (腎炎、脳炎、小児性、非腎性、腎外、円盤状、脱毛症を含む)、狼瘡 (S L E)、播種性紅斑性狼瘡 (l u p u s e r y t h e m a t o s u s d i s s e m i n a t u s)、ライム関節炎、ライム病、リンパ様間質性肺炎、マラリア、男性および女性自己免疫性不妊症、上顎の中程度の血管血管炎 (川崎病および結節性多発性動脈炎を含む)、膜性もしくは膜状増殖性 G N (M P G N)、(I 型および I I 型、ならびに急速進行性 G N、膜状 G N (膜状腎症) を含む)、メニエール病、髄膜炎、顕微鏡的大腸炎、顕微鏡的多発性血管炎、片頭痛、微小変化型腎症、混合性結合組織病 (M C T D)、伝染性単核球症、モーレン潰瘍、ミュシャー・ハーバーマン病、多巣性運動ニューロパチー、複数の内分泌不全、敗血症、外傷もしくは出血に続くものなどの多器官傷害症候群、多器官傷害症候群、脊椎 - 眼 M S などの多発性硬化症 (M S)、多発性硬化症、ムンプス、筋疾患、胸腺腫関連重症筋無力症などの重症筋無力症、重症筋無力症、心筋炎、筋炎、ナルコレプシー、壊死性腸炎、および経壁大腸炎、ならびに自己免疫性炎症性腸疾患、壊死性、皮膚性もしくは過敏性血管炎、新生児性狼瘡症候群 (N L E)、腎症、ネフローゼ症候群、神経学的疾患、視神経脊髄炎 (デビック)、視神経脊髄炎、神経性筋強直症、好中球減少症、非癌性リンパ球増加症、非肉芽腫性ブドウ膜炎、非悪性胸腺腫、眼および眼窩炎症性障害、眼性瘢痕性類天疱瘡、卵巣炎、交感性眼炎、オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群 (O M S)、オプソクローヌスもしくはオプソクローヌス・ミオクローヌス症候群 (O M S)、および二次ニューロパチー、視神経炎、肉芽腫性精巣炎 (o r c h i t i s g r a n u l o m a t o s a)、変形性関節症、回帰性リウマチ、睪炎、汎血球減少症、P A N D A S (S t r e p t o c o c c u s に関連する小児性自己免疫神経精神病的疾患)、傍腫瘍性小脳変性症、腫瘍随伴症候群、腫瘍随伴症候群 (神経性腫瘍随伴症候群を含む)、任意にランバート・イートン筋無力症候群もしくはイートン・ランバート症候群、寄生虫疾患 (例えばリーシュマニア症)、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (P N H)、パリーロンバーグ症候群、毛様体扁平部炎 (末梢ぶどう膜炎)、パーソナージュ (P a r s o n n a g e) ・ターナー症候群、バルボウイルス感染症、水疱性類天疱瘡および皮膚類天疱瘡などの類天疱瘡、天疱瘡 (尋常性天疱瘡を含む)、紅斑性天疱瘡、落葉状天疱瘡、天疱瘡粘液 - 膜類天疱瘡、天疱瘡、消化性潰瘍、周期性麻痺、末梢性ニューロパチー、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血 (p e r n i c i o u s a n e m i a) (悪性貧血 (a n e m i a p e r n i c i o s a))、悪性貧血、水晶体抗原性ブドウ膜炎、肺硬変、P O E M S 症候群、結節性多発性動脈炎、I 型、I I 型、および I I I 型多発性関節炎慢性プリマリア、多発性軟骨炎 (例えば、不応性もしくは再発性多発性軟骨炎)、多内分泌自己免疫疾患、多内分泌不全、多腺性症候群、任意に自己免疫性多腺性症候群 (もしくは多腺性内分泌異常症候群)、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、多発性筋炎 / 皮膚筋炎、多発ニューロパチー、急性多発性神経根炎 (p o

10

20

30

40

50

ly radiculitis acuta)、心臓切開後症候群、後部ブドウ膜炎、もしくは自己免疫性ぶどう膜炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、連鎖球菌感染後腎炎、予防接種後症候群、初老期認知症、原発性胆汁性肝硬変、原発性甲状腺機能低下症、原発性特発性粘液水腫、原発性リンパ球増加症(モノクローナルB細胞リンパ球増加症を含む)、任意に良性単クローン性免疫グロブリン血症および意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症、MGUS、原発性粘液水腫、原発性進行性MS(P PMS)、および再発性寛解型MS(R RMS)、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、全身性進行性硬化症、増殖性関節炎、乾癬(尋常性乾癬、乾癬、乾癬性関節炎など)、肺胞タンパク症、肺浸潤好酸球増加症、真正赤血球性貧血もしくは形成不全(P R C A)、赤芽球癆、化膿性もしくは非化膿性副鼻腔炎、爪の膿疱性乾癬および乾癬、腎盂炎、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎、レイノー現象、反応性関節炎、反復流産、血圧応答の低下、反射性交感神経性ジストロフィー、不応性スプルー、ライター病もしくはライター症候群、再発性多発性軟骨炎、心筋もしくは他の組織の再灌流傷害、再灌流傷害、呼吸促迫症候群、下肢静止不能症候群、網膜自己免疫、後腹膜線維化症、レイノー症候群、リウマチ疾患、リウマチ熱、リウマチ、関節リウマチ、リウマチ性脊椎炎、風疹ウイルス感染症、サンプター症候群、サルコイドーシス、住血吸虫症、シュミット症候群、SCIDおよびエプスタイン・パールウイルス関連疾患、強膜、強膜炎、強指症(sclerodactyl)、強皮症、任意に全身性強皮症、硬化性胆管炎、播種性硬化症、硬化症(全身性硬化症など)、感覚神経性難聴、血清反応陰性脊椎関節炎、シーハン症候群、シュルマン症候群、ケイ肺症、シェーグレン症候群、精子および精巣自己免疫、蝶形骨洞炎、ステーブンス・ジョンソン症候群、スティッフマン(もしくはスティッフパーソン)症候群、亜急性細菌性心内膜炎(SBE)、亜急性皮膚エリテマトーデス、突然の難聴、スザック症候群、シデナム舞踏病、交感性眼炎、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus)(SLE)もしくは全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus)、皮膚SLE、全身性壊死性血管炎、ANCA関連血管炎、任意のチャージ・ストラウス血管炎もしくは症候群(CSS)、脊髄癆、高安動脈炎、毛細血管拡張症、側頭動脈炎/巨細胞動脈炎、閉塞性血栓性血管炎、血小板減少症(血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)および自己免疫もしくは免疫媒介性血小板減少症、例えば特発性血小板減少性紫斑病(ITP)(慢性もしくは急性(ITP)を含む)、血小板減少性紫斑病(TTP)を含む)、甲状腺中毒症、組織傷害、トロサ・ハント症候群、中毒性表皮性表皮壊死症、毒性ショック症候群、輸血反応、乳児の一過性低ガンマグロブリン血症、横行性脊髄炎、横断性脊髄炎、熱帯性肺好酸球増加症、結核、潰瘍性大腸炎、未分化結合組織疾患(UCTD)、蕁麻疹、任意に慢性アレルギー性蕁麻疹および慢性特発性蕁麻疹(慢性自己免疫性蕁麻疹を含む)、ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、網膜ぶどう膜炎、弁膜炎、血管機能不全、血管炎、椎骨関節炎、小水疱性皮膚症、白斑、ヴェゲナー肉芽腫症(多発血管炎を伴う肉芽腫症(GPA))、ウイスコット・アルドリッチ症候群、またはx連鎖性高IgM症候群が挙げられる。

10

20

30

【0191】

本明細書で特定される疾患状態は例示的であることが意図され、完全ではないことを理解するべきである。

40

【0192】

対象アゴニストは、同じまたは異なる組成物で、また同時または異なるときに、順序に関わらず、投与され得る他の治療剤と組み合わせられてもよい。例えば、対象アゴニストは、PD-1またはPD-L1アゴニスト、CTLA4-Ig、サイトカイン、サイトカインアゴニスト、もしくはアンタゴニスト、または別の受容体アゴニストもしくはアンタゴニストの投与を含む治療レジメンにおいて投与され得る。

【0193】

免疫応答の下方制御

VISTAポリペプチドの阻害機能の上方制御または強化は、免疫応答を下方制御するために使用されてもよい。下方制御は、既に進行している免疫応答の阻害または遮断の形

50

態であり得るか、または免疫応答の誘導の防止を伴い得る。活性化免疫細胞の機能は、免疫細胞応答を下方制御することによって、または免疫細胞における特定のエネルギーを誘導することによって、またはそれら両方によって阻害され得る。例えば、V I S T A アゴニスト抗体は、様々な免疫細胞上で発現されるV I S T A ポリペプチドに結合し得、それにより免疫応答を下方制御する。このアゴニスト抗体は、単一特異性または多重特異性であってもよく、例えば、それは、B i T E などの二重特異性抗体を含み得る。例えば、かかる抗体は、V I S T A 抗原結合部分および別の抗原結合部分を含んでもよく、例えば、これは、免疫細胞、例えば、T細胞、B細胞、または骨髄細胞上の細胞表面受容体を標的とする。かかる抗体は、V I S T A 抗原結合部位を含むことに加えて、分子が特定の細胞集団を標的とするために、B細胞抗原受容体、T細胞抗原受容体、またはFcもしくは他の受容体に結合する結合部位を含み得る。二重特異性抗体に対するこの第2の抗原の選択は、標的とされる細胞集団の選択に柔軟性を提供する。V I S T A 活性を促進するか、または模倣するV I S T A アゴニスト抗体は、V I S T A とその天然結合パートナーとの相互作用を強化し得る。本明細書に開示されるように、他のヒトV I S T A 活性化またはアゴニスト抗体は、T細胞活性もしくは増殖を阻害するそれらの能力によって、および/あるいはインビトロにおける免疫抑制効果または炎症、アレルギー、もしくは自己免疫疾患モデルに基づいて特定され得る。

10

【0194】

いくつかの当該技術において認識されている細胞活性化の読み取りを用いて、例えば、活性化剤の存在下で、細胞増殖またはエフェクター機能（例えば、抗体産生、サイトカイン産生、食作用）を測定することができる。ヒトV I S T A の作用を刺激するか、または促進し、それにより、この活性化を遮断する試験抗体の能力は、測定される増殖またはエフェクター機能の減少に影響を与える薬剤の能力を測定することによって容易に決定することができる。したがって、免疫抑制性であり、免疫活性化を遮断する試験抗体の能力は、異なる濃度の抗原におけるサイトカイン産生および/または増殖を測定することによって決定することができる。

20

【0195】

本発明によるV I S T A アゴニスト抗体と抗原を共投与することにより、特異的抗原に対する寛容が誘導され得る。例えば、免疫応答が望ましくないアレルゲンまたは外来ポリペプチドへの特異的ポリペプチド免疫応答に対する寛容が誘導される。例えば、第V I I I 因子を受ける患者は、この凝固因子に対する抗体を頻繁に生成する。組換え第V I I I 因子との、V I S T A 活性、またはその天然結合パートナーとの相互作用を刺激するか、または模倣する、本発明によるV I S T A アゴニスト抗体の共投与は、この望ましくない免疫応答を抑制し得る。

30

【0196】

本発明によるV I S T A アゴニスト抗体は、免疫応答を下方制御するために、免疫細胞上の共刺激受容体の活性を遮断するか、または免疫細胞上に発現される別の免疫抑制受容体またはリガンドの活性を刺激する別の薬剤と組み合わせて使用することができる。例示的な分子としては、P D - 1、P D L - 1 アゴニスト、C T L A - 4 の可溶性形態、抗B 7 - 1 抗体、抗B 7 - 2 抗体、L A G - 3、T I M - 3、B T L A、B 7 - H 4、B 7 H 3 などのうちの1つ以上を標的とするアンタゴニスティックな抗体、および/またはC D 4 0、C D 1 3 7、O X 4 0、G I T R、C D 2 7、C D 2 8、もしくはI C O S のうちの1つ以上を標的とするアゴニスティックな抗体、またはそれらの組み合わせが挙げられる。これらの部分は、単一の組成物または化合物、例えば、本発明によるV I S T A アゴニスト抗体を含有し、更に別の免疫アゴニスト抗体を含む二重特異性抗体に組み込まれ得るか、または別の免疫抑制ポリペプチドもしくは他の活性化剤に融合される、本発明によるV I S T A アゴニスト抗体を含有する融合ポリペプチドを含み得る。代替的に、これらの部分は、対象における免疫細胞媒介免疫応答を下方制御するために、同じまたは異なる組成物において別個のまたは別の実体として（同時にまたは順次）投与され得る。

40

【0197】

50

本発明によるV I S T Aアゴニスト抗体と組み合わせることができる特定の免疫阻害分子の例としては、共刺激シグナルを遮断する抗体（例えば、C D 2 8またはI C O Sに対して）、C T L A 4を介して阻害シグナルを活性化する抗体、ならびに/または他の免疫細胞マーカー（例えば、C D 4 0、C D 4 0リガンド、またはサイトカインに対して）、融合タンパク質（例えば、C T L A 4 - F cまたはP D - 1 - F c）、および免疫抑制薬（例えば、ラパマイシン、シクロスポリンA、またはF K 5 0 6）に対する抗体が挙げられる。

【 0 1 9 8 】

更なる実施形態において、本発明によるV I S T Aアゴニスト抗体を含有する二重特異性抗体は、例えば、ある特定の細胞型、例えば、Bリンパ球、単球、樹状細胞、またはランゲルハンス細胞上のみ見出されるマーカーを使用して、特定の細胞集団を標的とするのに有用である。V I S T A活性またはV I S T A - 免疫細胞相互作用を活性化することによって免疫応答を下方制御する（したがって、V I S T Aの負のシグナル伝達機能を刺激する）ことは、免疫応答の下方制御において、例えば、組織、皮膚、および器官移植の場合において、移植片対宿主病（G V H D）もしくはアレルギーにおいて、または全身性エリテマトーデス、I B D、R A、乾癬、および多発性硬化症などの自己免疫疾患および炎症性疾患において有用である。例えば、免疫細胞機能を遮断することにより、組織移植における組織破壊の減少がもたらされる。典型的には、組織移植において、移植片の拒絶は、免疫細胞、による異物としてのその認識、続いて移植片を破壊する免疫反応を通して開始される。移植前または移植時に、免疫細胞上のV I S T Aの活性またはV I S T Aのその天然結合パートナー（複数可）との相互作用を促進する分子の単独投与、または別の下方調節剤と組み合わせた投与は、共刺激シグナルの生成を阻害することができる。更に、V I S T A活性の促進は、免疫細胞をアネルギー化するのも十分にあり、それにより対象に寛容を誘導することができる。

【 0 1 9 9 】

いくつかの疾患またはいくつかの対象において十分な免疫抑制または耐性を達成するために、他の分子の共刺激機能を遮断する必要がある。例えば、移植前または移植時に、これらの抗原のそれぞれの活性を有するか、またはこれらの抗原に対する抗体を遮断するペプチドの組み合わせの可溶性形態を投与することによって（別個にまたは単一組成物において一緒に）、B 7 - 1およびB 7 - 2の機能を遮断することが望ましい場合がある。代替的に、V I S T Aの阻害活性を促進し、B 7 - 1および/またはB 7 - 2の共刺激活性を更に阻害することが望ましい場合がある。

【 0 2 0 0 】

対象抗ヒトV I S T Aアゴニスト抗体は、自己免疫疾患の治療に特に有用である。多くの自己免疫障害は、自己組織に対して反応性であり、疾患の病理に關与するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進する免疫細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性免疫細胞の活性化を防止することにより、疾患症状を減少または排除することができる。V I S T Aの活性またはV I S T Aのその天然結合パートナー（複数可）との相互作用を促進する対象抗ヒトV I S T Aアゴニスト抗体の投与は、疾患の長期緩和をもたらし得る自己反応性免疫細胞の抗原特異的寛容を誘導し得る。更に、B 7分子の共刺激受容体との受容体 - リガンド相互作用を破壊することにより免疫細胞の共刺激を遮断する薬剤の共投与は、疾患プロセスに關与し得る自己抗体またはサイトカインの産生を防止するための免疫細胞活性化の阻害に有用であり得る。

【 0 2 0 1 】

対象抗ヒトV I S T Aアゴニスト抗体を使用する、V I S T A活性またはV I S T Aのその天然結合パートナー（複数可）との相互症の刺激を介した免疫応答の下方制御は、自家組織の自己免疫攻撃の治療においても有用であり得る。したがって、自己免疫攻撃によって引き起こされるか、または悪化する状態（例えば、心臓疾患、心筋梗塞、またはアテローム性動脈硬化）は、V I S T A活性またはV I S T Aのその天然結合パートナーへの結合を増加させることによって回復または改善され得る。したがって、対象抗ヒトV I S

10

20

30

40

50

T A アゴニスト抗体を使用してV I S T A 活性またはV I S T A のその対抗受容体との相互作用を刺激することにより、自己免疫障害（ならびに心臓疾患、心筋梗塞、およびアテローム性動脈硬化などの状態）などの自己免疫攻撃によって悪化する状態を調節することは、本発明の範囲内である。

【0202】

前述のように、自己免疫および炎症性障害を予防するか、または軽減するための本発明によるアゴニスト抗ヒトV I S T A 抗体の有効性は、ヒト自己免疫および炎症性疾患のいくつかの十分に特徴付けされた動物モデルを使用して決定され得る。例としては、マウス実験的自己免疫脳炎、M R L / l p r / l p r マウスまたはN Z B ハイブリッドマウスにおける全身性エリテマトーデス、マウス自己免疫コラーゲン関節炎、N O D マウスおよびB B ラットにおける真性糖尿病、ならびにマウス実験的重症筋無力症が挙げられる。P a u l e d . , F u n d a m e n t a l I m m u n o l o g y , R a v e n P r e s s , N e w Y o r k , 1 9 8 9 , p a g e s 8 4 0 - 8 5 6 を参照のこと。

10

【0203】

免疫細胞活性化の阻害は、例えば、I g E 産生を阻害することにより、アレルギーおよびアレルギー反応の治療において治療的に更に有用である。V I S T A 活性またはV I S T A のその天然結合パートナー（複数可）との相互作用を促進するか、または模倣する対象抗ヒトV I S T A アゴニスト抗体は、対象における免疫細胞媒介性アレルギー応答を阻害するために、アレルギー対象に投与され得る。V I S T A 活性またはその天然結合パートナー（複数可）との相互作用の刺激は、適切なM H C 分子とともにアレルギーに曝露することを伴い得る。アレルギー反応は、アレルギーの侵入経路およびマスト細胞または好塩基球上のI g E 沈着のパターンに応じて、本質的に、全身性または局所性であり得る。したがって、免疫細胞媒介性アレルギー応答は、対象抗ヒトV I S T A アゴニスト抗体の投与により局所的または全身的に阻害され得る。

20

【0204】

同じエピトープに結合する抗V I S T A 抗体の選択

ある特定の実施形態において、本発明によるアゴニスティックな抗V I S T A 抗体は、免疫刺激および関連機能の調節などの所望の機能特性を有する。図4に示され、実施例に開示されるように、本発明によるいくつかの抗ヒトV I S T A アゴニスト抗体のエピトープ特異性が明らかにされた。同じエピトープに結合することが示されたいくつかの抗体が免疫抑制性であることが分かったため、同じまたは重なるエピトープに結合する他のV I S T A アゴニスト抗体が特定され得る、すなわち、それらは、例示的なV I S T A アゴニスト抗体と結合するヒトV I S T A ポリペプチドのアミノ酸残基のうちの1つ以上と相互作用すると予測される。同じエピトープ特異性を有する他の抗体、および/または所望の抗体とV I S T A 抗原への結合に関して交差競合する能力を有するものが選択され得る。例えば、所望の抗体のエピトープ特異性は、全V I S T A ポリペプチドを含む重なるペプチドのライブラリを使用して決定され得、例えば、ライブラリ内の同じペプチドもしくはその1つ以上の残基に結合するV I S T A および抗体の所望のエピトープを含有する一部分を構成する15量体または重なるペプチドライブラリは、同じ線状または立体構造エピトープに結合することが決定される。実施例において、エピトープ特異性は、線状および立体構造エピトープを特定するために使用され得るP e p s c a n（登録商標）方法を使用して決定された。

30

40

【0205】

本発明によるアゴニスト抗体の修飾

フレームワーク領域もしくはC D R 領域内で行われる修飾に加えて、または修飾の代替として、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗体は、F c 領域内に修飾を含むように、典型的には、血清半減期、補体結合、F c 受容体結合、および/または抗原依存性細胞傷害性などの抗体の1つ以上の機能特性を変更するために操作され得る。更に、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗体は、化学的に修飾される（例えば、1つ以上の化学部分が抗体に結合され得る）か、またはやはり、抗体の1つ以上の機能特性を

50

変更するために、そのグリコシル化を変更するように修飾されてもよい。かかる実施形態は以下に更に説明される。Fc領域における残基の付番は、K a b a tのE Uインデックスのものである。

【0206】

一実施形態において、CH1のヒンジ領域は、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が変更されるように、例えば、増加するか、または減少するように、修飾される。このアプローチは、B o d m e rらによる米国特許第5,677,425号に更に記載されている。CHIのヒンジ領域におけるシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖のアセンブリを容易にするために、または抗体の安定性を増加させるかまたは減少させるために変更される。

10

【0207】

別の実施形態において、抗体のFcヒンジ領域は、抗体の生物学的半減期を減少させるために変異される。より具体的には、抗体が傷害性S t a p h y l o c c o c c a lプロテインA (S p A)結合を天然Fc-ヒンジドメインS p A結合に対して有するように、1つ以上のアミノ酸変異がFc-ヒンジ断片のCH2-CH3ドメインインターフェース領域に導入される。このアプローチは、W a r dらによる米国特許第6,165,745に更にさらに詳細に記載されている。

【0208】

別の実施形態において、抗体は、その生物学的半減期を増加させるように修飾される。様々なアプローチが可能である。例えば、以下の変異のうちの1つ以上を導入することができる：W a r dに対する米国特許第6,277,375号に記載されるように、T252L、T254S、およびT256F。あるいは、生物学的半減期を増加させるために、抗体は、P r e s t aらによる米国特許第5,869,046号および同第6,121,022号に記載されるように、I g GのFc領域のCH2ドメインの2つのループから得られるサルベージ受容体結合エピトープを含有するようにCH1またはCL領域内で変更され得る。

20

【0209】

更に他の実施形態において、Fc領域は、抗体のエフェクター機能を変更するために、少なくとも1つのアミノ酸を異なるアミノ酸残基と置き換えることによって変更される。例えば、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320、および322から選択される1つ以上のアミノ酸は、抗体がエフェクターリガンドに対して変更された親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、異なるアミノ酸残基に置き換えられ得る。親和性が増え変わるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分であり得る。このアプローチは、両方ともW i n t e rらによる米国特許第5,624,821号および同第5,648,260号に更に詳細に記載されている。

30

【0210】

別の例において、アミノ酸残基329、331、および322から選択される1つ以上のアミノ酸は、抗体が変更されたC1q結合および/または減少したもしくは消失した補体依存性細胞傷害(CDC)を有するように、異なるアミノ酸残基に置き換えられ得る。このアプローチは、I d u s o g i eらによる米国特許第6,194,551号に更に詳細に記載されている。

40

【0211】

別の例において、アミノ酸231位および239位内の1つ以上のアミノ酸残基は、変更されて、抗体が補体を固定する能力を変更する。このアプローチは、B o d m e rらによるP C T公開第W O 9 4 / 2 9 3 5 1号に更に記載されている。

【0212】

更に別の例において、Fc領域は、以下の位置で1つ以上のアミノ酸を修飾することにより、Fc受容体に対する抗体の親和性を増加させるように修飾される：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268

50

、 269、270、272、276、278、280、283、285、286、289
 、 290、292、293、294、295、296、298、301、303、305
 、 307、309、312、315、320、322、324、326、327、329
 、 330、331、333、334、335、337、338、340、360、373
 、 376、378、382、388、389、398、414、416、419、430
 、 434、435、437、438、または439。このアプローチは、PrestalによるPCT公開第WO00/42072号に更に記載されている。更に、FcRI、FcRII、FcRIII、およびFcRnのためのヒトIgG1上の結合部位がマッピングされており、改善された結合を有する変異型が記載されている(Shields, R. L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照のこと)。256位、290位、298位、333位、334位、および339位の特異的変異は、FcRIIIへの結合を改善することが示されている。更に、以下の組み合わせ変異体がFcRIII結合を改善することが示されている: T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A、およびS298A/E333A/K334A。更に、M252Y/S254T/T256EまたはM428L/N434Sなどの変異は、FcRnへの結合を改善し、抗体循環半減期を増加させる(Cahan CA and Carter PJ (2010) Nature Rev Immunol 10:301-316を参照のこと)。

10

【0213】

また別の実施形態において、抗体は、インビボFabアーム交換を抑制するように修飾され得る。具体的には、このプロセスは、機能的に一価であるb特異的抗体を効果的にもたらす他のIgG4抗体間でのIgG4半分子(1つの重鎖+1軽鎖)の交換を伴う。重鎖のヒンジ領域および定常ドメインへの変異は、この交換を抑制することができる(Aalberse, RC, Schuurman J., 2002, Immunology 105:9-19を参照のこと)。

20

【0214】

また別の実施形態において、抗体のグリコシル化が修飾される。例えば、非グリコシル化抗体を作製することができる(すなわち、抗体はグリコシル化を欠く)。グリコシル化を変更して、例えば、抗体の抗原に対する親和性を増加させることができる。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つ以上の部位を変更することによって達成することができる。例えば、1つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の排除をもたらす、それによりその部位でのグリコシル化を排除する、1つ以上のアミノ酸置換を行うことができる。かかるアグリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させ得る。かかるアプローチは、Coraによる米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号に更に詳細に記載されている。

30

【0215】

更にまたは代替的に、低減された量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体または増加した二分GlcNAc構造を有する抗体などの変更された種類のグリコシル化を有する抗体を作製することができる。かかる変更されたグリコシル化パターンは、抗体のADC能力を増加させることが示された。かかる炭水化物修飾は、例えば、変更されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって達成することができる。変更されたグリコシル化機構を有する細胞は当該技術分野で説明されており、本発明の少なくともいくつかの実施形態により組換え抗体を発現する宿主細胞として使用され、それにより変更されたグリコシル化を有する抗体を産生することができる。例えば、細胞株Ms704、Ms705、およびMs709は、Ms704、Ms705、およびMs709細胞株において発現される抗体がそれらの炭水化物でフコースを欠くように、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8(a(1,6)フコシルトランスフェラーゼ)を欠いている。Ms704、Ms705、およびMs709FUT8細胞株は、2つの交換ベクターを使用して、CHO/DG44細胞におけるFUT8遺伝子の標的破壊により作製される(Yamaneらによる米国特許公開第2004/0110704号およびY

40

50

amane - Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22を参照されたい)。別の例として、HanaiらによるEP1, 176, 195は、かかる細胞株において発現される抗体が1, 6結合関連酵素を減少させるか、または排除することによって低フコシル化を呈するように、フコシルトランスフェラーゼをコードする機能的に破壊されたFUT8遺伝子を有する細胞株を説明している。Hanaiらはまた、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加するための低酵素活性を有するか、または酵素活性を有さない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株YB2/0 (ATCC CRL 1662)も説明している。PrestaによるPCT公開第WO03/035835号は、フコースをAsn(297)連結炭水化物に結合する能力が減少し、その宿主細胞において発現された抗体の低フコシル化ももたらす変異型CHO細胞株Lecl3細胞を説明している(Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740も参照のこと)。UmanaらのPCT公開第WO99/54342号は、操作された細胞株において発現される抗体が抗体の増加したADCC活性をもたらず増加した二分GlcNAc構造を呈するように、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、P(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように操作された細胞株を説明している(Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180も参照のこと)。代替的に、抗体のフコース残基は、フコシダーゼ酵素を使用して切断され得る。例えば、フコシダーゼ-L-フコシダーゼは、抗体からフコシル残基を除去する(Tarentino, A. L. et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23)。

10

20

【0216】

本発明により想到される本明細書における抗体の別の修飾は、例えば半減期を強化するための、ペグ化または他の水溶性部分、典型的にはポリマーの付加である。抗体は、例えば、抗体の生物学的(例えば血清)半減期を増加させるためにペグ化され得る。抗体をペグ化するために、抗体またはその断片は典型的には、1つ以上のポリエチレングリコール(PEG)基が抗体または抗体断片に結合される条件下で、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのPEGと反応させられる。好ましくは、ペグ化は、反応性PEG分子(または類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して行われる。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ(Ci-Cio)アルコキシ-もしくはアリーロキシ-ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドなどの他のタンパク質を誘導体化するために使用されたPEGの形態のいずれかを包含することが意図される。ある特定の実施形態において、ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は当該技術分野で既知であり、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗体に適用することができる。例えば、NishimuraらによるEP0154316およびIshikawaraらによるEP0401384を参照のこと。

30

【0217】

抗体の操作方法

ある特定の実施形態において、V_HおよびV_L配列を有する本発明によるアゴニスト抗VISTA抗体は、それぞれ、V_Hおよび/もしくはV_L配列、またはそれに結合した定常領域を修飾することによって新たな抗VISTA抗体を創出するために使用され得る。したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態による別の態様において、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗VISTA抗体は、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗体の少なくとも1つの機能特性、例えば、ヒトVISTAへの結合などを保持する構造的に関連する抗VISTA抗体を創出するために使用される。例えば、1つのVISTA抗体またはその変異の1つ以上のCDR領域は、上述のように、既知のフレームワーク領域および/または他のCDRと組換えにより組み合わされて、本発明の少なくともいくつかの実施形態による追加の組換え操作された抗VISTA抗体を創出することができる。他の種類の修飾には、前の項に記載されるものが含まれる。操作方法の

40

50

ための出発材料は、本明細書に提供されるV_Hおよび/もしくはV_L配列のうちの1つ以上、またはその1つ以上のCDR領域である。操作された抗体を作製するために、本明細書に提供されるV_Hおよび/もしくはV_L配列のうちの1つ以上、またはその1つ以上のCDR領域を有する抗体を実際に調製する(すなわち、タンパク質として発現する)必要はない。むしろ、配列に含まれる情報は、元の配列に由来する「第2世代」の配列を創出するための出発材料として使用され、次いで「第2世代」の配列が調製され、タンパク質として発現される。

【0218】

標準的な分子生物学技法は、変更された抗体配列を調製し、発現するために使用され得る。好ましくは、変更された抗体配列によってコードされる抗VISTA抗体は、それぞれ、本明細書に提供される方法により産生され、配列を有する、抗VISTA抗体の機能特性のうちの1つ、いくつか、または全てを保持するものであり、この機能特性は、特定のK_Dレベル以下を有するVISTA抗原への結合、および/または免疫応答の調節、および/または例えばVISTA抗原を発現するなどの所望の標的細胞への選択的結合を含む。

10

【0219】

変更された抗体の機能特性は、当該技術分野で利用可能であり、かつ/または本明細書に記載される標準的なアッセイを使用して評価することができる。本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗体の操作方法のある特定の実施形態において、変異は、抗VISTA抗体コード配列の全てまたは一部とともにランダムにまたは選択的に導入され得、得られる修飾された抗VISTA抗体は、結合活性および/または他の所望の機能特性についてスクリーニングされ得る。

20

【0220】

変異方法は当該技術分野で説明されている。例えば、ShortによるPCT公開第WO02/092780号は、飽和変異誘発、合成ライゲーションアセンブリ、またはこれらの組み合わせを使用して抗体変異を創出およびスクリーニングするための方法を記載している。代替的に、LazarらによるPCT公開第WO03/074679号は、抗体の生理化学的特性を最適化するために計算スクリーニング方法を使用する方法を記載している。

【0221】

抗体をコードする核酸分子

本発明は、本発明による抗VISTA抗体、またはその断片もしくはコンジュゲートをコードする核酸を更に提供する。核酸は、全細胞に、細胞溶解物中に、または部分的に精製された形態もしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、ならびに当該技術分野で周知のその他を含む標準的な技術により、他の細胞成分または他の汚染物、例えば、他の細胞核酸またはタンパク質から精製されたとき、「単離される」か、または「実質的に純粋となる」。F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照のこと。本発明の少なくともいくつかの実施形態による核酸は、例えば、DNAまたはRNAであり得、イントロン配列を含有しても含有しなくてもよい。好ましい実施形態において、核酸はcDNA分子である。

30

40

【0222】

本発明の少なくともいくつかの実施形態による核酸は、標準的な分子生物学技法を使用して得ることができる。ハイブリドーマ(例えば、以下に更に記載されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスから調製されたハイブリドーマ)によって発現される抗体に関して、ハイブリドーマによって作製された抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、標準的なPCR増幅またはcDNAクローニング技法によって得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリから得られた抗体に関して(例

50

えば、ファージディスプレイ技法を使用して)、抗体をコードする核酸は、ライブラリから回収され得る。

【0223】

V_HおよびV_LセグメントをコードするDNA断片が得られたら、これらのDNA断片を、標準的な組換えDNA技法によって更に操作して、例えば、可変領域遺伝子を完全長抗体鎖遺伝子に、Fab断片遺伝子に、またはscFv遺伝子に変換することができる。これらの操作において、V_L-またはV_H-コードDNA断片は、抗体定常領域または可撓性リンカーなどの別のタンパク質をコードする別のDNA断片に作動可能に連結される。前に定義されるように、「作動可能に連結される」は、2つのDNA断片によりコードされるアミノ酸配列がフレーム内にあるように、2つのDNA断片が接合されることを意味する。

10

【0224】

V_H領域をコードする単離されたDNAは、V_H-コードDNAを、重鎖定常領域(C_{H1}、C_{H2}、およびC_{H3})をコードする別のDNA分子に作動可能に連結することによって完全長重鎖遺伝子に変換され得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野で既知であり(例えば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM、またはIgD定常領域であり得るが、最も好ましくは、IgG1、IgG2、またはIgG4定常領域である。Fab断片重鎖遺伝子に関して、V_HコードDNAは、重鎖C_{H1}定常領域のみをコードする別のDNA分子に作動可能に連結され得る。

20

【0225】

V_L領域をコードする単離されたDNAは、V_LコードDNAを、軽鎖定常領域C_L-をコードする別のDNA分子に作動可能に連結することによって完全長軽鎖遺伝子(ならびにFab軽鎖遺伝子)に変換され得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野で既知であり(例えば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照のこと)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域は、カッパ()またはラムダ()定常領域であり得るが、最も好ましくは、定常領域である。

30

【0226】

scFv遺伝子を作製するために、V_H-およびV_LをコードするDNA断片は、V_HおよびV_L配列が近接単鎖タンパク質として発現され得るように、可撓性リンカーをコードする、例えばアミノ酸配列(Gly4-Ser)3をコードする、別の断片に作動可能に連結され、V_LおよびV_H領域は可撓性リンカーによって接合される(例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426、Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554を参照されたい)。

40

【0227】

抗VISTAモノクローナル抗体の産生

本発明による抗VISTAモノクローナル抗体(mAb)および抗原結合断片は、従来のモノクローナル抗体方法論、例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技法を含む

50

様々な技法によって産生することができる。体細胞ハイブリダイゼーション手順が好ましいが、原理上、モノクローナル抗体を産生するための他の技法、例えば、Bリンパ球のウイルス性または癌性形質転換を用いることができる。

【0228】

ハイブリドーマを調製するための好ましい動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ産生は、十分に確立された手順である。免疫化プロトコルおよび融合のための免疫化した脾細胞の単離技法は、当該技術分野で既知である。融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）および融合手順も既知である。本発明のキメラ抗体またはヒト化抗体は、上述のように調製されたマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、目的のマウスハイブリドーマから得られ、標準的な分生物学技法を使用して、非マウス（例えば、ヒト）免疫グロブリン配列を含有するように操作され得る。例えば、キメラ抗体を創出するために、当該技術分野で既知の方法を使用して、マウス可変領域を、ヒト定常領域に連結することができる（例えば、Cabillyらに対する米国特許第4,816,567号を参照されたい）。ヒト化抗体を創出するために、当該技術分野で既知の方法を使用して、マウスCDR領域を、ヒトフレームワークに挿入することができる（例えば、Winterに対する米国特許第5,225,539号、ならびにQueenらに対する米国特許第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,693,762号、および同第6,180,370号を参照されたい）。

【0229】

本発明の少なくともいくつかの実施形態によると、抗体はヒトモノクローナル抗体である。VISTAに対して指向されるかかるヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の部分を有するトランスジェニックまたはトランスクロモソミック（transchromosomal）マウスを使用して生成され得る。これらのトランスジェニックおよびトランスクロモソミックマウスは、本明細書において、それぞれ、HuMAb Mouse（商標）およびKM Mouse（商標）と称されるマウスを含み、本明細書において、集合的に「ヒトIgマウス」と称される。HuMAb Mouse（商標）（Medarex Inc.）は、内因性の μ および鎖遺伝子座を不活性化する標的突然変異とともに、再編成されていないヒト重鎖 μ および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニファミリーを含む（例えば、Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859を参照されたい）。したがって、マウスはマウスIgMまたはの発現減少を呈し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチおよび体細胞変異を受けて、高親和性ヒトIgGモノクローナルを生成する（Lonberg, N. et al. (1994) (上記)、Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101において概説される、Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93、およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546）。HuMAb Mouse（登録商標）の調製および使用、ならびにかかるマウスによって行われたゲノム修飾は、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295、Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656、Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724、Choi et al. (1993) Nature Genetics 4: 117-123;、Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830、Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920、Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591、およびFishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:

10

20

30

40

50

845-851に更に記載されており、それらの全ての内容は、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる。更に、全てLonberg and Kayに対する米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,789,650号、同第5,877,397号、同第5,661,016号、同第5,814,318号、同第5,874,299号、および同第5,770,429号、Suraniに対する米国特許第5,545,807号、全てLonberg and Kayに対するPCT公開第WO92/03918号、同第WO93/12227号、同第WO94/25585号、同第WO97/13852号、同第WO98/24884号、および同第WO99/45962号、ならびにKormanに対するPCT公開第WO01/14424号を参照されたい。

10

【0230】

別の実施形態において、本発明の少なくともいくつかの実施形態によるヒト抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を有するマウスなど、導入遺伝子および導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を有するマウスを使用して産生することができる。本明細書において「KMマウス(商標)」と称されるかかるマウスは、Ishidaに対するPCT公開第WO02/43478号に詳細に記載されている。

【0231】

また更に、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスジェニック動物系は、当該技術分野で利用可能であり、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗VISTA抗体を産生するために使用され得る。例えば、Xenomouse (Abgenix, Inc) と称される代替トランスジェニック系を使用することができ、かかるマウスは、例えば、Kucherlapatiらに対する米国特許第5,939,598号、同第6,075,181号、同第6,114,598号、同第6,150,584号、および同第6,162,963号に記載されている。

20

【0232】

更に、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスクロムソミック動物系は、当該技術分野で利用可能であり、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗VISTA抗体を産生するために使用され得る。例えば、「TCマウス」と称される、ヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体の両方を有するマウスを使用することができ、かかるマウスは、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。更に、ヒト重鎖および軽鎖導入染色体を有するウシが当該技術分野で記載されており(Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894)、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗VISTA抗体を産生するために使用され得る。

30

【0233】

本発明の少なくともいくつかの実施形態によるヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して調製することもできる。ヒト抗体を単離するためのかかるファージディスプレイ法は、当該技術分野で確立されている。例えば、Ladnerに対する米国特許第5,223,409号、同第5,403,484号、および同第5,571,698号、Dowerらに対する米国特許第5,427,908号および同第5,580,717号、McCaffertyらに対する米国特許第5,969,108号および同第6,172,197号、Griffithsらに対する米国特許第5,885,793号、同第6,521,404号、同第6,544,731号、同第6,555,313号、同第6,582,915号、および同第6,593,081号を参照されたい。

40

【0234】

本発明の少なくともいくつかの実施形態によるヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト抗体応答が免疫化時に生成され得るようにヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを使用して調製することもできる。かかるマウスは、例えば、Wilsonらに対する米国特許第5,476,996号および同第5,698,767号に記載されている。

50

【0235】

ヒトIgマウスの免疫化

いくつかの実施形態において、Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859、Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851、ならびにPCT公開第WO98/24884号および同第WO01/14424号に記載されるように、ヒトIgマウスは、例えば、かかるマウスを、VISTA抗原および/もしくは組換えVISTAの精製または濃縮された調製物、またはVISTA融合タンパク質で免疫化することによって、本発明によるヒト抗VISTA抗体を産生するために使用され得る。好ましくは、マウスは、最初の注入時に6~16週齢であろう。例えば、VISTA抗原の精製されたまたは組換え調製物(.5~500 μgの範囲の用量)を使用して、ヒトIgマウスを腹腔内免疫化することができる。

10

【0236】

一般的に、トランスジェニックマウスは、最初に完全フロイントアジュバント中の抗原で腹腔内(IP)免疫化され、続いて2週間毎に不完全フロイントアジュバント中の抗原でIP免疫化する(最大合計6回)とき、応答する。しかしながら、フロイント以外のアジュバントも効果的であることも分かっている。加えて、アジュバントの不在下での全細胞は、高度に免疫原性であることが分かっている。免疫応答は、後眼窩出血によって得られる血漿試料での免疫化プロトコルの過程にわたって監視され得る。血漿は、ELISA(以下に記載される)によってスクリーニングされ、抗VISTAヒト免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスが、融合のために使用される。マウスは、殺および脾臓除去の3日前に静脈内ブーストされ得る。各免疫化のための2~3回の融合が実施される必要があることが予想される。6~24匹のマウスは、典型的には、各抗原に対して免疫化される。通常、HC07およびHC012株の両方が使用される。加えて、HC07およびHC012導入遺伝子の両方が一緒に育種されて、2つの異なるヒト重鎖導入遺伝子(HC07/HC012)を有する単一のマウスになり得る。代替的に、または加えて、KM Mouse(商標)株を使用することができる。例示的な実施形態において、これらのマウスは、ヒトIgG2抗体を選択的に産生するように操作される。

20

【0237】

ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

ある特定の実施形態では、本発明によるヒトモノクローナル抗VISTA抗体を産生するハイブリドーマは、免疫化マウスからの脾細胞および/またはリンパ節細胞を使用して生成され得、単離され、マウス骨髄腫細胞株などの適切な不死化細胞株に融合され得る。得られるハイブリドーマは、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングされ得る。例えば、免疫化マウスからの脾臓リンパ球の単一細胞懸濁液は、50%PEGでP3X63-Ag8.653非分泌マウス骨髄腫細胞(ATCC、CRL1580)の数の6分の1に融合され得る。細胞は、平底マイクロタイタープレートに約 2×10^5 で平板培養され、続いて、20%胎児クローン血清、18%「653」条件培地、5%オリゲン(IGEN)、4mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055mM 2-メルカプトエタノール、50単位/mlのペニシリン、50mg/mlのストレプトマイシン、50mg/mlのゲンタマイシン、およびIX HAT(Sigma; HATが融合の24時間後に添加される)を含有する選択培地中で2週間インキュベートされる。約2週間後、細胞を、HATがHTに交換される培地中で培養することができる。次いで、個々のウェルは、ヒトモノクローナルIgMおよびIgG抗体について、ELISAによりスクリーニングされ得る。広範なハイブリドーマ成長が生じたら、通常10~14日後、培地を観察することができる。ハイブリドーマを分泌する抗体は、再度平板培養され、再びスクリーニングされ、ヒトIgGに依然として陽性である場合、モノクローナル抗体が限界希釈により少なくとも2回サブクローニングされ得る。次いで、安定したサブクローンをインピトロで培養して、特徴付けのために組織培養培地中で少量の抗体を生成することができる。

30

40

50

【0238】

ヒトモノクローナル抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製の2リットルのスピナーフラスコ中で成長させることができる。プロテインA-セファロース(Pharmacia, Piscataway, N.J.)を用いた親和性クロマトグラフィーの前に、上清を濾過し、濃縮することができる。溶出されたIgGは、純度を確実にするために、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによりチェックすることができる。緩衝溶液をPBSに交換することができ、1.43の吸光係数を使用して、OD280により濃度を決定することができる。モノクローナル抗体は、アリコートされ、-80で保存され得る。

【0239】

ヒトモノクローナル抗体を産生するトランスフェクターマの生成

特定の実施形態において、本発明による抗VISTA抗体は、例えば、当該技術分野で周知の組換えDNA技法および遺伝子トランスフェクション方法の組み合わせを使用して、宿主細胞トランスフェクターマにおいて産生され得る(例えば、Morrisson, S. (1985) Science 229:1202)。例えば、抗体またはその抗体断片を発現するために、部分または完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAは、標準的な分子生物学技法(例えば、目的の抗体を発現するハイブリドーマを使用したPCR増幅またはcDNAクローニング)により得ることができ、DNAは、遺伝子が転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように発現ベクターに挿入することができる。この文脈において、「作動可能に連結される」という用語は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を制御するそれらの意図される機能を果たすように、抗体遺伝子がベクター内にライゲーションされることを意味することが意図される。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合性であるように選択される。抗体の軽鎖遺伝子および抗体の重鎖遺伝子は、別個のベクターに挿入され得るか、またはより典型的には、両方の遺伝子が同じ発現ベクター内に挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法(例えば、抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合、平滑末端ライゲーション)により発現ベクター内に挿入される。本明細書に記載される抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、V_Hセグメントがベクター内のC_Hセグメントに作動可能に連結され、V_Lセグメントがベクター内のC_Lセグメントに作動可能に連結されるように所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクター内にそれらを挿入することにより、任意の抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を創出するために使用され得る。加えて、または代替的に、組換え発現ベクターは、宿主細胞から抗体鎖の分泌を容易にするシグナルペプチドをコードし得る。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にフレーム内で連結されるようにベクター内にクローニングされ得る。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド)であり得る。

【0240】

抗原への抗体結合の特徴付け

ある特定の実施形態において、本発明によるアゴニスティックな抗VISTA抗体の結合特異性は、ELISAなどの既知の抗体結合アッセイ技法によって決定される。例示的なELISAにおいて、マイクロタイタープレートを、PBS中0.25 μg/mlで、精製された抗原、本明細書において、VISTAでコーティングし、次いで、PBS中5%ウシ血清アルブミンで遮断した。抗体の希釈物(例えば、免疫化マウスからの血漿の希釈物)を各ウェルに添加し、37で1~2時間インキュベートする。プレートをPBS/Tweenで洗浄し、次いで、37で1時間アルカリホスファターゼにコンジュゲートされた二次試薬(例えば、ヒト抗体に関して、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬)とともにインキュベートした。洗浄後、プレートをpNPP基質(1 mg/ml)とともに展開し、405~650のODで分析した。好ましくは、最高力価を獲得するマウスが融合のために使用される。

10

20

30

40

50

【0241】

上述のELISAアッセイを使用して、VISTA免疫原に陽性反応性を示すハイブリドーマをスクリーニングすることもできる。VISTAに高い結合力で結合するハイブリドーマをサブクローニングし、更に特徴付けする。親細胞の反応性を保持する(ELISAにより)各ハイブリドーマからの1つのクローンが、-140で保存される5~10のバイアル細胞バンクを作製するため、および抗体精製のために選択され得る。

【0242】

抗VISTA抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製の2リットルのスピナーフラスコ中で成長させることができる。プロテインA-セファロース(Pharmacia, Piscataway, N.J.)を用いた親和性クロマトグラフィーの前に、上清を濾過し、濃縮することができる。溶出されたIgGは、純度を確実にするために、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによりチェックすることができる。緩衝溶液をPBSに交換することができ、1.43の吸光係数を使用して、OD280により濃度を決定することができる。モノクローナル抗体は、アリコートされ、-80で保存され得る。

10

【0243】

選択された抗VISTAモノクローナル抗体が独特のエピトープに結合するかを決定するために、市販の試薬(Pierce, Rockford, Ill.)を使用して、各抗体がビオチン化され得る。非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を使用する競合研究は、上述のように、VISTAコーティングされたELISAプレートを使用して実施することができる。ビオチン化mAb結合は、ストレプト-アビジン-アルカリホスファターゼプローブで検出され得る。

20

【0244】

精製された抗体のアイソタイプを決定するために、アイソタイプELISAは、特定のアイソタイプ、例えばIgG2の抗体に特異的な試薬を使用して実施され得る。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを決定するために、マイクロタイタープレートのウェルは、4で一晩、 $\mu\text{g/ml}$ の抗ヒト免疫グロブリンでコーティングされ得る。1%BSAで遮断した後、プレートを、周囲温度で1~2時間、 $1\mu\text{g/ml}$ 以下の試験モノクローナル抗体または精製されたアイソタイプ対照と反応させる。次いで、ウェルを、ヒトIgG1またはヒトIgM特異的アルカリホスファターゼコンジュゲートプローブのいずれかと反応させることができる。上述のようにプレートを展開し、分析する。

30

【0245】

抗VISTAヒトIgGは、それぞれ、ウェスタンブロットにより、VISTA抗原との反応性について更に試験され得る。簡潔に、VISTA抗原を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に供する。電気泳動後、分離した抗原をニトロセルロース膜に移し、10%のウシ胎仔血清で遮断し、試験されるモノクローナル抗体でプローブする。ヒトIgG結合は、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを使用して検出され、BCIP/NBT基質錠剤(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)とともに展開され得る。

【0246】

別の態様において、本発明は、ペイロード薬物に連結された抗体(または単一鎖可変断片(scFv)などの抗体断片(多くの場合細胞傷害)からなる抗体-薬物コンジュゲート(ADC))を特徴とする。抗体は、ADCを標的癌細胞に結合させる。多くの場合、ADCは、次いで、細胞によって内在化され、薬物は細胞内に放出される。標的化のため、副作用はより低く、より広い治療域を提供する。親水性リンカー(例えばPEG4Mal)は、薬物がMDR(多剤耐性)トランスポーターにより耐性癌細胞から排出されることを防止するのを助ける。

40

【0247】

別の態様において、本発明は、細胞毒、薬物(例えば免疫抑制剤)、または放射性毒素などの治療薬にコンジュゲートされる、抗VISTA抗体またはその断片を含むイムノコ

50

ンジュゲートを特徴とする。かかる複合体は、本明細書において、「イムノコンジュゲート」と称される。1つ以上の細胞毒を含むイムノコンジュゲートは、「免疫毒素」と称される。細胞毒または細胞傷害性薬は、細胞に有害である（例えば死滅）任意の薬剤を含む。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミスラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピユーロマイシン、ならびにそれらの類似体または相同体が挙げられる。治療薬には、例えば、代謝拮抗薬（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパクロランブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン（以前のダウノマイシン）およびドキシソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、プレオマイシン、ミスラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン）も含まれる。

10

【0248】

本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗体にコンジュゲートされ得る治療細胞毒の他の例としては、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、マイタンシン、およびアウリスタチン、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。カリケアマイシン抗体コンジュゲートの一例は、市販されている（Mylotarg（商標）Wyeth）である。

20

【0249】

細胞毒は、当該技術分野で利用可能なリンカー技術を使用して、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗体にコンジュゲートされ得る。細胞毒を抗体にコンジュゲートするために使用されたリンカーの種類例としては、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド、およびペプチド含有リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、リソソーム区画内の低pHによる切断を受けやすいか、またはカテプシン（例えば、カテプシンB、C、D）などの腫瘍組織において優先的に発現されるプロテアーゼなど、プロテアーゼによる切断を受けやすいリンカーが選択され得る。細胞毒の種類、治療剤を抗体にコンジュゲートするためのリンカーおよび方法の更なる考察に関しては、Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215, Trail, P. A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337, Payne, G. (2003) Cancer Cell 3: 207-212, Allen, T. M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 750-763, Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3: 1089-1091, Senter, P. D. and Springer, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264も参照された。

30

40

【0250】

本発明の抗体は、放射性イムノコンジュゲートとも称される細胞傷害性放射性医薬品を生成するために、放射性同位体にもコンジュゲートされ得る。診断用途または治療用途に使用するための抗体にコンジュゲートされ得る放射性同位体の例としては、ヨウ素131、インジウム111、イットリウム90、およびルテチウム177が挙げられるが、これらに限定されない。放射性イムノコンジュゲートを調製するための方法は、当該技術分野において確立されている。Zevalin（登録商標）（Biogen IDEC）およびBexxar（登録商標）（Corixa Pharmaceuticals）を含む放射性イムノコンジュゲートが市販されており、同様の方法が、本発明の少なくともいくつか

50

かの実施形態による抗体を使用して、放射性イムノコンジュゲートを調製するために使用され得る。

【0251】

本発明の少なくともいくつかの実施形態によるアゴニスト抗ヒトVISTA抗体およびコンジュゲートを使用して、所与の生物学的応答を修飾することができ、薬物部分は、古典的な化学治療薬に限定されるものとして解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。かかるタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、pseudomonas外毒素、もしくはジフテリア毒素などの酵素的に活性な毒素もしくはその活性断片；腫瘍壊死因子もしくはインターフェロン - などのタンパク質；または例えば、リンホカイン、インターロイキン - 1 (「IL - 1」)、インターロイキン - 2 (「IL - 2」)、インターロイキン - 6 (「IL - 6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM - CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G - CSF」)、もしくは他の成長因子などの生物学的応答修飾物質が含まれ得る。

10

【0252】

かかる治療部分を抗体にコンジュゲートするための技法は周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243 - 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)、Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)、Thorpe, "Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinc hera et al. (eds.), pp. 475 - 506 (1985)、"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303 - 16 (Academic Press 1985)、およびThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody - Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119 - 58 (1982)を参照されたい。

20

30

【0253】

二重特異性分子

本発明の少なくともいくつかの実施形態によると、多重特異性抗VISTAアゴニスト抗体も包含される。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に結合特異性を有するモノクローナル抗体である。別の態様において、本発明は、本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗VISTA抗体またはその断片を含む二重特異性分子を特徴とする。本発明の少なくともいくつかの実施形態、による抗体、またはその抗原結合部分は、別の機能分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質 (例えば、受容体の別の抗体またはリガンド) に誘導体化または連結されて、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を生成することができる。本発明の少なくともいくつかの実施形態による抗体は、実際に、2つ以上の他の機能分子に誘導体化または連結されて、3つ以上の異なる結合部位および/または標的分子に結合する多重特異性分子を生成ことができ、かかる多重特異性分子は、本明細書で使用される場合、「二重特異性分子」と

40

50

いう用語によって包含されることも意図される。本発明の少なくともいくつかの実施形態による二重特異性分子を創出するために、抗体は、二重特異性分子がもたらされるように、別の抗体、抗体断片、ペプチド、もしくは結合模倣物などの1つ以上の他の結合分子に機能的に連結され得る（例えば、化学カップリング、遺伝子融合、非共有結合、ないしは別の方法により）。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体の結合特異性のうちの1つは、V I S T A に対してであり、もう一方は任意の他の抗原に対してである。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、V I S T A の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体をまた使用して、細胞傷害性薬を、V I S T A を発現する細胞に局限化させてもよい。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

10

【0254】

本発明の少なくともいくつかの実施形態による二重特異性抗体は、異なる構造のものである2つの標的に同時に結合し得る抗体である。本発明の少なくともいくつかの実施形態による二重特異性抗体（b s A b）および二重特異性抗体断片（b s F a b）は、B細胞抗原またはエピトープに特異的に結合する少なくとも1つのアームと、標的可能なコンジュゲートに特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを有する。

【0255】

少なくともいくつかの実施形態によると、本発明は、同じまたは異なる特異性を有する2つ以上の異なる単鎖抗体または抗体断片セグメントが連結される組換え産生された抗原結合分子である融合抗体タンパク質も包含する。様々な二重特異性融合抗体タンパク質が分子操作を使用して産生され得る。一形態において、二重特異性融合抗体タンパク質は、例えば、1つの抗原に対して単一の結合部位を有するセント（s e n t）、および第2の抗原に対して単一の結合部位を有するF a b断片からなる一価である。別の形態において、二重特異性融合抗体タンパク質は、例えば、1つの抗原に対して2つの結合部位を有するI g G、および第2の抗原に対して2つの結合部位を有する2つのs c F vからなる二価である。

20

【0256】

本発明は、「オクトパス抗体」（例えば、U S 2 0 0 6 / 0 0 2 5 5 7 6 A 1を参照のこと）、およびV I S T Aならびに別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用F A b」または「D A F」抗体（例えば、U S 2 0 0 8 / 0 0 6 9 8 2 0を参照のこと）を含む、3つ以上の機能性抗原結合部位を有する操作された抗体を更に包含する。したがって、本発明は、V I S T A に対して少なくとも1つの第1の結合特異性、および第2の標的エピトープに対して第2の結合特異性を含む二重特異性分子を含む。本発明の少なくともいくつかの実施形態によると、第2の標的エピトープは、F c受容体、例えば、ヒトF c R I（C D 6 4）またはヒトF c R受容体（C D 8 9）である。したがって、本発明は、両方を、それぞれ、F c R、F c R、またはF c s R発現エフェクター細胞（例えば、単球、マクロファージ、または多形核細胞（P M N））、およびV I S T A を発現する標的細胞に結合することが可能な二重特異性分子を含む。これらの二重特異性分子は、V I S T A 発現細胞をエフェクター細胞に標的化し、かつV I S T A 発現細胞の食作用、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）、サイトカイン放出、またはスーパーオキシドアニオンの生成などのF c受容体媒介エフェクター細胞活性を引き起こす。

30

40

【0257】

二重特異性分子が多重特異性である本発明の少なくともいくつかの実施形態によると、分子は、抗F c結合特異性に加えて、第3の結合特異性を更に含み得る。一実施形態において、第3の結合特異性は、抗増強因子（E F）部分、例えば、細胞傷害活性に關与する表面タンパク質に結合し、それにより、標的細胞に対する免疫応答を増加させる分子である。

【0258】

「抗増強因子部分」は、所与の分子、例えば、抗原または受容体に結合し、それにより、F c受容体または標的細胞抗原に対する結合決定基の効果の増強をもたらす、抗体、機

50

能性抗体断片、またはリガンドであり得る。「抗増強因子部分」は、Fc受容体または標的細胞抗原に結合することができる。代替的に、抗増強因子部分は、第1および第2の結合特異性が結合する実体とは異なる実体に結合することができる。例えば、抗増強因子部分は、細胞傷害性T細胞（例えば、CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1、または標的細胞に対して増加した免疫応答をもたらす他の免疫細胞を介して）に結合することができる。

【0259】

本発明の少なくともいくつかの実施形態によると、二重特異性分子は、結合特異性として、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、または単鎖Fvを含む、少なくとも1つの抗体、またはその抗体断片を含む。抗体はまた、Ladnerらの米国特許第4,946,778号（その内容は、参照により明示的に組み込まれる）に記載されるように、軽鎖もしくは重鎖二量体、またはその任意の最小断片（Fvもしくは単鎖構築物など）であってもよい。

10

【0260】

一実施形態において、Fc受容体に対する結合特異性は、モノクローナル抗体によって提供され、その結合は、ヒト免疫グロブリンG(IgG)によって遮断されない。本明細書で使用される場合、「IgG受容体」という用語は、染色体1に位置する8つの鎖遺伝子のうちのいずれかを指す。これらの遺伝子は、3つのFc受容体クラス：FcRI(CD64)、FcRII(CD32)、およびFcRIII(CD16)に分類される合計12の膜貫通または可溶性受容体アイソフォームをコードする。1つの好ましい実施形態において、Fc受容体はヒト高親和性FcRIである。ヒトFcRIは、単量体IgGに高親和性を示す、72kDa分子である。ある特定の好ましい抗Fcモノクローナル抗体の産生および特徴付けは、FangerらのPCT公開第WO88/00052号、および米国特許第4,954,617号により記載されており、それらの教示は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。これらの抗体は、受容体のFc結合部位とは異なる部位でFcRI、FcRII、またはFcRIIIのエピトープに結合し、したがって、それらの結合は、IgGの生理学的レベルによって実質的に遮断されない。既知の抗FcRI抗体には、mAb22、mAb32、mAb44、mAb62、およびmAb197が含まれる。mAb32を産生するハイブリドーマは、American Type Culture Collection、ATCC受託番号HB9469から入手可能である。他の実施形態において、抗Fc受容体抗体は、モノクローナル抗体22(H22)のヒト化形態である。H22抗体の産生および特徴付けは、Graziano, R. F. et al. (1995) J. Immunol. 155(10): 4996-5002およびPCT公開第WO94/10332号に記載されている。H22抗体産生細胞株は、HA022CLIの名称のもとAmerican Type Culture Collectionに寄託されており、受託番号CRL 11177を有する。

20

30

【0261】

また他の実施形態において、Fc受容体の結合特異性は、ヒトIgA受容体、例えば、Fc受容体(FcRI(CD89))に結合する抗体によって提供され、その結合は、好ましくは、ヒト免疫グロブリンA(IgA)によって遮断されない。「IgA受容体」という用語は、染色体19に位置するa-遺伝子(FcRI)の遺伝子産物を含むことが意図される。この遺伝子は、55~10kDaのいくつかの代替的にスプライスされた貫通膜アイソフォームをコードすることが既知である。FcRI(CD89)は、単球/マクロファージ、好酸球、および好中球性顆粒球上で構成的に発現されるが、非エフェクター細胞集団上では発現されない。FcRIは、IgA1およびIgA2の両方に中程度の親和性(約 $5 \times 10^{-7} M^{-1}$)を有し、これは、G-CSFまたはGM-CSFなどのサイトカインへの曝露により増加する(Morton, H. C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440)。IgAリガンド結合ドメインの外でFcRIに結合するA3、A59

40

50

、A 6 2、およびA 7 7として特定される4つのFc RI特異的モノクローナル抗体が記載されている(Monteiro, R. C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764)。

【0262】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の少なくともいくつかの実施形態による二重特異性分子に用いられ得る他の抗体は、マウス、キメラ、およびヒト化モノクローナル抗体である。本発明の二重特異性分子は、当該技術分野で既知の方法を用いて、成分結合特異性、例えば、抗FcRおよび抗VISTA結合特異性をコンジュゲートすることによって調製することができる。例えば、各二重特異性分子の結合特異性は、別個に生成され得、次いで互いにコンジュゲートされ得る。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、様々なカップリング剤または架橋剤を共有結合コンジュゲーションに使用することができる。架橋剤の例としては、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジリド-ジチオプロピオネート(SPDP))、およびスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)が挙げられる(例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686、Liu, M. A. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照のこと)。他の方法としては、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132、Brennan et al. (1985) Science 229:81-83)、およびGlennie et al. (1987) J. Immunol. 139:2367-2375)に記載されるものが挙げられる。好ましい結合剤は、SATAおよびスルホ-SMCCであり、両方とも、Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill.) から入手可能である。結合部分が抗体である場合、それらは、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介してコンジュゲートされ得る。特に好ましい実施形態において、ヒンジ領域は、奇数のスルフヒドリル残基、好ましくはコンジュゲート前に1つを含有するように修飾される。

【0263】

代替的に、両方の結合特異性は、同じベクターにコードされ、同じ宿主細胞において発現され、組み立てられ得る。この方法は、二重特異性分子がmAb X mAb、mAb X Fab、Fab X F(ab')₂、またはリガンド X Fab融合タンパク質である場合に特に有用である。本発明の少なくともいくつかの実施形態による二重特異性分子は、1つの単一鎖抗体および結合決定基を含む単一鎖分子、または2つの結合決定基を含む単一鎖二重特異性分子であり得る。二重特異性分子は、少なくとも2つの単一鎖分子を含み得る。二重特異性分子を調製するための方法は、例えば、米国特許第5,260,203号、米国特許第5,455,030号、米国特許第4,881,175号、米国特許第5,132,405号、米国特許第5,091,513号、米国特許第5,476,786号、米国特許第5,013,653号、米国特許第5,258,498号、および米国特許第5,482,858号に記載されている。

【0264】

多重特異性抗体を作製するための技法としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え共発現(Milstein and Cuello, Nature 305:537(1983))、WO93/08829、およびTrauneker et al., EMBO J. 10:3655(1991)を参照されたい)、および「ノブインホール」操作(例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい)が挙げられるが、これらに限定されない。多重特異性抗体は、抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作製するために静電ステアリング効果を操作すること(WO2009/089004A1);制御されたFabアーム交換(Labrijn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110(13):5145-50(2013)を参

照されたい) ; 2つ以上の抗体または断片を架橋すること(例えば、米国特許第4,676,980号およびBrennan et al. Science, 229:81(1985)を参照されたい) ; ロイシンジッパーを使用して、二重特異性抗体を産生すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)を参照されたい) ; 二重特異性抗体断片を作製するために「ダイアボディ」技術を使用すること(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)を参照されたい) ; および単鎖Fv(sFv)二量体を使用すること(例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368(1994))、ならびに例えば、Tutt et al. J. Immunol. 147:60(1991)に記載される三重特異性抗体を調製することによっても作製することができる。

10

【0265】

それらの特定の標的への二重特異性分子の結合は、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫測定法(RIA)、FACS分析、バイオアッセイ(例えば、成長障害)、またはウェスタンブロットアッセイによって確認することができる。これらのアッセイの各々は、一般的に、目的の複合体に特異的な標識された試薬(例えば、抗体)を用いることによって、特に目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えば、FcR-抗体複合体は、例えば、抗体-FcR複合体を認識し、それに特異的に結合する酵素連結抗体または抗体断片を使用して検出され得る。代替的に、複合体は、様々な他のイムノアッセイのうちのいずれかを使用して検出することができる。例えば、抗体は、放射性標識され、放射免疫測定法(RIA)で使用され得る(例えば、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照のこと。これは参照により本明細書に組み込まれる)。放射性同位体は、カウンターまたはシンチレーションカウンターの使用などの手段により、またはオートラジオグラフィーにより検出することができる。

20

【0266】

自己免疫疾患の治療のためのアゴニスティックな抗VISTA抗体および含有する医薬組成物の使用

30

少なくともいくつかの実施形態によると、VISTA刺激治療薬として機能する、本明細書に記載される抗VISTA抗体、その断片、コンジュゲート、またはそれらを含む含有する医薬は、免疫系関連疾患の治療に使用され得る。

【0267】

任意で、免疫系関連状態は、免疫関連状態、本明細書に列挙される自己免疫疾患、移植片拒絶、および移植片対宿主病、ならびに/または本明細書に列挙されるVISTA免疫関連疾患により媒介される免疫刺激を遮断もしくは促進するため、ならびに/または免疫療法のため(免疫刺激を促進または阻害)を含む。

【0268】

任意で、免疫状態は、自己免疫疾患、移植片拒絶、炎症性疾患、アレルギー状態、または移植片対宿主病から選択される。任意で、治療は、免疫関連状態の治療に有用な別の部分と組み合わせられる。

40

【0269】

したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態による薬剤を使用する多発性硬化症の治療は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、多発性硬化症を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

【0270】

したがって、対象アゴニスト抗体を使用する関節リウマチまたは他の関節炎状態の治療は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、関節リウマチを治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

50

【 0 2 7 1 】

したがって、対象アゴニスト抗体を使用する I B D の治療は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、I B D を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

【 0 2 7 2 】

したがって、対象アゴニスト抗体を使用する乾癬の治療は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、乾癬を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

【 0 2 7 3 】

したがって、対象アゴニスト抗体を使用する 1 型糖尿病の治療は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、1 型糖尿病を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

10

【 0 2 7 4 】

したがって、対象アゴニスト抗体を使用するぶどう膜炎の治療は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、ぶどう膜炎を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

【 0 2 7 5 】

したがって、対象アゴニスト抗体を使用するシェーグレン症候群の治療は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、シェーグレン症候群を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

20

【 0 2 7 6 】

したがって、対象アゴニスト抗体を使用する全身性エリテマトーデスの治療は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、全身性エリテマトーデスを治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

【 0 2 7 7 】

したがって、対象アゴニスト抗体を使用する G V H D の治療は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、G V H D を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

【 0 2 7 8 】

したがって、対象アゴニスト抗体を使用する、慢性もしくは急性感染および/またはそれに関連する肝毒性、例えば肝炎は、例えば、任意で本明細書に記載されるように、慢性もしくは急性感染および/またはそれに関連する肝毒性を治療するための任意の既知の治療薬または方法と組み合わせることができる。

30

【 0 2 7 9 】

上述の療法において、好ましくは、前述の、または他の自己免疫もしくは炎症性状態のうちの 1 つを有する対象は、本明細書に開示される免疫阻害抗 V I S T A 抗体、または本発明による抗原結合断片を投与され、この抗体は、免疫への少なくとも 1 つの V I S T A 媒介作用を模倣するか、または刺激し、例えば、疾患病理に關与する細胞傷害性 T 細胞、または N K 活性、および/または炎症誘発性サイトカインの産生を抑制し、それにより、例えば、T 細胞寛容または長期にわたる免疫抑制を誘発する T r e g の誘導のため、疾患症状を予防または回復させ、潜在的に長期にわたる疾患の寛解をもたらす。

40

【 0 2 8 0 】

本発明の少なくともいくつかの実施形態による、本明細書に列挙される治療薬および/またはそれを含む医薬組成物は、例えば、同種または異種移植片の急性もしくは慢性拒絶、または炎症性障害もしくは自己免疫障害の治療または予防のために、あるいは寛容を誘導するために、唯一の活性成分として、または免疫調節レジメンにおいて他の薬物と一緒に、または他の抗炎症剤と一緒に投与され得る。

【 0 2 8 1 】

敗血症の治療のためのアゴニスティックな抗 V I S T A 抗体および含有する医薬組成物の使用

50

少なくともいくつかの実施形態によると、本明細書に記載されるVISTA抗体、その断片、コンジュゲート、および/または医薬組成物は、敗血症を治療するために使用され得る。敗血症は、感染の潜在的な生命を脅かす合併症である。敗血症は、感染に対する初期宿主応答が不適切に増幅され、調節不全となり、宿主に有害となるときに発症する複雑な臨床症候群を表す。敗血症における初期過炎症相(「サイトカインストーム」)の後に免疫抑制の状態が続く(Hotchkiss et al 2013 Lancet Infect Dis. 13:260-268)。Dis. 13:260-268)。「免疫麻痺」とも称されるこの後者の免疫障害相は、一次感染除去の失敗、HSVおよびサイトメガロウイルスなどのウイルスの再活性化、ならびに多くの場合免疫適応性患者に特に毒性ではない生物による新しい二次感染の発症で明らかとなる。現在の敗血症患者の大部分は、その後の数日から数週間にわたって敗血症誘導性多器官機能障害を伴って、最終的に集中治療室に行くことによってのみこれらの初期過炎症の発作を生き延びる。敗血症誘導性免疫抑制は、これらの脆弱な患者において、騎乗免疫機能障害としてますます認識されている。一次感染後の病原体クリアランス不良および/または二次感染に対する感受性は、敗血症に関連する高罹患率および高死亡率に寄与する。

10

【0282】

本発明の少なくともいくつかの実施形態によると、本明細書に列挙されるように、治療薬および/またはそれを含む医薬組成物、ならびに敗血症の治療に有効な既知の治療薬の組み合わせの使用が提供される。

【0283】

20

本発明の少なくともいくつかの実施形態によると、敗血症の標準治療もしくは新たな治療、敗血症の初期過炎症相におけるサイトカインストームを遮断する療法、および/または敗血症誘導性免疫抑制相を克服するために免疫刺激作用を有する療法と組み合わせることができる、本明細書に列挙される、治療薬および/またはそれを含む医薬組成物の使用が提供される。

【0284】

「International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock」(Dellinger et al 2013 Intensive Care Med 39:165-228)によって推奨される、敗血症の標準治療の治療との組み合わせのうちのいくつかを以下に記載する。全ての可能性のある病原体に対して活性を有する広域抗生物質(細菌および/または真菌 - 治療は敗血症が診断されたときに開始するが、特定の病原体は特定されていない) - 例 セフォタキシム(Claforan(登録商標))、チカルシリンおよびクラブラネート(Timentin(登録商標))、ピペラシリンおよびタゾバクタム(Zosyn(登録商標))、イミペネムおよびシラスタチン(Primaxin(登録商標))、メロペネム(Merrem(登録商標))、クリンダマイシン(Cleocin(登録商標))、メトロニダゾール(Flagyl(登録商標))、セフトリアキソン(Rocephin(登録商標))、シプロフロキサシン(Cipro(登録商標))、セフェピム(Maxipime(登録商標))、レボフロキサシン(Levaquin(登録商標))、バンコマイシン、または列記された薬物の任意の組み合わせ。

30

2. 昇圧剤: 例 ノルエピネフリン、ドーパミン、エピネフリン、バソプレシン

3. ステロイド: 例ヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、またはフルドロコルチゾン、静脈内またはそうでなければ変力療法: 例 心筋機能不全を有する敗血症患者のためのドブタミン

40

4. ドロトレコギンアルファ(活性化)(DrotAA)などの組換えヒト活性化プロテインC(rhAPC)。

5. - 遮断薬は加えて局所および全身性炎症を減少させる。

6. ピルビン酸塩、コハク酸塩、または高用量インスリン置換などの代謝介入。

【0285】

遺伝子もしくは細胞療法または移植後の望ましくない免疫活性化を減少させるための抗V

50

Ⅰ S T A抗体および含有する医薬的組成物の使用

本明細書において使用される場合、「遺伝子治療」という用語は、任意の種類遺伝子治療、ベクター媒介遺伝子治療、遺伝子移入、ウイルス媒介遺伝子移入を包含し、ある特定の細胞療法、例えば、C A R T細胞療法およびC A R N K細胞療法を更に包含する。本発明の少なくともいくつかの実施形態によると、V I S T Aを標的とし、免疫応答に対して阻害活性を有する本明細書に記載されるアゴニストV I S T A抗体、その断片、コンジュゲート、および/または医薬組成物は、様々な遺伝子疾患の治療のために使用される遺伝子治療もしくは細胞療法後の望ましくない免疫活性化を減少させるための治療薬として使用され得る。単一の仮説によって限定されることを望むものではないが、かかる抗体は、免疫応答に対してV I S T A様阻害活性を有し、かつ/または任意で、病原性T細胞および/もしくはNK細胞の阻害によってV I S T A免疫阻害活性を強化する。

10

【0286】

遺伝子疾患の治療のための多くの遺伝子治療製品は現在臨床試験中である。近年の研究は、遺伝子治療ベクターを使用したいくつかの遺伝子疾患に対する治療的成功を記述している。遺伝子治療戦略は、3つの重要な要素、移入される遺伝子、遺伝子が導入される標的組織、および遺伝子の標的組織への侵入を容易にするために使用されるベクター（遺伝子送達ビヒクル）を特徴とする。遺伝子治療臨床試験の大部分は、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、偽型ウイルス、および単純ヘルペスウイルスを含む、非常に効率的な送達ビヒクルとしてウイルスベクターを活用している。しかしながら、ヒト免疫系と遺伝子治療ベクターの全ての成分との間の相互作用は、持続治療有効性に対する主な制限のうちの1つを表すように思われる。ヒト研究は、ウイルスベクターへの宿主免疫応答の可能性が高いことを示した。中和抗体の形成および/または細胞傷害性細胞による形質導入された細胞の破壊をもたらすウイルスまたは導入遺伝子産物自体へのかかる免疫応答は、治療有効性を大いに妨害し得る（Seregina and Amalfitano 2010 *Viruses* 2:2013, Mingozzi and High 2013 *Blood* 122:23, Masat et al 2013 *Discov Med* 15:379）。したがって、免疫応答を回避し、トランスジェニック治療タンパク質の長期発現を容易にするための戦略を開発することは、臨床における遺伝子治療成功のための主な課題のうちの1つである。

20

【0287】

ウイルスベクターによってコードされるトランスジェニックタンパク質に対する免疫応答に影響を与える因子としては、投与経路、ベクター用量、トランスジェニックタンパク質の免疫原性、宿主の炎症状態、およびカプシド血清型が挙げられる。これらの要因は、先天性免疫、サイトカイン産生、APC成熟、抗原提示、および最終的に、機能性エフェクターに対するナイーブTリンパ球のプライミングを引き起こすことによって免疫原性に影響を与えると考えられる（Mingozzi and High 2013 *Blood* 122:23）。したがって、まさにこれらの機序を妨害することによって免疫活性化を弱めるという考えは、短期免疫抑制を誘導し、ベクター投与に続く早期免疫プライミングを回避し、長期寛容を促進する目的で論理的に現れた。

30

【0288】

遺伝子治療に続く望ましくない免疫活性化を阻害するための戦略として、特に複数の注射後、ベクター送達時点での免疫応答の2つの非冗長チェックポイントを標的とすることによる免疫調節治療を動物モデルで試験した。マウスまたはサルの肺に滴下注入されたアデノウイルスベクターに対するベクター媒介性免疫応答の研究は、抗CD40L抗体による一過性の治療がアデノウイルス誘導性免疫応答の抑制をもたらし、結果的に、動物はアデノウイルスベクターで再投与され得ることを示した。このAbでの短い治療は、Ab効果が既に有意ではない時点を超えて、免疫機能に対する長期効果およびアデノウイルス特異的液性応答の長期阻害をもたらし、遺伝子移入ベクターの投与を可能にするための免疫調節レジメンとしてのこの共刺激経路の遮断における治療可能性を指し示す（Scaria et al. 1997 *Gene Ther* 4:611; Chirmule

40

50

et al 2000 J. Virol. 74:3345)。他の研究は、一次ベクター投与前後でのCTLA4-Igおよび抗CD40L Abの共投与がベクターへの免疫応答を減少させ、長期アデノウイルス媒介遺伝子発現を延長させ、またこれらの薬剤の免疫抑制効果がもはや存在しない後でさえ二次アデノウイルス媒介遺伝子移入を可能にしたことを示し、一過性の免疫抑制療法で、持続性ならびに二次アデノウイルス媒介遺伝子移入を得ることが可能であり得ることを示した(Kay et al 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:4686)。別の研究において、治療が各遺伝子移入注射中に投与されたならば、CTLA4-Igおよび抗CD40L Abの類似の投与は、ベクターに対する中和Abの形成を抑止し、遺伝子移入発現を可能にした(Lorain et al 2008 Molecular Therapy 16:541)。更に、単一投与であっても、マウスへのCTLA4-Igの投与は、免疫応答の抑制および早期時点での導入遺伝子発現の延長をもたらした(Adriouch et al 2011 Front. Microbiol. 2:199)。しかしながら、CTLA4-Ig単独は、導入遺伝子産物に対して免疫応答を恒久的に一掃するのに十分ではなかった。2つの免疫チェックポイントをCTLA4-IgおよびPD-L1またはPDL-2で標的化する組み合わせ治療は、おそらく免疫調節の2つの非冗長機序を標的とすることにより、後の時点で導入遺伝子寛容の相乗的改善をもたらし、長期導入遺伝子持続性および発現をもたらした(Adriouch et al 2011 Front. Microbiol. 2:199)。

【0289】

本発明の少なくともいくつかの実施形態によると、対象アゴニストは、遺伝子治療に対する免疫応答の限界を克服するために使用され得、単独でまたは他の活性剤との遺伝子治療に続く望ましくない免疫活性化を減少させるために使用され得る。現在のアプローチとしては、送達ベクターに対する抗体を有する患者の除外、高ベクター用量の投与、後のベクター形質導入を可能にする抗ベクター抗体を吸着するための空カプシドの使用、免疫グロブリンを吸着し、抗ベクター抗体価を減少させるための血漿交換(プラズマフェレシス)サイクルの反復が挙げられる。

【0290】

これらの制限を克服することを試みる新規アプローチは、Adベクター自体の選択的修飾および宿主の予防的な免疫調節の2つの幅広いカテゴリーに分けることができる(Seegin and Amalfitano 2010 Viruses 2:2013)。第1のカテゴリーは、(1)特定の阻害剤またはリガンドのAd-カプシド表示、(2)全Adベクターカプシド部分の共有結合修飾、(3)組織特異的プロモーターおよび局所投与経路の使用、(4)ゲノム修飾されたAdの使用、ならびに(5)キメラもしくは代替血清型Adの開発を含む、いくつかの画期的な戦略を含む。

【0291】

第2のカテゴリーの方法は、ウイルスベクターによって誘導されることが知られている重要な免疫経路を遮断するための免疫抑制薬または特定の化合物の使用を含む。免疫抑制剤は、前臨床研究において試験されており、移入ベクターおよび導入遺伝子産物への免疫応答の予防または根絶において有効性を示した。これらには、シクロスポリンA；シクロホスファミド；FK506；グルココルチコイドもしくはデキサメタゾンなどのステロイド；TLR9アンタゴニストオリゴヌクレオチドODN-2088などのTLR9遮断；TNF- α 抗体もしくはTNFR-Ig抗体でのTNF- α 遮断、U0126などのErkおよび他のシグナル伝達阻害剤などの一般的な免疫抑制剤が含まれる。臨床設定において、グルココルチコイドの投与は、ヒト第IX因子導入遺伝子を発現するアデノウイルス関連ウイルス(AAV)ベクターの、重度の血友病B患者への肝臓遺伝子移入時にウイルスカプシドに対して指向されるT細胞応答を鈍らせるために良好に使用された(Nathwani et al 2011 N. Engl. J. Med. 365:2357)。

【0292】

宿主を「包括的に」および非特異的に免疫抑制する傾向がある薬物を利用する前のアプ

ローチとは対照的に、より選択的な免疫抑制アプローチが開発されている。これらには、CD40とCD154、ICOSとICOSL、CD28とCD80もしくはCD86 (CTLA4-Igを含む)、NKG2DとNKG2Dリガンド、LFA-1とICAM、LFA-3とCD2、4-1BBと4-1BBL、OX40とOX40L、GITRとGITRLとの間など、正の共刺激相互作用の遮断を提供する薬剤の使用、ならびにCTLA-4、PD-1、BTLA、LAG-3、TIM-1、TEVI-3、KIRなどの負の共刺激受容体、ならびにB7-H4およびB7-H3の受容体を刺激する薬剤の使用が含まれる。これらのうちのいくつかは、前臨床または臨床移植研究で利用されている (Pilat et al 2011 Sem. Immunol. 23:293)。

【0293】

上述の遺伝子もしくは細胞療法において、または移植適応症の治療において、好ましくは、細胞もしくは遺伝子治療、または移植組織もしくは器官を有するか、またはそれを受容する対象は、本明細書に開示される免疫阻害抗VISTA抗体、または本発明による抗原結合断片を投与され、この抗体は、免疫への少なくとも1つのVISTA媒介効果、例えば、細胞傷害性T細胞もしくはNK活性に対するその阻害効果、および/または炎症誘発性サイトカインの産生に対するその阻害効果、またはTregに対するその刺激効果を強化、刺激、または模倣し、それにより、療法に使用された細胞もしくは遺伝子に対する宿主免疫応答、または移植細胞、器官、もしくは組織に対する望ましくない免疫応答を防止または減少させる。好ましくは、治療は、移植もしくは注入細胞、組織、または器官に対する延長された免疫寛容を誘発する。いくつかの場合において、例えば、免疫細胞を含有する移植細胞、組織、または器官の場合において、本明細書に開示される免疫阻害抗VISTA抗体または抗原結合断片は、注入または移植前に細胞、組織、または器官と、ならびに/または免疫細胞を寛容化し、望ましくない免疫応答もしくはGVHD免疫反応を防止するために、潜在的に移植レシピエントの免疫細胞と接触させられてもよい。

【0294】

医薬組成物

別の態様において、本発明は、組成物、例えば、本発明による抗ヒトVISTA抗体および任意で別の免疫抑制剤もしくは他の活性剤のうちの1つ、またはそれらの組み合わせを含有する医薬組成物を提供する。したがって、本発明の少なくともいくつかの実施形態による治療有効量の抗ヒトVISTA抗体を含む医薬組成物を特徴とする。特に、本発明は、本発明による治療有効[免疫抑制]量の少なくとも1つのアゴニスト抗ヒトVISTA抗体または抗体断片を含む医薬組成物を特徴とする。

【0295】

本発明の少なくともいくつかの実施形態による医薬組成物は、免疫関連障害、自己免疫、アレルギー、GVHD、炎症、または感染障害に関連する肝毒性、および/または敗血症の治療のために使用され得る。「治療」は、治療的処置および予防もしくは防止措置の両方を指す。治療を必要とするものには、障害を既に有するもの、ならびに障害が予防されるものが含まれる。したがって、本明細書で治療される哺乳動物は、障害を有すると診断されたか、または障害の素因があるか、もしくは障害になりやすい可能性がある。治療の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家畜動物、および農場動物、ならびにイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどの、動物園、スポーツ、またはペット動物を含む、哺乳動物に分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0296】

「治療有効量」という用語は、哺乳動物において疾患または障害を治療するのに有効である、本発明による薬剤の量を指す。本発明の治療薬は、対象単独で、またはそれらが薬学的に許容される担体と混合される医薬組成物の一部として提供され得る。多くの場合において、本発明によるアゴニスト抗VISTA抗体またはアンタゴニスト抗VISTA抗体は、特定の状態の治療に有用な他の免疫治療薬または他の治療薬と組み合わせて使用される。

【0297】

10

20

30

40

50

組成物は、その投与がレシピエント者患者によって許容され得る場合、「薬学的に許容される担体」であると言われる。本明細書で使用される場合、「医薬的に許容される担体」は、生理学的に適合性である、任意かつ全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、ならびに吸収遅延剤を含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、または表皮投与（例えば、注射または注入による）に適している。

【0298】

かかる組成物としては、滅菌水、緩衝食塩水（例えば、トリス - HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pHおよびイオン強度、ならびに任意で、洗剤および可溶化剤（例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、チメロサル、ベンジルアルコール）、ならびに増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）などの添加剤を含む。非水性溶媒またはビヒクルも、以下に詳述されるように使用され得る。

10

【0299】

本発明の少なくともいくつかの実施形態による医薬組成物において用いられ得る好適な水性および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの好適な混合物、オリブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。投与経路に応じて、VISTAタンパク質のいずれか1つまたは二重特異性分子に特異的に結合する活性化合物、すなわち、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、およびそれを含有する抗原結合断片、ならびにコンジュゲート、および/または代替的な足場は、化合物を不活性化し得る酸および他の自然条件の作用から化合物を保護する材料でコーティングされ得る。本発明の少なくともいくつかの実施形態による薬学的化合物は、1つ以上の薬学的に許容される塩を含み得る。「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を維持し、いかなる望ましくない毒性作用も付与しない塩を指す（例えば、Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照のこと）。かかる塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの非毒性無機酸、ならびに脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などの非毒性有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属、ならびに、 β -ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの非毒性の有機アミンに由来するものが挙げられる。

20

30

【0300】

本発明の少なくともいくつかの実施形態による医薬組成物は、薬学的に許容される酸化防止剤を含み得る。学的に許容される酸化防止剤の例としては、(1)アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性酸化防止剤、(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、p-トコフェノールなどの油溶性抗酸化剤、および(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤が挙げられる。

40

【0301】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントも含有し得る。微生物の存在の防止は、上記の滅菌手順により、ならびに様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、ソルビン酸フェノールなどを含めることによる両方によって確実にされ得る。また、糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含むことも望ましい場合がある。加えて、注射可能な薬学的形態の持続吸収は、モ

50

ノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤の包含によってもたらされ得る。

【0302】

薬剤的に許容される担体には、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。薬学的活性物質のためのかかる媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で既知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性化化合物と不適合である場合を除き、本発明の少なくともいくつかの実施形態による医薬組成物におけるその使用が想到される。補助的活性化化合物もまた、組成物に組み込むことができる。

【0303】

治療用組成物は、典型的には、製造および保管条件下で滅菌であり、安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に適した他の秩序構造として製剤化され得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。多くの場合には、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むのが好ましいであろう。注射可能な組成物の持続吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中へ含めることによってもたらされ得る。滅菌の注射可能な溶液は、必要量の活性化化合物を、上に列挙した成分のうちの1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒中に組み込むことによって調製され得、必要に応じて滅菌化精密ろ過が続く。一般的に、分散液は、活性化化合物を、塩基性分散媒および上で列挙したものから必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌の注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分+以前に滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末をもたらす真空乾燥および凍結乾燥（凍結乾燥（lyophilization））である。

【0304】

滅菌の注射可能な溶液は、必要量の活性化化合物を、上に列挙した成分のうちの1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒中に組み込むことによって調製され得、必要に応じて滅菌化精密ろ過が続く。一般的に、分散液は、活性化化合物を、塩基性分散媒および上で列挙したものから必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌の注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分+以前に滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末をもたらす真空乾燥および凍結乾燥（凍結乾燥（lyophilization））である。

【0305】

本発明の組成物は、当該技術分野で既知の様々な方法のうちの1つ以上を使用して、1つ以上の投与経路を介して投与され得る。当業者に理解されるように、投与経路および/または投与様式は、所望の結果に応じて異なる。本発明の少なくともいくつかの実施形態による治療薬の好ましい投与経路は、血管内送達（例えば、注射または注入）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、経口、腸内、直腸、肺（例えば、吸入）、経鼻、局所（経皮、頬側、および舌下を含む）、膀胱内、硝子体内、腹腔内、腔内、脳送達（例えば、脳室内、脳内、および対流強化拡散）、CNS送達（例えば、くも膜下腔内、脊髄周囲（perispinal）、および脊髄内）、または非経口（皮下、筋肉内、静脈内、および皮内）、経粘膜（例えば、舌下投与）、投与もしくは埋め込み物を介した投与、または他の非経口投与、例えば、注射または注入によって、または当該技術分野で既知の他の送達経路および/もしくは投与形態を含む。本明細書で使用される場合、「非経口投与」という語句は、腸内および局所投与以外、通常、注射による投与様式を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨内注射および注入を

10

20

30

40

50

含むが、これらに限定されない。具体的な実施形態において、本発明の少なくともいくつかの実施形態によるタンパク質、治療薬、または医薬組成物は、腹腔内または静脈内に投与され得る。

【0306】

代替的に、本発明によるVISTA特異的抗体は、局所、表皮、または粘膜投与経路など、例えば、鼻腔内、経口、膣、直腸、舌下、または局所の非経口経路を介して投与され得る。

【0307】

活性化合物は、化合物を急速な放出から保護する担体、例えば、埋め込み物、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む徐放性製剤とともに調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。かかる製剤の調製のための多くの方法が特許取得され、当業者に一般に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0308】

治療用組成物は、当該技術分野で既知の医療用デバイスで投与され得る。例えば、好ましい実施形態において、本発明の少なくともいくつかの実施形態による治療用組成物は、米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号、または同第4,596,556号などの針皮下注射デバイスで投与され得る。本発明に有用な埋め込み物およびモジュールの例としては、米国特許第4,487,603号（制御速度で薬剤を分配するための移植可能なマイクロ注入ポンプを開示している）、米国特許第4,486,194号（皮膚を通して薬剤を投与するための治療用デバイスを開示している）、米国特許第4,447,233号（正確な注入速度で薬剤を送達するための薬剤注入ポンプを開示している）、米国特許第4,447,224号（連続薬物送達のための変流量の移植可能な注入器具を開示している）、米国特許第4,439,196号（マルチチャンバコンパートメントを有する浸透圧薬物送達系を開示している）、米国特許第4,475,196号（浸透圧薬物送達系を開示している）が挙げられる。これらの特許は、参照により本明細書に組み込まれる。多くの他のかかる埋め込み物、送達系、およびモジュールが当業者に既知である。

【0309】

ある特定の実施形態において、抗VISTA抗体は、インビボでの適切な分布を確実にするように製剤化され得る。例えば、血液脳関門(BBB)は、多くの非常に親水性の化合物を排除する。本発明の少なくともいくつかの実施形態による治療用化合物がBBBを横断することを確実にするために（所望の場合）、それらは、例えばリポソームに製剤化され得る。リポソームを製造する方法については、例えば、米国特許第4,522,811号、同第5,374,548号、および同第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に輸送され、標的化された薬物送達を強化する1つ以上の部分を含み得る（例えば、V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照のこと）。例示的な標的部分としては、葉酸塩またはピオチン（例えば、Lowらに対する米国特許第5,416,016号を参照されたい）、マンノシド(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)、抗体(P. G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140、M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180)、界面活性剤プロテインA受容体(Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)、p120(Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)、K. Keinane

10

20

30

40

50

n ; M . L . Laukkanen (1994) F E B S L e t t . 346 : 123 も参照されたい、 J . J . Killion、および I . J . Fidler (1994) Immunomethods 4 : 273 が挙げられる。

【 0310 】

更に別の実施形態において、化合物（例えば、治療薬、標識、細胞毒、放射毒素免疫抑制剤）を、かかる化合物を本明細書に開示される抗体に連結することによって V I S T A 細胞表面受容体を有する細胞に標的化するために、本発明の免疫コンジュゲートが使用され得る。したがって、本発明は、 V I S T A を発現するエクスピボまたはインピボ細胞を（例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素共因子などの検出可能な標識で）局在化するための方法も提供する。代替的に、免疫コンジュゲートは、細胞毒または放射線毒素を V I S T A 抗原に標的化することによって V I S T A 細胞表面受容体を有する細胞を死滅させるために使用することができる。

10

【 0311 】

本明細書で使用される場合、「医薬的に許容される担体」は、生理学的に適合性である、任意かつ全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、ならびに吸収遅延剤を含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、または表皮投与（例えば、注射または注入による）に適している。投与経路に応じて、活性化化合物、すなわち、 V I S T A 抗原の外部ドメインを含有する可溶性ポリペプチドコンジュゲート、抗体、免疫コンジュゲート、代替的な足場、および/または二重特異性分子は、化合物を不活性化し得る酸および他の自然条件の作用から化合物を保護する材料でコーティングされ得る。本発明の少なくともいくつかの実施形態による薬学的化合物は、1つ以上の薬学的に許容される塩を含み得る。「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を維持し、いかなる望ましくない毒性作用も付与しない塩を指す（例えば、 B e r g e , S . M . , e t a l . (1977) J . P h a r m . S c i . 66 : 1 - 19 を参照のこと）。かかる塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの非毒性無機酸、ならびに脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などの非毒性有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属、ならびに、 β -ジベンジルエチレンジアミン、 N - メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの非毒性の有機アミンに由来するものが挙げられる。

20

30

【 0312 】

本発明の少なくともいくつかの実施形態による医薬組成物は、薬学的に許容される酸化防止剤を含み得る。学的に許容される酸化防止剤の例としては、（ 1 ）アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性酸化防止剤、（ 2 ）パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（ B H A ）、ブチル化ヒドロキシルエン（ B H T ）、レシチン、没食子酸プロピル、 p - トコフェノールなどの油溶性抗酸化剤、および（ 3 ）クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ E D T A ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤が挙げられる。本発明の少なくともいくつかの実施形態による医薬組成物において用いられ得る好適な水性および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの好適な混合物、オリブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。

40

【 0313 】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントも含有し得る。微生物の存在の防止は、上記の滅菌手順により、ならびに様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、ソルビン酸フェノールなどを含める

50

ことによる両方によって確実にされ得る。また、糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含むことも望ましい場合がある。加えて、注射可能な薬学的形態の持続吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤の包含によってもたらされ得る。

【0314】

薬剤的に許容される担体には、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。薬学的活性物質のためのかかる媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で既知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性化化合物と不適合である場合を除き、本発明の少なくともいくつかの実施形態による薬学的組成物におけるその使用が想到される。補助的活性化化合物もまた、組成物に組み込むことができる。

10

【0315】

治療用組成物は、典型的には、製造および保管条件下で滅菌であり、安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に適した他の秩序構造として製剤化され得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。多くの場合には、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むのが好ましいであろう。注射可能な組成物の持続吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中へ含めることによってもたらされ得る。滅菌の注射可能な溶液は、必要量の活性化化合物を、上に列挙した成分のうちの1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒中に組み込むことによって調製され得、必要に応じて滅菌化精密ろ過が続く。一般的に、分散液は、活性化化合物を、塩基性分散媒および上で列挙したのから必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌の注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分+以前に滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末をもたらす真空乾燥および凍結乾燥（凍結乾燥（lyophilization））である。

20

30

【0316】

滅菌の注射可能な溶液は、必要量の活性化化合物を、上に列挙した成分のうちの1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒中に組み込むことによって調製され得、必要に応じて滅菌化精密ろ過が続く。一般的に、分散液は、活性化化合物を、塩基性分散媒および上で列挙したのから必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌の注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分+以前に滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末をもたらす真空乾燥および凍結乾燥（凍結乾燥（lyophilization））である。

【0317】

担体材料と組み合わせる単一の剤形をもたらす得る活性成分の量は、治療される対象および特定の投与様式に応じて異なる。担体材料と組み合わせる単一の剤形をもたらす得る活性成分の量は、一般的に、治療効果をもたらすその組成物の量である。一般的に、100パーセント中、この量は、薬学的に許容される担体と組み合わせる、約0.01パーセント~約99パーセントの活性成分、好ましくは約0.1パーセント~約70パーセント、最も好ましくは約1パーセント~約30パーセントの活性成分の範囲である。

40

【0318】

投与レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整される。例えば、単一ボラスが投与され得るか、いくつかの分離用量が経時的に投与され得るか、または用量は、治療状況の緊急事態によって示されるように、比例して減少または増加され得る。投与の容易性および投与の均一性のための投与単位形態に非経口組成物を製

50

剤化することが得に有益である。本明細書で使用される用量単位形態は、治療される対象の単位投与量として適した物理的に別の単位を指し、各単位は、所望の治療効果をもたらすように計算された予め決められた活性化合物の量を必要な薬学的に許容される担体とともに含有するものである。本発明の少なくともいくつかの実施形態による投与単位形態のための仕様は、(a) 活性化合物の独特の特徴および達成される特定の治療効果、ならびに(b) 個体の感受性の治療のためのかかる活性化合物を配合する分野において付随する制限によって定められ、直接それらに依存する。

【0319】

本明細書に開示されるVISTA抗体の投与に関して、投与量は、宿主の体重の約0.0001~100mg/kg、より通常には0.01~5mg/kgの範囲である。例えば、投与量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重、もしくは10mg/kg体重、または1~10mg/kgの範囲内であり得る。例示的な治療レジームは、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1ヶ月に1回、3ヶ月に1回、または6ヶ月に1回の投与を伴う。本発明の少なくともいくつかの実施形態による本明細書に開示される抗体の好ましい投与レジメンは、静脈内投与を介して1mg/kg体重または3mg/kg体重を含み、本明細書に開示される抗体は、以下の投薬スケジュール：(i) 4週間に1回を6投与、次いで3ヶ月に1回、(ii) 3週間に1回、(iii) 3mg/kg体重を1回、続いて、1mg/kg体重を3週間に1回、のうちの1つを使用して、与えられる。

【0320】

いくつかの方法では、異なる結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、その場合、本明細書に開示される各抗体の投与量は、示される範囲内である。本明細書に開示される抗体は、通常、複数回投与される。単一投与量間の間隔は、例えば、毎日、毎週、毎月、3ヶ月毎、または毎年であり得る。間隔はまた、患者の標的抗原への抗体の血液レベルを測定することによって示されるように不規則であってもよい。いくつかの方法では、投与量は、約1~1000μg/mlの血漿抗体濃度を達成するように調整され、いくつかの方法において、約25~300マイクログラム/mlである。

【0321】

代替的に、治療薬は、持続放出製剤として投与され得、その場合、頻繁な投与が必要とされない。投与量および頻度は、患者における治療薬の半減期により異なる。一般的に、ヒト抗体は、最も長い半減期を示し、その後ヒト化抗体、キメラ抗体、および非ヒト抗体が続く。融合タンパク質の半減期は広く異なり得る。投与の投与量および頻度は、治療が予防的または治療的かどうかに応じて異なり得る。予防的用途において、比較的低用量が、長時間にわたって比較的低頻度の間隔で投与される。中には残りの人生の間治療を受け続ける患者がいる。治療の適用において、比較的短い間隔で比較的高い投与量が、疾患の進行が減少または終了するまで、好ましくは患者が疾患の症状の部分的または完全な回復を示すまで必要とされる場合がある。したがって、患者は、予防レジームを投与され得る。

【0322】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、患者に毒性であることなく、特定の患者、組成物、および投与様式の所望の治療応答を達成するのに有効な量の活性成分を得るよう異なり得る。選択された投与量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、用いられる特定の化合物の排泄速度、治療期間、用いられる特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬剤、化合物および/もしくは材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全般的な健康状態、および以前の病歴、ならびに医学分野でよく知られているような要因を含む様々な薬物動態因子に依存する。

【0323】

インビボ動物モデルを使用する機能的スクリーニング

1. コンカナバリンA誘導性肝炎動物モデルにおける本発明によるVISTAアゴニスト

抗体の試験

自己免疫性肝炎（A I H）は、肝臓に対するB細胞およびT細胞応答をもたらす自己寛容の喪失を特徴とする肝臓の慢性炎症性疾患である。C o n Aモデルは、A I Hの原因を理解するための最良の特徴付けされた系を表す。C o n Aは、肝臓において富化される特定の糖部分に結合するレクチンである。C o n Aによるこれらの糖残基の修飾は、肝臓マクロファージによって発現される修飾されたM H C構造との相互作用を通して迅速なC D 4 + T細胞活性化をもたらす。強いが一過性であるサイトカイン産生は、4 ~ 6時間以内にピーク血漿レベルに達する、最も標準的なT細胞サイトカイン（I L - 2、I L - 3、I F N、およびT N F）で生じる。注目すべきことに、C o n A誘導性炎症は、C D 4 + T細胞を枯渇させることによって遮断される。h V - K Iマウスを有するC o n Aモデルを使用して、本発明によるアゴニスティックな抗V I S T A m A bの抑制活性を確認することができる。マウスを量り、15 m p kのC o n Aを注射する3時間前に、10 m p kの抗V I S T A抗体または適切なアイソタイプ対照で処置した。抗V I S T A m A bはI P投与される一方で、C o n Aはこれらのマウスにおいて尾静脈を介して注射される。C o n A投与6時間後の時点で、マウスを安楽死させ、血液を収集する。次いで、血漿画分を、32のサイトカインの多重アッセイにより、血漿サイトカインに関して分析した。各抗体は、活性を確認するために、独立した実験において2回試験される。32 - p l e xの各サイトカインに関して、各抗V I S T A抗体をアイソタイプ対照と比較するために、D u n n e t t事後検定試験を用いて、一元配置A N O V Aが実施される。試験された抗V I S T A m A bは、サイトカイン抑制の有効性（抑制されたサイトカインがどれくらいであるか）および変動性（各実験内および実験間の抑制がどのくらい一貫しているか）に基づいてランク付けされる。T細胞活性化に標準的に関連付けられているサイトカインを抑制するm A bに更に重点が置かれる。

【0324】

本発明による多くの抗ヒトV I S T A抗体は、C o n Aモデルにおいてスクリーニングされており、その中で有効（免疫抑制性）であった、すなわち、それらは、C o n A誘導性サイトカイン産生を抑制し、生存を促進し、特に、I L - 2を含むT細胞活性化に関与するサイトカインの発現を抑制した。特に、本発明者らは、I N X 8 0 0、I N X 8 0 1、およびI N X 9 0 3、ならびにアゴニスト抗マウスV I S T A抗体を試験し、全てC o n A肝炎モデルにおいて有効（免疫抑制性）であった。したがって、本発明によるアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体は、肝炎などのいくつかの慢性および急性感染状態に関連する炎症および肝毒性の治療/予防において有用であるはずである。

【0325】

2. 移植片対宿主病動物モデルにおける本発明によるV I S T Aアゴニスト抗体の試験

G V H Dは、照射宿主への同種T細胞の養子移入によって媒介される全身性疾患である。G V H Dの原因において重要な5つの主要なステップがある：1) T細胞移入に先行する照射事象の形態で最も一般的である、宿主への損傷、2) 宿主およびドナーA P Cの両方による同種T細胞の活性化、3) リンパ節および脾臓におけるT細胞の拡大、4) 皮膚、腸、肝臓、および肺などの末梢部位内への輸送、ならびに5) T細胞およびまた動員された骨髄細胞により駆動される宿主への損傷。F 1 親株などのある特定のモデルにおいて、マウスは抗核m A bおよび免疫複合体媒介性糸球体腎炎を発症するため、狼瘡に好適なモデルである慢性G V H Dが生じる。注目すべきことに、ドナーT細胞からのV I S T Aの遺伝子欠失は、W T T細胞を受容するマウスに見られるよりも侵襲的な形態のG H V Dをもたらす。

【0326】

このアッセイを使用して、アゴニスティックな抗ヒトV I S T A候補のアゴニズムを特定し、ランク付けすることができる。また、このアッセイを使用して、本発明によるアゴニスト抗体がG V H Dを治療するかまたは予防するために使用され得ることを確認することができる。このモデルにおいて、B A L B / cマウスは、G V H Dを誘導するために、致死的に照射され、かつh V - K Iマウスからの同種骨髄細胞および脾臓T細胞を与えら

れ、1つの群は、陰性対照としてT細胞を受容しない。同種T細胞を受容するマウスは、対照I g群および治療群に分けられる。最大4つの独特のV I S T A m A bが、1群当たり8匹のマウスの単一実験で使用され、2つの反復実験を行う。10mpkまたは別の用量の抗体がT細胞移入時に、ならびに移入後2日目および4日目に投与される。各マウスの体重を追跡し、20%を超える初期発症体重を失う任意のマウスは殺される。各実験についてカプラン・マイヤー曲線が、各抗V I S T A抗体と対照を比較するログランク統計検定を用いて生成される。4つ全てのV I S T A m A bがG V H Dから完全に保護される場合、用量応答アッセイが、10、3、1、および0.3mpkの抗体で処置される群のG V H Dモデルにおいて実行される。L D 5 0値が各抗体について計算される。

【0327】

10

本発明によるいくつかのアゴニスト抗ヒトV I S T A抗体をこの動物モデルにおいて評価した。これらの試験された抗体は全て、このモデルにおいて有効（免疫抑制性）であった、すなわち、それらは、疾患の症状を減少させ、疾患の進行を緩徐し、疾患関連体重損失を減少させ、生存を促進した。特に、I N X 8 0 0、I N X 8 0 1、I N X 9 0 1、I N X 9 0 2、I N X 9 0 3、およびI N X 9 0 4の各々を評価し、この動物モデルにおける疾患症状を軽減または予防することを示した。また、A形態およびB形態のいずれかがG V H D動物モデルにおいて同様に効果的であったI N X 9 0 1のA形態およびB形態を使用して決定された。

【0328】

3. 炎症性腸疾患の動物モデルにおける本発明によるV I S T Aアゴニスト抗体の試験

20

炎症性腸疾患（I B D）、クローン病、および潰瘍性大腸炎は、宿主免疫応答、遺伝的感受性、環境因子、および腸内腔内容物間の定義が不完全な相互作用および複雑な相互作用から生じる。近年のゲノムワイド関連研究は、免疫細胞制御遺伝子とI B D感受性との間の関連性を報告している。先天性および適応免疫細胞の内因性遺伝子の両方が、これらの研究において表され、I B Dの原因におけるこれらの細胞集団の中心的役割を示す。現在、ヒトI B Dの50を超える動物モデルが存在する。1つのモデルがヒトI B Dを完全に模写しないが、多くは、疾患の発症および進行ならびに創傷治癒応答を含む、ヒト疾患の様々な態様の研究に有用である。

【0329】

1つの十分に確立されたI B Dモデルにおいて、腸炎症は、T細胞およびB細胞欠損レシピエントマウスへの同系脾臓C D 4 + C D 4 5 R B ^{h i} T細胞養子移入で開始される。C D 4 + C D 4 5 R B ^{h i} T細胞集団は、慢性小腸炎症および結腸炎症を誘導することができる活性化のためにプライムされたナイーブT細胞を主に含有する。この方法は、研究者が、疾患原因に関連する生物学的に関連する質問に答えるために、先天性および適応免疫細胞集団の両方を含む主な実験変数を修正することを可能にする。加えて、この方法は、マウスにおける疾患進行の臨床的特徴の動態研究を可能にする疾患発症の正確な開始、および十分に特徴付けされた実験時間経過を提供する。この方法によって誘導される腸炎症は、慢性大腸壁性炎症および小腸貫壁性炎症、T N FおよびI L - 1 2などのサイトカインによって駆動される原因、ならびに消耗などの全身症状を含む、ヒトI B Dと多くの特徴を共有する。したがって、これはヒトI B Dの原因を研究するための理想的なモデル系

30

40

【0330】

本発明によるアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体（I N X 9 0 1）は、このI B Dモデルにおいて試験され、有効であることが示された。特に、このアゴニスト抗体は、サイトカインレベルを抑制し、（i）大腸炎関連体重損失、（i i）大腸炎の進行に関連する体重損失、（i i i）結腸の短縮、（i v）結腸への炎症性浸潤物の動員、および（v）大腸炎の発症を効果的に予防するかまたは阻害することが示された。したがって、本発明によるアゴニストV I S T A抗体は、I B Dならびに関連炎症状態および腸状態の治療に使用され得る。

【0331】

50

4. 狼瘡動物モデルにおける本発明によるV I S T Aアゴニスト抗体の試験

狼瘡は、腎臓炎症、増加したタンパク尿、および脾腫を含む症状を有する自己免疫状態または炎症状態である。4種類の狼瘡のうち、全身性エリテマトーデスまたは(「S L E」)が最も一般的な形態である。この疾患は、軽度または重度であり得、主要器官系に影響を及ぼす可能性がある。狼瘡は、血液から廃棄物を濾過する能力に影響を及ぼす可能性がある、ループス腎炎と呼ばれる腎臓の炎症をもたらし得る原因不明の自己免疫状態であり、かつまたは重度の場合、透析または腎臓移植を必要とする腎臓損傷をもたらし得る。また、S L Eは、呼吸困難を引き起こし得る、肺高血圧症と呼ばれる肺の血圧の増加をもたらし得る。更なるS L Eは、記憶障害、混乱、頭痛、および脳卒中を引き起こし得る神経系および脳の炎症を引き起こし得る。更なるS L Eは、脳の血管内での炎症をもたらし得、これは高熱、発作、および行動変化を引き起こし得る。また、S L Eは、心臓発作につながり得る、冠動脈壁上の沈着物の蓄積である、動脈の硬化または冠動脈疾患をもたらし得る。

10

【0332】

本発明によるアゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体(I N X 9 0 3、 I N X 9 0 1、 I N X 9 0 1 - A、および I N X 9 0 1 - B)および抗マウスV I S T A抗体が試験され、M R L / l p r 狼瘡モデル、N Z B W F - 1 狼瘡モデル、およびB 6 D 2 F モデルを含む異なる狼瘡モデルにおいて有効であることが示された。B 6 D 2 F モデルはマウスモデルであり、S L EはヒトV I S T A ノックインD D E 1 C D 8 枯渴脾細胞(ドナー)のB 6 D 2 F 1 宿主(レシピエント)への移入によって誘発される。このモデルにおいて、ドナーC D 4 T細胞ポリクローナル活性化は、腎疾患につながる同族の宿主B細胞活性化、拡大、および自己抗体の産生を駆動する。B 6 D 2 F 1 モデルに移入されたC D 8 枯渴されたB 6の狼瘡様特徴は、(1)免疫複合体系球体腎炎、(2)抗核a b、(3)抗d s D N A a b、および(4)抗R B C a b(クームズ陽性)を含む。加えて、このモデルは、腎疾患重症度において性別に基づく相違を満たす。

20

【0333】

3つの異なる狼瘡モデルにおいて、アゴニスティックな抗ヒトV I S T A抗体およびマウスV I S T A抗体は、有効であり、狼瘡疾患発症の発生率、疾患の進行を減少させる、タンパク尿レベルを減少させる、腎炎および腎臓損傷を阻害する、T細胞活性化および蓄積を減少させる、B細胞活性化および蓄積を減少させる、ならびに自己抗体産生を阻害することが示された。特に、I N X 9 0 3、 I N X 9 0 1、 I N X 9 0 1 - A、および I N X 9 0 1 - Bは、(i) T細胞増殖および活性化を低減させる、(ii) 同族のB細胞活性化(M H C I I 発現)および蓄積を減少させる、脾腫を減少させる、抗d s D N A I g G自己抗体産生を減少させる、ならびにI型インターフェロンシグネチャを減少させることが示された。また、これらの免疫抑制効果は、抗体のヒトI g G 2 定常領域がA形態またはB形態であったかどうかによって影響を受けなかった。したがって、本発明によるアゴニストV I S T A抗体は、狼瘡ならびに関連炎症状態および自己免疫状態の治療に使用され得る。

30

【0334】

5. 乾癬動物モデルにおけるV I S T Aアゴニスト抗体の試験

40

イミキモド(I M Q D) 誘導性乾癬モデル

乾癬を治療する抗V I S T A抗体の能力は、イミキモド(I M Q D) 誘導性乾癬モデルを使用して評価された。イミキモド(I M Q D) は、ウイルス感染および黒色腫などの皮膚科的状態に広く使用されるT L R 7 / 8 アゴニストを含有する市販のクリームである。複数日にわたる皮膚へのI M Q Dの適用は、ケラチノサイトの増殖を介して表皮の肥厚をもたらす。更に、真皮層への免疫学的浸潤が、T細胞および骨髄細胞両方の集団で生じる。I M Q Dの反復投与は、乾癬を有する患者において観察されるものと類似の皮膚病変を創出する。I L - 1 7 およびI L - 2 3 は、I M Q Dへの免疫応答に關与する主要なサイトカインであると考えられる。

【0335】

50

アゴニスティックな抗マウスV I S T A抗体は、この乾癬モデルにおいて試験され、有効であることが示された。特に、この抗体は、イミキモド処置された皮膚を浸潤するC D 3 + T細胞の数を減少させた。観察された結果に基づき、V I S T Aアゴニスト抗体は、乾癬および他のT細胞媒介性自己免疫状態または炎症性皮膚状態の治療または予防に使用され得る。

【0336】

6. 関節炎動物モデルにおけるV I S T Aアゴニスト抗体の試験

関節炎を治療するための抗V I S T A抗体の免疫抑制効果が異なる動物モデルにおいて試験され得る。アゴニスティックな抗マウスV I S T A抗体および抗ヒトV I S T A抗体が試験され、十分に容認されている関節炎モデル、すなわち、コラーゲン誘導された関節炎またはC I Aモデルにおいて有効であることが示された。I N X 8 0 0、I N X 9 0 1、I N X 9 0 2、およびI N X 9 0 3、ならびにハムスター抗マウス抗V I S T A抗体は、この関節炎モデルにおいて全て試験された。疾患の発症は、経時的に罹患した関節における炎症の腫れを測定することによって評価された。臨床的スコア化は、各腫れた指について1のスコア、腫れた足蹠について5のスコア、腫れた手首または足首について5のスコアを与えることにより(C h a r l e s R i v e r L a b s採点システム)達成され、各動物に関して、合わせて最大60のスコアが与えられる。

【0337】

以下に記載されるように、これらの抗体の各々は関節炎疾患を減少させ、I N X 9 0 1およびI N X 9 0 2は疾患範囲を有意に減少させた。これらの結果に基づいて、抗ヒトV I S T Aアゴニスト抗体は、関節リウマチおよび他の炎症性状態または自己免疫状態の治療または予防に使用され得る。

【0338】

本発明を記載したが、以下の実施例は、本発明およびその固有の利点を更に図示するために提供される。

【実施例】

【0339】

実施例1：免疫抑制抗マウスV I S T A A bをスクリーニングするためのアッセイの使用

本発明者らは、推定上のアゴニスティックな抗マウスV I S T A抗体をスクリーニングするための様々なアッセイを開発した。図1に示されるように、インビトロおよびインビボスクリーニングアッセイを使用して、免疫抑制抗V I S T A m A bを特定した。図1 Aの実験において、精製されたT細胞を、示されるm A bの存在下で、抗C D 3の上で72時間平板培養した。H3組み込みによって増殖を測定した。図1 Bの実験において、精製されたD O 1 1 . 1 0 T細胞を、示される抗体の存在下で6日間、I S QパルスA P Cにより刺激した。増殖をC T V希釈色素を使用して測定した。図1 Cの実験において、G V H Dは、C 5 7 B L / 6細胞を照射されたB A L B / cレシピエントに移入することにより誘発された。移入後0、2、および4日目に200 μ gの抗体をマウスにI . P .注射し、生存を分析した。図1 Dの実験において、C o n A (1 5 m p k)の投与3時間前に、10 m p kの示される抗体でマウスを処置し、L u m i n e xにより6で血漿中のI L - 2を分析した。

【0340】

より具体的には、第1のアッセイにおいて、C D 4 + T細胞を単離し、抗C D 3コーティングされたプレートに添加する前に、A b 1、A b 2、またはA b 3とともにインキュベートした。培養3日後、細胞を増殖することによって組み込まれるトリチウム標識したチミジンで、T細胞をパルスした。注目すべきことに、A b 1およびA b 2の両方がT細胞の増殖速度の著しい減少を誘発し、一方A b 3は効果がなかった(図1)。トランスジェニックT細胞が代わりに抗原パルスA P Cで刺激された類似のアッセイにおいて、T細胞が増殖性色素希釈によって測定された。抗C D 3アッセイと同様に、A b 1は、抗原特異的T細胞増殖を約50%抑制した(図1 B)。これらのデータは、A b 3 m A bがm V I S T A機能を遮断する(すなわち、免疫応答を強化する)一方で、A b 1およびA b

3は、mVISTA機能を刺激し、主要な免疫応答を下方制御することを示す。

【0341】

我々はまた、Ab3およびAb1がインビボ動物モデル、特にGVHDおよびConA肝炎モデルを使用して区別され得るかどうかも決定した。対照抗体(Ham Ig)で処置されたGVHDを有するマウスは、進行性疾患を有し、予想されるように、移植の4週間後までに安楽死される必要があった(図1C)。Ab3処置マウスもGVHDになりやすく、実際、大半のマウスは対照処置群の前に死亡し、Ab3は疾患を悪化させる可能性があることを示す。逆に、Ab1処置されたマウスの全てがGVHDの明白な症状を示さず、ほぼ全てが少なくとも40日間健康であった。具体的に、これらの実験において、対照抗体(Ham Ig)で処置されたGVHDを有するマウスは、進行性疾患を有し、予想されるように、移植の4週間後までに安楽死される必要があった(図1C)。Ab3処置マウスもGVHDになりやすく、実際、大半のマウスは対照処置群の前に死亡し、Ab3は疾患を悪化させる可能性があることを示す。逆に、Ab1処置されたマウスの全てがGVHDの明白な症状を示さず、ほぼ全てが少なくとも40日間健康であった。

10

【0342】

ConAモデルにおいて、本発明者らは、各VISTA抗体がConAに対する十分に特徴付けされたT細胞サイトカイン応答に影響を与えるかどうかを試験した。注目すべきことに、Ab1はIL-2の血漿サイトカインレベルの減少を誘導したが、Ab3は減少させなかった(図1D)。具体的には、ConAモデルにおいて、本発明者らは、各VISTA抗体がConAに対する十分に特徴付けされたT細胞サイトカイン応答に影響を与えるかどうかを試験した。注目すべきことに、Ab1はIL-2の血漿サイトカインレベルの減少を誘導したが、Ab3は減少させなかった(図1D)。

20

【0343】

したがって、これらの結果は、両抗VISTA mAb(Ab1およびAb2)が免疫抑制性であることを示し、かかる免疫抑制性抗マウスVISTA抗体が炎症性免疫抑制性抗マウスVISTA抗体(Ab3)と区別され得ることも示した。図1に示されるように、Ab1は、GVHD、NZB/W F1狼瘡様糸球体腎炎、コンカナバリンA(ConA)誘導性肝炎、コラーゲン抗体誘導性関節炎(CAIA)、およびイミキモド誘導性乾癬を含む、複数の炎症モデルにおいて効果的(免疫抑制性)である。これらの疾患の各々において、疾患の進行中のAb1の投与は、病理および/または死亡率を大幅に減少させた。列記される各モデルは、疾患進行のためにT細胞に独特の要求を有する。GVHDおよびConAは両方とも、Th1 T細胞応答によって駆動される。

30

【0344】

実施例2：異なる自己免疫疾患モデルにおいて自己免疫を抑制する抗VISTA Abの特定

図2A~Fの実験において、異なる抗マウスVISTA Abの効果が再度異なる疾患モデルにおいて比較された。図2Aの実験において、25週目から開始して実験の終わり終了まで、Ab1またはHam Ig(200 µg)のいずれかで、3X/週でNZB/W F1マウスを処置した。「X」は、対照処置群全てが殺された時点を示す。図2Bの実験において、15 mg/kg(mpk)のConAの投与3時間前に、200 µgの抗体でマウスを処置し、生存を80時間追跡した。図2Cの実験において、コラーゲンIImAb、続いてLPSで順次マウスを処置し、足の腫れを測定することによって関節炎を測定した。実験において、Ab1およびHam-Igを1日毎に3x投与した(200 µg)。図2Dの実験において、マウスの耳にイミキモドを毎日適用した。14日目に、Ab1またはHam-Ig(200 µg)を1日毎に投与し、耳の厚さをキャリパスで測定した。同じ図2E~Fの実験において、マウスの背中にイミキモドを毎日適用した。9日目にマウスを安楽死させ、皮膚を切片し、IHCによりCD3発現に関して染色した。

40

【0345】

図2A~Fに示されるように、これらの実験の各々において、特定の疾患の進行中のAb1の投与は、病理および/または死亡率を大幅に減少させた。列記される各モデルは、

50

疾患進行のためにT細胞に独特の要求を有する。GVHDおよびConAは両方とも、Th1 T細胞応答によって駆動される。

【0346】

イミキモド誘導性乾癬は、T細胞が皮膚の皮層に動員されるIL-17/23駆動疾患である。Ab1は、真皮のCD3⁺細胞の数を劇的に減少させるが(図2EおよびF)、脾臓T細胞集団には影響を与えず(データ示さず)、この抗マウスVISTA Abが炎症病変で免疫を優先的に抑制したことを示す。

【0347】

NZB/WF1狼瘡は、B細胞、T細胞、および骨髄細胞からの寄与を有する多因子疾患である。このモデルにおいて、Ab1の治療投与は、腎臓への損傷の減少を示すタンパク尿レベルを減少させた。最後に、CAIAは適応免疫を伴わず、代わりにマクロファージおよび顆粒球によって駆動される。このモデルにおける抗VISTAによる抑制は、抗体が骨髄区画にも影響を及ぼし得ることを示す。したがって、抑制性VISTA mAbは、T細胞および先天性免疫区画の両方に対する効果を媒介するように思える。

10

【0348】

したがって、図1および図2に示されるように、モノクローナルハムスター抗マウスVISTA AbのAb1およびAb2の両方は、T細胞の増殖速度の著しい減少を誘導したが、Ab3は効果を有さなかった(図1)。トランスジェニックT細胞が抗原パルスAPCで刺激された同様のアッセイにおいて、T細胞活性化は、増殖性色素希釈によって測定された。抗CD3アッセイと同様に、Ab1は、抗原特異的T細胞増殖を約50%抑制した(図1B)。これらのデータは、Ab1およびAb2がVISTA機能を刺激し、それにより主要な免疫応答を下方制御することを示唆する。

20

【0349】

特に、Ab1、ハムスター抗マウスVISTA抗体は、GVHD、NZB/WF1狼瘡様系球体腎炎、コンカナバリンA(ConA)誘導性肝炎、コラーゲン抗体誘導性関節炎(CAIA)、およびイミキモド誘導性乾癬を含む、複数の炎症モデルにおいて効果的であった(図1および2)。これらの疾患の各々において、疾患の進行中のAb1の投与は、病理および/または死亡率を大幅に減少させた。列記される各モデルは、疾患進行のためにT細胞に独特の要求を有する。GVHDおよびConAは両方とも、Th1 T細胞応答によって駆動される。上述のように、イミキモド誘導性乾癬は、T細胞が皮膚の皮層に動員されるIL-17/23駆動疾患である。したがって、この特定の自己免疫モデルにおけるAb1による抑制は、この抗体が骨髄区画にも影響を及ぼし得ることを示す。したがって、これらの免疫抑制性抗マウスVISTA mAbは、T細胞および先天性免疫区画の両方に対する効果を媒介するように思える。

30

【0350】

実施例3：アゴニスティックな抗ヒトVISTA Abのスクリーニングに使用するためのヒトVISTAノックインマウスの開発

前の実施例は、アゴニスティックな抗マウスVISTA Abの単離および特徴付けに関する。今まで、アゴニスティックな抗ヒトVISTA Abは、文献において報告されたことがない。非常に多くのアンタゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体が本譲受人および他のグループによって特定されているという事実があってもである。したがって、本発明の前に、アゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体が特定されるかどうかは不明であった。

40

【0351】

現在、免疫応答を抑制するためのNCRの自然機能を利用する承認されているヒト治療薬は存在しないため、かかる抗体は非常に有益であろう。Orencia(CTLA4-Ig)は有効であるが、CD28-B7相互作用および経路を遮断することによってのみ作用し、下方制御経路を刺激することによっては機能しない。続く実施例に示される2つの異なるアゴニスティックな抗VISTA mAbの強力な免疫抑制効果によって図示されるように、この経路の係合は、異なるヒト自己免疫疾患の管理における革命であること

50

を証明し得る。更に、適応性および先天性の両方の自己免疫エフェクター機序に対する抗 V I S T A の免疫抑制の影響は、多くの他の抗炎症剤と区別される。

【 0 3 5 2 】

前述に関して、アゴニスティックな抗ヒト V I S T A A b のスクリーニングにおける望ましく、必要な試薬はヒト V I S T A ノックインマウスであると仮定した。ヒト V I S T A ノックインマウスは、本譲受人により創出された(「hV - K I M o u s e」)。これらの h V - K I マウスは、マウス V I S T A の代わりにヒト V I S T A を発現する。特に、図 3 に示されるように、C D 4 ⁺ T 細胞、C D 8 ⁺ T 細胞、T r e g (C D 4 ⁺ F o x P 3 ⁺)、および単球 C D 1 1 b ⁺、L y 6 C ⁺、L y 6 G ⁻ を、W T および V I S T A K I マウスのリンパ節から単離し、それぞれ、マウスまたはヒトタンパク質に対して V I S T A 抗体で染色した。h V - K I の発現パターンは、C D 4 ⁺ および C D 8 ⁺ T 細胞として W T マウスにおいて見られるものと同一であり、制御 T 細胞および単球は全て、2 つの株間で一貫した量の表面タンパク質を発現する(図 3 を参照のこと)。

10

【 0 3 5 3 】

加えて、h V - K I マウスは、V I S T A K O マウスにおいて観察される炎症性疾患のいかなる兆候も発症せず、h V I S T A がマウス免疫系内で完全に機能することを示す(データ示さず)。したがって、このマウスモデルは、免疫抑制性 m A b をスクリーニングするために、異なるアッセイで使用され得る。

【 0 3 5 4 】

実施例 4 : 推定上のアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体の合成

20

異なる抗ヒト V I S T A 抗体の配列は、図 4 に含まれる。これらの抗体は、ヒト V I S T A、例えば V S T B 4 9 - V S T B 1 1 6 に特異的に結合し、V I S T A アンタゴニスト特性を有する、すなわち、これらの抗体は、I g G 1 フォーマットであるとき、例えば、抗体が野生型、すなわち未修飾である I g G 1 F c 領域を含む場合、V I S T A の免疫への抑制効果を阻害する。

【 0 3 5 5 】

抗体の中でも図 4 で特定されるのは 1 E 8 である。このマウス抗ヒト V I S T A 抗体は、以下に記載される可変重鎖および軽鎖ポリペプチドを含み、本発明者らにより 2 つのヒトキメラ形態に変換された。本明細書において I N X 8 0 0 と称される第 1 のキメラ抗体は、ヒト I g G 2 重鎖および軽鎖定常領域ポリペプチドの 1 E 8 可変重鎖および軽鎖ポリペプチドへの結合によって得られた。この第 1 のキメラ抗体において、I g G 2 定常領域内のアミノ酸残基のいずれも修飾されなかった。

30

【 0 3 5 6 】

本明細書において I N X 8 0 1 と称される第 2 のキメラ抗体は、同様に、ヒト I g G 2 重鎖および軽鎖定常領域ポリペプチドの 1 E 8 可変重鎖および軽鎖ポリペプチドへの結合によって得られた。この第 2 のキメラ抗体において、ヒト I g G 2 カッパ鎖内の 1 2 7 位のシステイン残基をセリンに変換した。さもなければ、I g G 2 定常領域内のアミノ酸残基のいずれも修飾されなかった。

I E 8 V_H ポリペプチド

E V K L L E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F D F S R Y W M S W V R Q A
P G K G L E W I G E V Y P D S S T I N Y T P S L K D K F I I S R D N A K N T L Y
L Q M I K V R S E D T A L Y Y C A R G R G D Y W G Q G T S V T V S S (配列番号 :
5 7)

40

I E 8 V_L ポリペプチド

D I Q M T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G N I H N Y L S W Y H Q K Q
G K S P Q L L V Y N A K T L A D G V P S R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q P
E D F G S Y Y C Q N F W S T P F T F G S G T K L E I K R (配列番号 : 5 8)

【 0 3 5 7 】

実施例 5 : C o n A 動物モデルにおける推定上のアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体の評価

50

キメラ I g G 2 抗体および対照抗体両方の効果を、コンカバリン A 肝炎モデルにおいて比較した。このインビボモデルにおいて、異なる動物を、コンカバリン A 投与の 3 時間前に、10 mg / kg のいずれかのキメラ I g G 2 抗体 (I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1)、または対照抗体で前投薬した。抗体投与 3 時間後、マウスを、12 mg / kg の C o n A で投薬した。次いで、これらの動物および対照を、C o n A 投薬 6 時間後に心穿刺により出血させた。マウスの全ては良好であるように見え、明らかな罹患または死亡はなかった。

【 0 3 5 8 】

次いで、サイトカイン発現について血液を分析した。特に、慣例的にサイトカイン分析に使用される従来の方法およびサイトカイン試験キットを使用して、収集した血液試料から得た血漿を使用して、32 - p l e x を実行した。図 5 に示されるように、いくつかの炎症誘発性サイトカインの発現は、対照動物と比較して、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 の抗体を投与された動物において著しく抑制された。特に、G M - C S F、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 17、および T N F - レベルは全て、対照と比較して、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 処置動物において著しく低かった。これらのサイトカインの発現の [減少] は、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 処置動物において実質的に同一であった。

10

【 0 3 5 9 】

また、ある特定のケモカイン (ケラチノサイト由来ケモカインまたは「 K C 」) およびマクロファージ炎症性タンパク質 2 (M I P - 2) の発現は、対照と比較して、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 処置動物において実質的に増加した。同様に、これらのタンパク質の発現の [増加] は、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 処置動物において実質的に同一であった。これらの結果に基づいて、I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 の両方は、V I S T A が様々な炎症性サイトカインの発現を誘発する類似の免疫抑制効果を誘発するように思われるため、強力な V I S T A アゴニストであるように思われる。

20

【 0 3 6 0 】

実施例 6 : 移植片対宿主病 (G V H D) 動物モデルにおける推定上のアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体の評価

同じ推定上のアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体 I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 の効果も、未処置の動物または無関係な抗体で処置された対照と比較した移植片対宿主病 (G V H D) 動物モデルにおいて比較された。この動物モデルにおいて、T 細胞を照射宿主に養子移入し、体重を疾患の読み取りとして測定した。G V H D 疾患の進行に基づいて、対照マウスの全て (8 / 8) を安楽死させなければならなかった。これらの動物研究の結果を図 6 に示す。示されるように、G V H D は I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 抗体での処置の結果として大幅に抑制されたため、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 [0 / 8] 処置マウスのいずれも安楽死させる必要がなかった。これらの結果に基づいて、I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 の両方は、G V H D 免疫応答を強力に抑制するように思われるため、強力な V I S T A アゴニストであるように思われる。

30

【 0 3 6 1 】

実施例 7 : C D 3 駆動 T 細胞免疫応答に対する推定上のアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体の効果

40

同じアゴニスティックな抗ヒト V I S T A 抗体 I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 の効果も、C D 3 駆動 T 細胞免疫応答を抑制するそれらの可能性に関して比較された。これらの実験において、プレートを O K T 3 (2 . 5 μ g / m l) でコーティングした。T 細胞を、抗体とともに 30 分間事前インキュベートした。次いで、抗体処理された T 細胞を、O K T 3 コーティングしたプレートに添加し、これらのプレート上で 72 時間、T 細胞を培養した。C D 3 駆動 T 細胞免疫応答に対する抗体の可能な効果の読み取りとして、T 細胞増殖を検出するための十分に受け入れられている方法であるトリチウム組み込み方法を使用して、T 細胞増殖を決定した。図 7 に示されるように、T 細胞増殖は、対照 T 細胞培養物と比較して、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 抗体で処理した培養 T 細胞において大幅

50

に減少した。

【0362】

実施例8：特定のT細胞集団およびT細胞総数に対する推定上のアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体の効果

実験は、同じ抗ヒトVISTA抗体INX800およびINX801の、特定のT細胞の数ならびにT細胞総数への可能な効果を比較するために影響を受けた。これらの実験は、対象抗ヒトVISTA抗体のサイトカインおよびT細胞への観察された効果が、免疫へのそれらの特異的VISTA媒介免疫抑制効果の促進に基づく免疫抑制効果を誘発する3つの抗体ではなく細胞枯渇（非特異的効果）に起因し得るかどうかを評価するために行われた。

10

【0363】

アゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体INX800およびINX801の両方は、特定のT細胞集団の数またはT細胞総数に有意な効果はなかった。更に、INX800およびINX801抗体の両方の結果は、実質的に同じであった。例示的な実験の結果は図8にある。

【0364】

それに基づき、INX800およびINX801の観察されたアゴニスティックな効果は、細胞枯渇に起因するように思われたい。むしろ、これらの抗体の両方は、T細胞活性化/増殖に対する免疫抑制効果、GVHD免疫応答、および免疫へのそれらの特異的VISTA媒介免疫抑制効果の促進に基づく炎症誘発性サイトカインの発現を誘発するように思われる。

20

【0365】

実施例9：異なる免疫モデルにおける異なるアゴニスティックな抗ヒトVISTA Abの効果の要約

以下の表1および2に示されるように、図4にある配列を有する配列を有する異なる抗ヒトVISTA抗体のアゴニスティックな効果または免疫抑制効果が評価された。今までに、12の異なるキメラ抗ヒトVISTA抗体が免疫抑制性であることが示されている。得られた結果のうちのいくつかを表に要約する。ピン1の抗体全てがヒトVISTAへの結合に関して競合するが、ピン2の抗体とはVISTA結合に関して競合しない。逆に、ピン2の抗ヒトVISTA抗体全てが互いにヒトVISTAへの結合に関して競合するが、ピン1の抗体とは競合しない。

30

【0366】

「不明瞭」と表示される表2の抗体は、同じアッセイにおける免疫抑制効果を含む異なる効果を誘発したか、または他の理由のため曖昧な結果を誘発した。表1および2に示されるように、MLRアッセイもしくはConAアッセイならびに/または他のインビトロアッセイおよびインビボアッセイにおいて、あるいは自己免疫疾患、炎症性疾患、もしくはGVHD疾患モデルにおいて免疫抑制性であり、ヒトVISTAの免疫抑制効果を模倣するか、または刺激する、合計12の抗ヒトVISTA抗体が単離された。これらの結果に基づき、他の抗ヒトVISTA抗体が、同じまたは異なるVISTAエピトープ特異性を有するものを含む類似の方法によって得ることができることが予想される。

40

【0367】

また、図9の実験は、ConAアッセイにおける、異なる抗ヒトVISTA抗体の、ならびに選択炎症誘発性サイトカインおよび炎症マーカー、すなわち、IL-2、インターフェロン、およびIL-12p70の発現への効果を比較する。

50

【表 1 - 1】

表1(ヒトまたはヒト化抗ヒトVISTA抗体)

mAb ID	エピトープ群	起源	第1の アッセイ IgG1 として MLR増殖	Kd, M	状態	MLRおよび ／または ConA Hep アッセイに おけるIgG2 としての抑制	第2の アッセイ IgG1 として MLR増殖)
INX903 VSTB 95	1	HFA Hybr (His)	++	1. 26 E-10	免疫抑制に 関して試験 された	+	
INX904 VSTB 103	1	フージ、 元	-	6. 36 E-10	免疫抑制に 関して試験 された	+/-	あり
INX905 VSTB 53	1	HFA Hybr (Fc)	++	2. 64 E-11	免疫抑制に 関して試験 された	++	
INX908 VSTB 92	1	HFA Hybr (Fc)	++	9. 34 E-11	**免疫抑 制に 関して 試験された	++	
INX900 VSTB 50	2	HFA Hybr (Fc)	++	6. 32 E-10	免疫抑制に 関して試験 された	+/-	
INX901 VSTB 56	2	HFA Hybr (Fc)	+/-	2. 35 E-11	免疫抑制に 関して試験 された	++	あり
INX902 VSTB 63	2	HFA Hybr (Fc)	+/-	8. 30 E-10	免疫抑制に 関して試験 された	++	あり
INX906 VSTB 54	2	HFA Hybr (Fc)	+/-	2. 53 E-11	免疫抑制に 関して試験 された	++	
INX907 VSTB 66	2	HFA Hybr (Fc)	+/-	8. 06 E-11	免疫抑制に 関して試験 された	+	あり
INX909 VSTB 67	1	HFA Hybr (Fc)	+/-	6. 29 E-11	試験される		

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

mAb ID	エピトープ群	起源	第1のアッセイ IgG1 として MLR増殖	Kd, M	状態	MLRおよび /または ConA Hep アッセイにおけるIgG2 としての抑制	第2のアッセイ IgG1 として MLR増殖)
INX913 VSTB 85	1	HFA Hybr (Inter FAD)	++	3.78 E-11	試験される		
INX914 VSTB 97	1	ファージ、 元	+/-	7.68 E-10	試験される		
INX915 VSTB 106	1	ファージ、 ILM	+/-	1.67 E-10	試験される		
INX916 VSTB 107	1	ファージ、 ILM	++	8.90 E-11	試験される		
INX917 VSTB 110	1	ファージ、 ILM	+/-	2.02 E-10	試験される		
INX918 VSTB 113	1	ファージ、 ILM	++	4.33 E-11	試験される		
INX919 VSTB 115	1	ファージ、 ILM	+/-	1.45 E-10	試験される		あり
INX910 VSTB 73	2	HFA Hybr (His)	+/-	2.26 E-09	試験される		あり
INX911 VSTB 76	2	HFA Hybr (His)	+/-	1.31 E-09	試験される		
INX912 VSTB 84	2	HFA Hybr (Inter FAD)	+	2.03 E-09	試験される		

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

mAb ID	エピトープ群	起源	第1のアッセイ IgG1 として MLR増殖	Kd, M	状態	MLRおよび ／または ConA Hep アッセイに おけるIgG2 としての抑制	第2の アッセイ IgG1 として MLR増殖)
VSTB 100	1	ファージ、 元	+／-	1.48 E-09			
VSTB 101	1	ファージ、 元	+／-	3.18 E-09			
VSTB 102	1	ファージ、 元	+／-	2.98 E-09			
VSTB 104	1	ファージ、 元	+	6.75 E-10			
VSTB 105	1	ファージ、 ILM	+	1.15 E-10			
VSTB 108	1	ファージ、 ILM	+	4.94 E-10			
VSTB 109	1	ファージ、 ILM	+／-	1.02 E-10			
VSTB 111	1	ファージ、 ILM	++	1.71 E-10			
VSTB 112	1	ファージ、 ILM	++	1.56 E-10			
VSTB 114	1	ファージ、 ILM	++	1.52 E-10			
VSTB 116	1	ファージ、 ILM	++	2.13 E-10			
VSTB 49	1	HFA Hybr (Fc)	+	5.07 E-10			
VSTB 51	1	HFA Hybr (Fc)	++	1.04 E-10			
VSTB 59	1	HFA Hybr (Fc)	+	1.06 E-10			

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

mAb ID	エピトープ群	起源	第1のアッセイ IgG1 として MLR増殖	Kd, M	状態	MLRおよび /または ConA Hep アッセイにおけるIgG2 としての抑制	第2のアッセイ IgG1 として MLR増殖)
VSTB 65	1	HFA Hybr (Fc)	++	1. 08 E-09			
VSTB 70	1	HFA Hybr (His)	+/-	2. 23 E-09			
VSTB 81	1	HFA Hybr (Inter FAD)	+/-	3. 12 E-10			
VSTB 98	1	ファージ、元	+	2. 28 E-09			
VSTB 99	1	ファージ、元	+/-	1. 54 E-09			
VSTB 60	2	HFA Hybr (Fc)	+	3. 56 E-10			
VSTB 78	2	HFA Hybr (Inter FAD)	++	1. 13 E-09			
VSTB 74	4	HFA Hybr (His)	-	5. 62 E-10			

10

20

30

【表 2】

表2(マウス抗ヒトVISTA抗体)

抗体	ピン	抑制性?	MLR増殖	Kd, M
1E8*	1	あり	++	NT
GG8	1	あり	++	NT
GA1	2	不明瞭	—	NT

*2つの異なるIgG2形態において免疫抑制性であることを示す。

40

【0368】

実施例10：B細胞エピトープマッピングによる抗ヒトVISTA抗体のエピトープの決定

いくつかの推定上のアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体のエピトープ特異性は、独自の方法 [ProArray Ultra (商標)] を使用して、ヒトVISTAの断片を使用したカスタムペプチドアレイを使用して決定された。本質的に、ペプチド-抗体結合の決定は、ProArray Ultra (商標) ペプチドマイクロアレイとともに抗体試料をインキュベートし、続いて、蛍光標識された二次抗体とともにインキュベートすることにより行われた。いくつかの洗浄ステップの後、ProArray Ultra

50

(商標)アレイを乾燥させ、高解像度蛍光マイクロアレイ走査を使用して走査した。

【0369】

全てのペプチド(下に列記される)は、別個に合成され、次いで、ProImmune独自の技術を使用して、ProArray Ultra(商標)スライド表面に結合される。この最適化プロセスは、ペプチドが、対応するタンパク質領域の特性を厳密に模倣するような様式でアレイ上に提示され、遊離ペプチド自体の固有の生理化学的差異を回避し、適合性のある組み合わせられたペプチドおよびタンパク質アレイプラットフォームを作製することを確実にする。試験分析物(ペプチドおよびタンパク質)は、別のスポットのProArray Ultra(商標)スライド上に分配され、適切なgalファイルは、得られるアレイ特徴の正確な整列を沈着させた分析物に戻ることができる。

10

【0370】

ペプチド-抗体結合は、ProArray Ultra(商標)スライドとともに抗体試料(顧客によって提供される)をインキュベートし、続いて、蛍光標識された二次抗体とともにインキュベートすることによって決定される。最終インキュベーションおよび洗浄ステップ後、マイクロアレイを乾燥させ、高解像度マイクロアレイ走査システムにおいて走査する。

【0371】

蛍光標識されたProArray Ultra(商標)スライドを走査した後、スキャナは、走査したマイクロアレイスライド上の各蛍光スポットに関連する蛍光強度のレベルの解釈および定量化を可能にする画像分析ソフトウェアを使用して評価される画像を記録する。ペプチドマイクロアレイは、ヒトVISTAポリペプチド配列から合成される重なるペプチドライブラリに基づいた。配列に基づき、12個のアミノ酸が重なる15量体マイクロアレイペプチドを、ProImmune's ProArray Ultra(商標)技術を使用して生成した。合成されたペプチドの詳細は、表3(以下)に列記される。「位置」は、ペプチドが由来するポリペプチド配列内の開始および終了アミノ酸を指す。合成ペプチドは、6つ組スポットにおいて、それぞれ試験ペプチドおよび対照特徴を含む、24の同一のサブアレイのProArray Ultra(商標)スライド上に固定された。ペプチドは、以下の表3に示される。

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表3:ProArray Ultra (商標) ペプチドの詳細

ペプチドID	位置	配列	
1	1-15	FKVATPYSLYVCPEG (配列番号:7)	
2	4-18	ATPYSLYVCPEGQNV (配列番号:8)	
3	7-21	YVCPEGQNVTLTCRL (配列番号9)	
4	10-24	YVCPEGQNVTLTCRL (配列番号10)	
5	13-27	PEGQNVTLTCRLLGP (配列番号11)	
6	16-30	QNVTLTCRLLGPVDK (配列番号:12)	
7	19-33	TLTCRLLGPVDKGHD (配列番号:13)	10
8	22-36	CRLGPDVDKGHDVTF (配列番号:14)	
9	25-39	LGPVDKGHDVTFYKT (配列番号:15)	
10	28-42	VDKGHDVTFYKTWYR (配列番号16)	
11	31-45	GHDVTFYKTWYRSSR (配列番号17)	
12	34-48	VTFYKTWYRSSRGEV (配列番号18)	
13	37-51	YKTWYRSSRGEVQTC (配列番号19)	
14	40-54	WYRSSRGEVQTCSE (配列番号20)	
15	43-57	SSRGEVQTCSEERRPI (配列番号21)	
16	46-60	GEVQTCSEERRPIRNL (配列番号22)	
17	49-63	QTCSEERRPIRNLTFQ (配列番号23)	20
18	52-66	SERRPIRNLTFQDLH (配列番号24)	
19	55-69	RPIRNLTFQDLHLHH (配列番号25)	
20	58-72	RNLTFQDLHLHHGGH (配列番号26)	
21	61-75	TFQDLHLHHGGHQAA (配列番号27)	
22	64-78	DLHLHHGGHQAAANTS (配列番号28)	
23	67-81	LHHGGHQAAANTSHDL (配列番号29)	
24	70-84	GGHQAAANTSHDLAQR (配列番号30)	
25	73-87	QAANTSHDLAQRHGL (配列番号31)	
26	76-90	NTSHDLAQRHGLESA (配列番号32)	
27	79-93	HDLAQRHGLEASDHD (配列番号33)	
28	82-96	AQRHGLEASDHHGN (配列番号34)	30
29	85-99	HGLEASDHHGNFSI (配列番号35)	
30	88-102	ESASDHHGNFSITMR (配列番号36)	
31	91-105	SDHHGNFSITMRNLT (配列番号37)	
32	94-108	HGNFSITMRNLTL (配列番号38)	
33	97-111	FSITMRNLTL (配列番号39)	
34	100-114	TMRNLTL (配列番号40)	
35	103-117	NLTL (配列番号41)	
36	106-120	LL (配列番号42)	
37	109-123	SGLYCCLVVEIRHHH (配列番号43)	
38	112-126	YCCLVVEIRHHHSEH (配列番号44)	40

【表 3 - 2】

39	115-129	LVVEIRHHHSEHRVH(配列番号45)
40	118-132	EIRHHHSEHRVHGAM(配列番号46)
41	121-135	HHHSEHRVHGAMELQ(配列番号47)
42	124-138	SEHRVHGAMELQVQT(配列番号48)
43	127-141	RVHGAMELQVQTGKD(配列番号49)
44	130-144	GAMELQVQTGKDAPS(配列番号50)
45	133-147	ELQVQTGKDAPSNVCV(配列番号51)
46	136-150	VQTGKDAPSNVCVVYP(配列番号52)
47	139-153	GKDAPSNVCVVYPSSS(配列番号53)
48	142-156	APSNVCVVYPSSSQDS(配列番号54)
49	145-159	NCVVYPSSSQDSENI(配列番号55)
50	148-162	VYPSSSQDSENITAA(配列番号56)

10

【0372】

特定の抗ヒトVISTA抗体でのこのエピトープ分析の結果は、図4および以下の実施例に要約される。

【0373】

実施例11：エピトープ結合アッセイ

20

加えて、図4に示される配列を有するいくつかの抗ヒトVISTA抗体のエピトープ結合特性は、これらの抗体を、以下に記載されるそれらの結合特徴に基づく異なるエピトープ「ピン」に配置することによって特徴付けられた。

【0374】

方法：エピトープピンングを実施するために、Protein XPR36システム(BioRad)を使用した。Protein GLCチップ(BioRad、カタログ#176-5011)を、アミンカップリング化学物質(BioRad、カタログ#176-2410)の製造業者の指示を用いて、2セットの6つのモノクローナル抗体(mAb)でコーティングした。競合mAbを、室温で4時間、ヒトVISTAとともに過剰(250nM最終濃度)で事前インキュベートし、同時に6つが、4分間の会合時間、続いて5分間の解離時間で、コーティングされたmAbのパネルでコーティングされたチップ上で実行された。各実行後、チップを、100nMリン酸で再生した。

30

【0375】

データ分析は、全てのセンサグラムをリガンドにより分類し、XおよびY軸アラインメントを自動的に実施するアラインメントウィザード、およびアーチファクト除去を適用することを伴う。次いで、Interspot補正をデータに適用した。

【0376】

非競合mAbは、同じまたは>A1シグナル(ヒトVISTAのみへの結合)の結合シグナルを有すると定義された。競合mAbは、A1シグナル(すなわち、ヒトVISTAのみへの結合)の結合シグナルを有すると定義された。例えば、VISTAと複合体化されたVSTB49およびVSTB51は、チップ上にコーティングされたVSTB85に結合しなかったため、VSTB85とVISTA上の同じ結合部位に関して競合すると分類された。特定の抗ヒトVISTA抗体でのこのピンング分析の結果は、図4に要約される。

40

【0377】

実施例12：水素/重水素(H/D)交換研究を使用した抗VISTA抗体のエピトープマッピング

抗VISTA抗体の抗体エピトープは、アラニンスキヤニングおよび水素/重水素(H/D)交換ならびに前の実施例に記載される重なるペプチドアレイなどの様々な方法によって特定され得る。推定上のアゴニスティックな抗ヒトVISTA抗体のエピトープを特定

50

するための別の例示的な手段が以下に記載される。

【0378】

ヒトVISTA上のVSTB50、60、95、および112についてのエピトープを特定するために、対応するFabを使用して、溶液水素/重水素交換質量分析法(HDX-MS)を実施した。H/D交換に関して、Fab撰動を分析するために使用される手順は、いくつかの修正を伴って、以前に記載されるものと類似した(Hamuro et al, J. Biomol. Techniques 14:171-182, 2003, Horn et al, Biochemistry 45:8488-8498, 2006)。Fabは、Pierce Fab調製キット(Thermo Scientific、カタログ#44985)を使用してパパイン消化およびプロテインA捕捉を用いてIgGから調製された。ヒトVISTAタンパク質配列は、6つのN連結グリコシル化部位を含有する。配列占有率を改善するために、タンパク質をPNGase Fで脱グリコシル化した。脱グリコシル化VISTAタンパク質を重水素化水溶液中で既定の時間の間インキュベートし、交換可能な水素原子において重水素組み込みをもたらした。重水素化VISTAタンパク質を、4で30秒間、2分間、10分間、および60分間、46重水(D20)において、VSTB50、VSTB60、VSTB95、またはVSTB112のFabと複合体化した。交換反応を低pHでクエンチし、タンパク質をペプシンで消化した。特定されたペプチドにおける重水素レベルを、LC-MSでの質量シフトから監視した。参照対照として、Fab分子と複合体化されなかったことを除いて、VISTAタンパク質を同様に処理した。Fabに結合する領域は、交換から比較的保護されたそれらの部位であると推測されるため、参照VISTAタンパク質よりも高い分画の重水素を含有する。約94%のタンパク質が特定のペプチドにマッピングされ得る。

【0379】

VSTB50/VSTB60およびVSTB95/VSTB112とのVISTAの溶液HDX-MS撰動マップをマッピングし、2つのエピトープ群を特定した。抗VISTA VSTB50はVSTB60と同じエピトープを認識し、VSTB95は、VSTB112がVISTA上で結合するのとは別のエピトープ領域に結合する。抗VISTA VSTB50および60は、セグメント103 NLTLLDSGL111(配列番号59)を含む同じエピトープを共有し、136VQTGKDAPSN146(配列番号60)抗VISTA VSTB95およびVSTB112は、セグメント27PVDKGH DVTF36(配列番号61)および54RRPIRD LTFQDL65(配列番号62)を含む類似のエピトープを標的とするように思われる。これらのHDX-MSの結果は、図4に特定される配列を有する例示的な抗VISTA抗体のペプチドレベルエピトープを提供する。重なるエピトープ領域はこれら2つの領域のエピトープ群にはなかった。これらの結果は、それらが互いに競合しないという点で前の競合マッピングデータと一致する。再度、本明細書に記載されるように分析された様々な抗ヒトVISTA抗体のエピトープ分析結果は、図4に要約される。

【0380】

実施例13：異なるインビトロモデルおよびインビボモデルにおける - ヒトVISTA抗体INX901アゴニスト上のヒトIgG2骨格の役割/免疫抑制活性の評価

ネイティブなヒトIgG2骨格上の抗体は、重鎖ヒンジ、CH1、および軽鎖に存在するシステイン間のジスルフィド結合シャフリングによって生じたアイソフォームの混合物として存在する(Zhang, A., (2015), "Conformational difference in human IgG2 disulfide isoforms revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry", Biochemistry, 54(10), 1956-1962; Figure 10)。これらのアイソフォームは、Dillon et al., "Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing rec

ombinant antibody heterogeneity and stability”, J Chromatography A, 1120(1), 112-120によって開発された方法に基づいて、RP-HPLC(図10)によって評価された。最適化方法は、Dillon(同上)のものと比較して、より浅くかつより高い有機移動相B含量を使用した。INX901から濃縮された別個のA形態およびB形態は、Dillon(同上)に報告される条件に厳密に従って調製されたが、DPBSに交換し戻された緩衝液と組み合わせられ、内毒素除去手順が濃縮反応後に用いられた(図11)。

【0381】

これらの実験を調製する過程において、A濃縮形態の復帰が予想より迅速に、かつ予想より低い残留酸化還元試薬濃度で生じることが観察された。したがって、高速スピン、サイズ排除に基づく脱塩手順の利用が用いられ、これにより、この復帰が大幅に防止されるように思われた。図10のパネル(A)に示されるように、ジスルフィドシャフリングは、A/Bの移行とともに、アイソフォームAおよびBをもたらす(Zhang, Aら、2015から再現された)。(B)アイソフォームは、RP-HPLCにより区別可能である(Zhang, A. et al., 2015からの図)。(C)INX901の観察されたRP-HPLCクロマトグラム。

【0382】

IgG2アイソフォームを検出するための発明者らの最適化RP-HPLC方法を以下に記載する。図11において：(黒色線、上部)クロマトグラムはB形態を画定する優勢な最左ピークを示す。(赤色線、下部)クロマトグラムはA形態を画定する優勢な右ピークを示す。

アイソフォーム検出のための最適化RP-HPLC方法

移動相Aの調製(水中0.1%v/v TFA)：

1. 1.0Lのメスシリンダーに1.0LのMilli-Q水を量り入れた
2. 1mLのガラスのHamiltonシリンジを使用して、1Lの水に1.0mLのTFAを添加した
3. 溶液を1L瓶に移し、十分に混合した。
4. 満了は調製の2週間後である

移動相Bの調製(70%v/v IPA、20%v/v ACN、9.9%v/v水、0.1%v/v TFA)：

1. 1.0Lのメスシリンダーに700mLのIPAを量り入れた
2. 250mLのメスシリンダーに200mLのACNを量り入れ、700mLのIPAを含有する1.0Lのメスシリンダーに移した
3. 液体が1.0Lのマークに達するまで、700mLのIPAおよび200mLのACNを含有する1.0LのメスシリンダーにMilli-Q水を添加した
4. 1mLのガラスのHamiltonシリンジを使用して、1Lの水に1.0mLのTFAを添加した
5. 溶液を1L瓶に移し、十分に混合した。
6. 満了は調製の2週間後である

RP-HPLCクロマトグラフィー条件

1. カラムA(大口径)：Zorbax 300SB-C8、5 μ m、2.1x150mm、<<OR>>
2. カラムB(狭口径)：Zorbax 300SB-C8、3.5 μ m、1x50mm
3. 移動相A：水中0.1v/v TFA
4. 移動相B：70%v/v IPA、20%v/v ACN、9.9%v/v水、0.1%v/v TFA
5. 流量：カラムAについては0.5mL/分、またはカラムBについては0.25mL/分
6. カラムコンパートメント：75.0 \pm 1.0
7. 検出：214nm

8. R P - H P L C 移動相勾配 (以下の表)

【表 4】

時間(分)	移動相B%
0	15
2	26
34	36
35	75
36	15
40	15

10

I N X 9 0 1 ジスルフィドアイソフォーム濃縮方法

【表 5 - 1】

B形態濃縮

1. 内毒素不含非発熱性チューブに、以下を添加する:
 2. 1mLのINX901 (5.66mg/mL)
 - 792.6 μ Lの1MトリスpH8.0
 - 495.4 μ Lの内毒素不含水
 - 396.3の追加の内毒素不含水
 - 237.8 μ Lの100mMシステイン
 - 39.6 μ Lの100mMシスタミン
2. フィンガーボルテックス(軽く)、次いで2~8°Cで24時間キャップする
3. 室温で2時間、0.3M NaOH中にPall microsepスピンコンセントレータを浸漬し、次いで10×DPBSで3×、その後内毒素不含水で3回すすいだ。使用前にBSCで風乾させた
4. 0.5mLの内毒素除去カラムを再生するための業者の指示に従い、0.2N NaOH/95%エタノール(室温で2時間)を使用する。ステップ3のオプション:最終平衡化緩衝液として1×DPBSを使用した
5. 別個のPALL microsep(上で調製されるように)において、約4,020 μ Lの反応物(ステップ2から)を濃縮した。
6. 35分間、2,500X Gで0.4mL($\geq 10X$)に濃縮し、次いで4mLの1×DPBSで再希釈し、更に2回繰り返した
7. 15分間、2,500X Gで2mL未満に濃縮し、次いで1×DPBSを添加して2mLに戻した
8. 2mLの緩衝液交換試料全てを、再生し、スピン乾燥させ、底部キャップした内毒素除去カラムに添加し、上部をしっかりキャップし、倒置し、室温に設置し、約20分間毎に更に3回倒置し、次いで試料を非発熱性チューブにスピナウトさせ(業者の指示のとおり、500X Gで1分間)、2~8°Cに設置した。

20

30

40

50

【表 5 - 2】

A形態濃縮

1. 内毒素不含非発熱性チューブに、以下を添加する:
 1750 μ LのINX901 (6. 2mg/mL)
 370 μ Lの内毒素不含水
 700 μ Lの1MトリスpH8. 0
 435 μ Lの8M GdCl
 210 μ Lの0. 1MシステインHCl(1Mストックから新たに作製)
 35 μ Lの0. 1Mシスタミン-2HCl(1Mのストックから新たに作製)
 (最終容量3500 μ L) 10
2. フィンガーボルテックス(軽く)、次いで2~8°Cで24時間キャップする
3. 業者の指示のとおり、#7-2mL Zebaスピンカラム(Thermo P/N 89890)を調製し、1Xダルベッコリン酸緩衝食塩水(DPBS)中に平衡化した。
4. 500 μ Lの上記の反応混合物を#7の各々に充填し、1000X G(同様に業者の指示のとおり)で2分間スピンし、清潔な発熱物質不含チューブに収集した。
5. 脱発熱化PALL microsepに設置し、合計1時間10分スピンし、約5mg/mLで約1. 7mLに濃縮した
6. 上記の約1. 7mL全てを、業者の指示のとおり(室温で、0. 2M NaOHで一晩を含む)調製された1つの0. 5mLの内毒素除去スピンカラム(Thermo P/N 88274)に添加し、1XDPBS中に平衡化した。室温で約1時間放置し、次いで更に約1時間4°Cに設置し、両方の場合において、キャップしたチューブを約15分毎に倒置した。 20
7. 500X Gで1分間スピンことによって調製物を回収した(同様に業者の指示のとおり)。
8. 回収した容量:4. 61mg/mLで約1. 3mL(全ての濃度は0. 73のNanoDrop's内蔵IgG吸光係数に基づく)

【0383】

IgG2 A - およびBロック変異型

IgG2のアミノ酸配列に対する特定の置換は、ジスルフィドシャフリングを防止することができ、変異に応じて、A様またはB様のいずれかであるロック立体構造をもたらす(Martinez, et al., (2008). "Disulfide connectivity of human immunoglobulin G2 structural isoforms", Biochemistry, 47(28), 7496-7508, Allen, et al., (2009), "Interchain disulfide bonding in human IgG2 antibodies probed by site-directed mutagenesis", Biochemistry, 48(17), 3755-3766. 30

【0384】

したがって、本発明者らは、White et al., (2015), "Conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies", Cancer Cell, 27(1), 138-148によって使用されるIgG2変異型と一致するように、C233S(A-ロック)またはC127S(B-ロック)変異(Eu付番)のいずれかを有するINX901およびINX908変異型を設計した。 40

【0385】

定常重鎖配列を以下に列記する。

IgG2 C233S(A-ロック)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
 VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(配列番号 6 3)

I g G 2 C 1 2 7 S (B - ロック)

ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
 VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

(配列番号 6 4)

【 0 3 8 6 】

サイレント F c 変異型

本発明者らは、I g G 1 骨格上に次の点変異を導入することによって、サイレント F c 領域を有する I N X 9 0 1 および I N X 9 0 8 変異型を設計した。L 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 A / H 2 6 8 A / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S (M c C a r t h y e t a l . , (2 0 1 5) 米国特許出願第 1 4 / 8 1 8 8 6 4 号。W a s h i n g t o n , D C : U . S . 。一 種 類 の 変 異 型 (I N X 9 0 1 S i お よ び I N X 9 0 8 S i) に お いて、重定常領域の C H 1 / ヒンジ領域は、天然 I g G 2 のジスルフィドシャフリングを支持しない天然 I g G 1 である (図 1 2 、 中央) 。第 2 の種類の変異型 (I N X 9 0 1 H S i および I N X 9 0 8 H S i) に お いて、C H 1 / ヒンジ領域は、ジスルフィドシャフリングを支持する天然 I g G 2 である (W h i t e , A . L . ら、2 0 1 5) (図 1 2 、 下部) 。両方の種類の変異型の定常重鎖配列を以下に列記する。

20

サイレント F c を有する I g G 1 (I N X 9 0 1 S i および I N X 9 0 8 S i)

30

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGA
 SSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(配列番号 6 5)

I g G 2 C H 1 / ヒンジ + I g G 1 サイレント F c (I N X 9 0 1 H S i および I N X 9 0 8 H S i)

40

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPEAAGASSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(配列番号 6 6)

【 0 3 8 7 】

図 1 2 の実験は、ジスルフィドシャフリングに関する I N X 9 0 1 F c サイレント変

50

異型の免疫特性を比較する。(上部) I g G 2 骨格上の I N X 9 0 1 は、A、A / B、および B のアイソフォームの予想される混合物を示す。(中央) サイレント I g G 1 骨格上の I N X 9 0 1 S i は、単一アイソフォームとして存在する。(下部) I N X 9 0 1 H S i は、天然 I g G 2 に等しいジスルフィドシャフリングを可能にする、I g G 2 からの C H 1 / ヒンジを有する I g G 1 サイレント F c 領域を有する。これらの結果は、F c R 結合が本発明の抗体のアゴニスト特性に影響を及ぼすと思われることを示す。

【0388】

実施例 14 : ヒンジおよび F c 領域の要件を決定するための様々な I g 骨格における I N X 9 0 1 および I N X 9 0 8 の機能

我々は、抗ヒト V I S T A 抗体 I N X 9 0 1 および I N X 9 0 8 の重鎖の C H 1 / ヒンジおよび F c 領域の機能的要件を評価するための実験を行った。それらの元の状態において、両分子はネイティブなヒト I g G 2 骨格上にあり、したがって、ジスルフィドシャフリングをもたらす立体構造的に異なるアイソフォームの混合物である。前のデータが、このアッセイが I N X 9 0 1 および I N X 9 0 8 の両方の機能性の頑強な読み取りを提供することを示すため、高細胞密度混合リンパ球反応 (M L R) がこれらの研究のために選択された。特定のアイソフォームが、A または B アイソフォームのいずれかへの生化学的歪み、A 形態または B 形態に立体構造を「ロック」するための遺伝子修飾、ならびに F c が発現停止され、C H 1 / ヒンジ領域が I g G 1 (ジスルフィドシャフリングが生じない) または I g G 2 (天然ジスルフィドシャフリングを可能にする) のいずれかに由来するキメラ分子の機能に關与するかを調査するために、I N X 9 0 1 および / または I N X 9 0 8 の以下の修飾が行われた。

【0389】

アッセイの結果は、I N X 9 0 1 および I N X 9 0 8 が、A 形態、B 形態、または天然 I g G 2 を特徴付ける形態の混合物に関わらず機能を保持することを示す。更に、I N X 9 0 1 および I N X 9 0 8 の両方は、機能性のための活性 F c 領域を必要とする。

【0390】

M L R は、同種 T 細胞応答を駆動するために M H C クラス I および I I ミスマッチに依存する標準的な免疫学的アッセイである。末梢血単核細胞は、2 つのミスマッチ個体から単離され、一緒にインキュベートされ、これらのミスマッチの結果として、増殖およびサイトカイン産生が生じる。高細胞密度条件 (H C D) ($> 1 \times 10^7$ 細胞 / m l を有する培養物を意味する) は、インビトロでの抗体のアゴニスティックな機能を解明するために以前に報告された。我々の前のデータは、I N X 9 0 1 および I N X 9 0 8 の両方が M L R の H C D 条件下で T N F の発現を抑制することができることを示す。

【0391】

H C D M L R アッセイを使用して、各抗体の I g G 2 ジスルフィドアイソフォームおよび / または F c 発現停止に関して、遺伝子修飾または生化学的修飾のいずれかの後に I N X 9 0 1 および I N X 9 0 8 の機能を評価した。M L R を実行する前に、各抗体が、E L I S A により組換え V I S T A に結合することを確認した。I N X 9 0 1 は、E l i o n , L L C (L o u i s v i l l e , C O) に送られ、ここで、主に A 形態 (I N X 9 0 1 A 歪み) または B 形態 (I N X 9 0 1 B 歪み) のいずれかであるように酸化還元により修飾された。前の例に記載されるように、歪みは R P - H P L C によって確認された。(図 11)。各抗体ならびに親 I N X 9 0 1 を、用量応答で H C D M L R に希釈し、サイトカイン産生を L u m i n e x により測定した。前のデータは、T N F および / または I L - 2 が親 I N X 9 0 1 抗体の抗体機能のための頑強な読み取りであることを示した。2 つの別個の M L R において、T N F および I L - 2 の両方は、I g G 2 対照と比較して、I N X 9 0 1 親、I N X 9 0 1 A 歪み、および I N X 9 0 1 B 歪みにより還元された (図 13)。

【0392】

図 13 からのデータを確認するために、I N X 9 0 1 の追加の変異型を変異により作製し、A 形態または B 形態のいずれかのロック変異型を生成した。加えて、I N X 9 0 1 の

キメラ変異形を完全にサイレントFc領域で作製し、Fcドメインの機能を試験した。INX901Siは、完全にサイレントIgG1抗体である。INX901HSiは、完全にサイレントIgG1Fcを有するが、天然IgG2と区別不可能であるジスルフィドシヤリングを可能にするIgG2CH1/ヒンジ領域も有する。MLRを実行する前に、各抗体が、ELISAにより組換えVISTAに結合することを確認した。生化学的歪みからのデータを確認すると、INX901のAロック形およびBロック形の両方は、IL-2およびTNF両方の産生を減少させることができた(図14)。対照的に、INX901のSiおよびHSi形の両方は、IL-2およびTNFの産生を減少させることができなかった(図14)。

【0393】

図14からのデータを確認するために、同一の変異をINX908抗体に行い、A形態またはB形態のいずれかのロック変異型を生成した。加えて、INX908のキメラ変異形を完全にサイレントFc領域で作製し、Fcドメインの機能を試験した。INX908Siは、完全にサイレントIgG1抗体である。INX908HSiは、完全にサイレントIgG1Fcを有するが、IgG2CH1/ヒンジ領域を含有する。MLRを実行する前に、各抗体が、ELISAにより組換えVISTAに結合することを確認した。INX901変異型のデータを確認すると、INX908のAロック形およびBロック形の両方は、IL-2およびTNF両方の産生を低減することができた(図15)。対照的に、INX908のSiおよびHSi形の両方は、IL-2およびTNFの産生を減少させることができなかった(図15)。

【0394】

実施例15：PEPSCAN方法を使用したアゴニスト抗体の不連続エピトープマッピング

Pepscanは、直鎖および不連続エピトープの両方を決定するためにペプチド配列を使用する。この方法論は、抗体エピトープの確認のために、多くの研究者および会社によって使用される認められている方法である。図16は、本発明による様々なアゴニスト抗ヒトVISTA抗体によって結合された直鎖および不連続のエピトープを特定するために使用されるPepscan(登録商標)技術を概略的に記載する。

【0395】

CLIPS技術の原理

CLIPS技術は、画定された3次元構造にペプチドを構造的に固定する。これは、最も複雑な結合部位でさえもその機能的模倣物をもたらす。現在、CLIPS技術は、ペプチドライブラリを、単一、二重、または三重ループ構造、ならびにシートおよびらせん様折り畳み構造に成形するために日常的に使用される。CLIPS反応は、CLIPS足場のプロモ基とシステインのチオール側鎖との間に起こる。反応は軽度の条件下で迅速かつ特異的である。この洗練された化学を使用して、天然タンパク質配列は、広範な構造を有するCLIPS構築物に形質転換される。

【0396】

詳細なコンビナトリアルCLIPSライブラリスクリーニング

CLIPSライブラリスクリーニングは、コンビナトリアルマトリックス設計を使用して、標的タンパク質の、最大10,000の重なるペプチド構築物のライブラリへの変換で始まる。固体担体上で、直鎖ペプチドのマトリックスが合成され、その後、空間的に定義されたCLIPS構築物に成形される。正しい立体構造において不連続エピトープの両方の部分を表す構築物は、高い親和性で抗体に結合し、これは検出され、定量化される。不完全なエピトープを提示する構築物は低親和性で抗体に結合し、一方エピトープを含有しない構築物は全く結合しない。親和性情報は、エピトープの配列および立体構造を詳細に定義するために反復スクリーンで使用される。このエピトープ分析の結果を以下に要約する。

【0397】

抗体INX901、INX902、INX904、INX906、INX907、INX

10

20

30

40

50

908

中程度のストリンジェンシー条件下で試験したとき、抗体 INX901、INX902、INX904、INX906、INX907、INX908 は、直鎖および立体構造エピトープ模倣物に強く結合した。結合ペプチドは、コア配列₄₈NVTLLTCRLLGPV₆₀ (配列番号67)、₇₉EVQTCSERRPIR₉₀ (配列番号68)、₁₂₃SDHHGNFS₁₃₀ (配列番号69)、および₁₅₃HHHSEH₁₅₈ (配列番号70) を含有し、ここで、ペプチド伸張₇₉EVQTCSERRPIR₉₀ (配列番号68) は、エピトープの優勢部分である。

【0398】

線形エピトープ模倣物で記録されたデータの更なる分析により、ある特定の位置上の二重 A1a 変異体が顕著にシグナル強度を減少させたため、INX904、INX906、INX907、および INX908 の結合に重要な残基を特定することが可能であった。特に、₄₈NVTLLTCRLLGPV₆₀ (配列番号71) 内の残基 CR の置換は、INX906、INX907、および INX908 の結合に影響を及ぼす。また、₇₉EVQTCSERRPIR₉₀ (配列番号68) 内の残基 TC の置換は、INX904 および INX907 の結合に顕著に影響を及ぼす。

10

【0399】

抗体 INX800

中程度のストリンジェンシー条件下で試験したとき、抗体 INX800 は、直鎖および単純に制限されたエピトープ模倣物に検出可能に結合しなかったが、不連続エピトープ模倣物と検出可能な結合を示した。不連続エピトープ模倣物で得られたデータの分析は、抗体 INX800 がコア配列₅₃TCRLLGPVDKG₆₃ (配列番号72)、₁₀₁HGHQAA₁₀₇ (配列番号73)、₁₂₁SASDHHGNFS₁₃₀ (配列番号74)、および₁₅₃HHHSEHRVHGAM₁₆₄ (配列番号75) を有する不連続エピトープを認識することを示唆し、ここで、配列₁₅₃HHHSEHRVHGAM₁₆₄ (配列番号76) は優勢認識部位を表す。

20

【0400】

抗体 INX803 および INX804

高ストリンジェンシー条件下で試験したとき、INX803 および INX804 は、アレイ上に存在するいずれのペプチドにも結合しなかった。中程度のストリンジェンシー条件下で試験したとき、両方の抗体は、不連続エピトープ模倣物に結合した。結合プロファイルの累積分析は、両方の抗体がペプチド伸張₅₂LTCRLLGPV₆₀ (配列番号77)、₇₉EVQTCSERRPIR₉₀ (配列番号78)、₉₈HLHHGGHQA₁₀₇ (配列番号79)、₁₂₃SDHHGNFS₁₃₀ (配列番号80)、₁₅₃HHHSEHRVHGAM₁₆₄ (配列番号81) を同様に認識することを示唆し、ここで、領域₅₂LTCRLLGPV₆₀ (配列番号77) は、優勢認識部位である。

30

【0401】

抗体 INX900

高ストリンジェンシー条件下で試験したとき、抗体 INX900 は、コア配列₇₉EVQTCSERRPIR₉₀ (配列番号68) を有する直鎖エピトープ模倣物に非常に弱く結合した。顕著に高い結合は、配列₇₉EVQTCSERRPIR₉₀ (配列番号68) に加えて、コア配列₅₆LLGPVDKGHDVTFYK₇₀ (配列番号82)、₁₁₃LARHGLESA SDHHG₁₂₇ (配列番号83)、₁₅₃HHHSEHRVHGAM₁₆₄ (配列番号84) を含有する不連続エピトープ模倣物で観察された。

40

【0402】

抗体 INX903

高ストリンジェンシー条件下で試験したとき、抗体 INX903 は、直鎖エピトープ模倣物に結合しなかったが、立体構造のエピトープ模倣物と弱く結合した。記録された強度プロファイルの分析は、抗体がコア配列₇₉EVQTCSERR₈₇ (配列番号85)、₉₃TFQDLHLHHGGHQA₁₀₇ (配列番号86)、₁₄₆CLVVEIRHHHS

50

E H₁₅₈ (配列番号 87) で構成される不連続エピトープを認識することを示唆し、ここで、配列₇₉ E V Q T C S E R R₈₇ (配列番号 85) は、エピトープのコアである。

【0403】

抗体 I N X 9 0 5

高ストリンジエンシー条件下で試験したとき、抗体 I N X 9 0 5 は、コア配列₇₉ E V Q T C S E R R P₈₈ (配列番号 88) を有する直鎖エピトープに結合した。二重 A l a 変異体で取得されたデータは、₇₉ E V Q T C S E R R P₈₈ (配列番号 88) 内のモチーフ R R が認識に重要であることを示す。不連続エピトープ模倣物で記録された強度プロファイルは、ペプチド配列₅₃ T C R L L G P V D K G₆₃ (配列番号 89)、₁₂₃ S D H H G₁₂₇ (配列番号 90)、および₁₅₃ H H H S E H R V H G A M₁₆₄ (配列番号 91) の追加が抗体の結合を増強することを示唆する。図 17 は、大半のアゴニスト抗ヒト V I S T A 抗体が同じコア配列に結合することを示す。図 18 は、エピトープの結果も要約する。図 19 は、アゴニスト抗ヒト V I S T A 抗体によって結合されるエピトープを示し、結合に關与する重要な残基を特定する。

10

【0404】

実施例 16 : 炎症性腸疾患の治療におけるアゴニスト抗 V I S T A 抗体の使用

腸炎症は、T細胞およびB細胞欠損レシピエントマウスへの同系脾臓 C D 4 + C D 4 5 R B h i T細胞養子移入で開始される。C D 4 + C D 4 5 T細胞集団は、慢性小腸炎症および結腸炎症を誘導することができる活性化のためにプライムされたナイーブT細胞を主に含有する。加えて、この方法は、マウスにおける疾患進行の臨床的特徴の動態研究を可能にする疾患発症の正確な開始、および十分に特徴付けされた実験時間経過を提供する。この方法によって誘導される腸炎症は、慢性大腸壁性炎症および小腸貫壁性炎症、T N F および I L - 1 2 などのサイトカインによって駆動される原因、ならびに消耗などの全身症状を含む、ヒト I B D と多くの特徴を共有する。したがって、これはヒト I B D の原因を研究するための理想的なモデル系である。

20

【0405】

材料 & 方法

I N X 9 0 1 処置は、D D E 1 C D 4 + C D 4 5 R B h i 脾臓細胞移入後 0、3、および 6 日目に施された。14 日目に、末梢血をフローサイトメトリーにより分析した。マウスの体重は全実験中記録された。46 日目に、マウスが体重を失い始めたらすぐに実験を終了し、心臓血液および脾臓細胞をフローサイトメトリーにより分析し、測定した後に、結腸を切除し、組織学的検査のために処理した。2つの処置群：ヒト I g G 2 および I N X 9 0 1 (各々 8 匹のマウス)、ならびに全 C D 4 + 細胞 i v 注射を受け、疾患発症のための陰性対照である対照群 (8 匹のマウス) があつた。

30

【0406】

マウス

ドナーマウス：ヒト V I S T A ノックイン (D D E 1) マウスは、マウス V I S T A 遺伝子の代わりにヒト V I S T A c D N A ノックインを有し、R N A およびタンパク質レベルの両方でヒト V I S T A のみを発現する。マウスは、S a g e L a b s (B o y e r t o n , P A) で育種される。8 ~ 12 週齢のマウスは、最初に検疫施設に 3 週間移動され、その後我々の通常の施設に移された。4ヶ月齢の雄の D D E 1 マウスを使用した。

40

【0407】

レシピエントマウス：9 週齢の雄の R a g 1 ノックアウトマウスを、J a c k s o n L a b (B 6 . 1 2 9 S 7 - R a g 1 t m 1 M o m / J) から購入した。

【0408】

脾臓細胞の単離および移入

C D 4 + T細胞を、S t e m C e l l E a s y S e t (商標) M o u s e N a i v e C D 4 + T細胞単離キット (# 1 9 7 6 5) を使用して、負の選択により単離し、メモリーT細胞枯渇ステップは省略した。製造業者の指示に従い、1つの D D E 1 脾臓を、2枚のガラススライド間で機械的に分離し、C D 4 T細胞を単離した。簡潔に、脾臓細胞を P

50

B S 2 % F B S、1 m M E D T Aに再懸濁した。次いで、それらをラット血清およびC D 4 T細胞単離カクテルとともにインキュベートした。7.5分後、磁気ビーズを添加し、2.5分間インキュベートした。次いで、脾臓細胞およびビーズを含有する管を磁石上に配置し、2.5分後、未結合細胞を新しい管に移す。合計 1.3×10^6 C D 4 T細胞を得た。各対照マウスは、200 μ l中 0.5×10^6 細胞の静脈内(i.v.)注射を受けた。

【0409】

ナイーブC D 4 T細胞移入：T細胞単離は11のD D E 1脾臓で行った。上述のように製造業者の指示に従い、ナイーブC D 4 +を、Stem Cell Easy Set (商標) Mouse Naive C D 4 + T細胞単離キット(#19765)を使用して、負の選択により単離し、メモリーT細胞枯渇ステップを追加した。

10

【0410】

C D 4 5 R B +細胞を選択するために、C D 4 +細胞を、 100×10^6 細胞/mlで、P B S 2 % F B S、2 m M E D T A (結合緩衝液)、および抗C D 4 5 R B P E抗体に再懸濁し、4で10分間インキュベートした。結合緩衝液中で2回洗浄した後、抗P E M i c r o B e a d s (M i l t e n y i # 1 3 0 - 0 4 8 - 8 0 1)を添加し、4で15分間インキュベートした。結合緩衝液中で2回洗浄した後、細胞を1mlの結合緩衝液に再懸濁し、2 M i l t e n y i M Sカラム上に配置した。細胞を、カラム当たり1ml、2回に分けて溶出した。合計 5.6×10^6 のC D 4 + C D 4 5 R B +細胞を得た。マウスは、200 μ l中 0.329×10^6 細胞の静脈内(i.v.)注射を受けた。

20

【0411】

細胞純度は、以下のパネルを使用してフローサイトメトリーによって評価された：

C D 4 A P C - C y 7 (B i o L e g e n d、1 : 2 0 0で)

C D 4 5 R B P E (B i o L e g e n d、1 : 2 0 0で)

Y e l l o w L i v e / D e a d (I n v i t r o g e n、1 : 1 0 0 0で)

【0412】

抗ヒトV I S T A抗体および投与量

I N X 9 0 1および対照ヒトI g G 2を3 m g / k gで投薬した。0日目に、抗体をi.p.注射した。i.v.の3時間前に、細胞をレシピエントR a g 1 K Oマウスに移入した。次いで、3および6日目に、腹腔内(i.p.)注射によりマウスに投薬した。対照群は、ヒトI g G 2 (ロットA B 1 5 0 0 7 3 - 4 . 7 m g / m L)を受けた。処置群は、I N X 9 0 1 (ロットB P - 0 2 1 - 0 1 6 - 1 4 - 5 . 4 6 m g / m L)を受けた。

30

【0413】

末梢血中の「絶対」免疫細胞変化の評価

ドナー細胞移入後14日目に、フローサイトメトリーにより、ドナーC D 4 T細胞蓄積および活性化状態を、後眼窩出血で評価した。簡潔に、10 μ lのヘパリンを含有するエッペンドルフ管に血液を収集した。絶対細胞計数近くを得るために、100 μ Lの全血を、10 μ Lの抗体カクテル+マウスF cブロックを直接添加することによって染色した。40で30分後、760 μ lのA C K溶解緩衝液を各試料に添加する。20分のインキュベーション後、試料をP B S中で1回洗浄する。試料をM A C S Q u a n tフローサイトメトリーで実行し、F l o w J oプログラムで分析した。

40

【表 6】

抗体カクテル

フルオロ フォア	FITC	PE	PerCP Cy5. 5	PE-Cy7	APC	eFluor 780	BV421	BV510
抗原	CD62L	CD45 RB	CD11b	CD25	PD1	CD44	CD4	CD45
希釈	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200

【0414】

組織学的検査のための組織収集

46日目にマウスを安楽死させ、結腸を切除した。長さを測定した後、結腸を空にし、カセットに移した。10%ホルマリン中でo/n後、カセットは、70%エタノールに移され、パラフィン包埋、切片化、およびH&E染色のために病理部 (Pathology department) によって処理された。

【0415】

終了時点での脾臓の免疫細胞変化の評価

簡潔に、脾臓を収集し、機械的に分離した。ACK溶解後、細胞を洗浄し、以下の抗体カクテルで染色した。試料をMACSQuantフローサイトメトリーで実行し、FlowJoプログラムで分析した。

【表 7】

抗体カクテル

フルオロ フォア	FITC	PE	PerCP Cy5. 5	PE-Cy7	APC	eFluor 780	BV421	BV510
抗原	CD62L	CD45 RB	CD11b	CD25	FoxP3	CD44	CD4	LD黄色
希釈	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:1000

【0416】

INX901処置は、末梢血中のCD4T細胞数の減少をもたらす。

14日目の末梢血における免疫細胞変化の分析は、絶対計数としてまたはCD5+細胞の分画としての両方でCD4T細胞の減少を示し、残ったCD4T細胞は、主にCD45RB^{hi}であった(図20)。示されるように、100μlの血液の絶対数(左側のグラフ)、CD45+細胞の出現頻度(中央のグラフ)、CD4+細胞の出現頻度(右側のグラフ)(1群当たりn=8、SEM、統計的に対応のないT検定、等しいSDなし)。INX901処置後の14日目に存在した小集団CD4T細胞は、CD62LおよびCD45RBの統計的により高い発現レベルによって示されるように、依然としてナイーブであるように思われた(図21)。図は、末梢血におけるCD4T細胞活性化状態の変化を示す。(1群当たりn=8、SEM、統計的に対応のないT検定、等しいSDなし)(MFI: 蛍光強度の中央値)。

【0417】

30日目までに、CD45RB^{hi}ナイーブCD4T細胞を受けたマウスは、大腸炎が進行するにつれて体重を失い始め、一方、全T細胞分画を受けた対照群はいかなる疾患も発生しなかった(図22)。INX901処置は、対照群と比較したとき、体重減少を防止し、代わりにマウスの体重は増加するように思われた。マウスを46日目に安楽死させ、組織学的調査およびフローサイトメトリーのために、それぞれ、結腸および脾臓を収集した。

【0418】

更に、大腸炎に罹患しているマウスは、対照(全CD4)群と比較したとき、結腸の短縮を示し、INX901で処置された群において、短縮は生じなかった。図23に示されるように、大腸炎に罹患しているマウスは、対照(全CD4)群と比較したとき、結腸の

10

20

30

40

50

短縮を示したが、I N X 9 0 1で処置された群において、短縮は生じなかった。更に図24に示されるように、全細胞移入を受け、後にいずれの大腸炎も発生しなかった対照群と比較したとき、C D 4⁺ C D 4 5 R B^{h i}細胞移入を受けたマウスはすべて、腸絨毛間の重要な炎症性浸潤物（矢印、低倍率および高倍率の中央の写真）の存在によって示されるように、大腸炎を発生した。I N X 9 0 1処置は、分析された全ての試料における炎症性浸潤物の完全な不在により示されるように、大腸炎の発生を完全に予防した（1群当たり8匹のマウス）。

【0419】

図に示されるように、I N X 9 0 1処置は大腸炎発生を予防した。各マウス群の結腸のH & E染色切片の代表的な写真。倍率：上部の写真は4xであり、下部は20xである。矢印は、大量の炎症性浸潤物を有する領域を示す。I N X 9 0 1処置結腸試料におけるそれらの完全な不在に留意する。

10

【0420】

C D 3の免疫組織化学染色（図25）およびC D 1 1 b（図26）発現細胞は、I g G 2処置動物における大腸炎発生を確認した。対照およびI N X 9 0 1処置試料において、同様の数のC D 3⁺およびC D 1 1 b⁺細胞は、再度、I N X 9 0 1処置後の疾患の完全な不在を示す。図25は、I N X 9 0 1処置が結腸へのC D 3⁺T細胞動員を防止したことを示す。各マウス群の結腸のC D 3染色切片の代表的な写真。（倍率：上部の写真は4xであり、下部は20xである）。

【0421】

図26は、I N X 9 0 1処置が結腸への骨髄（C D 1 1 b⁺）細胞動員を防止したことを示す。各マウス群の結腸のC D 1 1 b染色切片の代表的な写真。倍率：上部の写真は4xであり、下部は20xである。また加えて、I N X 9 0 1処置は更に、長期C D 4 T細胞の変化を誘導することが示された。脾臓細胞に対するフローサイトメトリーによる分析は、I N X 9 0 1処置40日後、I g G 2群と比較して、依然としてC D 4 T細胞出現頻度において非常に有意に減少し、10~30%のC D 4 T細胞が依然としてC D 4 5 R B⁺であったことを示した（図27、右側および左側のグラフ）。I N X 9 0 1処置後に、制御性T細胞の変化は観察されなかった（図27、中央のグラフ）。図に示されるように、脾臓を46日目に収集し（最後の抗体投与の40日後）、フローサイトメトリーにより分析した（1群当たりn = 8または4、SEM、統計的に対応のないT検定、等しいSDなし）。

20

【0422】

したがって、体重減少、結腸の長さの変化、結腸に存在する炎症性浸潤物の不在により示されるように、抗V I S T A I N X 9 0 1処置が大腸炎発生を予防することが示された。加えて、我々は、C D 4 5 R B発現などのナイーブT細胞の特徴を維持したC D 4 T細胞の長期減少（処置の14および40日後）を観察した。したがって、抗V I S T A アゴニスト抗体は、大腸炎を治療または予防するために使用され得る。

30

【0423】

実施例17：乾癬の治療におけるアゴニスト抗V I S T A抗体の使用

イミキモド（I M Q D）誘導性乾癬モデル

40

イミキモド（I M Q D）は、ウイルス感染および黒色腫などの皮膚科的状态に広く使用されるT L R 7 / 8アゴニストを含有する市販のクリームである。複数日にわたる皮膚へのI M Q Dの適用は、ケラチノサイトの増殖を介して表皮の肥厚をもたらす。更に、真皮層への免疫学的浸潤が、T細胞および骨髄細胞両方の集団で生じる。I M Q Dの反復投与は、乾癬を有する患者において観察されるものと類似の皮膚病変を創出する。I L - 1 7およびI L - 2 3は、I M Q Dへの免疫応答に関与する主要なサイトカインであると考えられる。

【0424】

これらの実験において、我々は、I M Q D誘導性乾癬で、ハムスター マウスV I S T A抗体8 G 8の機能を試験する。8 G 8を1日おきにマウスに投薬し、一方で、マウスの

50

背面にIMQDを7日間局所投与した。次いで、皮膚を単離し、固定し、パラフィンブロックに包埋した。次いで、H&E分析、およびIHCによるいくつかの免疫学的集団の発現のために切片を染色した。注目すべきことに、8G8は、真皮内への全体的な細胞浸潤物を劇的に低減し、その大半はCD3+集団の低減であると思われる。

材料および方法

マウス処置

1. 7週齢のマウスBalb/cマウスをJacksonから購入し、DHMCでSPF条件下で保管した。実験の開始前にマウスの背面を剃毛した。
2. Dartmouth Hitchcock動物施設からイミキモドを購入した。Q-tipを使用して、62.5mgを毎日皮膚に適用した。
3. 200μg/マウスで、1日おきに8G8を投与した。
4. マウスを7日目に殺し、剃毛した部分から正方形に切断することによって皮膚を単離した。パラフィン包埋のためにDartmouth病理部に送る前に、皮膚をホルマリンに24時間設置した。

10

脾臓分析

1. 脾臓を単離し、単一の細胞懸濁液に粉碎した。
2. 遠心分離後、ACK溶液を使用して赤血球を溶解した(室温で5分)。
3. 細胞を遠心分離し、計数前にPBSに再懸濁した。
4. 各脾臓からの 1×10^5 細胞を、マウスFcブロックの存在下で、氷上で20分間、CD4、CD8、CD19、CD11b、LyC6C、およびLy6Gで標識した。
5. 標識した細胞をMiltenyi MACSquantで実行し、FlowJoを使用して分析した。
6. 統計をPRISM6で実施し、群を、一元配置ANOVA、続いてSidakの複数比較試験により比較した。p値は次のように示される： $p < 0.0001^{****}$ 、 $p < 0.001^{***}$ 、 $p < 0.01^{**}$ 、 $p < 0.05^*$ 。

20

H&EおよびIHC分析

1. 試料をカセットに入れ、室温で10%ホルマリン中でO/N固定し、次いでPBS中で簡単に洗浄し、70%エタノール(Fisher Scientific)に移して維持した後に、DartmouthのGeisel School of MedicineのPathology Translational Research Coreに移し、そこで、パラフィン包埋し、切片化し、その後染色した。
2. パラフィン包埋組織切片(4μm)を、Leica BOND RX自動染色装置を使用して染色した。脱蠟後、切片は、抗原回収(結合エピトープ回収溶液2、100、20分)を受け、Leica希釈剤中の一次抗体(下の希釈を参照されたい)とともに、室温で30~60分間インキュベートされた。次いで、スライドをPBS中で3×5分洗浄で洗浄し、二次抗体(Leica Bond Refine検出キット、DS9800から)とともにインキュベートした。PBS中で3回の最終洗浄後、切片をDAB(Leica Bondポリマー検出キット)とともにインキュベートし、すすぎ、ヘマトキシリンで対比染色し、装着した。
3. CD3+浸潤の統計はR統計プログラミング言語で実施された。異常値についてのカイ二乗検定(「異常値」パッケージにおける)を各群について実施し、 $p < 0.05$ である場合、データ点を除去した。次いで、合併分散を用いたスチューデントのt検定を使用して群を比較し、 $p < 0.05$ は*で示された。

30

40

【表 8】

特異性	Ig型	クローン/ フォーマット	カタログ#	会社	回収	希釈
マウスCD3	ウサギ	ポリクローナル	AB5690	Abcam	EDTA	0.25
マウスCD4	ウサギ	クローン1	50134- R001	SinoBiologicals	EDTA	0.32
マウスMPO	ウサギ	ポリクローナル	A0398	Dako	EDTA	0.74
マウスCD11b	ウサギ	ポリクローナル	ab-75476	Abcam	EDTA	0.25
マウスF4/80	ウサギ	クローンSP115	NBP2- 12506	Novus	EDTA	0.11

10

【0425】

結果

我々は、アゴニスト抗VISTA抗体が乾癬モデルに有効であることを決定し、特にアゴニスト抗ヒト抗体8G8がイミキモド誘導性乾癬に対する免疫学的応答を変更することができるかどうかを決定した。IMQDクリームを、7日間毎日Ba1b/cマウスの背面皮膚に施した。初期IMQD処置(0日目)時点で、ならびに2日目、4日目、および6日目に200μgの8G8またはハムスターIgをマウスに与えた。マウスを7日目に殺し、いくつかの免疫サブセットマーカーのH&EおよびIHCにより皮膚を分析した。

【0426】

H&E分析は、対照と比較して、8G8処置マウスの皮膚への高密度有核細胞(リンパ球の特徴)数の減少を示した(図28を参照されたい)。したがって、我々は、免疫学的細胞によって発現されるいくつかの細胞表面マーカーのIHC分析を実施した。注目すべきことに、CD3+細胞の数は、ハムスターIg対照群と比較して、8G8の処置マウスにおいて低減した(図29、30を参照されたい)。IMQD乾癬は、T細胞、具体的にはTh17およびT細胞を含むIL-17産生集団によって規範的に駆動されると考えられる。

20

【0427】

8G8処置が全体的なT細胞集団を低減したかどうか、またはそれらCD3+の減少が皮膚において単に観察されたかどうかを確認するために脾臓集団もプロファイルした。T細胞集団に対する変化は観察されなかったが、CD11b+Ly6G-(総%)およびCD19+(総数)集団におけるわずかな減少が8G8で生じた(図31を参照されたい)。

30

【0428】

したがって、これらの実験は、8G8がイミキモド処置された皮膚を浸潤するCD3+T細胞の数を低減することを示したため、抗ヒトVISTAアゴニスト抗体が乾癬モデルにおいて有効であることを明らかにした。これらの結果に基づき、VISTAアゴニスト抗体は、乾癬および他のT細胞媒介性自己免疫状態または炎症性皮膚状態の治療または予防に使用され得る。

【0429】

実施例18:コンカナバリンA誘導性肝炎モデルにおけるアゴニストINX800およびINX801抗VISTA抗体の使用

40

コンカナバリンA(ConA)は、主に肝臓において、最終的に免疫系の活性化につながる特定の糖に結合するレクチンである。ConAは、T細胞由来IL-2、IL-3、IL-4、TNF-、およびIFN-などの複数のサイトカインの迅速な産生を誘導する。T細胞活性化およびその後のサイトカイン応答は、急性肝炎および高用量モデルにおいて死を誘導する。ImmuneNextは、ヒトVISTAがマウスVISTAの代わりに発現される、ヒトVISTAノックインマウスを創出した。マウスは、表現型正常であり、hVISTAがマウスにおいて適切に機能することを示す。したがって、我々は、これらのマウスの肝炎のConAモデルにおいて、INX800およびINX801と呼ばれる2つの抗ヒトVISTA抗体を試験した。

50

【0430】

材料および方法

10週齢のマウスをJacksonから購入し、DHMCでSPF条件下で保管した。

【0431】

Canavalia ensiformisからのコンカナバリンA (Sigma、catalog # C2010-100MG) を、10mlの新しいPBSに再構成し、室温で30分間振盪した。-20°Cで保管用に300µLのアリコートを作製した。

【0432】

200µLの-hVISTA抗体または対照Ig対照 (Crown Biosciences) を、PBS中のIP注射によるConA処置の3時間前にマウスに投与した。抗体を10mpkで与えた。

10

【0433】

動物を量り、サイトカイン分析実験のために、15mg/kgのConAのいずれかを与えた。注射は尾静脈を通して実施された。全ての場合において、罹患率のためにマウスを数時間おきに監視し、触って冷たい場合、殺した。

【0434】

サイトカイン分析に関して、マウスを、CO₂を使用して殺し、次いで心穿刺により出血させた。血漿収集管に血液を収集し、その後、細胞成分を除去するために遠心分離した。製造元の指示に従ってマルチプレックスにより分析する前に、試料を-80°Cで短期間保管した。

20

【0435】

組換えサイトカイン標準物質からの較正曲線を、試料と同じマトリックスにおいて3倍希釈段階で調製した。

【0436】

高スパイクおよび低スパイク (刺激されたヒトPBMCおよび樹状細胞からの上清) が、サイトカイン回復を決定するために含まれた。

【0437】

標準物質および品質管理品を技術的3つ組において測定し、各3つ組試験試料を1回測定し、ブランク値を全ての読み取りから減算した。すべてのアッセイは、室温で96ウェル濾過プレート (Millipore, Billerica, MA) で直接実行し、遮光された。

30

【0438】

簡潔に、ウェルを、1%BSAを含有する100µlのPBSで事前に湿らせ、次いで標準物質、試料、スパイク、またはブランクと一緒にビーズを、100µlの最終容積で添加し、継続的に振盪しながら、室温で30分間一緒にインキュベートした。

【0439】

ビーズを、1%BSAおよび0.05%Tween 20を含有する100µlのPBSで3回洗浄した。

【0440】

ビオチン化抗体のカクテル (50µl/ウェル) を、継続的に振盪しながら、室温で30分間のインキュベーションの間ビーズに添加した。

40

【0441】

ビーズを3回洗浄し、次いでストレプトアビジン-PEを10分間添加した。ビーズを再び3回洗浄し、1%BSAおよび0.05%Tween 20を含有する125µlのPBSに再懸濁した。

【0442】

ビーズの蛍光強度を、Bio-Plexアレイリーダーを使用して測定した。5つのパラメトリック曲線適合を有するBio-Plex Managerソフトウェアをデータ分析のために使用した。

【0443】

50

サイトカイン分析の統計は、R Statistical Computing LanguageまたはPrism 6で実行された。検出を下回るサイトカイン濃度値 (< OOR) は、最低検出濃度に再調整され、正確な定量を上回る値 (> OOR) は、最大直線形定量可能濃度に再調整された。抗体処置群とIg対照との間の一対比較は、Tukey Honest Significant Differencesを用いた一元配置ANOVAを使用して行われた。0.1未満のP値は有意と見なされ、次のように表された：p < 0.0001****、p < 0.001***、p < 0.01**、p < 0.05*、p < 0.1~。

【0444】

結果

両方とも抗hVIST抗体であるINX800および/またはINX801がConAに対するサイトカイン応答を変更することができるかどうかを決定するために、2つの複製実験(#13および#14)を設計した。ConA(15mg/kg)で処置する3時間前に、マウスに10mpkのINX800、INX801、または対照Igを与え、次いでマウスを6時間時点で殺し、サイトカイン応答を32-plexにより決定した。大半のサイトカインは変化しなかったが、IL-2は、INX800およびINX801の両方によって一貫して減少した(図32、33)。すべてのサイトカインプロファイルは、付録に見出されるリンクで見ることができる。

【0445】

ナイーブマウスおよび実験14からのマウスも、免疫集団の変化について分析して、サイトカインの減少がT細胞枯渇のいずれの兆候に関連し得るかどうかを決定した。フローゲーティング戦略は、B220(B細胞); CD3、CD4、およびCD8(T細胞); ならびにCD11bおよびGr1(骨髄細胞)のマーカーを含んだ。抗体処置による総細胞数における統計的に有意な関係はいずれの集団においても観察されなかった(図34を参照されたい)。したがって、INX800およびINX801は両方とも、ConA誘導性IL-2を抑制することができる。ナイーブマウスまたはConA応答中のいずれかにおいて、INX800またはINX801によって引き起こされる細胞枯渇の明白な兆候はない。これらの実験結果は、VISTAアゴニスト抗体が急性感染中に誘発された肝炎感染および炎症ならびにサイトカイン応答を治療および予防するために使用され得ることを示唆する。これらの実験結果は、VISTAアゴニスト抗体が肝炎ならびに肝臓に影響を及ぼす他の感染および炎症性疾患に関連する肝毒性または肝臓損傷を治療および予防するために使用され得ることを示唆する。

【0446】

実施例19：コンカナバリンA誘導性肝炎モデルにおけるアゴニスト抗VISTA8G8および13F3抗体の使用

ConAモデルは前の実施例に記載されている。これらの実験において、我々は、ConAによって誘導されるサイトカイン応答に対する2つの異なる-mVISTA抗体(8G8および13F3)の能力を検査した。8G8はいくつかのT細胞由来サイトカインの産生を減少させることができ、我々は、それが致死用量のConAに対して保護され得るかどうかを検査した。

【0447】

材料&方法

7週齢のマウスをJacksonから購入し、DHMCでSPF条件下で保管した。

【0448】

Canavalia ensiformisからのコンカナバリンA(Sigma、catalog#C2010-100MG)を、10mlの新しいPBSに再構成し、室温で30分間振盪した。-20Cで保管用に300µLのアリコートを作製した。

【0449】

200µLの-mVISTA抗体8G8および13F3、またはハムスターIg対照(BioXcell)を、PBS中のIP注射によりConA処置の3時間前にマウスに

10

20

30

40

50

投与した。

【0450】

動物を量り、サイトカイン分析実験のために15 mg / kgのCon A、または死亡率実験のために30 mg / kgのCon Aのいずれかを与えた。注射は尾静脈を通して実施された。全ての場合において、罹患率のためにマウスを数時間おきに監視し、触って冷たい場合、殺した。

【0451】

サイトカイン分析に関して、マウスを、頬穿刺により、またはCO₂を使用して殺し、次いで心穿刺するかのいずれかにより出血させた。血漿収集管に血液を収集し、室温で30分間インキュベートし、その後、細胞成分を除去するために遠心分離した。製造元の指示に従ってマルチプレックスにより分析する前に、試料を-80°Cで短期間保管した。

10

【0452】

組換えサイトカイン標準物質からの校正曲線を、試料と同じマトリックスにおいて3倍希釈段階で調製した。

【0453】

高スパイクおよび低スパイク（刺激されたヒトPBMCおよび樹状細胞からの上清）が、サイトカイン回復を決定するために含まれた。

【0454】

標準物質および品質管理品を技術的3つ組において測定し、各3つ組試験試料を1回測定し、ブランク値を全ての読み取りから減算した。すべてのアッセイは、室温で96ウェル濾過プレート（Millipore, Billerica, MA）で直接実行し、遮光された。

20

【0455】

簡潔に、ウェルを、1%BSAを含有する100µlのPBSで事前に湿らせ、次いで標準物質、試料、スパイク、またはブランクと一緒にビーズを、100µlの最終容積で添加し、継続的に振盪しながら、室温で30分間一緒にインキュベートした。

【0456】

ビーズを、1%BSAおよび0.05%Tween 20を含有する100µlのPBSで3回洗浄した。

【0457】

ビオチン化抗体のカクテル（50µl/ウェル）を、継続的に振盪しながら、室温で30分間のインキュベーションの間ビーズに添加した。

30

【0458】

ビーズを3回洗浄し、次いでストレプトアビジン-PEを10分間添加した。ビーズを再び3回洗浄し、1%BSAおよび0.05%Tween 20を含有する125µlのPBSに再懸濁した。

【0459】

ビーズの蛍光強度を、Bio-Plexアレイリーダーを使用して測定した。5つのパラメトリック曲線適合を有するBio-Plex Managerソフトウェアをデータ分析のために使用した。

40

【0460】

サイトカイン分析の統計は、R Statistical Computing LanguageまたはPrism6で実行された。検出を下回るサイトカイン濃度値(<OOR)は、最低検出濃度に再調整され、正確な定量を上回る値(>OOR)は、最大直線形定量可能濃度に再調整された。抗体処置群とIg対照との間の対比較は、Tukey Honest Significant Differencesを用いた一元配置ANOVAを使用して行われた。すべての試験および比較について0.05未満のP値は有意であると見なされた。

【0461】

結果

50

我々の初期の実験は、両方とも抗mVISTA抗体である8G8または13F3がConAに対するサイトカイン応答を変更することができるかどうかを決定するために設計された。ConA (15 mg/kg) で処置する3時間前に、マウスに200 µgの8G8、13F3、またはハムスターIgを与え、次いでマウスを6時間時点で殺し、サイトカイン応答を32-plexにより決定した(図35)。大半のサイトカインは変化しなかったが、IL-2は8G8の存在下で減少したが、13F3の存在下では減少しなかった。次いで、IL-2の低減がConA誘導性死亡の保護と関連し得るかどうかを決定することが望まれた。そのために、マウスを8G8またはハムスターIgで前処置し、次いで30 mg/kgのConAを与え、生存を追跡した(図36)。ハムスターIg処置マウスのすべては40時間以内に安楽死させなければならなかったが、8G8処置マウスの80%は72時間を超えて生存し、健康であるように見えた。したがって、アゴニスト抗体8G8は、ConA誘導性肝炎モデルにおいてIL-2への変化を誘導し得るが、13F3は誘導しない。更に、8G8は、ConA (30 mg/kg) の致死攻撃から保護される。これらの実験結果は、VISTAアゴニスト抗体が急性または慢性感染中に誘発された肝炎感染および病理学的炎症ならびに炎症誘発性サイトカイン応答を治療および予防するために使用され得ることを示唆する。これらの実験結果は、VISTAアゴニスト抗体が肝炎ならびに肝臓に影響を及ぼす他の感染および炎症性疾患に関連する肝毒性または肝臓損傷を治療および予防するために使用され得ることを更に示唆する。

【0462】

実施例20：コンカナバリンA誘導性肝炎モデルにおけるアゴニスト抗VISTA INX903抗体の使用

ConAモデルは前の実施例に記載されている。これらの実験において、我々は、対照としてINX800を使用して、肝炎のConAモデルにおいて更なる抗ヒトVISTA抗体INX903を試験した。一実験において、我々は、免疫細胞によるサイトカイン産生を増強することが前に示されたアンタゴニスティックなVISTA抗体とINX903およびINX800も比較した。

【0463】

材料および方法

10週齢のマウスをJacksonから購入し、DHMCでSPF条件下で保管した。

【0464】

Canavalia ensiformisからのコンカナバリンA (Sigma、catalog # C2010-100MG) を、10 mlの新しいPBSに再構成し、室温で30分間振盪した。-20°Cで保管用に300 µLのアリコートを作製した。

【0465】

200 µLの-hVISTA抗体または対照Ig対照(Crown Biosciences)を、PBS中のIP注射によるConA処置の3時間前にマウスに投与した。抗体を10 mpkで与えた。

【0466】

動物を量り、サイトカイン分析実験のために、15 mg/kgのConAのいずれかを与えた。注射は尾静脈を通して実施された。全ての場合において、罹患率のためにマウスを数時間おきに監視し、触って冷たい場合、殺した。

【0467】

サイトカイン分析に関して、マウスを、CO₂を使用して殺し、次いで心穿刺により出血させた。血漿収集管に血液を収集し、その後、細胞成分を除去するために遠心分離した。製造元の指示に従って、LuminoxまたはMSDマルチプレックスにより分析する前に、試料を-80°Cで短期間保管した。

【0468】

サイトカイン分析の統計は、R統計演算言語で実行された。検出を下回るサイトカイン濃度値(<OOR)は、最低検出濃度に再調整され、正確な定量を上回る値(>OOR)は、最大直線形定量可能濃度に再調整された。抗体処置群とIg対照との間の一対比較は

、Tukey Honest Significant Differencesを用いた一元配置ANOVAを使用して行われた。0.1未満のP値は有意と見なされ、次のように表された： $p < 0.0001$ ****、 $p < 0.001$ ***、 $p < 0.01$ **、 $p < 0.05$ *、 $p < 0.1$ ~。

【0469】

これらの実験の結果は図37および図38に含まれる。図37において、IL-2発現は、対照Ig、INX800、またはINX903で処置されたマウスの6時間時点からの血漿において検出された。示される抗体の各々で、マウスを-3時間で前処置した。0時間で、15mg/kgのConAをマウスに投薬し、その後殺し、6時間時点で出血させた。図38は、対照Ig、2つのアゴニストVISTA ab (INX800およびINX903)、またはVISTAアntagオニストAbで処置されたマウスの6時間時点からの血漿におけるIL-2およびMIP-1発現を示す。示される抗体の各々で、マウスを-3時間で前処置した。0時間で、15mg/kgのConAをマウスに投薬し、その後殺し、6時間時点で出血させた。これらの実験は、INX800およびINX903がConA誘導性サイトカイン応答を抑制することができることを示す。

【0470】

これらの実験結果は、VISTAアゴニスト抗体が急性または慢性感染中に誘発された肝炎感染および病理学的炎症ならびに炎症誘発性サイトカイン応答を治療および予防するために使用され得ることを示唆する。これらの実験結果は、VISTAアゴニスト抗体が肝炎ならびに肝臓に影響を及ぼす他の急性または慢性感染および炎症性疾患に関連する肝毒性または肝臓損傷を治療および予防するために使用され得ることを更に示唆する。

【0471】

実施例21：コラーゲン誘導性関節炎またはCIAモデルにおけるアゴニスト8G8抗VISTA抗体の使用

アジュバントにおけるコラーゲンII型(CII)でのげっ歯類および霊長類の免疫化は、様々に関節リウマチ(RA)症状を再現する、自己免疫性関節炎、いわゆるコラーゲン誘導性関節炎またはCIAを誘導する。CIIは、RAにおける炎症の部位である可動関節の軟骨の主要成分タンパク質であり、CIIに対する免疫がRA患者において検出され得る。

【0472】

様々な種のCIIの保存されたエピトープを認識する5つのモノクローナル抗体のカクテル(ArthroGen-CIA(登録商標)関節炎誘発性5-モノクローナル抗体カクテル)は、ナイーブマウスにおいて関節炎を誘導し得る。このモデルは、コラーゲン抗体誘導性関節炎(CAIA)と呼ばれる。5-抗体カクテルでのインビトロ研究は、これらの抗体が炎症性メディエーターの不在下でも軟骨細胞に対して病原性であり、軟骨形成を妨げる可能性があり、それらはまた、コラーゲン合成、原線維形成を阻害し、マトリックス合成の増加を伴って、または伴わずに、細胞外マトリックスにおけるCII原線維の崩壊も引き起こすことを示した。更に、5-抗体カクテルは、事前形成された軟骨にも有害作用を有する。

【0473】

本実験において、我々は、RAのCAIAマウスモデルに対する8G8(ハムスター抗マウスVISTAモノクローナル抗体)処置の影響を試験した。-2日目から開始して、1日おきに8G8をマウスに投薬した。マウスに、0日目に5-抗体カクテル、そして3日目にLPSを投与した。疾患の発症は、経時的に罹患した関節における炎症の腫れを測定することによって評価された。臨床的スコア化は、各腫れた指について1のスコア、腫れた足蹠について5のスコア、腫れた手首または足首について5のスコアを与えることにより(Charles River Labs採点システム)達成され、各動物に関して、合わせて最大60のスコアが与えられる。

【0474】

材料および方法

マウス処置

Jackson Labsから8週齢のDBAマウスを得た。尾部に印をつける前に、マウスを2日間馴化した。

【0475】

CAIA誘導：0日目に、AMSBIO/Chondroxから購入した5-抗体カクテルを、マウス当たり1.5mgの投与量で、マウスに腹腔内(ip)注射した。次いで、3日目に、マウスはipで50μgのLPS(AMSBIOから)を受けた。

【0476】

抗VISTA処置：-2日目から開始して、実験期間中、1日おきに10mg/kgの投与量で抗VISTA 8G8または対照ハムスターIgGをマウスに投薬した。(図39を参照されたい)

10

【0477】

統計分析

CAIAスコア化は、データ管理のためにExcel、そしてグラフ化のためにGraphPad Prismを使用して分析された。差次的に処置されたマウスの2つの群間の腫瘍体積の相違を測定し、「混合効果反復測定」と命名されるR統計演算ソフトウェアのマクロを使用して統計分析を実施した。

【0478】

結果

実験の目的は、アゴニスト抗VISTA抗体が関節炎モデルにおいて効果的であるかどうかを決定することであった。実験において、抗VISTAアゴニスト抗体8G8がRAのCAIA実験モデルにおける疾患進行に影響を及ぼし得ることが示された。図40のデータは、疾患進行および8G8に应答する範囲における大幅な減少を示す(相互作用項 $P < 0.000005$)。示されるように、処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(各群において $n = 10$)。8G8処置は、疾患の重症度を著しく低減した(相互作用項 $P < 0.000005$)。

20

【0479】

実施例22：コラーゲン誘導性関節炎またはCAIモデルにおけるアゴニスト(INX903)抗VISTA抗体の使用

CAIモデルは前の実施例に記載されている。本実験において、我々は、RAのCAIマウスモデルに対するINX903(ヒト抗ヒトVISTA-IgG2)処置の影響を試験した。-2日目から開始して、1日おきにINX903をマウスに投薬した。マウスに、0日目に5-抗体カクテル、そして3日目にLPSを投与した。疾患の発症は、経時的に罹患した関節における炎症の腫れを測定することによって評価された。臨床的スコア化は、各腫れた指について1のスコア、腫れた足蹠について5のスコア、腫れた手首または足首について5のスコアを与えることにより(Charles River Labs採点システム)達成され、各動物に関して、合わせて最大60のスコアが与えられる。

30

【0480】

材料および方法

マウス処置

実験プロトコルは、図41に概略的に示される。

【0481】

hVISTAノックイン(KI)マウスは、Horizon Discovery(Sage)Labs(Boyerstown, PA)で育種される。8~12週齢のマウスは、最初に検疫施設に3週間移動され、その後通常の施設に移される。4ヶ月齢マウスをこの実験に使用した。実験開始2日前に、マウスの尾部に印を入れた。

【0482】

CAIA誘導：0日目に、AMSBIO/Chondroxから購入した5-抗体カクテルを、マウス当たり5mgの投与量で、マウスに腹腔内(ip)注射した。次いで、3日目に、マウスはipで50μgのLPS(AMSBIOから)を受けた。

50

【0483】

抗VISTA処置：-2日目から開始して、実験期間中、1日おきに10mg/kgの投与量で抗VISTA INX903または対照ヒトIgG2をマウスに投薬した。

【0484】

図42に示されるように、処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群においてn=9、INX903処置群においてn=8;1匹のマウスは疾患のいずれの徴候も示さなかったため、対照群から外された)。INX903処置は、疾患の重症度を著しく低減した(相互作用項P<0.0005)。CAIAスコア化は、前の実施例にあるように分析された。図42に示されるデータは、疾患進行およびINX903に应答する範囲において大幅な減少があることを示す(相互作用項P=0.0005)。

10

【0485】

実施例23：コラーゲン誘導性関節炎またはCIAモデルにおけるアゴニスト(INX903)抗VISTA抗体の使用

本実験において、我々は、RAのCAIAマウスモデルに対するINX903(ヒト抗ヒトVISTA-IgG2)処置の影響を再度試験した。-2日目から開始して、1日おきにINX903をマウスに投薬した。マウスに、0日目に5-抗体カクテル、そして3日目にLPSを投与した。疾患の発症は、経時的に罹患した関節における炎症の腫れを測定することによって評価された。臨床的スコア化は、各腫れた指について1のスコア、腫れた足蹠について5のスコア、腫れた手首または足首について5のスコアを与えることにより(Charles River Labs採点システム)達成され、各動物に関して、合わせて最大60のスコアが与えられる。

20

【0486】

材料および方法

マウス処置

hVISTAノックイン(KI)マウスは、Horizon Discovery(Sage)Labs(Boyerstown,PA)で育種される。8~12週齢のマウスは、最初に検疫施設に3週間移動され、その後通常の施設に移される。4ヶ月齢マウスをこの実験に使用した。実験開始2日前に、マウスの尾部に印を入れた。

【0487】

CAIA誘導：0日目に、AMSBIO/Chondroxから購入した5-抗体カクテルを、マウス当たり5mgの投与量で、マウスに腹腔内(ip)注射した。次いで、3日目に、マウスはipで50μgのLPS(AMSBIOから)を受けた。

30

【0488】

抗VISTA処置：-2日目から開始して、以下に示されるように実験期間中、1日おきに10mg/kgの投与量で抗VISTA INX903または対照ヒトIgG2をマウスに投薬した。

【0489】

CAIAスコア化は、前の実施例にあるように分析された。

【0490】

図43に示されるデータは、疾患進行およびINX903に应答する範囲において大幅な減少があることを示す(相互作用項P=0.01)。

40

【0491】

実施例24：コラーゲン誘導性関節炎またはCIAモデルにおけるアゴニスト(8G8)抗VISTA抗体の使用

本実験において、我々は、RAのCAIAマウスモデルに対する8G8(ハムスター抗マウスVISTAモノクローナル抗体)処置の影響を試験した。-2日目から開始して、1日おきに8G8(アゴニスト抗マウスVISTA抗体)をマウスに投薬した。マウスに、0日目に5-抗体カクテル、そして3日目にLPSを投与した。疾患の発症は、経時的に罹患した関節における炎症の腫れを測定することによって評価された。臨床的スコア化

50

は、各腫れた指について1のスコア、腫れた足蹠について5のスコア、腫れた手首または足首について5のスコアを与えることにより (Charles River Labs 採点システム) 達成され、各動物に関して、合わせて最大60のスコアが与えられる。図44に示されるように、疾患進行および8G8に应答する範囲において大幅な減少をもたらした (相互作用項 $P < 0.0001$)。

【0492】

実施例25：コラーゲン抗体誘導性関節リウマチマウスモデルにおける疾患進行に対するアゴニスト抗体 (INX800、901、および902) の使用

我々は、RAのCAIAマウスモデルに対するINX800 (キメラマウス抗ヒトVISTA-IgG2)、INX901、およびINX902 (ヒト抗ヒトVISTA-IgG2) 処置の影響を試験した。-2日目から開始して、1日おきにINX800、INX901、またはINX902をマウスに投薬した。マウスに、0日目に5-抗体カクテル、そして3日目にLPSを投与した。疾患の発症は、経時的に罹患した関節における炎症の腫れを測定することによって評価された。臨床的スコア化は、各腫れた指について1のスコア、腫れた足蹠について5のスコア、腫れた手首または足首について5のスコアを与えることにより (Charles River Labs 採点システム) 達成され、各動物に関して、合わせて最大60のスコアが与えられる。

10

【0493】

CAIAスコア化は、前述されるように分析された。図45に示されるように、INX800処置は定性的に疾患進行を減少させるが、この実験において統計的有意性はない (相互作用 $P = 0.46$)。対照的に、図46に示されるように、INX901処置は疾患進行を完全に予防した (相互作用 $P < 0.0001$)。図47に更に示されるように、INX902処置は、疾患進行を完全に予防した (相互作用 $P < 0.0001$)。

20

【0494】

実施例26：C57/B16 GVHDモデルにおけるアゴニストVISTA抗体 (8G8) の使用

MHC不適合性急性GVHDの最も一般的に研究されるマウスモデルは、C57/B16 (H2b) BALB/c (H2d) (C57/B16 (H2b) ドナーからの細胞分離株のBALB/c (H2d) への移植) である。ここでは、我々は、照射BALB/cレシピエントに移入された脾臓細胞および骨髄のドナーとしてC57/B16マウスを使用した。我々は、ハムスター-マウスVISTA抗体13F3およびハムスター-IgG対照と比較して、ハムスター-マウスVISTA抗体8G8の免疫抑制の有効性を検査した。

30

【0495】

材料および方法

10週齢の雌のBALB/cレシピエントマウスおよびC57/B16ドナーマウスをCharles River Laboratoriesから購入した。すべてのマウスをDHMCビバリウムでSPF条件下で収容した。

【0496】

レシピエントマウスは、移入前のD0で2回 (9:30 amおよび1:30 pm)、450 cGyでセシウム-137源から発生する全身体照射 (TBI) を受けた。

40

【0497】

ドナーマウスを安楽死させ、HBSSで大腿骨および脛骨を洗い流すことによって、骨髄を採取した。ACT溶液を使用して、赤血球を溶解した。脾臓から単離された単一細胞を懸濁調製し、ACT溶液を使用して、赤血球を溶解した。

【0498】

レシピエントマウスは、200 ugのハムスター-IgG (BioXcell、BE0091ロット#18206/1015)、または8G8 (ロット#AB-130318)、または13F3-2E9 (ロット#BP-075-014) とともに、1000万個の骨髄細胞および1000万個の脾臓細胞を受けた。細胞および抗体を尾静脈静脈内注射によ

50

り投与した。

【0499】

D2、4、および6で、3回の追加用量の抗体がIP注射された。

【0500】

マウスを定期的に量り、疾患の進行を監視した。しかしながら、すべてのマウスは照射障害により体重が大幅に減少し、実験の期間にわたって液体回復食が提供された。罹患の徴候を示すとき、マウスを安楽死させた。

【0501】

結果

図48A～Bは、急性GvHD疾患モデルにおける8G8、13F3、または対照ハムスターIgG抗体で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率を示す。図48Aは21日目のマウスの外観を示し、図48Bは生存率を示す。示されるように、ハムスター - マウスVISTA抗体8G8は、免疫抑制性であり、21日目のマウスの毛皮の外観により図示されるように(図48a)、疾患の重症度を強く減弱し、GvHD誘導性致死から保護される(図48b)。対照的に、13F3はいずれのかかる保護を示さなかった。したがって、ハムスター8G8 - マウスVISTAは、免疫抑制性であり、急性GvHDの重症度を強く減弱し、長期生存を促進する。対照的に、13F3は疾患進行を変更しなかった。

【0502】

実施例27：C57/B16 GvHD疾患モデルにおけるアゴニストVISTA抗体(INX901、INX902、INX903、およびINX904)の使用

我々は、C57/B16 GvHDモデルにおける疾患進行/重症度を調節するそれらの能力を測定することによって、ヒトIgG対照と比較して、 - ヒトVISTA抗体INX901、INX902、INX903、およびINX904の免疫抑制の有効性を検査した。我々は、処置の41日後のレシピエントマウスから採取した末梢血のフローサイトメトリにより、生存マウスにおけるドナーT細胞の存在および完全なキメラ現象を検証した。

【0503】

材料&方法

9～11週齢の雄のBALB/cレシピエントマウスをJacksonから購入した。C57/B16背景の11週齢の雄のヒト-KI VISTAドナーマウス(DDE1)をSage実験室から購入した。すべてのマウスをDHMCビバリウムでSPF条件下で収容した。

【0504】

レシピエントマウスは、移入前の - 1日目およびD0で、300cGyでセシウム - 137源から発生する全身体照射(TBI)を受けた。

【0505】

ドナーマウスを安楽死させ、HBSSで大腿骨および脛骨を洗い流すことによって、骨髓を採取した。ACK溶液を使用して、赤血球を溶解した。T細胞は負の選択により脾臓から単離された(Stemcell#19851)。

【0506】

レシピエントマウスは、10mg/kgのヒトIgG2(Crown Bioscience、ロット#AB150073)、INX901(ロット#BP-021-016-2)、INX902(ロット#BP-021-016-3)、INX903(ロット#BP-021-016-4)、またはINX904(ロット#BP-021-016-5)とともに、1000万個の骨髓細胞および200万個のT細胞を受けた。細胞および抗体を尾静脈静脈内注射により投与した。

【0507】

マウスを定期的に量り、疾患進行を監視し、マウスの体重が初期体重の75%を下回って低下する場合、安楽死させた。

10

20

30

40

50

【0508】

末梢血のフローサイトメトリー分析

後眼窩出血により、移入の41日後に末梢血をマウスから単離した。

【0509】

全血を、CD45、CD11b、CD3、H2Kd (レシピエント)、およびH2Kb (ドナー) に対してBiolegendの蛍光標識抗体で染色し、次いでBD FAC S溶解溶液 (#349202) を使用して、RBCを溶解した。溶解後、細胞をPBSで1回洗浄した。

【0510】

標識した細胞をMiltenyi MACSquantで実行し、FlowJoを使用して分析した。

10

【0511】

結果

図49A~Cは、実験期間中の各処置群の平均(AおよびB)体重減少および生存率(c)を図示する。免疫抑制性 - ヒトVISTA抗体は、疾患のピークでGVHD疾患重症度(体重減少)の抑制または減弱におけるそれらの影響に基づいてランク付けされ得る(図49A)。

【0512】

INX904(黄色)は、抑制性が乏しく、半分のマウスしか生存しない。INX901(緑色)、INX902(赤色)、およびINX903(オレンジ)は、抑制性が強く、完全に保護的であり、INX901は疾患を完全に阻害し、INX902およびINX903は疾患重症度を強く減弱した。示されるように、 - ヒトVISTA処置マウスは長期間生存する(図49BおよびC)。

20

【0513】

41日後、末梢血を生存マウスから採取し、ドナー(H2Kb)またはレシピエント(H2Kd)MHCクラスI染色によって、キメラ現象(ドナー由来造血系)について試験する。図50Aは、血液中のCD11bの大部分がBALB/c対照の血液と比較してドナー型MHCクラスIを発現する、生存 - ヒトVISTA処置マウスの一例を図示する。注目すべきことに、骨髄細胞のみを受けた4/8匹のマウスおよびINX901で処置された3/8匹のマウスは、「生着の失敗」(図50B)によりキメラ現象に達することができず、分析から遡及的に外された。この現象は、最適以下の照射線量およびINX901のT細胞活性化を抑制する高い効力によって説明され得る。T細胞は、T細胞が特に低用量のTBIで生着を補助することは十分に確立されている("The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation", Vincent T. Ho, Robert J. Soiffer Blood 2001 98:3192-3204; doi:10.1182/blood.V98.12.3192)。完全なキメラ現象は、INX902、INX903、およびINX904で処置されたマウスの100%で達成された。ドナー由来T細胞は、すべての生存キメラマウスの血液において数値化された。すべての - ヒトVISTA処置生存キメラマウスは、骨髄細胞のみを受けたマウス(図50C)よりも4~9倍高い数のT細胞を示し、 - ヒトVISTA抗体の枯渇効果を否定する。

30

40

【0514】

したがって、INX901、INX902、INX903、およびINX904 - ヒトVISTA抗体はすべて、免疫抑制活性を示し、急性GVHDを部分的に減弱するか、または完全に抑制した。

【0515】

実施例28: NSGマウスにおける異種GVHDに対する - ヒトVISTA抗体INX901(10mg/kg)の効果

50

異種移植片対宿主病 (G v H D) のヒト化マウスモデルは、インビボにおけるヒト薬物標的に特異的な免疫調節化合物の研究を可能にする。これらは、ヒトからの末梢血単核細胞 (P B M C) を注射されたマウスの免疫欠損株に基づく。 N O D - S C I D I L - 2 R n u l l (N S G) 株は、成熟 T 細胞、 B 細胞、およびナチュラルキラー細胞を欠き、異種 G v H D 研究に修正可能である。 x e n o - G v H D の N S G モデルにおいて、ドナーヒト T 細胞は、レシピエントマウスにおいて確実に拡大し、皮膚組織浸潤につながる抗宿主細胞反応性をもたらす。マウスは体重が減り、未処置のままの場合、 G v H D で死亡する。疾患進行の時間枠は、 3 ~ 5 週間の範囲であり得る。疾患発生および進行の時間は、ヒト P B M C の移入前にマウスを 3 G y で照射することによって加速され得る。この場合、疾患はおよそ 1 ~ 2 週間後に始まり、マウスは 2 ~ 3 週間時点までに死亡する。

10

【 0 5 1 6 】

本明細書において、我々は、ヒト V I S T A 特異的抗体 I N X 9 0 1 が N S G G v H D の疾患進行を調節する能力を検査した実験の結果を説明する。簡潔に、マウスを照射し、単一用量の対照免疫グロブリン (I g) または I N X 9 0 1 とともに、 2 5 0 万個のヒト P B M C をマウスに注射した。我々は、処置の 1 0 日後のレシピエントマウスから採取した末梢血のフローサイトメトリにより、ヒト T 細胞の存在を確認した。疾患進行は、定期的にマウスを量ることにより監視した。 N X 9 0 1 は劇的に疾患進行を低減し、マウス生存率を増加させた。

【 0 5 1 7 】

材料および方法

20

マウスおよび疾患誘導

7 週齢の N S G マウスを、 D H M C の S t e v e F i e r i n g の実験室から購入し、 D H M C で S P F 条件下で収容した。実験の開始前に、マウスに印を入れた。

【 0 5 1 8 】

ヒト末梢血を、 D H M C 血液ドナープログラムのボランティアドナーから提供されるアフレーシスコーンから単離した。

【 0 5 1 9 】

F i c o l l 勾配遠心分離によって P B M C を単離した。

【 0 5 2 0 】

細胞移入前に、マウスを 3 G y で照射した (D H M C) 。

30

【 0 5 2 1 】

6 匹のマウスが、 2 0 0 u l の P B S 中の 1 0 m g / m l のヒト I g G (C r o w n B i o s c i e n c e 、 ロット # A B 1 5 0 0 7 3) に希釈された 2 5 0 万個の P B M C を受けた。 6 匹のマウスが、 2 0 0 u l の P B S 中の 1 0 m g / m l の I N X 9 0 1 (ロット # B P - 0 2 1 - 0 1 6 - 2) に希釈された 2 5 0 万個の P B M C を受けた。すべての治療薬は尾静脈注射を介して送達された。

【 0 5 2 2 】

マウスを定期的に量り、疾患進行を監視し、マウスの体重が開始体重の 8 0 % を下回って低下する場合、安楽死させた。

【 0 5 2 3 】

末梢血のフローサイトメトリー分析

40

後眼窩出血により、処置の 1 0 日後に末梢血をマウスから単離した。

【 0 5 2 4 】

細胞は R B C 溶解を受け、十分にすすぎ、標準的な免疫学的フローサイトメトリープロトコルを使用して、 B i o l e g e n d の蛍光標識抗体の抗マウス C D 4 5 B r V 4 2 1 、抗マウス C D 3 - A P C - C y 7 、抗ヒト C D 4 5 - P E 、および抗ヒト C D 3 - P E - C y 7 で染色した。

【 0 5 2 5 】

標識した細胞を M i l t e n y i M A C S q u a n t で実行し、 F l o w J o を使用して分析した。

50

【 0 5 2 6 】

結果

図 5 1 A の実験は、実験期間中の群内のマウスの平均体重を比較する。図 5 1 B は、個々のマウスの体重を比較する。図 5 2 は、治療後 1 0 日目のマウス末梢血のフローサイトメトリー分析の結果を示す。実験は、x e n o - G v H D 疾患モデルにおいて I N X 9 0 1 または対照 A B で処置された N S G マウスにおける T 細胞拡大を示し、ここで、値は、ヒト C D 3 + T 細胞を構成したマウス末梢循環における全 C D 4 5 + 細胞の % を示す。

【 0 5 2 7 】

これらの結果は、末梢ヒト T 細胞の拡大が I N X 9 0 1 処置群において低減され、I N X 9 0 1 処置群のマウスが対照処置群と同じくらい迅速または一貫して体重が減らないことを示す。これらの結果は、V I S T A アゴニスト抗体が G v H D 疾患を治療および予防するために使用され得る更なる証拠を提供する。

10

【 0 5 2 8 】

実施例 2 9 : C 5 7 / B 1 6 T 細胞および骨髄を注射された照射 B A L B / c マウスにおける G v H D に対する 8 m g / k g でのハムスター - マウス V I S T A 抗体 8 G 8 の有効性

我々は、ハムスター I g G 対照と比較して、G V H D 疾患進行 / 重症度を調節するその能力により、ハムスター - マウス V I S T A 抗体 8 G 8 の免疫抑制の有効性を検査した。

【 0 5 2 9 】

材料および方法

1 0 週齢の雄の B A L B / c レシピエントマウスおよび C 5 7 / B 1 6 ドナーマウスを J a c k s o n から購入した。すべてのマウスを D H M C ビバリウムで S P F 条件下で収容した。

20

【 0 5 3 0 】

レシピエントマウスは、移入前の - 1 日目および D 0 で、3 0 0 c G y でセシウム - 1 3 7 源から発生する全身体照射 (T B I) を受けた。

【 0 5 3 1 】

ドナーマウスを安楽死させ、H B S S で大腿骨および脛骨を洗い流すことによって、骨髄を採取した。A C K 溶液を使用して、赤血球を溶解した。T 細胞は負の選択により脾臓から単離された (S t e m c e l l # 1 9 8 5 1) 。

30

【 0 5 3 2 】

レシピエントマウスは、2 0 0 u g のハムスター I g G (B i o X c e l l , B E 0 0 9 1 ロット # 1 8 2 0 6 / 1 0 1 5) または 8 G 8 (ロット # A B 1 3 0 3 1 8 - 1) とともに、1 0 0 0 万個の骨髄細胞および 2 0 0 万個の T 細胞を受けた。細胞および抗体を尾静脈静脈内注射により投与した。

【 0 5 3 3 】

マウスを定期的に量り、疾患進行を監視し、マウスの体重が初期体重の 7 5 % を下回って低下する場合、安楽死させた。

【 0 5 3 4 】

結果

図 5 3 A ~ C は、実験期間中の各処置群の平均 (a) および個々 (b) の体重減少および生存率 (c) を図示する。免疫抑制性ハムスター - マウス V I S T A 抗体 8 G 8 は、疾患のピーク (D 8 ~ 1 0) において疾患重症度を強く減弱し、マウスの大部分において長期生存を促進する。具体的には、図 5 3 A は、群別 (1 群当たり N = 8 のマウス) の平均体重減少を示し、図 5 3 B は、群別 (1 群当たり N = 8 のマウス) の個々の体重減少を示し、図 5 3 C は生存率を示す。これらの結果は、8 G 8 が免疫抑制性であり、急性 G v H D の重症度を強く減弱し、長期生存を促進することを示す。これらの結果は、V I S T A アゴニスト抗体が G v H D 疾患を治療および予防するために使用され得る更なる証拠を提供する。

40

【 0 5 3 5 】

50

実施例 30 : D D E 1 T 細胞および骨髄を注射された照射 B A L B / c マウスにおける G v H D に対する - ヒト V I S T A 抗体 I N X 9 0 2 (1 0、2 . 5、および 1 m g / k g) の用量有効性

これらの実験において、完全 C 5 7 / B 1 6 ヒト - V I S T A ノックインマウス (D D E 1) が T 細胞のドナーとして使用され、骨髄は照射 B A L B / c レシピエントに移入された。疾患進行は、定期的にマウスを量ることにより監視した。我々は、疾患進行 / 重症度を調節する能力を測定することによって、ヒト I g 対照と比較して、様々な用量での - ヒト V I S T A 抗体 I N X 9 0 2 の免疫抑制の有効性を検査した。我々は、処置の 2 1 日後のレシピエントマウスから採取した末梢血のフローサイトメトリにより、生存マウスにおけるドナー T 細胞の存在およびキメラ現象も検証した。

10

【 0 5 3 6 】

材料および方法

G v H D モデルおよび疾患重症度評価

10 週齢の雄の B A L B / c レシピエントマウスを J a c k s o n から購入した。C 5 7 / B 1 6 背景の 1 4 週齢の雄のヒト - K I V I S T A ドナーマウス (D D E 1) を S a g e 実験室から購入した。すべてのマウスを D H M C ビバリウムで S P F 条件下で収容した。

【 0 5 3 7 】

レシピエントマウスは、移入前の - 1 日目および D 0 で、3 5 0 c G y でセシウム - 1 3 7 源から発生する全身体照射 (T B I) を受けた。

20

【 0 5 3 8 】

ドナーマウスを安楽死させ、H B S S で大腿骨および脛骨を洗い流すことによって、骨髄を採取した。A C K 溶液を使用して、赤血球を溶解した。T 細胞は負の選択により脾臓から単離された (S t e m c e l l # 1 9 8 5 1) 。

【 0 5 3 9 】

レシピエントマウスは、1 0 m g / k g のヒト I g G 2 (C r o w n B i o s c i e n c e、ロット # A B 1 5 0 0 7 3) または 1 0 m g / k g、2 . 5 m g / k g、もしくは 1 m g / k g の I N X 9 0 2 (ロット # B P - 0 2 1 - 0 1 6 - 3) とともに、1 0 0 0 万個の骨髄細胞および 2 0 0 万個の T 細胞を受けた。細胞および抗体を尾静脈静脈内注射により投与した。

30

【 0 5 4 0 】

マウスを定期的に量り、疾患進行を監視し、マウスの体重が初期体重の 7 5 % を下回って低下する場合、安楽死させた。

【 0 5 4 1 】

末梢血のフローサイトメトリー分析

後眼窩出血により、移入の 2 1 日後に末梢血をマウスから単離した。

【 0 5 4 2 】

全血を、C D 4 5、C D 1 1 b、C D 3、H 2 K d (レシピエント)、および H 2 K b (ドナー) に対して B i o l e g e n d の蛍光標識抗体で染色し、次いで B D F A C S 溶解溶液 (# 3 4 9 2 0 2) を使用して、R B C を溶解した。溶解後、細胞を P B S で 1 回洗浄した。

40

【 0 5 4 3 】

標識した細胞を M i l t e n y i M A C S q u a n t (登録商標) で実行し、F l o w J o を使用して分析した。

【 0 5 4 4 】

結果

急性 G v H D は、ヒト V I S T A - K I マウスから単離された同種 (C 5 7 / B 1 6) 骨髄および脾臓 T 細胞を移入することによって、照射 B A L B / c レシピエントにおいて誘導される。疾患重症度は体重減少を追跡することによって測定される。

【 0 5 4 5 】

50

図54A～Bは、INX902処置マウスの平均体重減少(A)および生存率(B)を図示する。INX902は、対照Ig処置マウスと比較して、低減した体重減少により評価されるように、試験したすべての用量で疾患重症度を減弱する(図54A)。INX902は、体重減少(54A)および死亡(図54B)の両方の防止において、低用量よりも高用量(10mg/kg)でより効率的であるように見える。

【0546】

21日後、末梢血を生存マウスから採取し、ドナー(H2Kb)またはレシピエント(H2Kd)MHCクラスI染色によりキメラ現象(ドナー由来造血系)について試験する。図55Aは、INX902処置マウスにおけるキメラ現象の百分率を図示する。350cGyの照射線量で、骨髄細胞のみを受けるマウスを含むすべてのマウスが完全なキメラ現象に達した。図55Bは、骨髄細胞のみを受けたマウスと比較して、T細胞数がINX902処置マウスにおいて増加していることを示す。具体的には、図55A～Bは、急性GvHD疾患モデルにおいて様々な用量のINX902または対照Igで処置された生存マウスのキメラ現象を示す。図55Aは、INX902処置マウスの血液中のドナー由来CD11bの百分率を示し、図55Aは、INX902処置マウスまたはDDE1対照マウスの25uLの血液中のドナー由来T細胞数を示す。

10

【0547】

したがって、急性GvHDは、INX902アゴニスト抗体を使用して、照射BALB/cレシピエントにおいて効果的に処置される。これらの結果は、VISTAアゴニスト抗体がGvHD疾患を治療および予防するために使用され得る更なる証拠を提供する。

20

【0548】

実施例31：DDE1T細胞および骨髄を注射された照射BALB/cマウスにおけるGvHDに対するヒトVISTA抗体INX901およびINX903(10、2.5、および1mg/kg)の用量有効性

我々は、GvHD疾患進行/重症度を調節する能力を測定することによって、ヒトIg対照と比較して、様々な用量でのヒトVISTA抗体INX901およびINX903の免疫抑制の有効性を検査した。我々は、処置の27～34日後のレシピエントマウスから採取した末梢血のフローサイトメトリにより、生存マウスにおけるキメラ現象も検証した。

【0549】

材料および方法

GvHDモデルおよび疾患重症度評価

9週齢の雄のBALB/cレシピエントマウスをJacksonから購入した。C57/B16背景の12週齢の雄のヒト-KI VISTAドナーマウス(DDE1)をSage実験室から購入した。すべてのマウスをDHMCビバリウムでSPF条件下で収容した。

【0550】

レシピエントマウスは、移入前の-1日目およびD0で、300cGyでセシウム-137源から発生する全身体照射(TBI)を受けた。

【0551】

ドナーマウスを安楽死させ、HBSSで大腿骨および脛骨を洗い流すことによって、骨髄を採取した。ACK溶液を使用して、赤血球を溶解した。T細胞は負の選択により脾臓から単離された(Stemcell#19851)。

40

【0552】

レシピエントマウスは、10mg/kgのヒトIgG2(Crown Bioscience、ロット#AB150073)または10mg/kg、2.5mg/kg、もしくは1mg/kgのINX901(ロット#BP-021-016-2)またはINX903(ロット#BP-021-016-4)とともに、1000万個の骨髄細胞および200万個のT細胞を受けた。細胞および抗体を尾静脈静脈内注射により投与した。

【0553】

50

マウスを定期的に量り、疾患進行を監視し、マウスの体重が初期体重の75%を下回って低下する場合、安楽死させた。

【0554】

末梢血のフローサイトメトリー分析

後眼窩出血により、移入の27日後(INX901)または34日後(INX903)に末梢血をマウスから単離した。

【0555】

全血を、CD45、CD11b、CD3、H2Kd(レシピエント)、およびH2Kb(ドナー)に対してBiolegendの蛍光標識抗体で染色し、次いでBD FACS溶解溶液(#349202)を使用して、RBCを溶解した。溶解後、細胞をPBSで1回洗浄した。

10

【0556】

標識した細胞をMiltenyi MACSquantで実行し、FlowJoを使用して分析した。

【0557】

結果

急性GvHDは、ヒトVISTA-KIマウスから単離された同種(C57/B16)骨髄および脾臓T細胞を移入することによって、照射BALB/cレシピエントにおいて誘導される。疾患重症度は体重減少を追跡することによって測定される。図56A~Dは、実験期間中のINX901(図56Cおよび図56D)およびINX903(図56Aおよび図56B)処置マウスの平均(図56Aおよび図56C)体重減少および生存率(bおよびd)を図示する。

20

【0558】

INX903は、対照Ig処置マウスと比較して、低減した体重減少により評価されるように、試験したすべての用量で疾患重症度を減弱する(図56A)。INX903は、試験したすべての用量で生存率も増加させ、1mg/kgの最小用量がより高い用量よりも保護的であるように見える(図56B)。

【0559】

INX901は、対照Ig処置マウスと比較して、体重減少の不在により評価されるように、試験したすべての用量で疾患を完全に阻害する(図56C)。INX901は、試験したすべての用量で生存率も増加させ、1mg/kgの最小用量がより高い用量よりも保護的であるように見える(図56D)。

30

【0560】

27~34日後、末梢血を生存マウスから採取し、ドナー(H2Kb)またはレシピエント(H2Kd)MHCクラスI染色によりキメラ現象(ドナー由来造血系)について試験する。

【0561】

図57Aは、INX903処置マウスにおけるキメラ現象の百分率を図示し、図57Bは、INX901処置マウスにおけるキメラ現象の百分率を図示する。骨髄細胞のみを受けたすべてのマウス、およびT細胞を受け、INX901で処置されたほぼすべてのマウスは、「生着の失敗」によりキメラ現象に達することができなかった(図57Aおよび図57B)。この現象は、最適以下の照射線量およびINX901のT細胞活性化を抑制する高い効力によって説明され得る。上述のように、T細胞は特に低用量のTBIで生着を補助することが十分に確立されている。その証拠として、完全なキメラ現象は、T細胞を受け、あまり抑制性ではないINX903で処置されたほぼすべてのマウスにおいて達成された(図57A)。

40

【0562】

したがって、INX901およびINX903は、それぞれ、1mg/kgの低い用量で急性GvHDを抑制または減弱する。より低い用量はより高い用量よりも効果的であるように見えるが、死亡率は、低用量のTBIとの関連で、強力な免疫抑制抗体を受けるマ

50

ウスにおける生着失敗にも起因し得る。これらの結果は、V I S T A アゴニスト抗体が G v H D 疾患を治療および予防するために使用され得る更なる証拠を提供する。

【0563】

実施例32：D D E 1 T細胞および骨髄を注射された照射 B A L B / c マウスにおける G v H D に対する 10 mg / K g での - ヒト V I S T A 抗体 I N X 8 0 3、I N X 8 0 4 の有効性の比較

これらの実験において、我々は、完全 C 5 7 / B 1 6 ヒト - V I S T A ノックインマウス (D D E 1) を T 細胞のドナーとして使用し、骨髄は照射 B A L B / c レシピエントに移入された。疾患進行は、定期的にマウスを量ることにより監視した。我々は、疾患進行 / 重症度を調節する能力を測定することによって、ヒト I g 対照と比較して、 - ヒト V I S T A 抗体 I N X 8 0 3 および I N X 8 0 4 の免疫抑制の有効性を検査した。

10

【0564】

材料および方法

G v H D モデルおよび疾患重症度評価

9 週齢の雄の B A L B / c レシピエントマウスを J a c k s o n から購入した。C 5 7 / B 1 6 背景の 10 週齢の雄のヒト - K I V I S T A ドナーマウス (D D E 1) を S a g e 実験室から購入した。すべてのマウスを D H M C ビバリウムで S P F 条件下で収容した。

【0565】

レシピエントマウスは、移入前の - 1 日目および D 0 で、3 5 0 c G y でセシウム - 1 3 7 源から発生する全身体照射 (T B I) を受けた。

20

【0566】

ドナーマウスを安楽死させ、H B S S で大腿骨および脛骨を洗い流すことによって、骨髄を採取した。A C K 溶液を使用して、赤血球を溶解した。T 細胞は負の選択により脾臓から単離された (S t e m c e l l # 1 9 8 5 1) 。

【0567】

レシピエントマウスは、10 mg / k g のヒト I g G 2 (C r o w n B i o s c i e n c e、ロット # A B 1 5 0 0 7 3)、または I N X 8 0 3 (ロット # B P - 0 1 8 - 0 1 6)、I N X 8 0 4 (ロット # B P - 0 1 9 - 0 1 6) とともに、1000 万個の骨髄細胞および 200 万個の T 細胞を受けた。細胞および抗体を尾静脈静脈内注射により投与した。

30

【0568】

マウスを定期的に量り、疾患進行を監視し、マウスの体重が初期体重の 7 5 % を下回って低下する場合、安楽死させた。

【0569】

結果

図 5 8 A ~ C は、実験期間中の各処置群の平均 (5 8 A) および個々 (5 8 B) の体重減少および生存率 (5 8 C) を図示する。I N X 8 0 3 (緑色) は、強く抑制性であり、疾患の発生を阻害し、マウスを完全に保護する。I N X 8 0 4 は、疾患のピークにおける疾患重症度を減弱するが、長期でマウスを完全に保護することはできず、その半分は最終的に G v H D で死亡する。したがって、試験された - ヒト V I S T A 抗体は、急性 G v H D を減弱するかまたは完全に抑制する能力において免疫抑制活性を示した。これらの結果は、抗ヒト V I S T A アゴニスト抗体が G v H D 疾患を治療および予防するために使用され得る更なる証拠を提供する。

40

【0570】

実施例33：D D E 1 T細胞および骨髄を注射された照射 B A L B / c マウスにおける G v H D に対する - ヒト V I S T A 抗体 I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 の有効性

これらの実験において、我々は、完全 C 5 7 / B 1 6 ヒト - V I S T A ノックインマウス (D D E 1) を再度 T 細胞のドナーとして使用し、骨髄は照射 B A L B / c レシピエントに移入された。疾患進行は、定期的にマウスを量ることにより監視した。我々は、疾患

50

進行 / 重症度を調節する能力を測定することによって、ヒト Ig 対照と比較して、10 mg / kg での - ヒト V I S T A 抗体 I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 の免疫抑制の有効性を検査した。

【0571】

材料および方法

G v H D モデルおよび疾患重症度評価

9 週齢の雄の B A L B / c レシピエントマウスを J a c k s o n から購入した。C 5 7 / B 1 6 背景の 1 2 週齢の雄のヒト - K I V I S T A ドナーマウス (D D E 1) を S a g e 実験室から購入した。すべてのマウスを D H M C ビバリウムで S P F 条件下で収容した。

【0572】

レシピエントマウスは、移入前の - 1 日目および D 0 で、3 0 0 c G y でセシウム - 1 3 7 源から発生する全身体照射 (T B I) を受けた。

【0573】

ドナーマウスを安楽死させ、H B S S で大腿骨および脛骨を洗い流すことによって、骨髓を採取した。A C K 溶液を使用して、赤血球を溶解した。T 細胞は負の選択により脾臓から単離された (S t e m c e l l # 1 9 8 5 1) 。

【0574】

レシピエントマウスは、1 0 m g / k g のヒト I g G 2 (C r o w n B i o s c i e n c e 、ロット # A B 1 5 0 0 7 3) 、1 0 m g / k g の I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 とともに、5 0 0 万個の骨髓細胞および 1 6 0 万個の T 細胞を受けた。細胞および抗体を尾静脈静脈内注射により投与した。

【0575】

マウスを定期的に量り、疾患進行を監視し、マウスの体重が初期体重の 8 0 % を下回って低下する場合、安楽死させた。

【0576】

結果

I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 マウスの両方が、対照処置群よりも体重が減少しなかった (図 5 9) 。実際、対照群からのすべてのマウスが 2 週間以内に 殺されなければならなかったが、I N X 8 0 0 または I N X 8 0 1 で処置されたマウスのすべてが > 3 2 日間生存した (図 5 9) 。実験において、急性 G v H D は h V - K I マウスからの T 細胞および B M を照射 B a l b / c レシピエントに移入することによって誘導された。体重減少によりマウスを疾患について追跡し、最初の開始体重の 2 0 % 超を失った場合、マウスを殺した。

【0577】

したがって、I N X 8 0 0 および I N X 8 0 1 の両方は、1 0 m g / k g の用量で急性 G v H D を減弱する。これらのマウスは、I g 対照群よりも体重減少をあまり呈さず、増加した生存率を示した。これらの結果は、抗ヒト V I S T A アゴニスト抗体が急性および慢性形態両方の G v H D 疾患を治療および予防するために使用され得る更なる証拠を提供する。

【0578】

実施例 3 4 : N Z B W F - 1 狼瘡モデルにおける抗マウス V I S T A 抗体の効果

N Z B W F - 1 狼瘡モデル

ニュージーランドブラック x ニュージーランドホワイト (N Z B W F - 1) は、T h e J a c k s o n L a b o r a t o r y を通して入手可能な市販の狼瘡易発性株である。これらのマウスは、全身性エリテマトーデス (S L E) 患者に類似する狼瘡を自発発生し、雌のマウスにおいて流行する。疾患の特徴としては、タンパク尿、糸球体腎炎、d s D N A 抗体などの自己反応性抗体のレベル上昇、溶血性貧血、および腎臓における免疫複合体沈着が挙げられる。細胞レベルでは、T 細胞、B 細胞、および骨髓細胞の異常が報告されている。

10

20

30

40

50

【0579】

これらの実験において、我々は、雌のNZBWF - 1マウスにおいて、ハムスター マウスVISTA抗体8G8の機能を検査した。マウスを対照Igまたは8G8で1週間に3回処置した。タンパク尿および体重に関してマウスを毎週監視した。処置中、2週間おきに血清を収集した。実験の終了時に、血清、脾臓、および腎臓を採取した。Luminexアッセイに必要となるまで血清を - 80 で保管した。

【0580】

脾臓を、フローサイトメトリ分析、細胞選別のために処理するか、または免疫蛍光染色ならびに遺伝子プロファイリングおよびnanoString分析のためのRNA単離のためにOCTにおいて急速凍結した。1つの腎臓を、免疫蛍光染色、ならびに遺伝子プロ 10
 ファイリングおよびnanoString分析のためのRNA単離のためにOCTにおいて急速凍結した。2つ目の腎臓を固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片は臨床病理のためにH&E染色された。

【0581】

材料および方法

マウス処置

8週齢の雌のNZBWF - 1マウスをJacksonから購入し、DHMCでSPF条件下で保管した。

【0582】

タンパク尿および体重を、Dartmouth Hitchcock動物施設において 20
 毎週監視した。

【0583】

対照IgG / ハムスターIgまたは8G8を、i.p注射により300µg / マウスで1週間に3回投与した。

【0584】

健康不良の徴候および活動の減少の際には、ならびに動物施設のプロトコルに従い、マウスを 殺した。

【0585】

タンパク尿

Chemstrips10をRocheから購入した。尿をマウスから収集し、chemstripに設置した。尿中のタンパク質を決定するために、比色スケールを使用した 30
 : 0mg / dL、微量(1mg / dL)、30mg / dL、100mg / dL、および500mg / dL。

【0586】

血清分析

血清を収集し、必要とされるまで - 80 で保管した。ケモカインおよびサイトカインレベルは、32 Milliplex Mouse Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore) を使用して決定され、アッセイはBio-plex 200 System (Life Science Research, Bio Rad) で実行した。Bio-Plex Manager 6.0 ソフトウェアを使用して、データを分析した。 40

【0587】

臨床病理

腎臓をカセットに入れ、室温で10%ホルマリン中でO/N固定し、次いでPBS中で簡単に洗浄し、70%エタノール(Fisher Scientific)に移して維持した後に、DartmouthのGeisel School of MedicineのPathology Translational Research Coreに移し、そこで、パラフィン包埋し、切片化し、その後染色した。

【0588】

パラフィン包埋組織切片(4µm)を、Leica BOND RX自動染色装置を使用 50

して染色した。脱蠟後、切片は、抗原回収（結合エピトープ回収溶液2、100、20分）を受け、Leica希釈剤中の一次抗体（下の希釈を参照されたい）とともに、室温で30～60分間インキュベートされた。次いで、スライドをPBS中で3×5分洗浄で洗浄し、二次抗体（Leica Bond Refine検出キット、DS9800から）とともにインキュベートした。PBS中で3回の最終洗浄後、切片をDAB（Leica Bondポリマー検出キット）とともにインキュベートし、すすぎ、ヘマトキシリンで対比染色し、装着した。

【0589】

臨床病理は病理学者によって評価される。

【0590】

10

結果

この実験は、8G8が雌のNZBWF-1マウスにおいて免疫抑制の役割を媒介したかどうかを検査するために設計された。マウスは、タンパク尿発生について16週齢から毎週監視された。タンパク尿が検出された後の週の32週目に、マウスを、1週間に3回、i.p注射により300μgのハムスターIgまたは8G8で処置した。33週目に、ハムスターIg群のすべてのマウスは、健康不良により殺され、脾臓、腎臓、および血漿が収集された。図60に示されるように、8G8群のマウスは、良好な健康および低減されたタンパク尿を示した。

【0591】

血漿におけるメディエーターに対する8G8の効果を決定するために32 Multiplex Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Luminescence Assayを実行した。LIX/CXCL5における大幅な低減およびIL-9の増加が検出された（図61）。具体的には、図61に示されるように、対照Igおよび8G8処置NZBWF-1マウスの血清中のLIX/CXCL5およびIL-9レベルが検出された。対照IgG（n=5）および8G8マウス（n=5）から血清を33週目に収集し、Bio-plex 200 Systemsを使用して、32 plex実行でケモカインおよびサイトカインを評価し、Bio Plex manager 6.0ソフトウェアにより分析した。データは平均+/-SEMとして示され、統計的有意性は対応のない学生t検定によって決定された。図61において、**は群間の有意性（p<0.01）を示す。

20

【0592】

LIX/CXCL5の減少は、その発現がIL-17によって調節され、狼瘡において病原性サイトカインであるため、注目すべきである。これは、SLEにおける好中球動員および加速されたアテローム性動脈硬化症にも関連する（Nalbandian et al., "Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts", *Clinical and Experimental Immunology*, 2009; 157(2): 209-15、Lopez-Pedreria et al., "Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches", *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010 Article ID 607084)。IL-9がSLEにおいて炎症の低減に役割を果たし得るため、IL-9の増加は、8G8が促進し、抗炎症環境を示唆する（Leng et al., "Potential roles of IL-9 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus", *American Journal of Clinical and Experimental Immunology* 2012; 1(1): 28-32）。

30

40

【0593】

結論

50

アゴニスティックな抗VISTAアゴニスティック8G8は、生存率を改善し、保護的な抗炎症性サイトカインを増加させ、炎症性サイトカインを低減し、タンパク尿の発生を更に低減した(図60、61)。これらの結果は、アゴニスティックな抗VISTA抗体が狼瘡の治療または予防に、ならびに腎臓機能に対するその有害作用などの狼瘡の病理学的副作用を管理するため、および生存率を高めるために使用され得ることを示す。

【0594】

実施例35：NZBWF-1狼瘡モデルにおける抗マウスVISTA抗体の効果

NZBWF-1狼瘡モデル

NZBWF-1狼瘡モデルは、上に記載される。NZBWF-1狼瘡モデルを使用する実験のこの群において、我々は、雌のNZBWF-1マウスにおいて、ハムスターマウスVISTA抗体8G8の機能を再度検査した。マウスを対照Igまたは8G8で1週間に3回処置した。タンパク尿および体重に関してマウスを毎週監視した。処置中、2週間おきに血清を収集した。実験の終了時に、血清、脾臓、および腎臓を採取した。Luminexアッセイに必要なまで血清を-80で保管した。

10

【0595】

脾臓を、フローサイトメトリ分析、細胞選別のために処理するか、または免疫蛍光染色ならびに遺伝子プロファイリングおよびnanoString分析のためのRNA単離のためにOCTにおいて急速凍結した。1つの腎臓を、免疫蛍光染色、ならびに遺伝子プロファイリングおよびnanoString分析のためのRNA単離のためにOCTにおいて急速凍結した。2つ目の腎臓を固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片は臨床病理のためにH&E染色された。

20

【0596】

材料および方法

マウス処置

8週齢の雌のNZBWF-1マウスをJacksonから購入し、DHMCでSPF条件下で保管した。

【0597】

タンパク尿および体重を、Dartmouth Hitchcock動物施設において毎週監視した。

【0598】

対照IgG/ハムスターIgまたは8G8を、i.p注射により300μg/マウスで1週間に3回投与した。

30

【0599】

健康不良の徴候および活動の減少の際には、ならびに動物施設のプロトコルに従い、マウスを殺した。

【0600】

タンパク尿

【0601】

Chemstrips10をRocheから購入した。尿をマウスから収集し、chemstripに設置した。尿中のタンパク質を決定するために、比色スケールを使用した：0mg/dL、微量(1mg/dL)、30mg/dL、100mg/dL、および500mg/dL。

40

【0602】

血清分析

血清を収集し、必要とされるまで-80で保管した。ケモカインおよびサイトカインレベルは、32 Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel(Millipore)を使用して決定され、アッセイはBio-plex 200 System(Life Science Research, Bio Rad)で実行した。Bio-Plex Manager 6.0ソフトウェアを使用して、データを分析した。

50

【0603】

骨髄由来抑制細胞単離キット

骨髄由来抑制細胞 (MDS C) を、製造業者の指示に従い、Miltenyi Biotec の骨髄由来抑制細胞単離キットを使用して単離した。

【0604】

RNA単離およびnanoString

RNAは、Trizol (Life Technologies) およびPureLink RNA Mini Kit (Ambion) を使用して、MDS Cから単離された。RNAは、マウス炎症 nanoString 12アッセイ (nanoString Technologies) で実行され、データはnSolver分析ソフトウェアを使用し

10

【0605】

臨床病理

腎臓をカセットに入れ、室温で10%ホルマリン中でO/N固定し、次いでPBS中で簡単に洗浄し、70%エタノール (Fisher Scientific) に移して維持した後に、DartmouthのGeisel School of MedicineのPathology Translational Research Coreに移し、そこで、パラフィン包埋し、切片化し、その後染色した。

【0606】

パラフィン包埋組織切片 (4 μm) を、Leica BOND RX自動染色装置を使用して染色した。脱蠟後、切片は、抗原回収 (結合エピトープ回収溶液2、100、20分) を受け、Leica希釈剤中の一次抗体 (下の希釈を参照されたい) とともに、室温で30~60分間インキュベートされた。次いで、スライドをPBS中で3x5分洗浄で洗浄し、二次抗体 (Leica Bond Refine検出キット、DS9800から) とともにインキュベートした。PBS中で3回の最終洗浄後、切片をDAB (Leica Bondポリマー検出キット) とともにインキュベートし、すすぎ、ヘマトキシリンで対比染色し、装着した。

20

【0607】

臨床病理は病理学者によって評価される。

【0608】

結果

この実験は、8G8が雌のNZBWF-1マウスにおいて免疫抑制の役割を媒介したかどうかを検査するために設計された。マウスは、タンパク尿発生について22週齢から毎週監視された。タンパク尿が検出された後の週の28週目に、マウスを、1週間に3回、i.p注射により300 μgのハムスターIgまたは8G8で処置した。対照群における疾患重症度は増加し続けたが、8G8群のマウスは、タンパク尿レベルの低減を示した (図62)。

30

【0609】

図に示されるように、アゴニスティックな抗VISTA抗体8G8は、タンパク尿の発生を低減した (図62)。

40

【0610】

実施例36: IMRL/lpr狼瘡モデルにおける抗VISTA抗体の評価

IMRL/lpr狼瘡動物モデル

記述されるように、MRL/lprは、The Jackson Laboratoryを通して入手可能な市販の狼瘡易発性株である。これらのマウスは、Fasにおいて自発変異によるリンパ球増殖 (Fas lpr) の兆候を示す。疾患の特徴としては、免疫複合体系球体腎症および高レベルの循環免疫複合体が挙げられる。T細胞区画における異常も報告されている。この実験において、我々は、雌のMRL/lprマウスにおいて、ハムスターマウスVISTA抗体8G8の機能を検査した。マウスを対照Ig/ハムスターIgまたは8G8で1週間に3回処置した。タンパク尿および体重に関してマウスを毎週

50

監視した。処置中、2週間おきに血清を収集した。実験の終了時に、血清、脾臓、および腎臓を採取した。Luminexアッセイに必要なまで血清を-80で保管した。脾臓およびリンパ節を、細胞選別のために処理するか、または免疫蛍光染色ならびに遺伝子プロファイリングおよびnanoString分析のためのRNA単離のためにOCTにおいて急速凍結した。1つの腎臓を、免疫蛍光染色、ならびに遺伝子プロファイリングおよびnanoString分析のためのRNA単離のためにOCTにおいて急速凍結した。2つ目の腎臓を固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片は臨床病理のためにH&E染色された。

【0611】

材料および方法

マウス処置

12週齢の雌のNZBWF-1マウスをJacksonから購入し、DHMCでSPF条件下で保管した。

【0612】

タンパク尿および体重を、Dartmouth Hitchcock動物施設において毎週監視した。

【0613】

対照Ig/ハムスターIgまたは8G8を、i.p注射により300μg/マウスで1週間に3回投与した。

【0614】

タンパク尿が500mg/dLになったときマウスを殺した。

【0615】

タンパク尿

Chemstrips10をRocheから購入した。尿をマウスから収集し、chemstripに設置した。尿中のタンパク質を決定するために、比色スケールを使用した：0mg/dL、微量(1mg/dL)、30mg/dL、100mg/dL、および500mg/dL。

【0616】

血清分析

血清を収集し、必要とされるまで-80で保管した。ケモカインおよびサイトカインレベルは、32 Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel(Millipore)を使用して決定され、アッセイはBio-plex 200 System(Life Science Research, Bio Rad)で実行した。Bio-Plex Manager 6.0ソフトウェアを使用して、データを分析した。

【0617】

RNA単離およびnanoString

RNAは、Trizol(Life Technologies)およびPureLink RNA Mini Kit(Ambion)を使用して、単離された。RNAは、マウス炎症nanoString 12アッセイ(nanoString Technologies)で実行され、データはnSolver分析ソフトウェアを使用して定量化された。

【0618】

臨床病理

腎臓をカセットに入れ、室温で10%ホルマリン中でO/N固定し、次いでPBS中で簡単に洗浄し、70%エタノール(Fisher Scientific)に移して維持した後に、DartmouthのGeisel School of MedicineのPathology Translational Research Coreに移し、そこで、パラフィン包埋し、切片化し、その後染色した。

【0619】

10

20

30

40

50

パラフィン包埋組織切片(4 μm)を、Leica BOND RX自動染色装置を使用して染色した。脱蠟後、切片は、抗原回収(結合エピトープ回収溶液2、100、20分)を受け、Leica希釈剤中の一次抗体(下の希釈を参照されたい)とともに、室温で30~60分間インキュベートされた。次いで、スライドをPBS中で3×5分洗浄で洗浄し、二次抗体(Leica Bond Refine検出キット、DS9800から)とともにインキュベートした。PBS中で3回の最終洗浄後、切片をDAB(Leica Bondポリマー検出キット)とともにインキュベートし、すすぎ、ヘマトキシリンで対比染色し、装着した。

【0620】

臨床病理は病理学者によって評価される。

10

【0621】

結果

この実験は、8G8が雌のMRL/lprマウスにおいて免疫抑制の役割を媒介したかどうかを検査するために設計された。マウスは、タンパク尿発生について15週齢から毎週監視された。16週目に、マウスを、1週間に3回、i.p注射により300 μgのハムスターIgまたは8G8で処置した。血漿におけるメディエーターに対する8G8の効果を決定するために、収集し、-80で保管した。脾臓およびリンパ節を採取し、免疫蛍光染色およびRNA単離のために急速凍結した。アゴニスティックな抗VISTA抗体8G8は、高いタンパク尿レベルを特徴とする疾患発生の発生率を低減した(図63を参照されたい)。

20

【0622】

図63に示されるように、アゴニスト抗マウスVISTA抗体8G8は、15週齢の雌のMRL/lprマウスをタンパク尿に関して毎週監視した実験において、MRL/lprマウスにおけるタンパク尿の発生を低減する。タンパク尿値は、chemstripsを使用して記録され、mg/dLとして定量化された。16週目に、300 μgのハムスターIg(黒色線、n=8)または300 μgの8G8(赤色線、n=8)のいずれかで、1週間に3回i.p.注射によりマウスを処置した。21週目のデータは、chemstripsの技術的問題により廃棄された。(図63A)平均タンパク尿は標準誤差棒で示される。(図63B)各時間点における疾患発生率は、100 mg/dL以上のタンパク尿を示した各群におけるマウスのパーセントとして計算された。したがって、8G8は、高タンパク尿レベルを特徴とする疾患発生の発生率を低減した。

30

【0623】

図64に示されるように、8G8は、300 μgの対照Ig/ハムスターIgまたは300 μgの8G8のいずれかで、1週間に3回i.p.注射により処置されたマウスから脾臓を23週目で採取した実験において、MRL/lprマウスにおける脾腫も低減する。脾腫は、8G8処置マウスと比較して、対照Ig処置マウスにおいて観察された。(代表的な脾臓は図に示される)。

【0624】

図65に更に示されるように、8G8は、300 μgの対照Ig/ハムスターIgまたは300 μgの8G8のいずれかで、1週間に3回i.p.注射により処置されたマウスから頸部リンパ節を23週目で採取した実験において、MRL/lprマウスにおける頸部リンパ節のリンパ球増殖も低減する。リンパ球増殖は、8G8処置マウスと比較して、対照Ig処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な頸部リンパ節を示す。

40

【0625】

これらの結果は、アゴニスティックな抗VISTA抗体が狼瘡の治療または予防に、ならびに腎臓機能および脾臓ならびに病理学的リンパ球増殖に対するその有害作用などの狼瘡の病理学的副作用を管理するために使用され得ることを更に示す。

【0626】

実施例37:IMRL/lpr狼瘡モデルにおける抗VISTA抗体の評価

IMRL/lpr狼瘡動物モデル

50

MRL/lpr 狼瘡モデルは、上に記載される。この実験において、我々は、雌の MRL/lpr マウスにおいて、ハムスター マウス VISTA 抗体 8G8 の効果を再度検査した。マウスを、PBS、対照 Ig / ハムスター Ig、または 8G8 で 1 週間に 3 回処置した。タンパク尿および体重に関してマウスを毎週監視した。処置中、2 週間おきに血清を収集した。実験の終了時に、血清、リンパ節、脾臓、および腎臓を採取した。血清を -80 で保管した。器官を固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片は臨床病理のために H & E 染色された。

【0627】

材料および方法

マウス処置

8 週齢の雌の MRL/lpr マウスを Jackson から購入し、DHMC で SPF 条件下で保管した。

【0628】

タンパク尿および体重を、Dartmouth Hitchcock 動物施設において毎週監視した。

【0629】

10 mg / kg / マウス対照 Ig / ハムスター Ig もしくは 8G8、または 200 uL の PBS を、11 週目から開始して、1 週間に 3 回 i.p 注射により投与した。

【0630】

タンパク尿が 500 mg / dL になったときマウスを 殺した。

【0631】

タンパク尿

Chemstrips 10 を Roche から購入した。尿をマウスから収集し、chemstrip に設置した。尿中のタンパク質を決定するために、比色スケールを使用した：0 mg / dL、微量 (1 mg / dL)、30 mg / dL、100 mg / dL、および 500 mg / dL。

【0632】

血清分析

血清を収集し、必要とされるまで -80 で保管した。

【0633】

臨床病理

腎臓をカセットに入れ、室温で 10% ホルマリン中で O/N 固定し、次いで PBS 中で簡単に洗浄し、70% エタノール (Fisher Scientific) に移して維持した後に、Dartmouth の Geisel School of Medicine の Pathology Translational Research Core に移し、そこで、パラフィン包埋し、切片化し、その後染色した。

【0634】

パラフィン包埋組織切片 (4 μm) を、Leica BOND RX 自動染色装置を使用して染色した。脱蠟後、切片は、抗原回収 (結合エピトープ回収溶液 2、100、20 分) を受け、Leica 希釈剤中の一次抗体 (下の希釈を参照されたい) とともに、室温で 30 ~ 60 分間インキュベートされた。次いで、スライドを PBS 中で 3 x 5 分洗浄で洗浄し、二次抗体 (Leica Bond Refine 検出キット、DS9800 から) とともにインキュベートした。PBS 中で 3 回の最終洗浄後、切片を DAB (Leica Bond ポリマー検出キット) とともにインキュベートし、すすぎ、ヘマトキシリンで対比染色し、装着した。

【0635】

臨床病理は病理学者によって評価される。

【0636】

結果

この実験は、8G8 が雌の MRL/lpr マウスにおいて免疫抑制の役割を媒介したか

10

20

30

40

50

どうかを検査するために設計された。マウスは、タンパク尿発生について9週齢から毎週監視された。11週目に、マウスを、1週間に3回、i.p注射により200 μ gのPBSまたは10mg/kgのハムスターIgもしくは8G8で処置した。血漿におけるメディエーターに対する8G8の効果を決定するために、収集し、-80で保管した。

【0637】

したがって、VISTAアゴニスト8G8は、高いタンパク尿レベルを特徴とする疾患発生の発生率を低減した(図66を参照されたい)。実験において、9週齢の雌のMRL/lprマウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstripsを使用して記録され、mg/dLとして定量化された。11週目に、200uLのPBS(黒色点線、n=8)または10mg/kgのハムスターIg(黒色実線、n=8)または8G8(赤色線、n=8)のいずれかで、1週間に3回i.p注射によりマウスを処置した。(図66A)平均タンパク尿は標準誤差棒で示される。(図66B)各時間点における疾患発生率は、100mg/dL以上のタンパク尿を示した各群におけるマウスのパーセントとして計算された。

10

【0638】

これらの結果は、アゴニスティックな抗VISTA抗体が狼瘡の治療または予防に、ならびに腎臓機能に対するその有害作用などの狼瘡の病理学的副作用を管理するために使用され得ることを更に示す。

【0639】

実施例38：全身性エリテマトーデスのマウスモデルにおける疾患誘導に対する抗ヒトVISTAアゴニスト抗体INX903の効果

20

本実験において、我々は、認められている狼瘡モデルにおいて抗ヒトVISTAアゴニスト抗体の効果を試験した。このマウスモデルにおいて、SLEはヒトVISTAノックインDDE1CD8枯渇脾細胞(ドナー)のB6D2F1宿主(レシピエント)への移入によって誘発される。さらに、このモデルにおいて、ドナーCD4T細胞ポリクローナル活性化は、腎疾患につながる同族の宿主B細胞活性化、拡大、および自己抗体の産生を駆動する。

【0640】

この狼瘡動物モデルは、狼瘡の11のAmerican College of Rheumatology(ACR)基準のうちの4つを満たす(“Systemic lupus erythematosus;” Tsokos GC. N Engl J Med. 2011 Dec 1; 365(22): 2110-21)。B6D2F1モデルに移入されたCD8枯渇されたB6の狼瘡様特徴は、(1)免疫複合体糸球体腎炎、(2)抗核ab、(3)抗dsDNA ab、および(4)抗RBC ab(クームズ陽性)を含む。加えて、このモデルは、腎疾患重症度において性別に基づく相違を満たす。

30

【0641】

より具体的には、我々は、処置がSLE誘導の早期段階においてもたらされた、INX903(ヒト抗ヒトVISTA-IgG2の効果)を試験した。2週間の表現型が長期臨床表現型を確実に予測し、長期疾患の早期代理マーカーとして機能し得ることは、当該技術分野において受け入れられている(“Advances in lupus stemmi ng from the parent-into-F1 model”. Via CS. Trends Immunol., 2010 Jun. 31(6): 236-45)。

40

【0642】

材料および方法

研究設計

実験パラメータの概略的要約は図67に含まれる。示されるように、INX903(VSTB95抗体の可変領域を含有する抗ヒトIgG2アゴニスト抗体)を、DDE1移入後0、2、および6日目に投与した。各時点で、1群当たり4匹のマウスと1匹のナイーブマウスを分析した。脾臓をフローサイトメトリー用に処理し、ELISAによる抗dsDNA IgGの検出のために心臓血液から血清を回収した。

50

【0643】

マウス

ヒトVISTA KI (DDE1) マウスは、マウスVISTA遺伝子の代わりにヒトVISTA cDNAノックインを有し、RNAおよびタンパク質レベルの両方でヒトVISTAのみを発現する。マウスは、Sage Labs (Boyertown, PA) で育種される。8~12週齢のマウスは、最初に検疫施設に3週間移動され、その後我々の通常の施設に移された。4ヶ月齢の雌のDDE1マウスを使用した。9週齢の雌のB6D2F1マウスを、Jackson Labから購入した。

【0644】

脾臓細胞の単離および移入

B6D2F1マウスレシピエント当たり1に等しいDDE1ドナー脾臓を移入した。

10

【0645】

機械的破壊により、36のDDE1脾臓から単一の細胞懸濁液を調製した。RBCをACKで溶解した。

【0646】

製造業者の指示に従い、Dynabeads (登録商標) Mouse CD8 (Lyt2) (ThermoFisher #11447D) を使用して、CD8T細胞を枯渇させた。

【0647】

細胞増殖を追跡するために、製造業者の指示に従い、脾臓細胞を、Cell Trace Violet (Cell Trace (商標) Violet Cell Proliferation Kit (フローサイトメトリー用) (ThermoFisher #C34557)) で染色した。

20

【0648】

合計 $1,230 \times 10^6$ のCD8+枯渇脾臓細胞を得た。

【0649】

各B6D2F1マウスは、尾静脈注射 (iv) 当たり $200 \mu\text{l}$ の容積で、 34×10^6 のCD8枯渇脾臓細胞を受けた。

【0650】

抗ヒトVISTA抗体および投与量

INX903を 10 mg/kg で投薬した。

30

【0651】

0日目に、レシピエントB6D2F1マウスへのIV移入直前に、抗体を細胞懸濁液に直接添加した。

【0652】

次いで、2および6日目に、腹腔内 (i.p.) 注射によりマウスに投薬した。

【0653】

対照群は、ヒトIgG2 (ロットAB150073 - 4.7 mg/mL) を受けた。

【0654】

処置群は、INX903 (BP-021-016-4-6 mg/mL) を受けた。

40

【0655】

フローによる免疫細胞の分析

ドナー細胞移入後1、3、7、および14日目に、フローサイトメトリーにより、ドナーCD4T細胞の活性化、増殖、蓄積、ならびに宿主B細胞の活性化および蓄積を、脾臓で評価した。1群当たり4匹の動物と1匹のナイーブマウスを各時点で分析した。脾臓を機械的に破壊し、ACK緩衝液を使用してRBCを溶解し、Cellometer自動細胞計数システムおよびAOPIを使用して全生存可能有核細胞数を評価した。200万個の細胞を、下に示されるように、以下のパネルで染色した。

【表 9】

1日目

B1	B2	B3	B4	R1	R2	V1	V2	
FITC	PE	PerCp Cy5.5	PE- Cy7	AF647	APC- Cy7	BV421	BV510	
IAd	H2Kd	B220	CD69	H2Kb	CD4	CTV	黄色LD	Fcブロック
1/1000	1/200	1/200	1/200	1/200	1/300	該当せず	1/1000	1/200

翌日:

B1	B2	B3	B4	R1	R2	V1	V2	
FITC	PE	PerCp Cy5.5	PE- Cy7	AF647	APC- Cy7	BV421	BV510	
IAd	H2Kd	B220	CD25	H2Kb	CD4	CTV	黄色LD	Fcブロック
1/1000	1/200	1/200	1/200	1/200	1/300	該当せず	1/1000	1/200

【0656】

試料をMac s Q u a n t フローサイトメトリーで実行し、F l o w J o プログラムで分析した。

【0657】

ドナーCD4T細胞を、生CD4 + B220 - H2Kb + H2Kd - として特定し、活性化マーカー発現(CD69またはCD25)および増殖(Cell Trace Violet希釈)について分析した。脾臓当たりのドナーCD4細胞数は、脾臓の全生存可能細胞数に対するドナーCD4T細胞の割合を適用することによって計算された。

【0658】

レシピエントB細胞を、生CD4 - B220 + H2Kb + H2Kd + として特定し、MHCクラスII発現について分析した。各時点で、ナイーブB6D2F1は、基底MHCクラスII発現比較に役立つ。脾臓当たりのレシピエントB細胞数は、脾臓の全生存可能細胞数に対する宿主B細胞の割合を適用することによって計算された。

【0659】

抗2本鎖DNA検出

7および14日目の血清中の抗dsDNA IgGは、製造業者の指示に従い、Alpha Diagnostic(カタログ番号5120)のELISAキットを使用して定量化された。

【0660】

レシピエントおよびドナー細胞集団の特定

図68に示されるように、DDE1脾臓細胞(マイナスCD8+細胞)の移入によって生成されたSLEマウスは、ドナーおよびレシピエント両方のB細胞およびCD4T細胞の存在を示す。ドナーCD4T細胞は、生CD4 + B220 - H2Kb + H2Kd - として特定された。レシピエントB細胞は、生CD4 - B220 + H2Kb + H2Kd + として特定された。図68の実験において、ドナーおよび宿主細胞集団は、それらのMHCクラスI対立遺伝子によって区別される。宿主B6D2F1細胞はH-2KbおよびH-2Kdの両方を発現する一方で、ドナーDDE1細胞はH-2Kbのみを発現する。

【0661】

INX903は、SLE疾患進行の減少をもたらす

抗VISTAアゴニスト抗体INX903が早期疾患進行に影響を及ぼし得るかどうかを決定するために、我々は、レシピエントB細胞の活性化、dsDNA抗体の産生、CD4T細胞の活性化、および増殖を評価した。INX903投与はレシピエントB細胞活性化および蓄積の減少をもたらし、脾腫をもたらすことが示された。B細胞活性化は、ヒトIgG2(HuIgG2)処置群における移植後の経時的なMHCクラスII I A d の発現増加によって示されたが、I A d の変化はINX903処置群において認めらず、ナイ

10

20

30

40

50

ープマウスに類似するように見える。これらの結果を図 6 9 A に示す。注目すべきことに、これは、レシピエントマウスからの B 細胞がヒト V I S T A を発現せず、そのため、I N X 9 0 3 に対して直接応答することができないため、間接的な効果である。

【 0 6 6 2 】

D 1 4 で正常な F 1 値の 2 0 0 % に達し、軽度の脾腫をもたらすヒト I g G 2 (H u I g G 2) 処置群における移植後の B 細胞の漸進的拡大は、I N X 9 0 3 処置群においても防止される (図 6 9 B および C を参照されたい) 。図のデータは、S L E 進行中の B 細胞活性化が I N X 9 0 3 処置によっても防止されることを更に示す。図 6 9 A は、レシピエント B 細胞の M H C I I I A d 発現のヒストグラムプロットを含有する。図 6 9 B は、実験期間中のレシピエント B 細胞および脾臓細胞の総数、ならびに実験期間中のレシピエント B 細胞の M H C クラス I I I A d M F I を示す (n = 4 、 S E M) 。図 6 9 C は、D 1 4 の処置動物における脾臓の大きさを示す。

10

【 0 6 6 3 】

図 7 0 の実験データは、I N X 9 0 3 投与が抗 d s D N A 自己抗体産生の減少をもたらすことを更に示す。これらの実験において、血清中の抗 d s D N A I g G 力価は、D 7 および D 1 4 で、ナイーブマウス (n = 2) および H u I g G 2 または I N X 9 0 3 処置マウスにおいて E L I S A により測定された (n = 4 、 S E M) 。図 7 1 の実験データは、I N X 9 0 3 投与が T 細胞活性化および増殖の減少をもたらすことを更に示す。示されるように、C D 6 9 発現は早期時点で減少する。具体的には、C D 6 9 発現は I N X 9 0 3 処置 C D 4 T 細胞 (n = 4) において 1 日目に減少することが分かる。

20

【 0 6 6 4 】

図 7 2 および 7 3 の実験データは、移入後のドナー C D 4 + T 細胞の蓄積における持続的な低減があることを更に示す。h u I g G 2 処置群と同じ出現頻度で分割したにもかかわらず、I N X 9 0 3 処置マウスにおける C D 4 T 細胞は経時的に劇的に減少する (n = 4) 。これらの実験結果は、例示的な抗ヒト V I S T A アゴニスト A b の投与が、(i) T 細胞増殖および活性化の低減 (これは、疾患開始 T 細胞が追跡され得る利用可能な唯一のモデルである) 、(i i) 同族 B 細胞活性化 (M H C I I 発現) および蓄積の低減、(i i i) 脾腫の低減、ならびに (i v) 抗 d s D N A I g G 自己抗体産生の低減をもたらしたことを示す。

【 0 6 6 5 】

比較的短期間の観察だが、これらの結果は、このモデルにおいて、2 週間の表現型が長期臨床表現型を確実に予測することが知られており、長期疾患の早期の疾患のための早期代理マーカーとして機能し得るため、有意である。

30

【 0 6 6 6 】

実施例 3 9 : 全身性エリテマトーデスに対する マウス V I S T A 抗体 8 G 8 の効果 - M R L / l p r - S C D 8 G 8 M R L 1

この実験において、我々は、雌の M R L / l p r マウスにおいて、ハムスター抗マウス V I S T A アゴニスト抗体 8 G 8 の効果を再度検査した。マウスを対照 I g / ハムスター I g または 8 G 8 で 1 週間に 3 回処置した。タンパク尿および体重に関してマウスを毎週監視した。処置中、2 週間おきに血清を収集した。実験の終了時に、血清、脾臓、および腎臓を採取した。l u m i n e x アッセイに必要なまで血清を - 8 0 で保管した。脾臓およびリンパ節を、細胞選別のために処理するか、または免疫蛍光染色ならびに遺伝子プロファイリングおよび n a n o S t r i n g 分析のための R N A 単離のために O C T において急速凍結した。1 つの腎臓を、免疫蛍光染色、ならびに遺伝子プロファイリングおよび n a n o S t r i n g 分析のための R N A 単離のために O C T において急速凍結した。2 つ目の腎臓を固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片は臨床病理のために H & E 染色された。

40

【 0 6 6 7 】

材料および方法

マウス処置

50

12週齢の雌のNZBWF-1マウスをJacksonから購入し、DHMCでSPF条件下で保管した。

【0668】

タンパク尿および体重を、Dartmouth Hitchcock動物施設において毎週監視した。

【0669】

対照Ig/ハムスターIgまたは8G8を、i.p注射により300μg/マウスで1週間に3回投与した。

【0670】

タンパク尿が500mg/dLになったときマウスを 殺した。

10

【0671】

タンパク尿

Chemstrips10をRocheから購入した。尿をマウスから収集し、chemstripに設置した。尿中のタンパク質を決定するために、比色スケールを使用した：0mg/dL、微量(1mg/dL)、30mg/dL、100mg/dL、および500mg/dL。

【0672】

血清分析

血清を収集し、必要とされるまで-80 で保管した。ケモカインおよびサイトカインレベルは、32 Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore) を使用して決定され、アッセイはBio-plex 200 System (Life Science Research, Bio Rad) で実行した。Bio-Plex Manager 6.0ソフトウェアを使用して、データを分析した。

20

【0673】

RNA単離およびnanoString

RNAは、Trizol (Life Technologies) およびPureLink RNA Mini Kit (Ambion) を使用して、単離された。RNAは、マウス炎症nanoString 12アッセイ (nanoString Technologies) で実行され、データはnSolver分析ソフトウェアを使用して定量化された。

30

【0674】

臨床病理

腎臓をカセットに入れ、室温で10%ホルマリン中でO/N固定し、次いでPBS中で簡単に洗浄し、70%エタノール (Fisher Scientific) に移して維持した後に、DartmouthのGeisel School of MedicineのPathology Translational Research Coreに移し、そこで、パラフィン包埋し、切片化し、その後染色した。

【0675】

パラフィン包埋組織切片(4μm)を、Leica BOND RX自動染色装置を使用して染色した。脱蠟後、切片は、抗原回収(結合エピトープ回収溶液2、100、20分)を受け、Leica希釈剤中の一次抗体(下の希釈を参照されたい)とともに、室温で30~60分間インキュベートされた。次いで、スライドをPBS中で3×5分洗浄で洗浄し、二次抗体(Leica Bond Refine検出キット、DS9800から)とともにインキュベートした。PBS中で3回の最終洗浄後、切片をDAB(Leica Bondポリマー検出キット)とともにインキュベートし、すすぎ、ヘマトキシリンで対比染色し、装着した。

40

【0676】

臨床病理は病理学者によって評価された。

【0677】

50

結果

マウスは、タンパク尿発生について15週齢から毎週監視された。16週目に、マウスを、1週間に3回、i.p注射により300 μ gのハムスターIgまたは8G8で処置した。血漿におけるメディエーターに対する8G8の効果を決定するために、収集し、-80で保管した。脾臓およびリンパ節を採取し、免疫蛍光染色およびRNA単離のために急速凍結した。図74A~Bに示されるように、8G8は、MRL/lprマウスにおいてタンパク尿の発生を低減する。これらの実験において、15週齢の雌のMRL/lprマウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstripsを使用して記録され、mg/dLとして定量化された。16週目に、300 μ gのハムスターIg(黒色線、n=8)または300 μ gの8G8(赤色線、n=8)のいずれかで、1週間に3回i.p注射によりマウスを処置した。21週目のデータは、chemstripsの技術的問題により廃棄された。(図74A)平均タンパク尿は標準誤差棒で示される。(図74B)各時間点における疾患発生率は、100mg/dL以上のタンパク尿を示した各群におけるマウスのパーセントとして計算された。

10

【0678】

図75に更に示されるように、8G8投与は、MRL/lprマウスにおいて脾腫も低減する。これらの実験において、300 μ gの対照Ig/ハムスターIgまたは300 μ gの8G8のいずれかで、1週間に3回i.p注射により処置したマウスから脾臓を23週目に採取した。脾腫は、8G8処置マウスと比較して、対照Ig処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な脾臓を示す。

20

【0679】

図76に更に示されるように、8G8投与は、MRL/lprマウスにおいて頸部リンパ節のリンパ球増殖も低減する。これらの実験において、300 μ gの対照Ig/ハムスターIgまたは300 μ gの8G8のいずれかで、1週間に3回i.p注射により処置したマウスから頸部リンパ節を23週目に採取した。リンパ球増殖は、8G8処置マウスと比較して、対照Ig処置マウスにおいて観察された。

【0680】

実施例40:全身性エリテマトーデス-ニュージーランドブラックxニュージーランドホワイト(NZBWF-1マウス)に対する-マウスVISTA抗体8G8の効果

我々は、雌のNZBWF-1マウスにおいて、ハムスターマウスVISTA抗体8G8の機能を検査した。マウスを対照Igまたは8G8で1週間に3回処置した。タンパク尿および体重に関してマウスを毎週監視した。処置中、2週間おきに血清を収集した。実験の終了時に、血清、脾臓、および腎臓を採取した。luminesアッセイに必要なまで血清を-80で保管した。

30

【0681】

脾臓を、フローサイトメトリ分析、細胞選別のために処理するか、または免疫蛍光染色ならびに遺伝子プロファイリングおよびnanosttring分析のためのRNA単離のためにOCTにおいて急速凍結した。1つの腎臓を、免疫蛍光染色、ならびに遺伝子プロファイリングおよびnanosttring分析のためのRNA単離のためにOCTにおいて急速凍結した。2つ目の腎臓を固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片は臨床病理のためにH&E染色された。

40

【0682】

材料および方法

マウス処置

8週齢の雌のNZBWF-1マウスをJacksonから購入し、DHMCでSPF条件下で保管した。

【0683】

タンパク尿および体重を、Dartmouth Hitchcock動物施設において毎週監視した。

【0684】

50

対照 I g G / ハムスター I g または 8 G 8 を、i . p 注射により 3 0 0 μ g / マウスで 1 週間に 3 回投与した。

【 0 6 8 5 】

健康不良の徴候および活動の減少の際には、ならびに動物施設のプロトコルに従い、マウスを 殺した。

【 0 6 8 6 】

タンパク尿

C h e m s t r i p s 1 0 を R o c h e から購入した。尿をマウスから収集し、c h e m s t r i p に設置した。尿中のタンパク質を決定するために、比色スケールを使用した : 0 m g / d L、微量 (1 m g / d L)、3 0 m g / d L、1 0 0 m g / d L、および 5 0 0 m g / d L。

10

【 0 6 8 7 】

血清分析

血清を収集し、必要とされるまで - 8 0 で保管した。ケモカインおよびサイトカインレベルは、3 2 M i l l i p l e x M o u s e C y t o k i n e / C h e m o k i n e M a g n e t i c B e a d P a n e l (M i l l i p o r e) を使用して決定され、アッセイは B i o - p l e x 2 0 0 S y s t e m (L i f e S c i e n c e R e s e a r c h , B i o R a d) で実行した。B i o - P l e x M a n a g e r 6 . 0 ソフトウェアを使用して、データを分析した。

【 0 6 8 8 】

20

骨髄由来抑制細胞単離キット

骨髄由来抑制細胞 (M D S C) を、製造業者の指示に従い、M i l t e n y i B i o t e c の骨髄由来抑制細胞単離キットを使用して単離した。

【 0 6 8 9 】

RNA 単離および n a n o S t r i n g

RNA は、T r i z o l (L i f e T e c h n o l o g i e s) および P u r e L i n k R N A M i n i K i t (A m b i o n) を使用して、M D S C から単離された。RNA は、マウス炎症 n a n o S t r i n g 1 2 アッセイ (n a n o S t r i n g T e c h n o l o g i e s) で実行され、データは n S o l v e r 分析ソフトウェアを使用して定量化された。

30

【 0 6 9 0 】

免疫蛍光染色

腎臓を O C T に包埋し、9 μ m の切片を切断し、- 8 0 で保管した。スライドを 2 0 分間室温に設置し、予め冷却したアセトンに 1 0 分間固定し、取り出して過剰のアセトンを蒸発させ、5 分間 P B S 中で再水和し、I m m E d g e ペン (V e c t o r L a b s) を使用して、切片に丸を付けた。それらを、室温で 1 時間、1 0 % ヤギ血清 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h) とともにインキュベートし、洗浄した。切片を、P B S に希釈した C 3 および I g G に直接コンジュゲートした抗体で、室温で 2 時間染色し、2 分間洗浄し、その後 D A P I (L i f e T e c h n o l o g i e s) を含む P r o L o n g G o l d A n t i f a d e M o u n t a n t に装着し、暗所で 4 8 時間室温で保管した。Z e i s s C o n f o c a l M i c r o s c o p e で画像を取得し、L S M 5 1 0 M e t a ソフトウェアで分析した。

40

【 0 6 9 1 】

臨床病理

腎臓をカセットに入れ、室温で 1 0 % ホルマリン中で O / N 固定し、次いで P B S 中で簡単に洗浄し、7 0 % エタノール (F i s h e r S c i e n t i f i c) に移して維持した後に、D a r t m o u t h の G e i s e l S c h o o l o f M e d i c i n e の P a t h o l o g y T r a n s l a t i o n a l R e s e a r c h C o r e に移し、そこで、パラフィン包埋し、切片化し、その後染色した。

【 0 6 9 2 】

50

パラフィン包埋組織切片(4 μm)を、Leica BOND RX自動染色装置を使用して染色した。脱蠟後、切片は、抗原回収(結合エピトープ回収溶液2、100、20分)を受け、Leica希釈剤中の一次抗体(下の希釈を参照されたい)とともに、室温で30~60分間インキュベートされた。次いで、スライドをPBS中で3×5分洗浄で洗浄し、二次抗体(Leica Bond Refine検出キット、DS9800から)とともにインキュベートした。PBS中で3回最終洗浄後、切片をDAB(Leica Bondポリマー検出キット)とともにインキュベートし、すすぎ、ヘマトキシリンで対比染色し、装着した。

【0693】

臨床病理は病理学者によって評価された。

10

【0694】

結果

この実験は、8G8が雌のNZBWF-1マウスにおいて免疫抑制の役割を媒介したかどうかを検査するために設計された。マウスは、タンパク尿発生について22週齢から毎週監視された。タンパク尿が検出された後の週の28週目に、マウスを、1週間に3回、i.p注射により300 μgのHam-Igまたは8G8で処置した。対照群における疾患重症度は増加し続けたが、8G8群のマウスは、タンパク尿レベルの低減を示した。

【0695】

特に、図77に示されるように、8G8抗体投与は、NZBWF-1マウスにおいてタンパク尿の発生を低減する。示されるように、これらの22週齢の雌のNZBWF-1マウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstripsを使用して記録され、mg/dLとして定量化された。28週目に、300 μgのHam-Ig(黒色線、n=6)または300 μgの8G8(赤色線、n=6)のいずれかで、1週間に3回i.p.注射によりマウスを処置した。

20

【0696】

図78に示されるように、8G8は、NZBWF-1マウスにおいて、免疫複合体沈着に影響を及ぼさなかった。示されるように、同じ22週齢の雌のNZBWF-1マウスをタンパク尿に関して毎週監視した。マウスを300 μgのHam-Ig(n=8)または300 μgの8G8で1週間に3回処置した。B6、Ham-Ig、および8G8マウスにおける免疫複合体(IC)沈着を決定するために、免疫蛍光染色を、凍結したOCT腎臓切片で実施して、C3(赤)およびIgG(緑)ICを倍率×40顕微鏡の共焦点顕微鏡により検出した。

30

【0697】

結果は下の表に更に示される。これらの値は、8G8がNZBWF-1マウスにおける腎臓損傷を低減することを更に裏付ける。実験において、H&E染色され、間質性炎症および糸球体損傷について盲検的に臨床的に検査された、Ham-Igまたは8G8処置NZBWF-1およびC57BL/6(ナイーブ対照)マウスからのパラフィン包埋腎臓を使用して、臨床病理を検査した。*群間の有意性を示す。

【表10】

表4:8G8はNZBWF-1マウスにおいて腎臓損傷を低減する

40

株	間質性炎症 スコア	糸球体 スコア
B6	0	0
Ham-Ig	1.5 ±0.5	2.5±0.8
8G8	0.8±0.4*	0.8±0.4**

【0698】

50

結論

本明細書に開示されるこれらの動物アッセイおよび他の実験の結果は、アゴニストまたは免疫抑制抗 V I S T A アゴニスト抗体が自己免疫、アレルギー、炎症状態、または免疫抑制が治療的に望ましい他の状態の治療および予防のために使用され得、特にアゴニスト抗 V I S T A アゴニスト抗体が狼瘡、G V H D、R A、I B D、慢性感染、および肝毒性、乾癬の治療および予防のために、ならびに他の急性および慢性の自己免疫、アレルギー、炎症状態の症状を予防、低減、または管理するために使用され得る確固とした証拠を提供することを示す。

本出願に引用される参考文献

本出願において引用される以下の参考文献および他の参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

- 1 Dong, C., Juedes, A. E., Temann, U. A., Shresta, S., Allison, J. P., Ruddle, N. H. and Flavell, R. A., ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001. 409: 97-101.
- 2 Suh, W. K., Gajewska, B. U., Okada, H., Gronski, M. A., Bertram, E. M., Dawicki, W., Duncan, G. S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., Wakeham, A., Itie, A., Chung, S., Da Costa, J., Arya, S., Horan, T., Campbell, P., Gaida, K., Ohashi, P. S., Watts, T. H., Yoshinaga, S. K., Bray, M. R., Jordana, M. and Mak, T. W., The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol* 2003. 4: 899-906. 10
- 3 Borriello, F., Sethna, M. P., Boyd, S. D., Schweitzer, A. N., Tivol, E. A., Jacoby, D., Strom, T. B., Simpson, E. M., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H., B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1997. 6: 303-313.
- 4 Chambers, C. A., Sullivan, T. J. and Allison, J. P., Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* 1997. 7: 885-895.
- 5 Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H. and Mak, T. W., Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 1995. 270: 985-988. 20
- 6 Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A. and Sharpe, A. H., Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995. 3: 541-547.
- 7 Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T., Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999. 11: 141-151. 30
- 8 Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., Koulmanda, M., Freeman, G. J., Sayegh, M. H. and Sharpe, A. H., Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006. 203: 883-895.
- 9 Ortler, S., Leder, C., Mittelbronn, M., Zozulya, A. L., Knolle, P. A., Chen, L., Kroner, A. and Wiendl, H., B7-H1 restricts neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: implications for the lesion pathogenesis of multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2008. 38: 1734-1744. 40

【表 1 1 - 2】

- 10 Zhu, G., Augustine, M. M., Azuma, T., Luo, L., Yao, S., Anand, S., Rietz, A. C., Huang, J., Xu, H., Flies, A. S., Flies, S. J., Tamada, K., Colonna, M., van Deursen, J. M. and Chen, L., B7-H4-deficient mice display augmented neutrophil-mediated innate immunity. *Blood* 2009. 113: 1759-1767.
- 11 Chen, Y., Wang, Q., Shi, B., Xu, P., Hu, Z., Bai, L. and Zhang, X., Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well as supernatants of PD-L1(+) cell lines. *Cytokine* 2011.
- 12 Greenwald, R. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H., The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005. 23: 515-548. 10
- 13 Zhu, Y., Yao, S., Iliopoulou, B. P., Han, X., Augustine, M. M., Xu, H., Phennicie, R. T., Flies, S. J., Broadwater, M., Ruff, W., Taube, J. M., Zheng, L., Luo, L., Zhu, G., Chen, J. and Chen, L., B7-H5 costimulates human T cells via CD28H. *Nat Commun* 2013. 4: 2043.
- 14 Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E. and Levin, S. D., The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 2009. 206: 1495-1503. 20
- 15 Wang, L., Rubinstein, R., Lines, J. L., Wasiuk, A., Ahonen, C., Guo, Y., Lu, L. F., Gondek, D., Wang, Y., Fava, R. A., Fiser, A., Almo, S. and Noelle, R. J., VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J Exp Med* 2011. 208: 577-592.
- 16 Lines, J. L., Sempere, L. F., Wang, L., Panttazi, E., Mak, J., O'Connell, S., Ceeraz, S., Suriawinata, A. A., Yan, S., Ernstoff, M. S. and Noelle, R. J., VISTA is an immune checkpoint regulator for human T cells. in revision (Cancer Research).
- 17 LeMercier, I., Lines, J. L., Sergent, P., Li, J., Noelle, R. J. and Wang, L., VISTA regulates the development of protective anti-tumor immunity. in revision (Cancer Research). 30
- 18 Wolchok, J. D., Kluger, H., Callahan, M. K., Postow, M. A., Rizvi, N. A., Lesokhin, A. M., Segal, N. H., Ariyan, C. E., Gordon, R. A., Reed, K., Burke, M. M., Caldwell, A., Kronenberg, S. A., Agunwamba, B. U., Zhang, X., Lowy, I., Inzunza, H. D., Fely, W., Horak, C. E., Hong, Q., Korman, A. J., Wigginton, J. M., Gupta, A. and Sznol, M., Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013. 369: 122-133.
- 19 Iliopoulos, D., Kavousanaki, M., Ioannou, M., Boumpas, D. and Verginis, P., The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21. *Eur J Immunol* 2011. 41: 1754-1763. 40

【表 1 1 - 3】

- 20 Ansari, M. J., Salama, A. D., Chitnis, T., Smith, R. N., Yagita, H., Akiba, H., Yamazaki, T., Azuma, M., Iwai, H., Khoury, S. J., Auchincloss, H., Jr. and Sayegh, M. H., The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 2003. 198: 63-69.
- 21 Bertsias, G. K., Nakou, M., Choulaki, C., Raptopoulou, A., Papadi mitraki, E., Goulielmos, G., Kritikos, H., Sidiropoulos, P., Tzardi, M., Kardassis, D., Mamalaki, C. and Boumpas, D. T., Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009. 60: 207-218. 10
- 22 Prokunina, L., Castillejo-Lopez, C., Oberg, F., Gunnarsson, I., Berg, L., Magnusson, V., Brookes, A. J., Tentler, D., Kristjansdottir, H., Grondal, G., Bolstad, A. I., Svenungsson, E., Lundberg, I., Sturfelt, G., Jonssen, A., Truedsson, L., Lima, G., Alcocer-Varela, J., Jonsson, R., Gyllensten, U. B., Harley, J. B., Alarcon-Segovia, D., Steinsson, K. and Alarcon-Riquelme, M. E., A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002. 32: 666-669.
- 23 Ozkaynak, E., Wang, L., Goodearl, A., McDonald, K., Qin, S., O'Keefe, T., Duong, T., Smith, T., Gutierrez-Ramos, J. C., Rottman, J. B., Coyle, A. J. and Hancock, W. W., Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *J Immunol* 2002. 169: 6546-6553. 20
- 24 Watson, M. P., George, A. J. and Larkin, D. F., Differential effects of costimulatory pathway modulation on corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006. 47: 3417-3422.
- 25 Podojil, J. R., Liu, L. N., Marshall, S. A., Chiang, M. Y., Goings, G. E., Chen, L., Langermann, S. and Miller, S. D., B7-H4 inhibits mouse and human T-cell function and treats EAE via IL-10/Treg-dependent mechanisms. *J Autoimmun* 2013. 44: 71-81.
- 26 Sica, G. L., Choi, I. H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S. D., Tamura, H., Chapoval, A. I., Flies, D. B., Bajorath, J. and Chen, L., B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* 2003. 18: 849-861. 30
- 27 Wang, X., Hao, J., Metzger, D. L., Mui, A., Ao, Z., Verchere, C. B., Chen, L., Ou, D. and Warnock, G. L., B7-H4 induces donor-specific tolerance in mouse islet allografts. *Cell Transplant* 2012. 21: 99-111.
- 28 Yamaura, K., Watanabe, T., Boenisch, O., Yeung, M., Yang, S., Magee, C. N., Padera, R., Datta, S., Schatton, T., Kamimura, Y., Azuma, M. and Najafian, N., In vivo function of immune inhibitory molecule B7-H4 in alloimmune responses. *Am J Transplant* 2010. 10: 2355-2362.
- 29 Yi, K. H. and Chen, L., Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol Rev* 2009. 229: 145-151. 40

【表 1 1 - 4】

- 30 Wang, X., Hao, J., Metzger, D. L., Ao, Z., Chen, L., Ou, D., Verchere, C. B., Mui, A. and Warnock, G. L., B7-H4 Treatment of T Cells Inhibits ERK, JNK, p38, and AKT Activation. *PLoS One* 2012. 7: e28232.
- 31 Terawaki, S., Tanaka, Y., Nagakura, T., Hayashi, T., Shibayama, S., Muroi, K., Okazaki, T., Mikami, B., Garboczi, D. N., Honjo, T. and Minato, N., Specific and high-affinity binding of tetramerized PD-L1 extracellular domain to PD-1-expressing cells: possible application to enhance T cell function. *Int Immunol* 2007. 19: 881-890.
- 32 Sedy, J. R., Gavrieli, M., Potter, K. G., Hurchla, M. A., Lindsley, R. C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C. F., Murphy, T. L. and Murphy, K. M., B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 2005. 6: 90-98. 10
- 33 Parisi, S., Battista, M., Musto, A., Navarra, A., Tarantino, C. and Russo, T., A regulatory loop involving Dies1 and miR-125a controls BMP4 signaling in mouse embryonic stem cells. *FASEB J* 2012. 26: 3957-3968.
- 34 Youngnak, P., Kozono, Y., Kozono, H., Iwai, H., Otsuki, N., Jin, H., Omura, K., Yagita, H., Pardoll, D. M., Chen, L. and Azuma, M., Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003. 307: 672-677. 20
- 35 Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. and Freeman, G. J., Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the b7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007. 27: 111-122.
- 36 Sharpe, A. H. and Freeman, G. J., The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002. 2: 116-126.
- 37 Bartel P. L. et al. (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, D. A. Hartley, Ed., Oxford University Press, Oxford; pp 153-179.
- 38 Beranger F. et al. (1997) Getting more from the two-hybrid system : N-terminal fusions to LexA are efficient and sensitive baits for two-hybrid studies. *NAR* 25: 2035-36. 30
- 39 Formstecher E. et al. (2005) Protein interaction mapping: a Drosophila case study. *Genome Res.* 15: 37684.
- 40 Fromont-Racine M., Rain J. C., and Legrain P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* 16: 277-82.
- 41 Rain J. C. et al. (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409: 211-15.
- 42 Vojtek A. and Hollenberg S. M. (1995) Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol.* 255: 33142.
- 43 Wojcik J., Boneca I. G., and Legrain P. (2002) Prediction, assessment and validation of protein interaction maps in bacteria. *J. Mol. Biol.* 323: 763-70. 40

【表 1 1 - 5】

44. Franklin EC, Kunkel HG. Immunologic Differences Between the 19 S and 7 S Components of Normal Human γ -Globulin. *The Journal of Immunology*. 1957;78(1):11-8.
45. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel J-F. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. *Clin Trans Gastroenterol*. 2016;7:e135. doi: 10.1038/ctg.2015.63.
46. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology*. 2005;23:515-48. PubMed PMID: 15771580.
47. Lines JL, Pantazi E, Mak J, Sempere LF, Wang L, O'Connell S, Ceeraz S, Suriawinata AA, Yan S, Ernstoff MS, Noelle R. VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer Research*. 2014;74(7):1924-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1504. PubMed PMID: 24691993; PMCID: 3979527. 10
48. Le Mercier I, Chen W, Lines JL, Day M, Li J, Sergeant P, Noelle RJ, Wang L. VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity. *Cancer Research*. 2014;74(7):1933-44. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1506. PubMed PMID: 24691994; PMCID: PMC4116689.
49. Flies DB, Han X, Higuchi T, Zheng L, Sun J, Ye JJ, Chen L. Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4(+) T cell-mediated immunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(5):1966-75. doi: 10.1172/JCI74589. PubMed PMID: 24743150; PMCID: 4001557.
50. Lines JL, Sempere LF, Broughton T, Wang L, Noelle R. VISTA Is a Novel Broad-Spectrum Negative Checkpoint Regulator for Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunology research*. 2014;2(6):510-7. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0072. PubMed PMID: 24894088. 20
51. Wang L, Le Mercier I, Putra J, Chen W, Liu J, Schenk AD, Nowak EC, Suriawinata AA, Li J, Noelle RJ. Disruption of the immune-checkpoint VISTA gene imparts a proinflammatory phenotype with predisposition to the development of autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(41):14846-51. doi: 10.1073/pnas.1407447111. PubMed PMID: 25267631; PMCID: 4205642.
52. Wang L, Rubinstein R, Lines JL, Wasiuk A, Ahonen C, Guo Y, Lu L F, Gondek D, Wang Y, Fava RA, Fiser A, Almo S, Noelle RJ. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *The Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(3):577-92. Epub 2011/03/09. doi: jem.20100619 [pii] 10.1084/jem.20100619. PubMed PMID: 21383057; PMCID: 3058578. 30
53. Flies DB, Han X, Higuchi T, Zheng L, Sun J, Ye JJ, Chen L. Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4(+) T cell-mediated immunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(5):1966-75. doi: 10.1172/JCI74589. PubMed PMID: PMC4001557.
54. Yoon KW, Byun S, Kwon E, Hwang SY, Chu K, Hiraki M, Jo SH, Weins A, Hakrrouch S, Cebulla A, Sykes DB, Greka A, Mundel P, Fisher DE, Mandinova A, Lee SW. Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science*. 2015;349(6247):1261-669. doi: 10.1126/science.1261669. PubMed PMID: 26228159. 40

【表 1 1 - 6】

55. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo V K. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-specific T Cell Receptor Transgenic Mice Develop Spontaneous Autoimmune Optic Neuritis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;197(9):1073-81. doi: 10.1084/jem.20021603.
56. Ceeraz S, Sergent P, Plummer S, Schned A, Pechenick D, Burns C, Noelle R. VISTA deficiency accelerates the development of fatal murine lupus nephritis. *Arthritis and Rheumatology*. 2016;submitted.
57. Liu J, Yuan Y, Chen W, Putra J, Suriawinata AA, Schenk AD, Miller HE, Guleria I, Barth RJ, Huang YH, Wang L. Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(21):6682-7. doi: 10.1073/pnas.1420370112. PubMed PMID: 25964334; PMCID: PMC4450438. 10
58. Flies DB, Higuchi T, Chen L. Mechanistic Assessment of PD-1/HLA Class II Inhibitory Receptor-Induced T Cell Tolerance to Allogeneic Antigens. *Journal of Immunology*. 2015;194(11):5294-304. doi: 10.4049/jimmunol.1402648. PubMed PMID: 25917101; PMCID: PMC4433880.
59. DiLillo DJ, Ravetch JV. Fc-Receptor Interactions Regulate Both Cytotoxic and Immunomodulatory Therapeutic Antibody Effector Functions. *Cancer Immunology Research*. 2015;3(7):704-13. doi: 10.1158/2326-6066.cir-15-0120.
60. White AL, Chan HT, French RR, Willoughby J, Mockridge CI, Roghania n A, Penfold CA, Booth SG, Dodhy A, Polak ME, Potter EA, Ardern-Jones MR, Verbeek JS, Johnson PW, Al-Shamkhani A, Cragg MS, Beers SA, Glennie MJ. Conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies. *Cancer Cell*. 2015;27(1):138-48. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.001. PubMed PMID: 25500122; PMCID: PMC4297290. 20
61. Dubey AK, Handu SS, Dubey S, Sharma P, Sharma KK, Ahmed QM. Belimumab: First targeted biological treatment for systemic lupus erythematosus. *J Pharmacol Pharmacother*. 2011;2(4):317-9. doi: 10.4103/0976-500X.85930. PubMed PMID: 22025872; PMCID: PMC3198539.
62. Wallace DJ, Hobbs K, Clowse ME, Petri M, Strand V, Pike M, Merrill JT, Leszczynski P, Neuwelt CM, Jeka S, Houssiau F, Keiserman M, Ordi-Ros J, Bongardt S, Kilgallen B, Galateanu C, Kalunian K, Furie R, Gordon C. Long-term safety and efficacy of epratuzumab in the treatment of moderate-to-severe systemic lupus erythematosus: results from an open-label extension study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015. doi: 10.1002/acr.22694. PubMed PMID: 26316325. 30
63. Van Wauwe JP, De Mey JR, Goossens JG. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *The Journal of Immunology*. 1980;124(6):2708-13.
64. Robertson JM, Jensen PE, Evavold BD. DO11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323-339 Epitope. *The Journal of Immunology*. 2000;164(9):4706-12. doi: 10.4049/jimmunol.164.9.4706. 40

【表 1 1 - 7】

65. Wang H-X, Liu M, Weng S-Y, Li J-J, Xie C, He H-L, Guan W, Yuan Y-S, Gao J. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2012;18(2):119-25. doi: 10.3748/wjg.v18.i2.119. PubMed PMID: PMC3257438.
66. Weiner GJ. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):361-70. doi: 10.1038/nrc3930. PubMed PMID: 25998715; PMCID: PMC4491443.
67. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annual review of immunology*. 2001;19:275-90. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.275. PubMed PMID: 11244038.
68. Li F, Smith P, Ravetch JV. Inhibitory Fc γ receptor is required for the maintenance of tolerance through distinct mechanisms(). *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;192(7):3021-8. doi: 10.4049/jimmunol.1302934. PubMed PMID: PMC3967505.
69. Hinton PR, Johlfis MG, Xiong JM, Hanestad K, Ong KC, Bullock C, Keller S, Tang MT, Tso JY, Vasquez M, Tsurushita N. Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(8):6213-6. doi: 10.1074/jbc.C300470200. PubMed PMID: 14699147.
70. Vaccaro C, Zhou J, Ober RJ, Ward ES. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nature biotechnology*. 2005;23(10):1283-8. doi: 10.1038/nbt1143. PubMed PMID: 16186811.
71. Borrok MJ, Wu Y, Beyaz N, Yu X-Q, Oganessian V, Dall'Acqua WF, Tsui P. pH-dependent Binding Engineering Reveals an FcRn Affinity Threshold That Governs IgG Recycling. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(7):4282-90. doi: 10.1074/jbc.M114.603712. PubMed PMID: PMC4326836.
72. Oyarzun P, Ellis JJ, Gonzalez-Galarza FF, Jones AR, Middleton D, Boden M, Kobe B. A bioinformatics tool for epitope-based vaccine design that accounts for human ethnic diversity: Application to emerging infectious diseases. *Vaccine*. 2015;33(10):1267-73. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.040.
73. Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *The Journal of experimental medicine*. 1983;157(4):1149-69. Epub 1983/04/01. PubMed PMID: 6601175; PMCID: Pmc2186983.
74. Markees TG, Phillips NE, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation*. 1997;64(2):329-35.
75. Ehst BD, Ingulli E, Jenkins MK. Development of a novel transgenic mouse for the study of interactions between CD4 and CD8 T cells during graft rejection. *American Journal of Transplantation: American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003;3(11):1355-62. PubMed PMID: 14525595.

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 8】

76. Wu S, Jin L, Vence L, Radvanyi LG. Development and application of 'p hosphoflow' as a tool for immunomonitoring. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9 (6):631–43. doi: 10.1586/erv.10.59. PubMed PMID: 20518718; PMCID: PMC2933839.
77. Weissmuller S, Kronhart S, Kreuz D, Schnierle B, Kalinke U, Kirberg J, Hanschmann KM, Waibler Z. TGN1412 Induces Lymphopenia and Human Cytokine Release in a Humanized Mouse Model. *PloS one*. 2016;11(3):e 0149093. doi: 10.1371/journal.pone.0149093. PubMed PMID: 26959227; PMCID: PMC4784892.
78. Piccotti JR, Alvey JD, Reindel JF, Guzman RE. T-cell-dependent antibody response: assay development in cynomolgus monkeys. *J Immunotoxicol*. 2005;2(4):191–6. doi: 10.1080/15476910500362838. PubMed PMID: 18958673.
79. Muller PY, Brennan FR. Safety assessment and dose selection for first-in-human clinical trials with immunomodulatory monoclonal antibodies. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;85(3):247–58. doi: 10.1038/clpt.2008.273. PubMed PMID: 19177065

10

配列表

配列番号 1 : Homo sapiens VISTA (代替名: B7-H5; B7H5; D1アルファ; GI24; PP2135; SISP1) アミノ酸配列

20

1 mgvptaleag swrwgslfla iflaaslgpv aafkvatpys lyvcpegqnv tltrcrlgpv
61 dkghdvtfyk twyrssrgev qtcserpir nltfqdihlh hgghqaants hdlaqrhgle
121 sasdhgnfs itmrltld sglycclvve irhhhsehrv hgamelqvqt gkdapsncvv
181 ypsssqdsen itaaalatga civgilclpl illlvykqrq aasnrraqel vrmdsniqgi
241 enpgfeaspp aqgipeakvr hplsyvaqrq psegrrhils epstplspgg pgdvffpsld
301 pvpdspnfev i

配列番号 2 : Mus musculus VISTA アミノ酸配列

30

1 mgvpavpeas sprwgtilla iflaasrglv aafkvtpys lyvcpegqna tltrcrlgpv
61 skghdvtiyk twylssrgev qmckehrpri nftiqhqlh gshlkanash dqpqkhglel
121 asdhgnfsi tlrnvtprds glycclviel knhhpeqrfy gsmelqvqag ksgstcmas
181 neqdsdsita aalatgaciv gilclplill lvykqrqvas hrraqelvrmdsntqgienp
241 gfettppfq mpeaktrpp syvaqrqps esgryllsdp tplsppggpd vffpsldpvp
301 dspnseai

配列番号 3 : Mus musculus VISTA アミノ酸配列

40

1 mgvpavpeas sprwgtilla iflaasrglv aafkvtpys lyvcpegqna tltrcrlgpv
61 skghdvtiyk twylssrgev qmckehrpri nftiqhqlh gshlkanash dqpqkhglel
121 asdhgnfsi tlrnvtprds glycclviel knhhpeqrfy gsmelqvqag ksgstcmas
181 neqdsdsita aalatgaciv gilclplill lvykqrqvas hrraqelvrmdsntqgienp
241 pgfettppfq gmpeaktrpp lsyvaqrqps esgryllsdp stplsppggpd dvffpsldpvp
301 pdspnseai

配列番号 4 : Homo sapiens VISTA (代替名: B7-H5; B7H5; D1アルファ; GI24; PP2135; SISP1) 核酸配列

50

1 gggggcgggt gcctggagca cggcgctggg gccgcccga gcgctcactc gctcgactc
61 agtcgcggga ggcttccccg cgccggccgc gtcccggccg ctccccggca ccagaagttc
121 ctctgcgct cgcacggcga catggggctc cccacggccc tggaggccgg cagctggcgc
181 tggggatccc tgctttcgc tctttcctg gctgcgtccc taggtccggt ggcagcctc
241 aaggctgcca cgccgtattc cctgtatgtc tgtccgagg ggcagaacgt caccctcacc
301 tgcaggctct tgggccctgt ggacaaaggg cacgatgtga cttctacaa gacgtggtac
361 cgcagctcga ggggcgaggt gcagacctgc tcagagcgc ggcccatccg caacctcacg
421 ttccaggacc ttcacctgca ccatggaggc caccaggctg ccaacaccag ccacgacctg
481 gctcagcgc acgggctgga gtcggcctcc gaccacatg gcaacttctc catcacatg
541 cgcaacctga ccctgctgga tagcggcctc tactgctgcc tgggtggtgga gatcaggcac
601 caccactcgg agcacagggt ccatggtgcc atggagctgc aggtgcagac aggcaaagat

10

20

30

40

50

661 gcaccatcca actgtgtggt gtacccatcc tcctcccagg atagtgaaaa catcacggct
721 gcagccctgg ctacgggtgc ctgcatcgtg ggaatcctct gcctcccct catcctgctc
781 ctggcttaca agcaaaggca ggagcctcc aaccgccgtg cccaggagct ggtgcggatg
841 gcagcaaca ttaagggat tgaaccccc ggcttgaag cctcaccacc tccccgggg
901 ataccgagg ccaaagtcag gacccccctg tcctatgtgg cccagcggca gccttctgag
961 tctggcggc atctgcttc ggagcccagc acccccctgt ctctccagg cccgggagac
1021 gtctcttcc catcctgga cctgtcct gactctcaa acttgaggt catctagccc
1081 agctggggga cagtggtgct ttgtggctgg gtctggggca ggtgcatttg agccagggct
1141 ggctctgta gtggcctct tggcctcggc cctggttccc tccctctgc tctgggctca
1201 gatactgta catcccagaa gcccagccc tcaaccctc tggatgctac atggggatgc
1261 tggacggctc agcccctgt ccaaggattt tgggtgctg agattctccc cttagagacct
1321 gaaattcacc agctacagat gccaatgac ttacatcta agaagtctca gaacgtccag
1381 cccttcagca gctctgctc tgagacatga gccttgggat gtggcagcat cagtgggaca
1441 agatggacac tgggccacc tcccaggcac cagacacagg gcacgggtgga gagacttctc
1501 cccctggcc gccttggctc cccgctttg cccgaggctg ctcttctgtc agacttctc
1561 tttgtaccac agtggctctg gggccaggcc tcctgccc ctggccatcg ccacttccc
1621 cagctgctc ctaccagcag tttctctgaa gatctgtaa caggttaagt caatctgggg
1681 ttccaactgc ctgattcca gtccccagag cttgggtggtc ccgaacggg aagtacat
1741 tggggcatgg tggcctcgt gagcaaatg tgtcttggc aatctgaggc caggacagat
1801 gttgcccac cactggaga tggctctgag ggaggtgggt gggccttct gggaaggta
1861 gtggagagg gacctgccc ccccccctc ccatccccta ctcccactgc tcagcgggg
1921 ccattcaag ggtgccacac aatgtctgt ccaccctggg acacttctga gtatgaagc
1981 ggatgctatt aaaaactaca tgggaaaca ggtgcaaac ctggagatgg attgtaagag
2041 ccagttaaa tctgactct gctgctctc cccaccccc accttccact ccatacaatc
2101 tgggcctggt ggagtcttc cttcagagcc attcggccag gtgcgggtga tttccatc
2161 tcctgctgt gggcatgcc tggcttgtt tttatacaca taggcaagg gagtctctg
2221 tggaaattgt attgaaggat ttaaaagcag gggaggagag tagggggcat ctctgtacac
2281 tctgggggta aaacagggaa ggagtgctc gagcatgggg acaggtgagg tgggctggg
2341 cagaccctc gtagcgtta gcaggatggg ggccccagg actgtggaga gcatagtcca
2401 gcctgggcat ttgtctccta gcagcctaca ctggctctg tgagctgggc ctgggtgctg
2461 aaagccagga ttggggcta ggcgggaaga tttcggcca attgcttggg gggttggggg
2521 gatggaaaag gggagcacct ctaggctgcc tggcagcagt gagccctggg cctgtggcta
2581 cagccaggga accccactg gacacatggc cctgcttcta agccccag ttagcccaa
2641 aggaatggtc cactgagggc ctctgctc gcctgggctg ggccaggggc tttgaggaga
2701 gggtaaacat agggccggag atggggctga cacctcagat ggccagaata tgccaaacc
2761 cggcttctc cttgtcctc aggcagaggg gggctcctc tttgttccc tctggtcacc
2821 acaatgctg atgccagctg ccataggaag aggggtctgg ctggccatgg tggcacacac
2881 ctgtctccc agcactttg agggctgagg tggaggacc gcttaagccc aggtgtcaa
2941 ggctgctgt agctgttgc gagccactac actccagct ggggacggag caaaactttg
3001 cctcaaaaca aatttaaaa agaaagaaag aaggaaagag ggtatgttt tcacaattca
3061 tggggcctg catggcagga gtggggacag gacacctgct gttcctggag tcgaaggaca
3121 agccacagc ccagattccg gttctccaa ctgaggaaga gcatgccctg ccctctgggg
3181 aggtggcct gggccagcc ctgagctgt gacttgagg cagagacaac tttaagaat
3241 ttggctgcca gacccaggc ctggctgctg ctgtgtggag agggaggcgg cccgcagcag

10

20

30

40

50

3301 aacagccacc gcacttctc ctcagcttc tctggtgagg ccctgccctc tcttctctgg
 3361 acccttttac aactgaacgc atctgggctt cgtggtttcc tgttttcagc gaaatttact
 3421 ctgagctccc agttccatct tcatccatgg ccacaggccc tgcctacaac gcactagggga
 3481 cgtccctccc tgctgctgct ggggaggggc aggctgctgg agccgccctc tgagttgccc
 3541 gggatggtag tgcctctgat gccagccctg gtggctgtgg gctgggggtgc atgggagagc
 3601 tgggtgagag aacatggcgc ctccaggggg cgggagggagc actaggggct ggggcaggag
 3661 gctcctggag cgctggattc gtggcacagt ctgaggccct gagagggaaa tccatgcttt
 3721 taagaactaa ttcattgtta ggagatcaat caggaattag gggccatctt acctatctcc
 3781 tgacattcac agttaaag agacttctg ctttattcc ctcccaggga gaggctgaag
 3841 gaatggaatt gaaagcacca ttggagggt ttgctgaca cagcggggac tgctcagcac
 3901 tccctaaaaa cacacatgg aggccactgg tgactgctgg tgggcaggct ggcctgct
 3961 gggggagctc gtggcagtg gcgctgggt ggaggtgcag gagccccagg acctgctttt
 4021 caaaagactt ctgctgacc agagctcca ctacatgagc tggcccaggc cagaggggct
 4081 gatacatggc cttttcagg ggggtctct cgcggggtgg acttgggagt gtgcagtggg
 4141 acagggggct gcaggggtcc tgccaccacc gagcaccaac ttggcccctg gggctctgcc
 4201 tcatgaatga ggccttcccc agggctggcc tgactgtgct gggggctggg ttaacgtttt
 4261 ctgaggaac cacaatgcac gaaagaggaa ctggggtgc taaccaggat gctgggaaca
 4321 aaggcctctt gaagcccagc cacagcccag ctgagcatga ggcccagccc atagacggca
 4381 cagggcacct ggcccattcc ctgggattc ctgctttgc attgctgctt ctctcacc
 4441 catggaggct atgtaccct aactatctg gaatgtgtt agagggattc tgaatgatca
 4501 atatagctt gtgagacagt gccagatag atagccatgt ctgcttggg cacgggagag
 4561 ggaagtggca gcatgcatgc tgtttctgg cttttctgt tagaatactt ggtgctttc
 4621 aacacactt cacatgtgt gtaactgtt tgatccacc ccttcctga aatcctggg
 4681 aggtttatt gctgccatt aacacagagg gcaatagagg ttctgaaagg tctgtctt
 4741 gtcaaaacaa gtaaacggtg gaactacgac taaa

//

配列番号 5 : H o m o s a p i e n s V I S T A (代替名 : B 7 - H 5 ; B 7 H 5 ; D
D 1 アルファ ; G I 2 4 ; P P 2 1 3 5 ; S I S P 1) コード核酸配列

1 ctgccgcgc tgagccgct cgggacggag ccatgcggcg ctgggcctgg gccgcggtcg
 61 tggctcccct cgggccgag ctctgtctcc tcgggggctt cggggcccgg cgggaggcac
 121 agaggacgca gcagcctggc cagcgcgag atccccca cgccaccgc agcgcgtct
 181 cccgcgagg gctgcccag gccccaagc catcccaggc ctgaggacct gatttctcc
 241 acgcccacat gacatggctg aactttgtc ggcggccgga cgacggcgc ttaaggaagc
 301 ggtgcggaag cagggacaag aagccgagg atctcttcgg tccccagga cctccaggtg
 361 cagaagtgc cgcgagact ctgctcacg agtttcagga gctgctgaaa gaggccacgg
 421 agcggcggtt ctgaggctt ctggaccgc tgctgcccc gggggcgggc ctgaggctgg
 481 tggcgaggc ctttactgc cggctgagg gtccccgcg ggtggacaag cggacgctgg
 541 tggagctgca tggttccag gctcctgctg cccaagggtc cttctgca ggctccggtc
 601 tgagcctggc ctgggtcgg ttacggccc cgtgtccgg catcttcag ttcttgcca
 661 gtctgcacgt ggaccacagt gagctcagg gcaaggccc gctgcgggccc cgggacgtgg
 721 tgtgtgtct catctgtatt gattccctg gccagcgcca cacgtgctg gaggcctct
 781 caggcctgga gagcaacagc agggcttca cgctacagg gcaggggctg ctgagctgc
 841 aggctggaca gtacgtctt gtgtttgtg acaatggctc cggggccgtc ctaccatcc

10

20

30

40

50

901 aggcgggctc cagcttctcc gggctgctcc tgggcacgtg agggcgcca ggggggctgg
 961 cgaggagctg ccgccggtc ccggggaccc tctactgat gcccggtggtc accacaataa
 1021 agagccctcc accctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

//

配列番号6 : M u s m u s c u l u s V I S T Aコード核酸配列

1 ctgccgcgc tgagccgcct cgggacggag ccatgcggcg ctgggcctgg gccgcggtcg
 61 tggccccct cgggccgag ctctgctcc tggggggcgt cggggcccgg cgggaggcac
 121 agaggacgca gcagcctggc cagcgcgag atcccccaa cgccaccgcc agcgcgtcct
 181 cccgcgaggg gctgcccag gccccaaag catcccaggc ctgaggacct gatttctccg
 241 acgcccacat gacatggctg aactttgtcc ggccggccgga cgacggcgcc ttaaggaagc
 301 ggtgcggaag cagggacaag aagcccgagg atctcttcgg tccccagga cctccaggtg
 361 cagaagtgac cgcggagact ctgcttcacg agtttcagga gctgctgaaa gaggccacgg
 421 agcggcggtt ctgaggcctt ctggaccgc tgctgcccc gggggcgggc ctgaggctgg
 481 tgggcgaggc ctttactgc cggctgcagg gtccccccg ggtggacaag cggacgctgg
 541 tggagctgca tggtttcag gctcctgctg cccaagggtc cttctgca ggctccggtc
 601 tgagcctggc ctgggctcgg ttcacggccc ccgtgtccgg catcttcag ttcttgcca
 661 gtctgcacgt ggaccacagt gagctgcagg gcaaggccc gctgcgggcc cgggacgtgg
 721 tgtgttct catctgtatt gagtccctgt gccagcgcca cacgtgcctg gaggccgtct
 781 caggcctgga gagcaacagc aggtcttca cgctacagg gtaggggctg ctgcagctgc
 841 aggtggaca gtacgttct gtgtttgtg acaatggctc cggggccgtc ctcaccatcc
 901 aggcgggctc cagcttctcc gggctgctcc tgggcacgtg agggcgcca ggggggctgg
 961 cgaggagctg ccgccggtc ccggggaccc tctactgat gcccggtggtc accacaataa
 1021 agagccctcc accctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

10

20

30

40

50

//

【 4 - 1 4 】

種別	種別記号	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換
VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5

【 4 - 1 6 】

種別	種別記号	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換
VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5

【 4 - 1 5 】

種別	種別記号	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換
VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5

【 4 - 1 7 】

種別	種別記号	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換	種別変換
VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5	VTB5

10

20

30

40

50

【 4 - 3 8 】

項目	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	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
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	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	

【 4 - 3 9 】

項目	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	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
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	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	

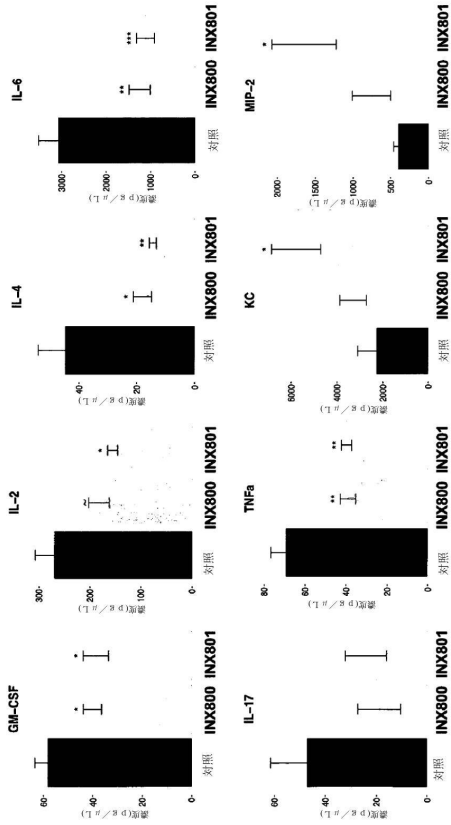
【 4 - 4 0 】

項目	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	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
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	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	

【 4 - 4 1 】

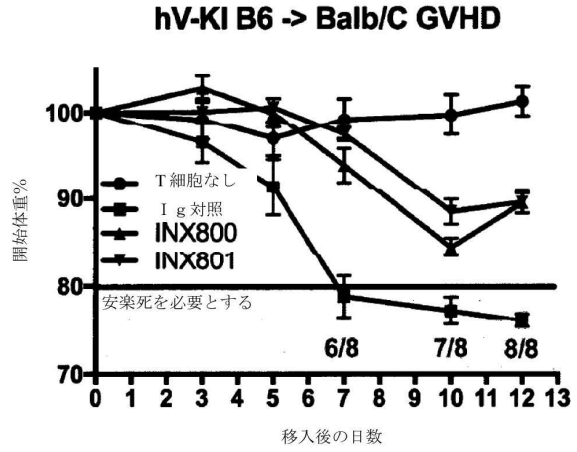
項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	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	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	

【 図 5 】



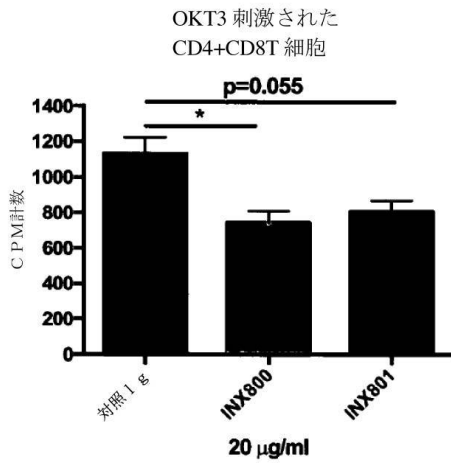
【 図 6 】

GVHD 動物モデルにおけるアゴニスト抗ヒト VISTA Ab の効果

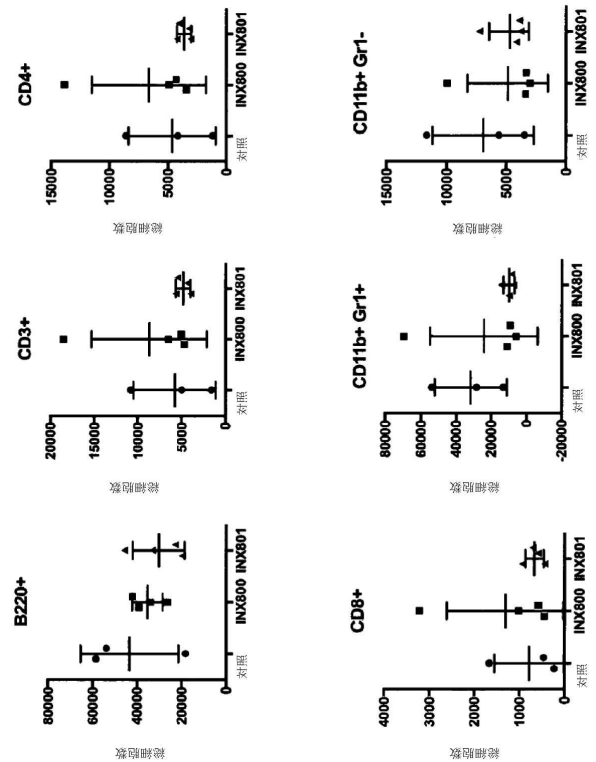


【 図 7 】

アゴニスト VISTA 抗体は CD3 駆動 T 細胞応答を抑制する



【 図 8 】



10

20

30

40

50

【 図 1 3 】

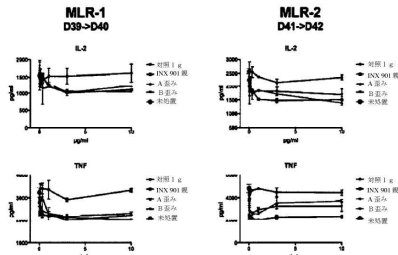


図 13：生化学的に歪められた INX901 型は、依然として MLR におけるサイトカイン産生を減少させることができる。72 時間の時点でのサイトカイン産生に関して、2 つの別個の MLR の上清を Luminex 分析により分析した。INX901 親、A 歪み、および B 歪みは全て、用量依存様式で TNFα および IL-2 の産生を減少させた。

【 図 1 4 】

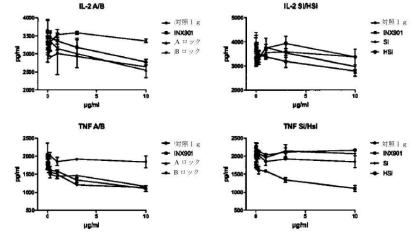


図 14 において：遺伝的にロックされた INX901 型は、依然として MLR におけるサイトカイン産生を減少させることができるが、Fc サイレント変異型は減少させることができない。72 時間の時点でのサイトカイン産生に関して、各 MLR の上清を Luminex 分析により分析した。INX901 親、A ロック、および B ロックは全て、用量依存様式で TNFα および IL-2 の産生を減少させた。Fc ドメインを発現停止させる変異を含有する Si および HSi 変異型は、サイトカイン産生を一貫して抑制しなかった。

10

【 図 1 5 】

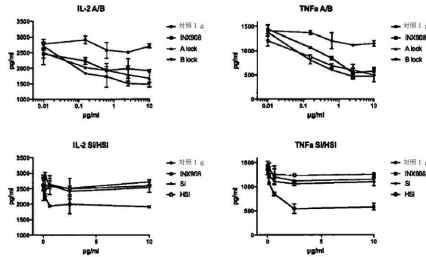
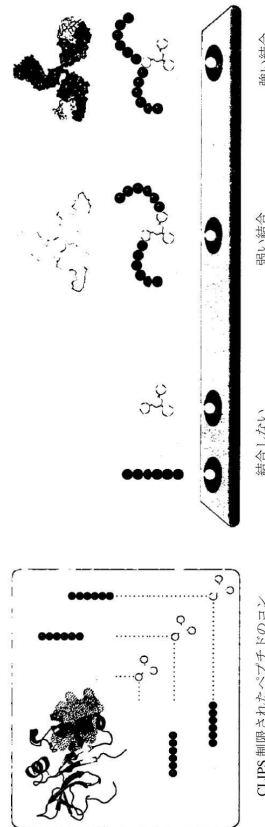


図 15 において：遺伝的にロックされた INX908 型は、依然として MLR におけるサイトカイン産生を減少させることができるが、Fc サイレント変異型は減少させることができない。72 時間の時点でのサイトカイン産生に関して、各 MLR の上清を Luminex 分析により分析した。INX908 親、A ロック、および B ロックは全て、用量依存様式で TNFα および IL-2 の産生を減少させた。Fc ドメインを発現停止させる変異を含有する Si および HSi 変異型は、サイトカイン産生を一貫して抑制しなかった。

【 図 1 6 】



Pepscan は、線形および不連続エпитオプの両方を決定するためにペプチド配列を使用する

20

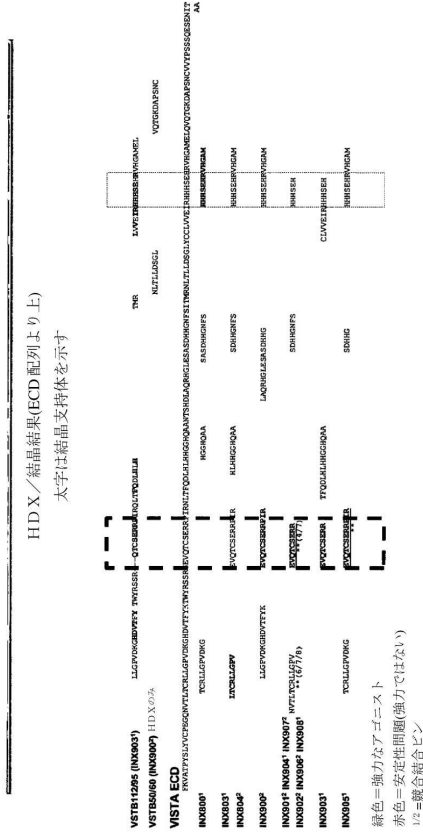
30

40

50

【 図 17 】

図 17 全ての抑制性 INX ab は同じコア配列に結合する



Pepsin 結果 (ECD 配列より下)

太字は優位に認識されるコア配列を示す
下線付きは強い線形エピートープ認識を示す
*重要な残基

【 図 18 】

図 18: エピートープマッピング要約

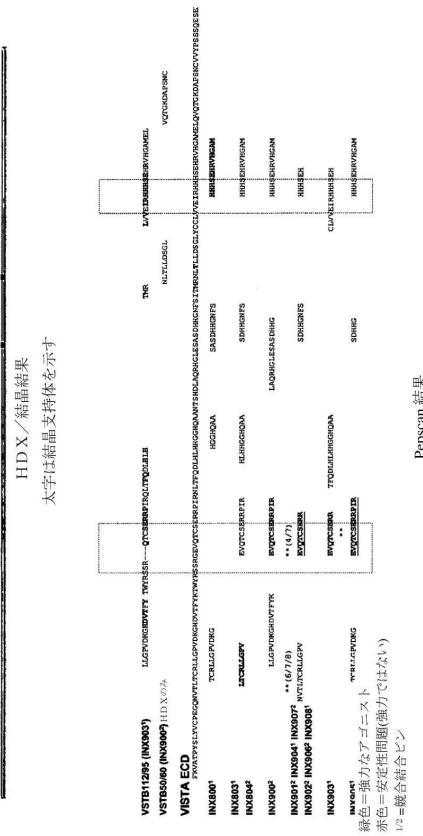
INX	mGVHD	NSG	MLR	CAIA	エピートープ EQV
INX800	+/-	-		-	いい交
INX803	+				あり
INX804	+				あり
INX900	-		-	+	あり
INX901	+		+	+	あり
INX902	+		+	+	あり
INX903	-		+	+	あり
INX904	-		+	+	あり
INX905	+		+	+	あり
INX906	+		+	+	あり
INX907	+		+	+	あり
INX908	+		+	+	あり

10

20

【 図 19 】

図 19: VISTA エピートープ

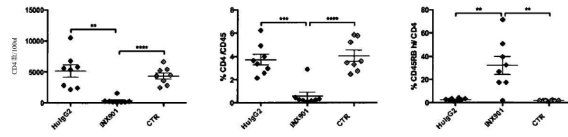


Pepsin 結果

太字は優位に認識されるコア配列を示す
下線付きは強い線形エピートープ認識を示す
*重要な残基

【 図 20 】

図 20 において: 末梢血における CD4T 細胞の変化。100³の血液の絶対数(左側のグラフ)、CD4+細胞の出現頻度(中央のグラフ)、CD4+細胞の出現頻度(右側のグラフ)(1 群あたり n=8、SEM、統計的に対応のない T 検定、等しい S D なし)。



30

40

50

【 図 2 1 】

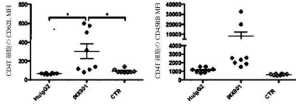


図 21 において：末梢血における CD4T 細胞活性化状態の変化。（1 群当たり n=8、SEM、統計的に対応のない T 検定、等しい SD なし）（MFI：蛍光強度の中央値）。

【 図 2 2 】

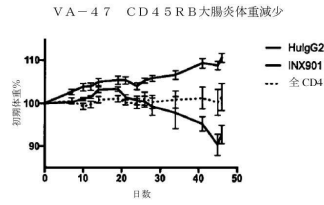


図 22 において：INX901 処置は、大腸炎進行に関連する体重減少を予防する。（1 群当たり n=8、SEM）。

【 図 2 3 】

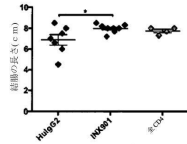


図 23 において：INX901 処置は結腸の短縮を予防した。（1 群当たり n=8 または 4、SEM、統計的に対応のない T 検定、等しい SD なし）。

【 図 2 4 】

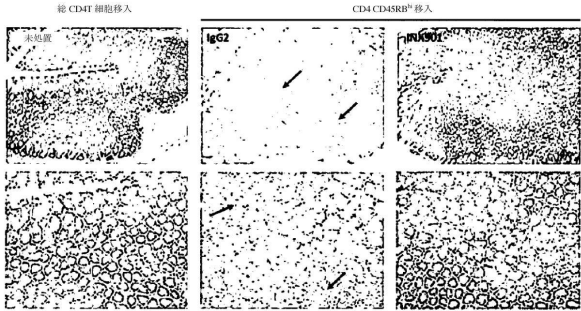


図 24 において：INX901 処置は、大腸炎の発生を予防した。各マウス群の結腸の H&E 染色切片の代表的な写真。倍率：上部の写真は 4×であり、下部は 20×である。矢印は、大量の炎症性浸潤物を有する領域を示す。INX901 処置結腸試料におけるそれらの完全な不在に留意する。

【 図 2 5 】



図 25 において：INX901 処置は結腸への CD3+T 細胞動員を防止した。各マウス群の結腸の CD3 染色切片の代表的な写真。倍率：上部の写真は 4×であり、下部は 20×である。

【 図 2 6 】

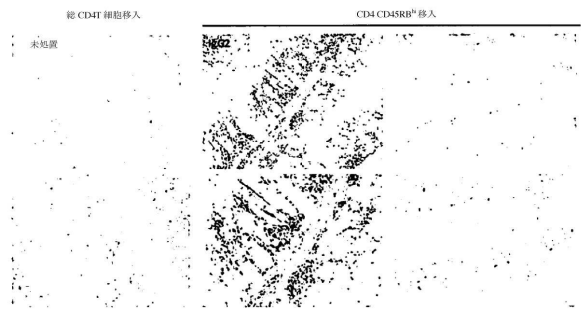


図 26 において：INX901 処置が結腸への骨髄(CD11b+)細胞動員を防止した。各マウス群の結腸の CD11b 染色切片の代表的な写真。倍率：上部の写真は 4×であり、下部は 20×である。

10

20

30

40

50

【図 27】

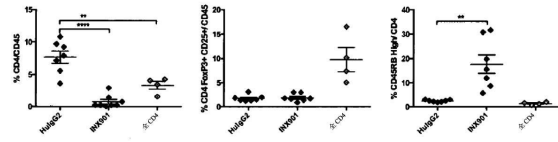
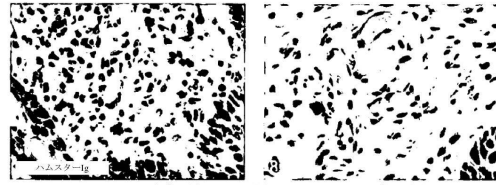


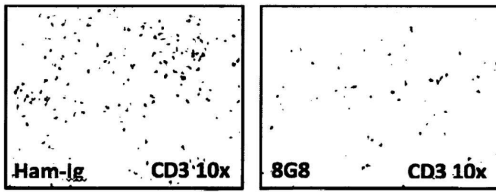
図 27 において、脾臓 CD4T 細胞における変化。脾臓を 4 6 日目に収集し(最後の抗体投与の 4 0 日後)、フローサイトメトリーにより分析した。(1 群当たり n=8 または 4、SEM、統計的に対応のない T 検定、等しい SD なし)。

【図 28】



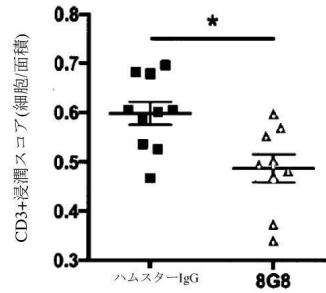
IMQD 処置マウスからの皮膚切片の H&E 分析。ハムスター Ig 画像は左側であり、8G8 処置群は右側である。

【図 29】



IMQD 処置マウスからの皮膚切片の IF 分析。ハムスター Ig 画像は左側であり、8G8 処置群は右側である。

【図 30】

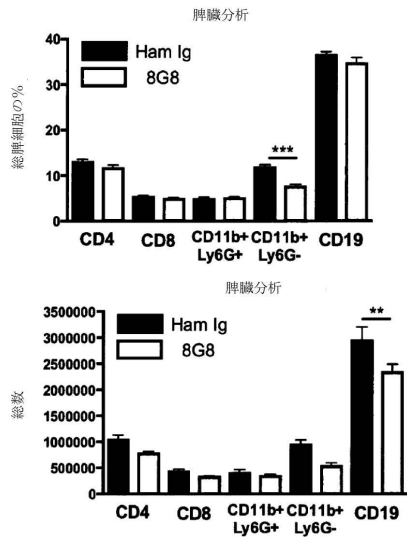


視野内の CD3+細胞の IMQD 処置マウスからの皮膚切片の定量分析。

10

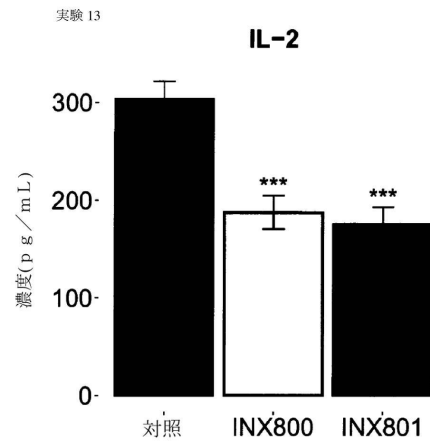
20

【図 31】



8 日目のイミキド乾燥モデル
ハムスター Ig および 8G8 処置マウスの脾臓における免疫学的集団の定量分析。8 日目に脾臓を採取し、分析した。

【図 32】



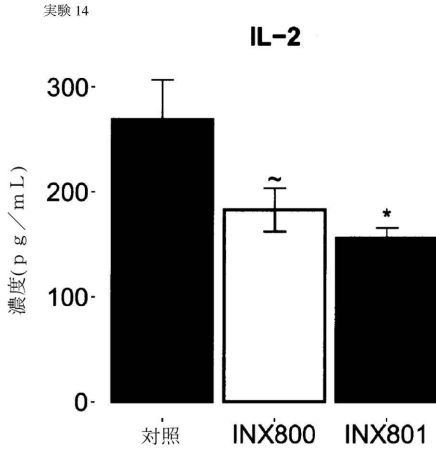
対照 Ig、INX800、または INX801 で処置されたマウスの 6 時間時点の 32 のサイトカインのパネルからの IL-2 の Luminex 分析。示される抗体の各々で、マウスを -3 時間で前処置した。0 時間で、15mg/kg の ConA をマウスに投与し、その後屠殺し、6 時間時点で出血させた。

30

40

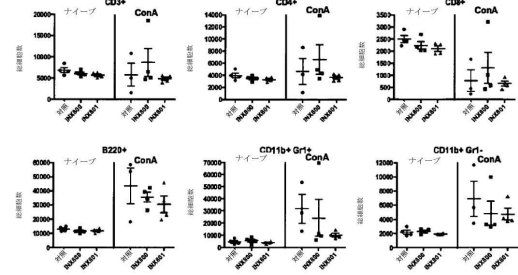
50

【 図 3 3 】



対照 Ig、INX800、または INX801 で処置されたマウスの 6 時間時点の 32 のサイトカインの Luminex 分析を示す。示される抗体の各々で、マウスを-3 時間で前処置した。0 時間で、15mg/kg の ConA をマウスに投薬し、その後屠殺し、6 時間時点で出血させた。

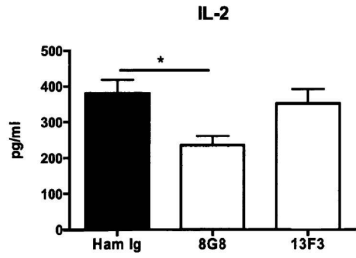
【 図 3 4 】



実験 14 からの ConA 処置マウスおよびナイーブマウスからの ALC 計数。10mpk で、示される抗体の各々で、マウスを-3 時間で前処置した。0 時間で、15mg/kg の ConA をマウスに投薬する (実験 14) か、または全く投薬せず (ナイーブ)、その後、フローサイトメトリーによる ALC 計数のために 6 時間で出血させた。

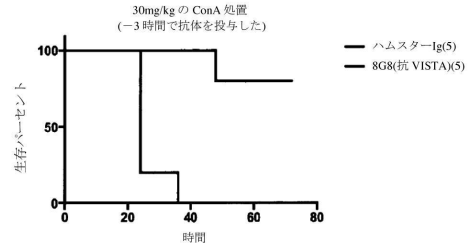
10

【 図 3 5 】



Ham-Ig、8G8、または 13F3 で処置されたマウスの 6 時間時点の 32 のサイトカインのパネルからの血清 IL-2 の Luminex 分析。示される抗体の各々で、マウスを-3 時間で前処置した。0 時間で、15mg/kg の ConA をマウスに投薬し、その後屠殺し、6 時間時点で出血させた。

【 図 3 6 】



30mg/kg の ConA 処置マウスの Kaplan-Meier 生存曲線。示される抗体の各々で、マウスを-3 時間で前処置した。0 時間で、30 mg/kg の ConA をマウスに投薬し、その後屠殺し、6 時間時点で出血させた。

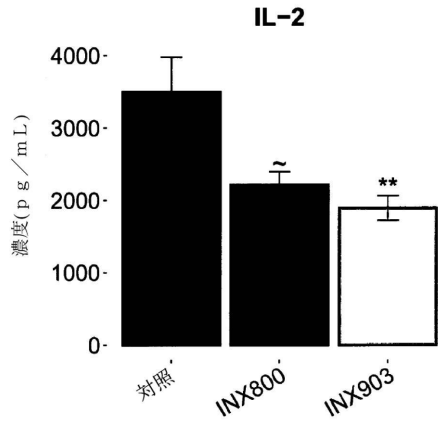
20

30

40

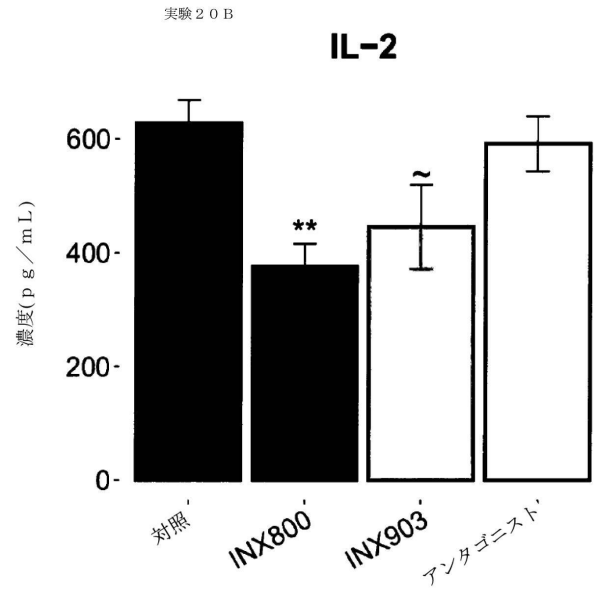
50

【 図 3 7 】



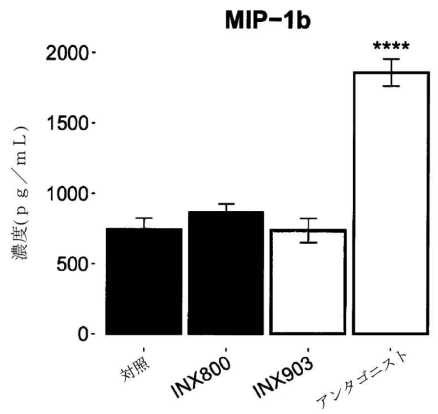
対照 Ig、INX800、または INX903 で処置されたマウスの 6 時間時点からの血漿における IL-2 発現。示される抗体の各々で、マウスを-3 時間で前処置した。0 時間で、15mg/kg の ConA をマウスに投薬し、その後屠殺し、6 時間時点で出血させた。

【 図 3 8 A 】



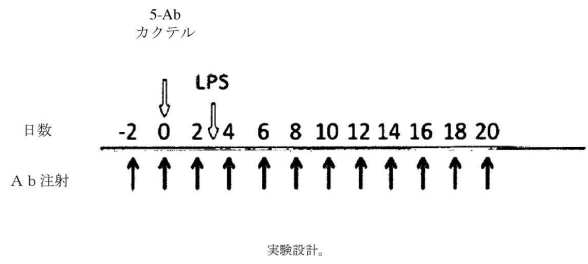
10

【 図 3 8 B 】



対照 Ig、INX800、INX903、またはアンタゴニストで処置されたマウスの 6 時間時点からの血漿における IL-2 および MIP-1β 発現。示される抗体の各々で、マウスを-3 時間で前処置した。0 時間で、15mg/kg の ConA をマウスに投薬し、その後屠殺し、6 時間時点で出血させた。

【 図 3 9 】



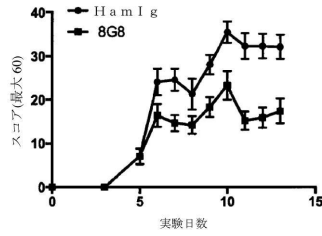
20

30

40

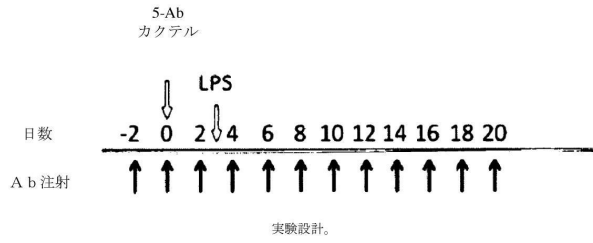
50

【 図 4 0 】

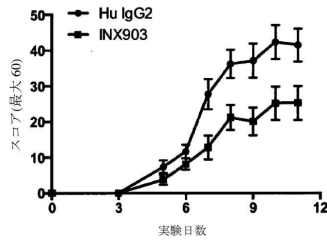


CAIA 疾患進行のスコア化。処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(各群においてn=10)。8G8 処置は、疾患の重症度を著しく低減した(相互作用項 $P < 0.000005$)。

【 図 4 1 】

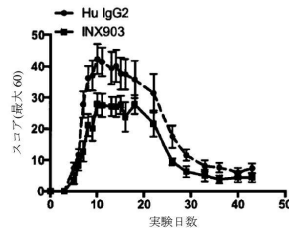


【 図 4 2 】



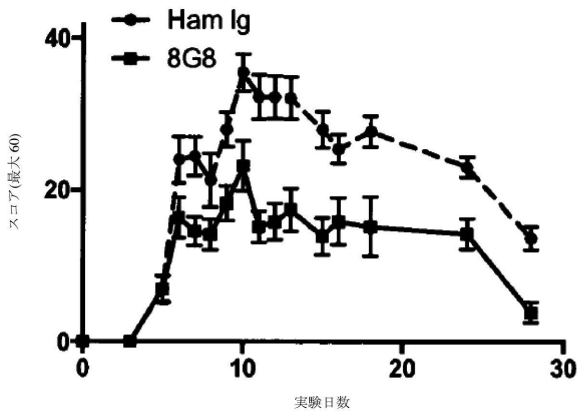
CAIA 疾患進行のスコア化。処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群においてn=9、INX903 処置群においてn=8；1匹のマウスは疾患のいずれの徴候も示さなかったため、対照群から外された)。INX903 処置は、疾患の重症度を著しく低減した(相互作用項 $P < 0.0005$)。

【 図 4 3 】

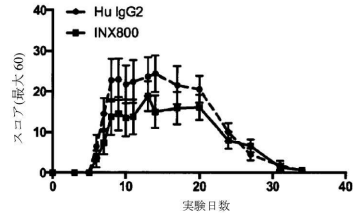


CAIA 疾患進行のスコア化。処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群においてn=9、INX903 処置群においてn=8；1匹のマウスは疾患のいずれの徴候も示さなかったため、対照群から外された)。INX903 処置は、疾患の重症度を著しく低減した(相互作用項 $P < 0.01$)。

【 図 4 4 】



【 図 4 5 】



INX800でのCAIA 疾患進行のスコア化。処置は-2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群においてn=9、INX800 処置群においてn=8)。

10

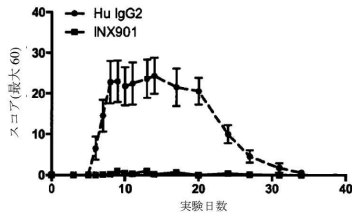
20

30

40

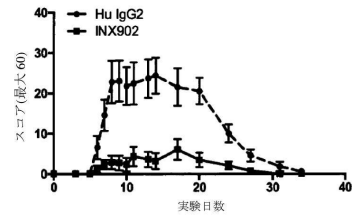
50

【図 4 6】



INX901 処置での CAIA 疾患進行のスコア化。処置は2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群において n = 9、INX901 処置群において n = 10)。

【図 4 7】



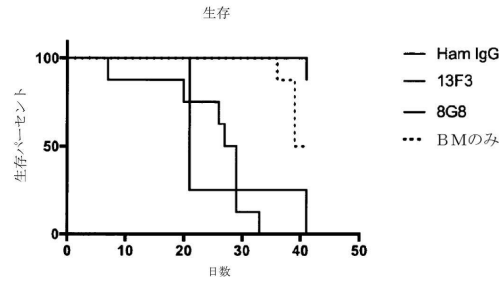
INX902 処置での CAIA 疾患進行のスコア化。処置は2日に開始され、その後、マウスに1日おきに投薬した。(対照処置群において n = 9、INX902 処置群において n = 7)。

10

【図 4 8 A】



【図 4 8 B】



急性 GvHD 疾患モデルにおける 8G8、13F3、または対照ハムスターIgG 抗体で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率。

- a) D 21 のマウスの外見
- b) 生存。

20

30

40

50

【 図 4 9 】

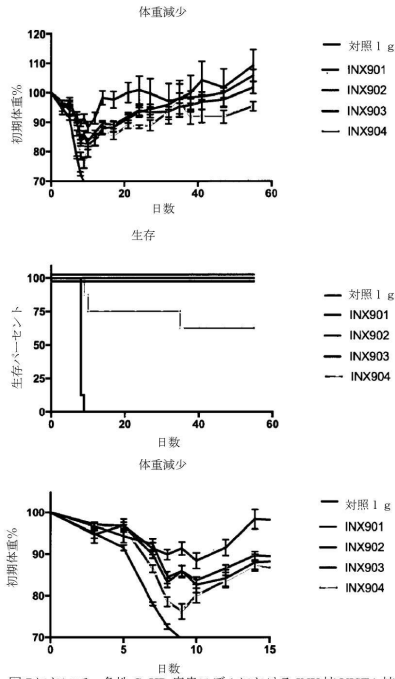
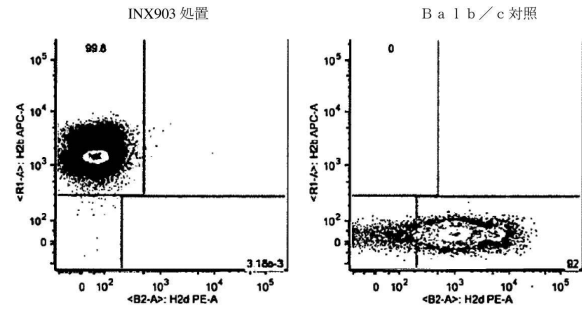


図7において：急性 GvHD 疾患モデルにおける INX 抗 VISTA 抗体または対照 Ig で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率。

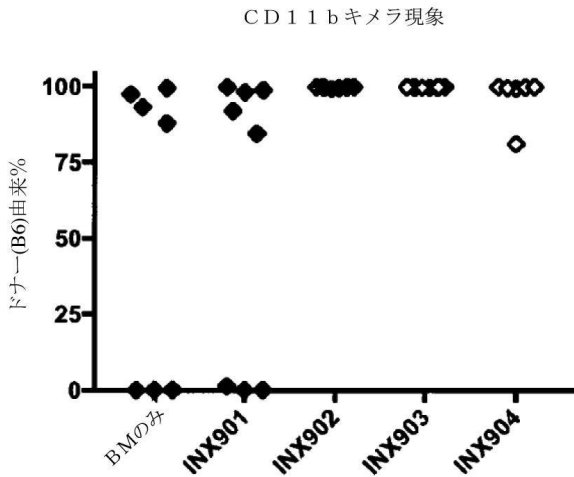
- a) 疾患のピークにおける群別(1 群当たり N=5~8 匹のマウス)の平均体重減少
- b) 群別(1 群当たり N=5~8 匹のマウス)の平均体重減少
- c) 生存率。

【 図 5 0 A 】

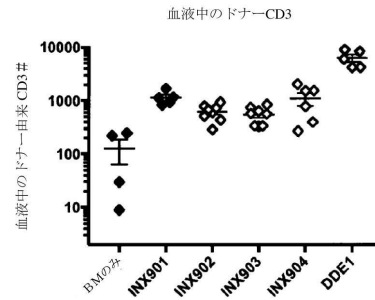


10

【 図 5 0 B 】



【 図 5 0 C 】



30

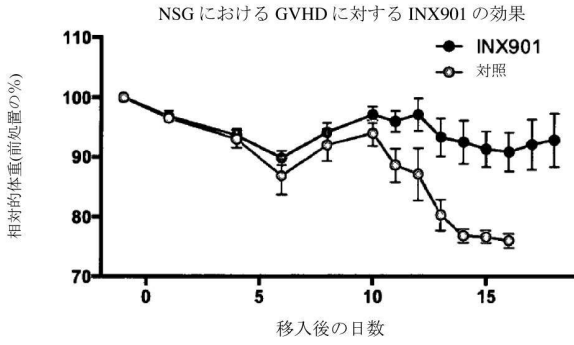
急性 GvHD 疾患モデルにおける INX901、INX902、INX903、および INX904、または対照 Ig 抗体で処置された生存マウスのキメラ現象およびドナー T 細胞数。

- a) α -ヒト VISTA 処置マウス(左側のパネル)または Balb/c 対照マウス (右側のパネル) における血液 CD 1 1 b 細胞におけるドナー(H 2 K b、垂直)またはレシピエント(H 2 K d、水平)発現の代表的なプロット
- b) α -ヒト VISTA 処置マウスの血液中のドナー由来 CD11b の百分率
- c) キメラ α -ヒト VISTA 処置マウスまたは DDE1 対照マウスにおける 25 μ L の血液中のドナー由来 T 細胞数

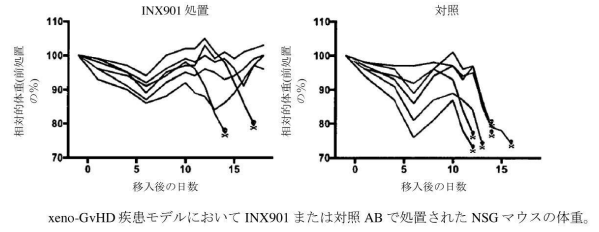
40

50

【 図 5 1 A 】



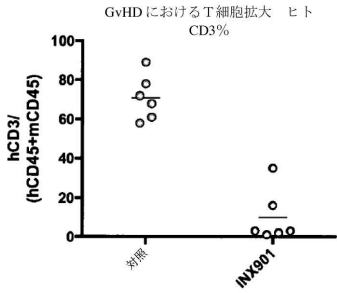
【 図 5 1 B 】



a) 群別(N = 6)の平均
b) 個々のマウスの体重。どくろは、マウスが死亡した状態で発見されたか、または示される日に安楽死されたかのいずれかであったことを示す。

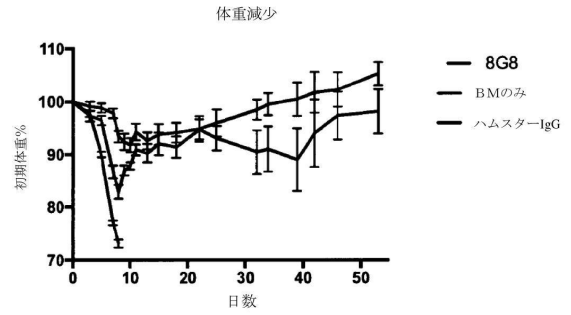
10

【 図 5 2 】

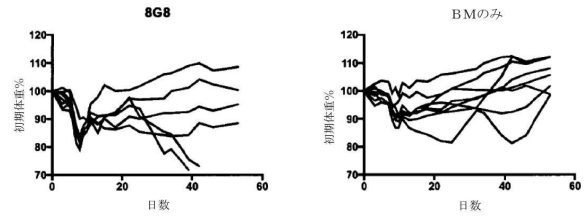


xeno-GvHD 疾患モデルにおいて INX901 または対照 AB で処置された NSG マウスの T 細胞拡大値は、ヒト CD3+T 細胞を構成したマウス末梢循環における全 CD45+細胞の%を示す。

【 図 5 3 A 】



20

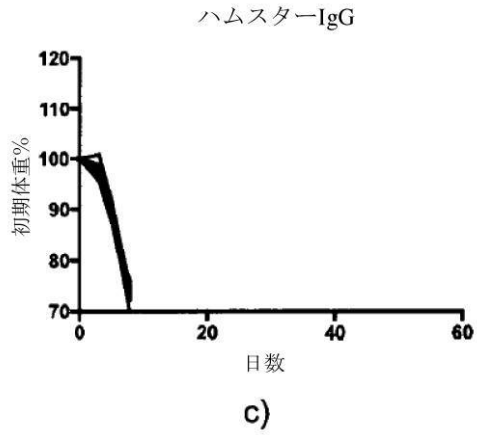


30

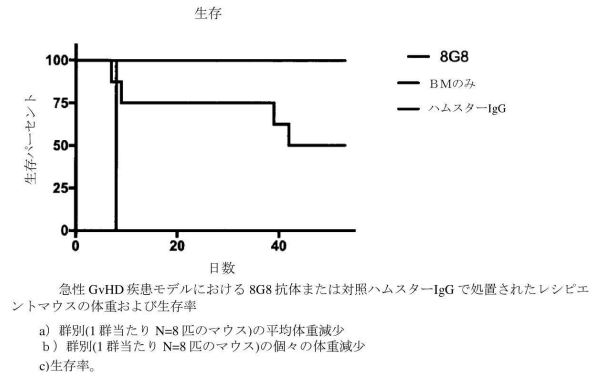
40

50

【図 5 3 B】

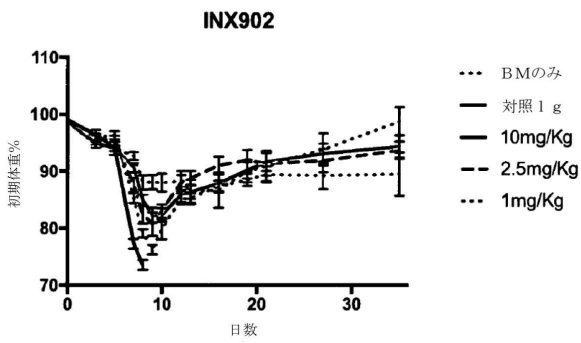


【図 5 3 C】

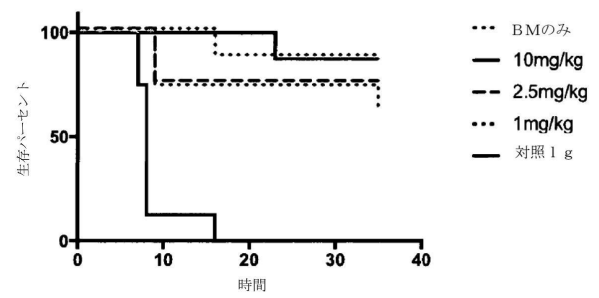


10

【図 5 4 A】



【図 5 4 B】



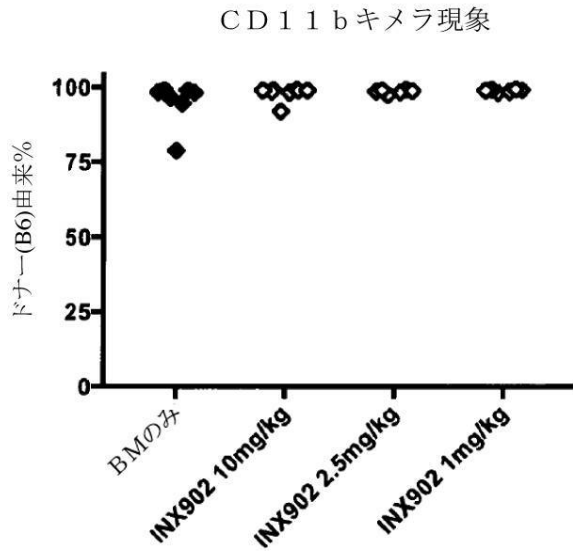
20

30

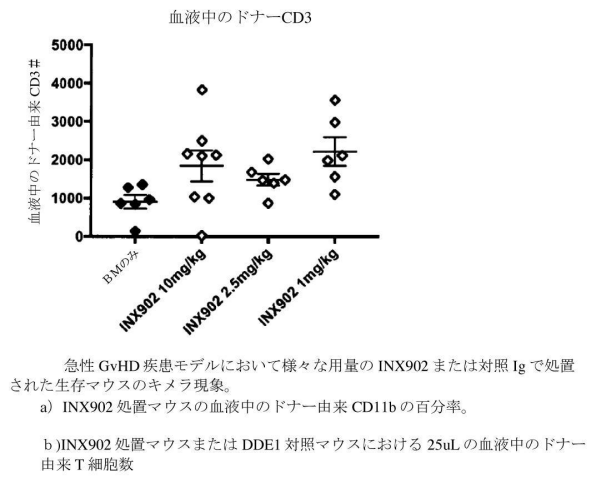
40

50

【図 5 5 A】

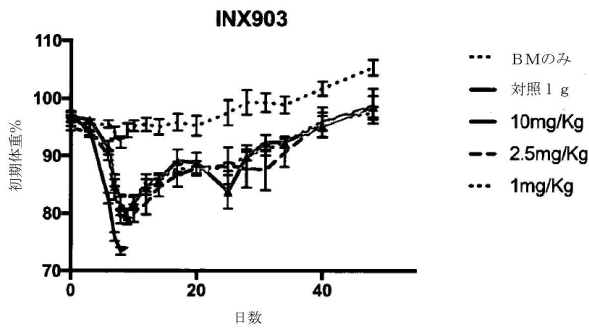


【図 5 5 B】

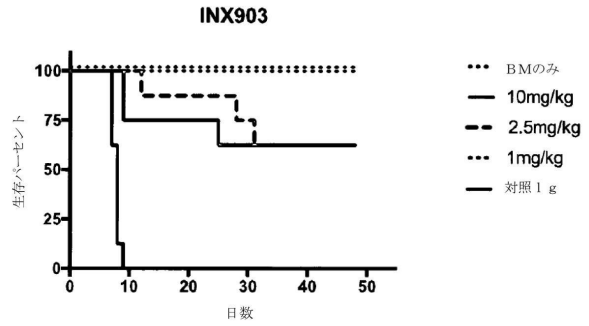


10

【図 5 6 A】



【図 5 6 B】



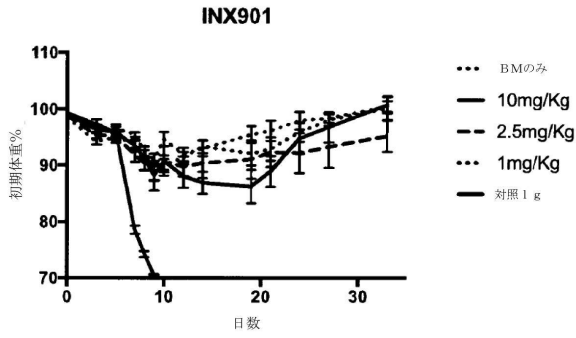
20

30

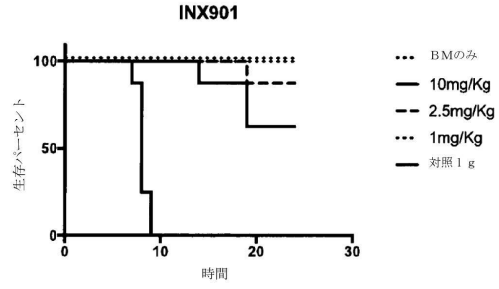
40

50

【 図 5 6 C 】



【 図 5 6 D 】

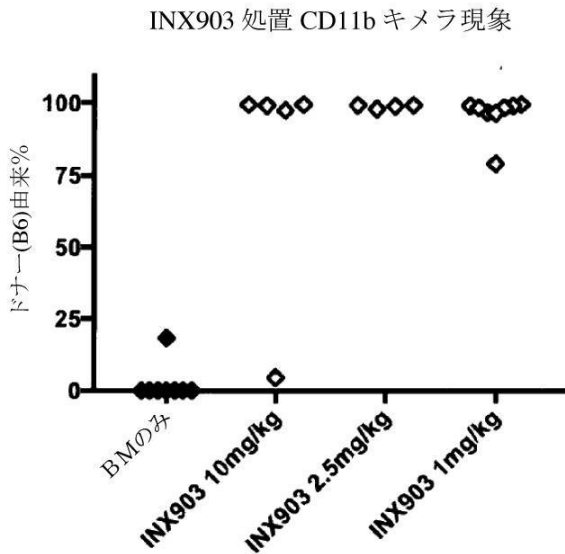


急性 GvHD 疾患モデルにおける様々な用量の INX903 および INX901 抗体または対照 1g で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率

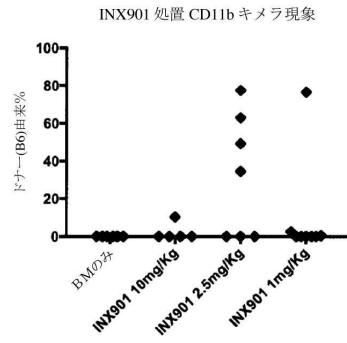
- a) INX903 処置マウスの群別(1 群当たり N=8 匹のマウス)の平均体重減少
- b) INX903 処置マウスの生存率
- c) INX901 処置マウスの群別(1 群当たり N=8 匹のマウス)の平均体重減少
- d) INX901 処置マウスの生存率

10

【 図 5 7 A 】



【 図 5 7 B 】



急性 GvHD 疾患モデルにおいて様々な用量の INX901 および INX903、または対照 1g で処置された生存マウスのキメラ現象

- a) INX903 処置マウスの血液中のドナー由来 CD11b の百分率
- b) INX901 処置マウスの血液中のドナー由来 CD11b の百分率

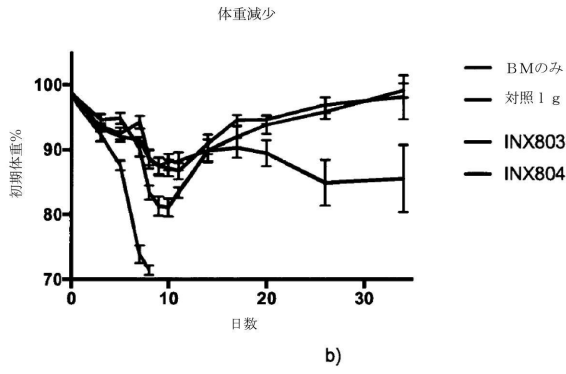
20

30

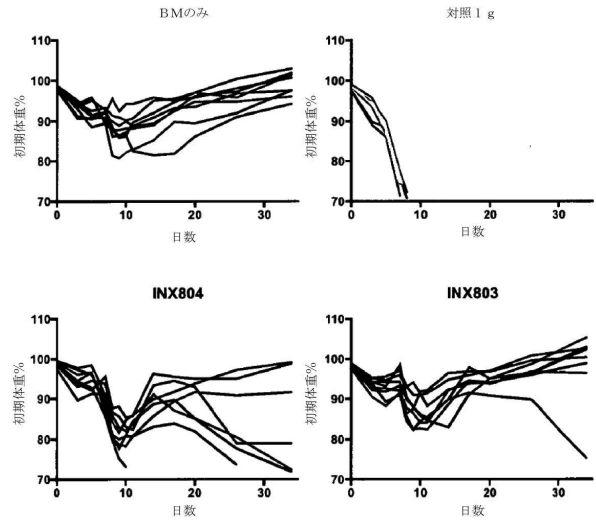
40

50

【図 5 8 A】



【図 5 8 B】



10

【図 5 8 C】

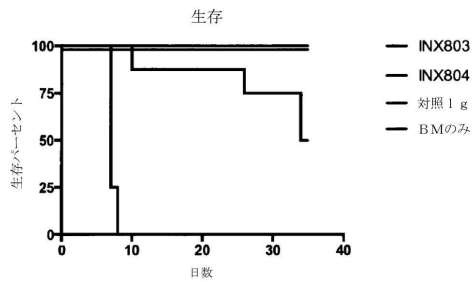


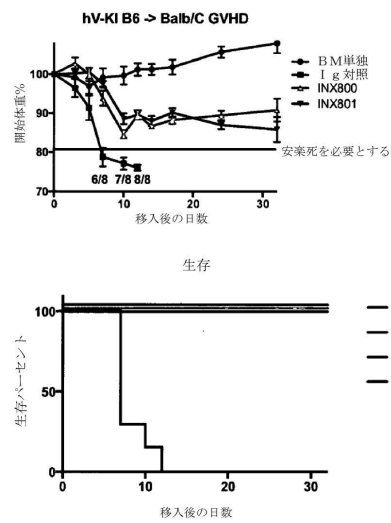
図 16 A~C : 急性 GvHD 疾患モデルにおける INX 抗体または対照 Ig で処置されたレシピエントマウスの体重および生存率

a) 群別(1 群当たり N=8 匹のマウス)の平均体重減少

b) 群別(1 群当たり N=8 匹のマウス)の個々の体重減少

c) 生存率。

【図 5 9】



20

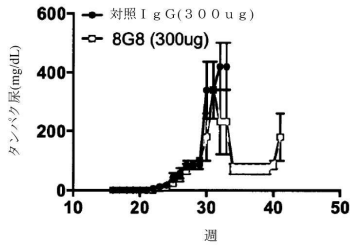
30

図 17 急性 GvHD は hV-KI マウスからの T 細胞および BM を照射 Balb/c レシピエントに移入することによって誘導された。体重減少によりマウスを疾患について追跡し、最初の開始体重の 20% 超を失った場合、マウスを屠殺した。

40

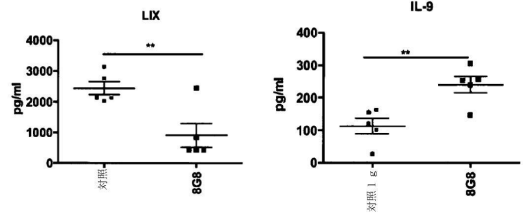
50

【図 6 0】



8G8はNZBWF-1マウスにおいてタンパク尿の発症を遅延する
 16週齢の雌のNZBWF-1マウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstripsを使用して記録され、mg/dLとして定量化された。32週目に、300ugの対照IgG(黒色線、n=5)または300ugの8G8(赤色線、n=5)のいずれかで、1週間に3回 i.p.注射によりマウスを処置した。33週目に、対照IgGで処置されたマウスは、健康不良のため屠殺された。

【図 6 1】

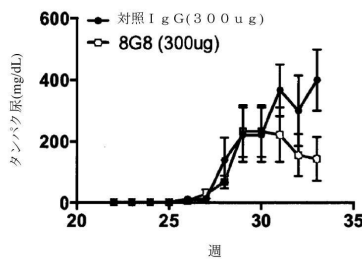


対照Igおよび8G8処置NZBWF-1マウスの血清中のCLSおよびIL-9
 対照IgG(n=5)および8G8マウス(n=5)から血清を33週目に採取し、Bio-plex 200 Systemsを使用して、32plex実行でケモカインおよびサイトカインを評価し、Bio Plex manager6.0ソフトウェアにより分析した。データは平均±SEMとして示され、統計的有意性は対応のない学生t検定によって決定された。
 **は群間の有意性(p<0.01)を示す。

LIX/CX

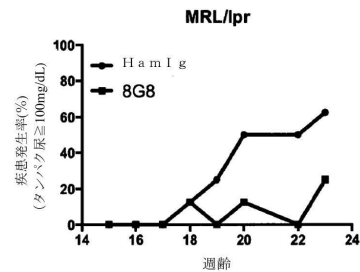
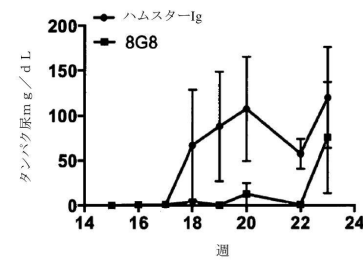
10

【図 6 2】



8G8はNZBWF-1マウスにおいてタンパク尿の発生を低減する
 22週齢の雌のNZBWF-1マウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstripsを使用して記録され、mg/dLとして定量化された。28週目に、300ugの対照IgG(黒色線、n=6)または300ugの8G8(赤色線、n=6)のいずれかで、1週間に3回 i.p.注射によりマウスを処置した。

【図 6 3】



8G8はMRL/lprマウスにおいてタンパク尿の発生を低減する
 15週齢の雌のMRL/lprマウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstripsを使用して記録され、mg/dLとして定量化された。16週目に、300ugのハムスターIg(黒色線、n=8)または300ugの8G8(赤色線、n=8)のいずれかで、1週間に3回 i.p.注射によりマウスを処置した。21週目のデータは、chemstripsの技術的問題により廃棄された。(A)平均タンパク尿は標準誤差で示される。(B)各時点における疾患発生率は、100mg/dL以上のタンパク尿を示した各群におけるマウスのパーセントとして計算された。

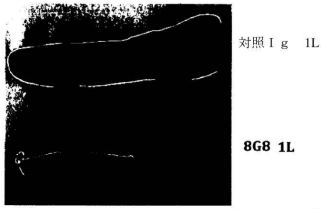
20

30

40

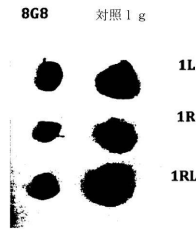
50

【図 6 4】



8G8 は MRL/lpr マウスにおいて脾腫を低減する
 300ug の対照 Ig/ハムスター-Ig または 300ug の 8G8 のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p. 注射により処置したマウスから脾臓を 23 週目に採取した。脾臓は、8G8 処置マウスと比較して、対照 Ig 処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な脾臓を示す。

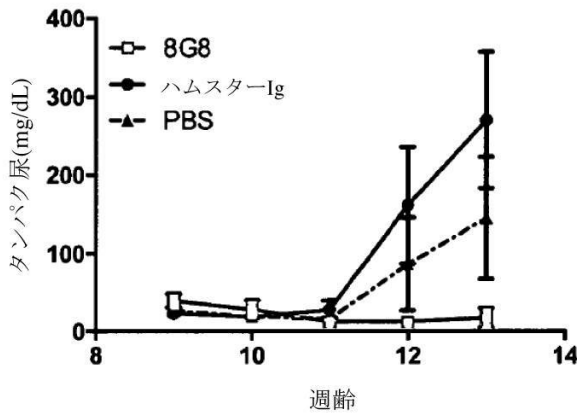
【図 6 5】



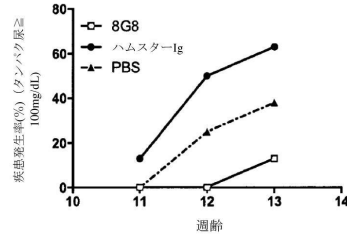
8G8 は MRL/lpr マウスにおいて頸部リンパ節のリンパ球増殖を低減する
 300ug の対照 Ig/ハムスター-Ig または 300ug の 8G8 のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p. 注射により処置したマウスから頸部リンパ節を 23 週目に採取した。リンパ球増殖は、8G8 処置マウスと比較して、対照 Ig 処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な頸部リンパ節を示す。

10

【図 6 6 A】



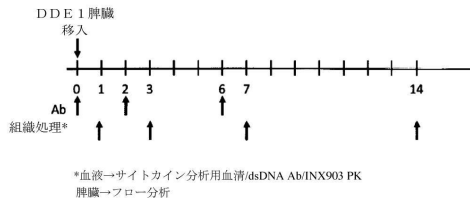
【図 6 6 B】



8G8 は MRL/lpr マウスにおいてタンパク尿の発生を低減する
 9 週齢の雌の MRL/lpr マウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstrips を使用して記録され、mg/dL として定量化された。11 週目に、200uL の PBS(黒色点線、n=8)または 10mg/kg のハムスター-Ig(黒色実線、n=8)または 8G8(赤色線、n=8)のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p. 注射によりマウスを処置した。(A)平均タンパク尿は標準誤差棒で示される。(B)各時間点における疾患発生率は、100mg/dL 以上のタンパク尿を示した各群におけるマウスのパーセントとして計算された。

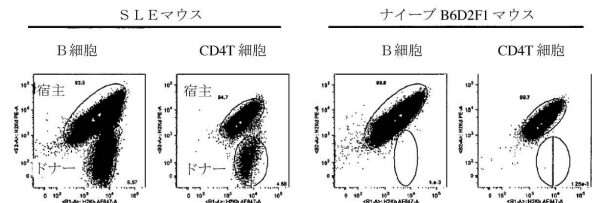
20

【図 6 7】



V A-3 9 実験設計。INX903 処置は DDE1 移入後 0、2、および 6 日目に施された。各時点で、1 群当たり 4 匹のマウスと 1 匹のナイーブマウスを分析した。脾臓をフローサイトメトリを用いて処理し、ELISA による抗 dsDNA-IgG の検出のために心臓血液から血清を回収した。

【図 6 8】



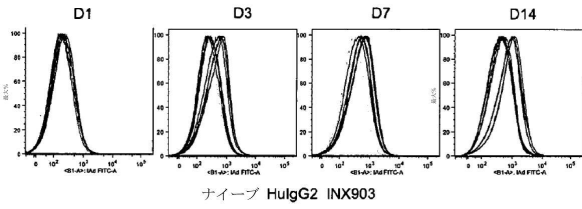
ドナーおよび宿主細胞集団は、それらの MHC クラス I 対立遺伝子によって区別される。宿主 B6D2F1 細胞は H-2K^b および H-2K^d の両方を発現する一方で、ドナー-DDE1 細胞は H-2K^b のみを発現する。

30

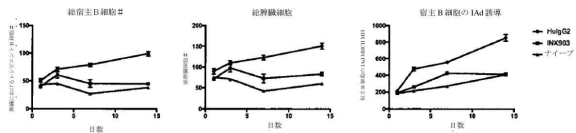
40

50

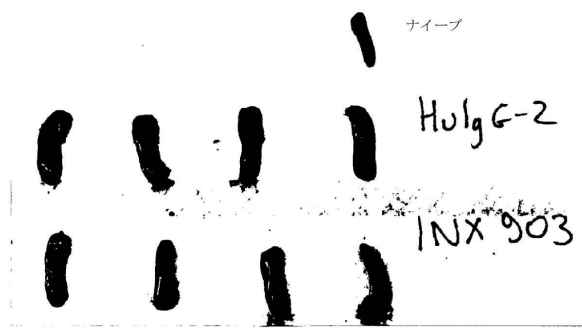
【図 69 A】



【図 69 B】

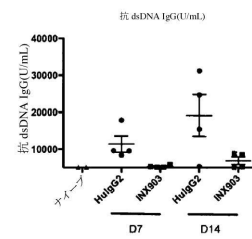


【図 69 C】



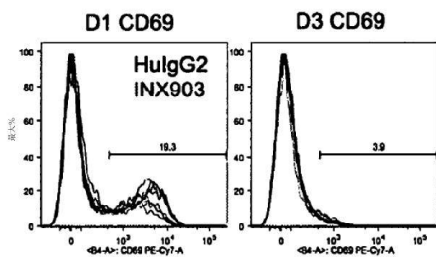
SLE 進行中の B 細胞活性化は INX903 処置によって防止される。A) レシビエント B 細胞の MHCII IAad 発現のヒストグラムプロット。B) 実験期間中のレシビエント B 細胞および脾臓細胞の総数。実験期間中のレシビエント B 細胞の MHC クラス II IAad MFI (n=4, SEM)。C) D 14 での脾臓の大きさ。

【図 70】



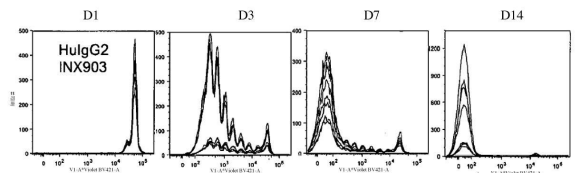
SLE における自己抗体抗 dsDNA 自己抗体産生は INX903 処置によって防止される。血清中の抗 dsDNA IgG 力価は、D 7 および D 14 で、ナイーブマウス (n=2) および HulG2 または INX903 処置マウスにおいて ELISA により測定された (n=4, SEM)。

【図 71】



INX903 処置 CD4T 細胞における 1 日目の CD69 発現の減少 (n=4)。

【図 72】



細胞周期に変化がないにもかかわらず、INX903 処置マウスにおける CD4 T 細胞数の減少 (n=4)。

10

20

30

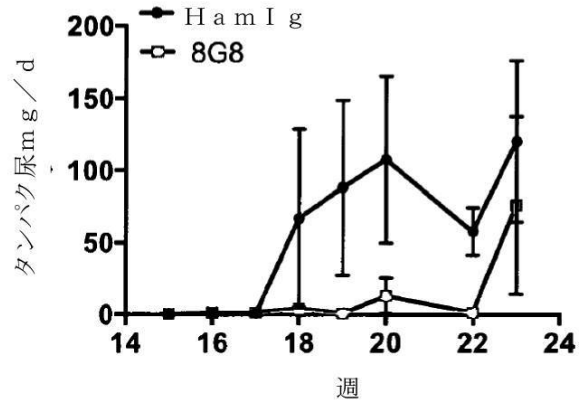
40

50

【 図 7 3 】

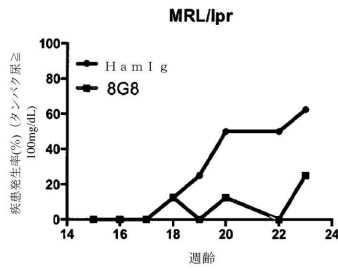


【 図 7 4 A 】



10

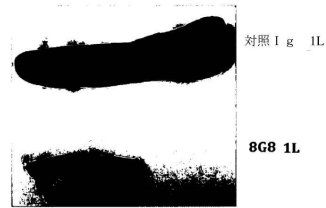
【 図 7 4 B 】



8G8 は MRL/lpr マウスにおいてタンパク尿の発生を低減する

15 週齢の雌の MRL/lpr マウスをタンパク尿に関して毎週監視した。タンパク尿値は、chemstrips を使用して記録され、mg/dL として定量化された。16 週目に、300ug のハムスターIg(黒色線、n=8)または 300ug の 8G8(赤色線、n=8)のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p.注射によりマウスを処置した。21 週目のデータは、chemstrips の技術的問題により廃棄された。(A)平均タンパク尿は標準誤差棒で示される。(B)各時点における疾患発生率は、100mg/dL 以上のタンパク尿を示した各群におけるマウスのパーセントとして計算された。

【 図 7 5 】



8G8 は MRL/lpr マウスにおいて脾腫を低減する

300ug の対照 Ig/ハムスターIg または 300ug の 8G8 のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p.注射により処置したマウスから脾臓を 23 週目に採取した。脾腫は、8G8 処置マウスと比較して、対照 Ig 処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な脾臓を示す。

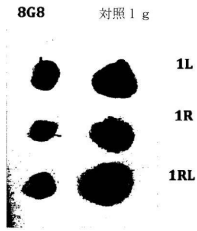
20

30

40

50

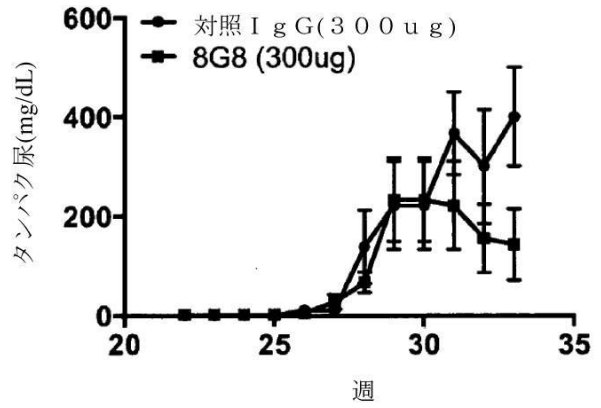
【 図 7 6 】



8G8 は MRL/lpr マウスにおいて頸部リンパ節のリンパ球増殖を低減する

300ugの対照 Ig/ハムスター-Ig または 300ug の 8G8 のいずれかで、1 週間に 3 回 i.p. 注射により処置したマウスから頸部リンパ節を 23 週目に採取した。リンパ球増殖は、8G8 処置マウスと比較して、対照 Ig 処置マウスにおいて観察された。ここでは代表的な頸部リンパ節を示す。

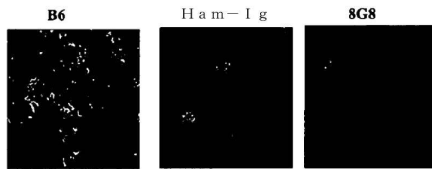
【 図 7 7 】



10

【 図 7 8 】

8G8 は NZBWF-1 マウスにおいてタンパク尿の発生を低減する



8G8 は、NZBWF-1 マウスにおいて、免疫複合体沈着に影響を及ぼさない。

20

【 配列表 】

[0007277047000001.app](#)

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 19/02 (2006.01)
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)
 A 6 1 P 1/00 (2006.01)
 A 6 1 P 17/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 13/02 (2006.01)
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 39/02 (2006.01)
 A 6 1 P 31/20 (2006.01)
 A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4706(2006.01)
 A 6 1 K 31/519(2006.01)
 A 6 1 K 31/675(2006.01)
 A 6 1 K 31/42 (2006.01)
 A 6 1 K 31/635(2006.01)
 C 0 7 K 14/725(2006.01)
 C 0 7 K 16/18 (2006.01)
 C 0 7 K 16/46 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 1 2 N 15/62 (2006.01)

F I

A 6 1 P 37/08
 A 6 1 P 29/00 1 0 1
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 1/00
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 13/02
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 A 6 1 P 39/02
 A 6 1 P 31/20
 A 6 1 K 39/00 G
 A 6 1 K 31/4706
 A 6 1 K 31/519
 A 6 1 K 31/675
 A 6 1 K 31/42
 A 6 1 K 31/635
 C 0 7 K 14/725
 C 0 7 K 16/18
 C 0 7 K 16/46
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 N 15/62

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/363,917

(32)優先日 平成28年7月19日(2016.7.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/363,925

(32)優先日 平成28年7月19日(2016.7.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/363,929

(32)優先日 平成28年7月19日(2016.7.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/363,931

(32)優先日 平成28年7月19日(2016.7.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/364,073

(32)優先日 平成28年7月19日(2016.7.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/365,102

(32)優先日 平成28年7月21日(2016.7.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/365,087
- (32)優先日 平成28年7月21日(2016.7.21)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/365,085
- (32)優先日 平成28年7月21日(2016.7.21)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/365,081
- (32)優先日 平成28年7月21日(2016.7.21)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/365,166
- (32)優先日 平成28年7月21日(2016.7.21)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/372,362
- (32)優先日 平成28年8月9日(2016.8.9)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/385,627
- (32)優先日 平成28年9月9日(2016.9.9)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/385,785
- (32)優先日 平成28年9月9日(2016.9.9)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/385,805
- (32)優先日 平成28年9月9日(2016.9.9)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/385,871
- (32)優先日 平成28年9月9日(2016.9.9)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/385,888
- (32)優先日 平成28年9月9日(2016.9.9)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/385,893
- (32)優先日 平成28年9月9日(2016.9.9)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/406,632
- (32)優先日 平成28年10月11日(2016.10.11)
- (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (31)優先権主張番号 62/425,184

(32)優先日 平成28年11月22日(2016.11.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 PCT/US2017/027765

(32)優先日 平成29年4月14日(2017.4.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

エンフィールド、マーステン レイン 11、ユニット 35

(72)発明者 ロススタイン、ジェイ

アメリカ合衆国、ヴァーモント、ノーウィッチ、エルム ストリート 18

(72)発明者 キャリエール、キャサリン

アメリカ合衆国、ニューハンプシャー、レバノン、メディカル センター ドライブ 1

(72)発明者 ノエル、ランドルフ、ジェイ、

アメリカ合衆国、ニューハンプシャー、ブレインフィールド、フリーマン ヒル ロード 301

(72)発明者 デロング、サブリーナ

アメリカ合衆国、ニューハンプシャー、レバノン、メディカル センター ドライブ 1

(72)発明者 ルメルシエール、イザベル

アメリカ合衆国、マサチューセッツ、ドーチェスター、レイブン ストリート 32、ユニット 1

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 特表2019-525943(JP,A)

特表2013-527144(JP,A)

特表2015-526064(JP,A)

J. Clin. Invest. , 2014年, Vol.124, No.5 , pp.1966-1975

J. Immunol. , 2011年, Vol.187 , pp.1537-1541

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

A61K 39/00 - 39/44

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)