(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2015-533796
(P2015-533796A)
(43)公表日　平成27年11月26日(2015.11.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	ZNA	4B024
C12N 5/0783	(2010.01)	C12N	5/00	202L	4B064
C12N 5/09	(2010.01)	C12N	5/00	202U	4B065
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	G	4C084
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 210 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-531291 (P2015-531291)
(86)(22)出願日　平成25年9月9日 (2013.9.9)
(85)翻訳文提出日　平成27年5月7日 (2015.5.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/058785
(87)国際公開番号　WO2014/039983
(87)国際公開日　平成26年3月13日 (2014.3.13)
(31)優先権主張番号　61/698,003
(32)優先日　平成24年9月7日 (2012.9.7)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　PCT/US2013/047009
(32)優先日　平成25年6月21日 (2013.6.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌の診断および治療のためのＶＩＳＴＡ調節剤

(57)【要約】
本開示は、免疫応答の活性化を、それを必要とする患者において行うための組成物および治療方法に関する。好ましい実施形態において、本主題の方法および組成物は、免疫寛容に寄与する天然の「チェックポイント」タンパク質であるＶＩＳＴＡの活性に、任意にＰＤ－１等の第２のチェックポイント経路のアンタゴニストとの組み合わせで、拮抗することができる。例えば、そのような方法および組成物は、結腸癌または別の癌の防止および治療に好適であり得る。例示的なＶＩＳＴＡアンタゴニスト、特に、抗ＶＩＳＴＡ抗体は、インビトロおよびインビボで癌細胞に対する免疫応答を活性化し、それによって、防御的抗腫瘍免疫を与え、これが腫瘍量を減少させることが、本明細書に示される。さらに、ＶＩＳＴＡアンタゴニストを、第２のチェックポイントタンパク質アンタゴニスト、特に、ＰＤ－１リガンド（ＰＤ－Ｌ１）に対する抗体と組み合わせて使用した場合に、付加的利益が観察された。
【選択図】図１Ａ

```
MGVPAVPEASSPRWGTLLLAIFLAASRGLVAAFKVTTPYSLYVCPEGQNA 50
TLTCRILGPVSKGHDVTIYKTWYLSSRGEVQMCKEHRPIRNFTLQHLQHH 100
GSHLKANASHDQPQKHGLELASDHHGNFSITLRNVTPRDSGLYCCLVIEL 150
KNHHPEQRFYGSMELQVQAGKGSGSTCMASNEQDSDSITAAALATGACIV 200
GILCLPLILLLVYKQRQVASHRRAQELVRMDSSNTQGIENPGFETTPPFQ 250
GMPEAKTRPPLSYVAQRQPSESGRYLLSDPSTPLSPPGPGDVFFPSLDPV 300
PDSPNSEAI*
```

FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための方法であって、ＶＩＳＴＡアンタゴニストを投与し、それによって前記ＶＩＳＴＡに媒介される免疫応答の抑制を阻害し、その結果免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態が治療されることを含む、方法。
【請求項２】
免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための方法であって、前記対象から免疫細胞を取り出し、前記免疫細胞をインビトロでＶＩＳＴＡアンタゴニストと接触させ、それによって前記免疫細胞をインビトロで刺激し、前記インビトロで刺激した免疫細胞を前記対象に再導入することを含む、方法。
【請求項３】
前記免疫細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記免疫細胞集団をインビトロで増殖させることをさらに含む、請求項２または３に記載の方法。
【請求項５】
免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための方法であって、前記対象から免疫細胞を取り出し、前記免疫細胞に、その天然の結合パートナー（複数可）に結合することができないＶＩＳＴＡの形態をコードする核酸分子をトランスフェクトし、その結果前記細胞がＶＩＳＴＡ分子のすべてまたは一部分を発現するようになり、前記トランスフェクトした細胞を前記対象に再導入し、それによって前記トランスフェクトした細胞がＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞への阻害性シグナルを防止し、それによって免疫応答を上方制御することを含む、方法。
【請求項６】
前記免疫細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含み、任意に、前記免疫細胞集団をインビトロで増殖させることを含む、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
対象における癌を治療するための方法であって、前記対象に由来する癌細胞に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を阻害する核酸分子をトランスフェクトし、それによって前記トランスフェクトした細胞が、ＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞への阻害性シグナルを防止し、それによって前記癌に対する免疫応答を上方制御することを含む、方法。
【請求項８】
対象における感染性障害を治療するための方法であって、前記対象に由来する感染細胞に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を阻害する核酸分子をトランスフェクトし、それによって前記トランスフェクトした細胞が、ＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞への阻害性シグナルを防止し、それによって前記感染症、例えば、細菌性、ウイルス性、酵母もしくは真菌性、寄生虫、または原虫感染症に対する免疫応答を上方制御することを含む、方法。
【請求項９】
前記免疫細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む、請求項７または８に記載の方法。
【請求項１０】
前記免疫細胞集団をインビトロで増殖させることをさらに含む、請求項７、８、または９に記載の方法。
【請求項１１】
前記癌細胞に、免疫系の共刺激を達成する１つ以上の追加のポリペプチドをトランスフェクトすることをさらに含む、請求項７～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記１つ以上の追加のポリペプチドは、Ｂ７－１および／またはＢ７－２を含む、請求

項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記感染または癌細胞に、ＭＨＣクラスＩ　α鎖ポリペプチド、β２ミクログロブリンポリペプチド、ＭＨＣクラスＩＩ　α鎖ポリペプチド、および／またはＭＨＣクラスＩＩ　β鎖ポリペプチドのすべてまたは一部分をコードする１つ以上の追加のポリペプチドをトランスフェクトし、それによって、前記癌細胞に、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩポリペプチドを前記細胞表面に発現させることをさらに含む、請求項７～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
任意で不変鎖であるＭＨＣクラスＩＩ関連ポリペプチドの発現を阻害するｓｉＲＮＡまたはｓｉＲＮＡをコードする遺伝子を導入し、それによって、腫瘍関連抗原の提示を促進することをさらに含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
エキソビボで達成される、請求項７～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記感染または癌細胞を前記対象に再導入することをさらに含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記トランスフェクションは、インビボで達成される、請求項７～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
対象における癌を治療するための方法であって、前記対象に由来する癌細胞に、ＶＩＳＴＡ活性を阻害する核酸分子をトランスフェクトし、それによって前記トランスフェクトした細胞が、ＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞への阻害性シグナルを防止し、前記対象から免疫細胞を取り出し、前記トランスフェクトした細胞を前記免疫細胞と接触させ、それによって前記癌に対する免疫応答を上方制御し、前記インビトロで刺激した免疫細胞を前記対象に再導入することを含む、方法。
【請求項１９】
前記免疫細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記免疫細胞集団をインビトロで増殖させることをさらに含む、請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２１】
ＶＩＳＴＡ活性を阻害する前記核酸分子は、ＶＩＳＴＡに対してアンチセンスである核酸分子、非活性化抗ＶＩＳＴＡ抗体もしくはその可変領域をコードする核酸分子、またはその天然の結合パートナー（複数可）に結合することができないＶＩＳＴＡの形態をコードする核酸分子のうちの１つ以上を含む、請求項１８～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記状態は、癌または感染状態である、請求項１に記載の方法。
【請求項２３】
前記状態は、癌または感染状態である、請求項２～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記免疫細胞をインビトロで前記対象の１つ以上の癌細胞と接触させることをさらに含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記インビトロで刺激した免疫細胞は、前記癌の部位で前記対象に、または前記癌に血液を供給する血管に、再導入される、請求項２に記載の方法。
【請求項２６】

前記状態は、癌である、請求項５～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２７】
抗癌免疫または感染因子に感染した細胞に対する免疫の活性化を、それを必要とする対象において行う方法であって、ＶＩＳＴＡアンタゴニストを前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項２８】
対象における抗癌免疫または感染因子に感染した細胞に対する免疫を活性化するための方法であって、１つ以上の癌または感染因子の抗原およびＶＩＳＴＡアンタゴニストを前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項２９】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、前記対象の免疫細胞上でのＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する薬剤である、請求項１～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、抗ＶＩＳＴＡ抗体を含む、請求項１～２９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡシグナル伝達の小分子阻害剤を含む、請求項１～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用の小分子阻害剤を含む、請求項１～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡフラグメントを含む、請求項１～３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、前記ＶＩＳＴＡと免疫細胞またはそのフラグメントとの相互作用を遮断するＶＩＳＴＡの形態、または抗原提示細胞上でＦｃ受容体に結合しないＶＩＳＴＡの可溶性形態を含む、請求項１～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３５】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーの可溶性形態またはフラグメントを含む、請求項１～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、前記ＶＩＳＴＡの発現を下方制御するｓｉＲＮＡ分子を含む、請求項１～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記ｓｉＲＮＡ分子は、ＶＩＳＴＡ　ＤＮＡから転写されるＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡを標的とする、請求項３７に記載の方法。
【請求項３８】
前記ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号１または３の核酸配列の部分配列を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～６７のうちの１つ以上の核酸配列を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記ｓｉＲＮＡ分子は、ＶＩＳＴＡのＯＲＦまたはＵＴＲ領域を標的とする、請求項３７に記載の方法。
【請求項４１】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーの発現を下方制御するｓｉＲＮＡを含む、請求項１～４０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４２】
前記ｓｉＲＮＡ分子は、前記ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーをコードするＤＮＡから転写されるｍＲＮＡを標的とする、請求項４２に記載の方法。
【請求項４３】
前記ｓｉＲＮＡ分子は、前記ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーをコードするＤＮＡから転写されるｍＲＮＡのＯＲＦまたはＵＴＲ領域を標的とする、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーに対する抗体を含む、請求項１～４３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４５】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、癌または感染症を治療するのに十分な量で投与される、請求項８～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記癌は、結腸直腸癌である、請求項８～４６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４７】
前記癌は、肉腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、または癌腫である、請求項８～４６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４８】
ＰＤ－１アンタゴニスト、任意で抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、ＰＤ－１の発現を標的とするｓｉＲＮＡ、ＰＤ－Ｌ１の発現を標的とするｓｉＲＮＡ、またはＰＤ－１もしくはＰＤ－Ｌ１のペプチド、フラグメント、ドミナント陰性形態、もしくは可溶性形態を投与することをさらに含む、請求項１～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４９】
ＣＴＬＡ－４アンタゴニスト、任意で抗ＣＴＬＡ－４抗体、ＣＴＬＡ－４の発現を標的とするｓｉＲＮＡ、またはＣＴＬＡ－４のペプチド、フラグメント、ドミナント陰性、もしくは可溶性形態を投与することをさらに含む、請求項１～４８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５０】
Ｂ７－Ｈ４アンタゴニスト、任意で抗Ｂ７－Ｈ４抗体、Ｂ７－Ｈ４の発現を標的とするｓｉＲＮＡ、またはＢ７－Ｈ４のペプチド、フラグメント、ドミナント陰性、もしくは可溶性形態を投与することをさらに含む、請求項１～４９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５１】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、薬学的に許容される担体において投与される、請求項１～５０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５２】
前記対象に由来する試料中のＶＩＳＴＡの発現レベルを判定することをさらに含む、請求項８～５２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５３】
前記対象に由来する前記試料は、前記癌の細胞、腫瘍微小環境、または末梢血のうちの１つ以上を含む、請求項５３に記載の方法。
【請求項５４】
前記対象に由来する前記試料は、Ｔｒｅｇ、ＭＤＳＣ、および／または寛容原性ＤＣのうちの１つ以上を含む、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記対象に由来する前記試料は、腫瘍生検または腫瘍細胞を含む試料を含む、請求項５３に記載の方法。
【請求項５６】
ＶＩＳＴＡの前記発現レベルは、ＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡおよび／またはＶＩＳＴＡタンパク質の発現レベルを測定することによって判定される、請求項５３～５６のいずれか１

項に記載の方法。
【請求項５７】
上昇したレベルのＶＩＳＴＡ発現が、前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストの前記投与の前に前記患者試料に検出される、請求項５３～５７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５８】
免疫応答を上方制御する１つ以上の追加の薬剤を投与することをさらに含む、請求項１～５８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５９】
前記１つ以上の追加の薬剤は、共刺激性受容体を介してシグナルを伝達し、それによって前記免疫応答をさらに増大させる、Ｂ７ファミリーメンバーの形態を含むか、または１つ以上のサイトカイン、アジュバント、共刺激性分子の刺激性形態、もしくはそれらのリガンドを含む、請求項５９に記載の方法。
【請求項６０】
別の抗癌治療、任意に放射線療法、化学療法、および／または抗癌生物製剤の投与と組み合わせて有効であり、それによって前記他の抗癌治療の有効性を増加させる、請求項８～６０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６１】
前記癌は、棘細胞腫、腺房細胞癌、聴神経腫、末端黒子型黒色腫、先端汗腺腫、急性好酸球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性巨核芽球性白血病、急性単球性白血病、成熟急性骨髄芽球性白血病、急性骨髄樹状細胞性白血病、急性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、アダマンチノーマ、腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫、腺様歯原性腫瘍、副腎皮質癌、成人Ｔ細胞性白血病、侵攻性ＮＫ細胞性白血病、ＡＩＤＳ関連癌、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、胞状軟部肉腫、エナメル上皮線維腫、肛門癌、未分化大細胞リンパ腫、未分化甲状腺癌、血管免疫芽球性Ｔ細胞リンパ腫、血管筋脂肪腫、血管肉腫、虫垂癌、星状細胞腫、非定型奇形腫様横紋筋様腫瘍、基底細胞癌、基底細胞様癌、Ｂ細胞性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、ベリーニ管癌、胆道癌、膀胱癌、芽細胞腫、骨癌、骨腫瘍、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、乳癌、ブレンナー腫瘍、気管支腫瘍、細気管支肺胞癌、褐色腫、バーキットリンパ腫、未知の原発部位の癌、カルチノイド腫瘍、癌腫、上皮内癌、陰茎の癌腫、未知の原発部位の癌腫、癌肉腫、キャッスルマン病、中枢神経系胚芽腫、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫、子宮頸癌、胆管癌、軟骨腫、軟骨肉腫、脊索腫、絨毛腫、脈絡叢乳頭腫、慢性リンパ球性白血病、慢性単球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、慢性好中球性白血病、明細胞腫瘍、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、デゴス病、隆起性皮膚線維肉腫、皮様嚢腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、胚芽異形成性神経上皮腫瘍、胎生期癌、内胚葉洞腫瘍、子宮内膜癌、子宮内膜性子宮癌、子宮内膜性腫瘍、腸疾患関連Ｔ細胞リンパ腫、上衣芽細胞腫、上衣腫、類上皮肉腫、赤白血病、食道癌、鼻腔神経芽細胞腫、ユーイングファミリーの腫瘍、ユーイングファミリーの肉腫、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管癌、乳房外ページェット病、卵管癌、封入奇形、線維腫、線維肉腫、濾胞性リンパ腫、濾胞性甲状腺癌、胆嚢癌、胆嚢癌、神経節膠腫、神経節細胞腫、胃癌（Ｇａｓｔｒｉｃ　Ｃａｎｃｅｒ）、胃リンパ腫、消化管癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、消化管間質腫瘍、胚細胞腫瘍、胚細胞腫、妊娠性絨毛癌、妊娠性絨毛腫瘍、骨巨細胞腫、多形性膠芽腫、神経膠腫、大脳膠腫症、グロムス腫瘍、グルカゴノーマ、性腺芽細胞腫、顆粒膜細胞腫、有毛細胞性白血病、有毛細胞性白血病、頭頸部癌、頭頸部癌、心臓癌、血管芽細胞腫、血管周囲細胞腫、血管肉腫、血液学的悪性腫瘍、肝細胞癌腫、肝脾Ｔ細胞リンパ腫、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、視床下部膠腫、炎症性乳癌、眼内黒色腫、島細胞癌、島細胞腫、若年性骨髄単球性白血病、カポジ肉腫、カポジ肉腫、腎臓癌、クラッキン腫瘍、クルッケンベルグ腫瘍、喉頭癌、喉頭癌、悪性黒子型黒色腫、白血病、白血病、口唇および口腔癌、脂肪肉腫、肺癌、黄体腫、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ上皮腫、リンパ性白血病、リンパ腫、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、悪性線維性組織球腫、骨の悪性線維性組織球腫、悪性神経膠腫、悪性中

皮腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、悪性横紋筋様腫瘍、悪性トリトン腫瘍、ＭＡＬＴリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肥満細胞性白血病、縦隔胚細胞腫瘍、縦隔腫瘍、甲状腺髄様癌、髄芽細胞腫、髄芽細胞腫、髄様上皮腫、黒色腫、黒色腫、髄膜腫、メルケル細胞癌、中皮腫、中皮腫、原発不明転移性扁平上皮性頸部癌、転移性尿路上皮癌、ミュラー管混合腫瘍、単球性白血病、口腔癌（Ｍｏｕｔｈ　Ｃａｎｃｅｒ）、粘液性腫瘍、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫、菌状息肉腫、菌状息肉腫、骨髄異形成疾患、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、骨髄性肉腫、骨髄増殖性疾患、粘液腫、鼻腔癌、鼻咽頭癌、鼻咽頭癌腫、新生物、神経線維腫症、神経芽細胞腫、神経芽細胞腫、神経線維腫、神経腫、結節型黒色腫、非ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、非黒色腫皮膚癌、非小細胞肺癌、眼癌、乏突起星細胞腫、乏突起神経膠腫、好酸性顆粒細胞腫、視神経鞘髄膜腫、口腔癌（Ｏｒａｌ　Ｃａｎｃｅｒ）、口腔癌（Ｏｒａｌ　ｃａｎｃｅｒ）、口腔咽頭癌、骨肉腫、骨肉腫、卵巣癌、卵巣癌、上皮性卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、乳房パジェット病、パンコースト腫瘍、膵臓癌、膵臓癌、甲状腺乳頭癌、乳頭腫、傍神経節腫、副鼻腔癌、副甲状腺癌、陰茎癌、血管周囲類上皮細胞腫瘍、咽頭癌、褐色細胞腫、中間分化型松果体実質腫瘍、松果体芽細胞腫、下垂体細胞腫、下垂体腺腫、下垂体部腫瘍、形質細胞腫、胸膜肺芽腫、多胚芽腫、前駆Ｔリンパ芽球性リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、原発性肝細胞癌、原発性肝臓癌、原発性腹膜癌、原始神経外胚葉腫瘍、前立腺癌、腹膜偽粘液腫、直腸癌、腎細胞癌、第１５染色体上のＮＵＴ遺伝子が関与する気道癌、網膜芽細胞腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、リヒタートランスフォーメーション、仙尾部奇形腫、唾液腺癌、肉腫、シュワン細胞腫、脂腺癌、続発性腫瘍、セミノーマ、漿液腫、セルトリライディッヒ細胞腫瘍、性索間質腫瘍、セザリー症候群、印環細胞癌、皮膚癌、小青色円形細胞腫瘍、小細胞癌腫、小細胞肺癌、小細胞リンパ腫、小腸癌、軟部組織肉腫、ソマトスタチン産生腫瘍、煤煙性疣贅、脊髄腫瘍（Ｓｐｉｎａｌ　Ｃｏｒｄ　Ｔｕｍｏｒ）、脊髄腫瘍（Ｓｐｉｎａｌ　ｔｕｍｏｒ）、脾性辺縁帯リンパ腫、扁平上皮細胞癌、胃癌（Ｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）、表在拡大型黒色腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、表層上皮性間質性腫瘍、滑膜肉腫、Ｔ細胞急性リンパ性白血病、Ｔ細胞大型顆粒リンパ球性白血病、Ｔ細胞性白血病、Ｔ細胞リンパ腫、Ｔ細胞前リンパ球性白血病、奇形腫、末端リンパ腺癌、精巣癌、莢膜細胞腫、咽喉癌、胸腺癌、胸腺腫、甲状腺癌、腎盂および尿管の移行上皮癌、移行上皮癌、尿膜管癌、尿道癌、泌尿生殖器腫瘍、子宮肉腫、ブドウ膜黒色腫、膣癌、ヴァーナーモリソン症候群、疣状癌、視経路神経膠腫、外陰癌、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ワルチン腫瘍、ウィルムス腫瘍、またはこれらの組み合わせである、請求項８～６１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６２】

ＶＩＳＴＡアンタゴニストを含む、免疫応答の活性化のための治療的組成物。

【請求項６３】

ＶＩＳＴＡ活性またはＶＩＳＴＡのその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を阻害する薬剤と、癌抗原と、を含む、癌ワクチン。

【請求項６４】

癌抗原およびＶＩＳＴＡ活性を阻害する核酸分子の両方をコードする遺伝子を含む、抗癌ワクチン接種のためのベクター。

【請求項６５】

ＶＩＳＴＡ活性を阻害する前記核酸分子は、ＶＩＳＴＡに対してアンチセンスである核酸分子、非活性化抗ＶＩＳＴＡ抗体もしくはその可変領域をコードする核酸分子、またはその天然の結合パートナー（複数可）に結合することができないＶＩＳＴＡの形態をコードする核酸分子のうちの１つ以上を含む、請求項６５に記載のベクター。

【請求項６６】

免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための組成物であって、前記ＶＩＳＴＡに媒介される免疫応答の抑制を阻害するように適合されるＶＩＳＴＡアンタゴニストを含み、その結果、その投与が免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を治療する、組成物。

【請求項６７】
免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための組成物であって、前記対象から取り出した免疫細胞であって、前記免疫細胞をインビトロで刺激するように適合されたＶＩＳＴＡアンタゴニストと接触状態にある、免疫細胞を含み、前記インビトロで刺激した細胞は、前記対象への再導入に好適である、組成物。
【請求項６８】
前記免疫細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む、請求項６８に記載の組成物。
【請求項６９】
前記免疫細胞集団は、インビトロで増殖されている、請求項６７または６８に記載の組成物。
【請求項７０】
免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための組成物であって、前記対象から取り出して、天然の結合パートナー（複数可）に結合することができないＶＩＳＴＡの形態をコードする核酸分子をトランスフェクトした、免疫細胞を含み、その結果、前記細胞は、前記ＶＩＳＴＡ分子のすべてまたは一部分を発現し、前記トランスフェクトした細胞は、ＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞への阻害性シグナルを防止し、それによって免疫応答を上方制御するために、前記対象に再導入するのに好適である、組成物。
【請求項７１】
前記免疫細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む、請求項７０に記載の組成物。
【請求項７２】
前記免疫細胞集団は、インビトロで増殖されている、請求項７０または７１に記載の組成物。
【請求項７３】
対象における癌を治療するための組成物であって、ＶＩＳＴＡ活性を阻害する核酸分子をトランスフェクトした前記対象に由来する癌細胞を含み、それによって、前記トランスフェクトした細胞は、ＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞への阻害性シグナルを防止し、それによって前記癌に対する免疫応答を上方制御するのに好適である、組成物。
【請求項７４】
前記免疫細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む、請求項７３に記載の組成物。
【請求項７５】
前記免疫細胞集団は、インビトロで増殖されている、請求項７３または７４に記載の組成物。
【請求項７６】
前記癌細胞には、免疫系の共刺激を達成する１つ以上の追加のポリペプチドがさらにトランスフェクトされる、請求項６３～６５または７３～７５のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項７７】
前記１つ以上の追加のポリペプチドは、Ｂ７－１および／またはＢ７－２を含む、請求項７６に記載の組成物。
【請求項７８】
前記癌細胞には、ＭＨＣクラスＩ　α鎖ポリペプチド、β２ミクログロブリンポリペプチド、ＭＨＣクラスＩＩ　α鎖ポリペプチド、および／またはＭＨＣクラスＩＩ　β鎖ポリペプチドのうちのすべてまたはその一部分をコードする１つ以上の追加のポリペプチドがさらにトランスフェクトされ、それによって、前記癌細胞に、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩポリペプチドを前記細胞表面に発現させる、請求項６３～６５または７３～７７のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項７９】
任意で不変鎖であるＭＨＣクラスＩＩ関連ポリペプチドの発現を阻害するｓｉＲＮＡまたはｓｉＲＮＡをコードする遺伝子をさらに含み、それによって、腫瘍関連抗原の提示を促進する、請求項７８に記載の組成物。
【請求項８０】
エキソビボで産生される、請求項６３～６５または７３～７９のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項８１】
前記癌細胞は、前記対象への再導入に好適である、請求項８０に記載の組成物。
【請求項８２】
前記トランスフェクションは、インビボで達成される、請求項６３～６５または７３～７９のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項８３】
対象における癌を治療するための組成物であって、前記対象に由来する癌細胞であって、ＶＩＳＴＡ活性を阻害する核酸分子がトランスフェクトされ、それによって前記トランスフェクトした細胞がＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞への阻害性シグナルを防止する、癌細胞と、前記対象から取り出され、前記トランスフェクトした細胞と接触し、それによって、前記癌に対する免疫応答を上方制御する、免疫細胞と、を含み、前記インビトロで刺激される免疫細胞は、前記対象への再導入に好適である、組成物。
【請求項８４】
前記免疫細胞は、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む、請求項８３に記載の組成物。
【請求項８５】
前記免疫細胞集団は、インビトロで増殖されている、請求項８３または８４に記載の組成物。
【請求項８６】
ＶＩＳＴＡ活性を阻害する前記核酸分子は、ＶＩＳＴＡに対してアンチセンスである核酸分子、非活性化抗ＶＩＳＴＡ抗体もしくはその可変領域をコードする核酸分子、または天然の結合パートナー（複数可）に結合することができないＶＩＳＴＡの形態をコードする核酸分子のうちの１つ以上を含む、請求項８３～８５のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項８７】
前記状態は、癌である、請求項６２に記載の組成物。
【請求項８８】
前記状態は、癌である、請求項６３～６５のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項８９】
前記免疫細胞は、前記対象の１つ以上の癌細胞とインビトロで接触する、請求項８８に記載の組成物。
【請求項９０】
前記インビトロで刺激した免疫細胞は、前記癌の部位で前記対象に、または前記癌に血液を供給する血管に、再導入するのに好適である、請求項８８または８９に記載の組成物。
【請求項９１】
前記状態は、癌である、請求項６６～６８のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項９２】
抗癌免疫の活性化を、それを必要とする対象に行う組成物であって、前記対象への投与に好適なＶＩＳＴＡアンタゴニストを含む、組成物。
【請求項９３】
対象における抗癌免疫を活性化するための組成物であって、１つ以上の癌抗原と、前記対象への投与に好適なＶＩＳＴＡアンタゴニストと、を含む、組成物。
【請求項９４】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、前記対象の免疫細胞上でのＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する薬剤である、請求項６２～９３のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項９５】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、抗ＶＩＳＴＡ抗体を含む、請求項６２～９４のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項９６】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡシグナル伝達の小分子阻害剤を含む、請求項６２～９５のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項９７】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用の小分子阻害剤を含む、請求項６２～９６のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項９８】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡフラグメントを含む、請求項６２～９７のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項９９】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡと免疫細胞もしくはそのフラグメントとの相互作用を遮断するＶＩＳＴＡの形態、または抗原提示細胞上でＦｃ受容体に結合しないＶＩＳＴＡの可溶性形態を含む、請求項６２～９８のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１００】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーの可溶性形態またはフラグメントを含む、請求項６２～９９のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１０１】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡの発現を下方制御するｓｉＲＮＡ分子を含む、請求項６２～１００のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１０２】

前記ｓｉＲＮＡ分子は、ＶＩＳＴＡ　ＤＮＡから転写されるＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡを標的とする、請求項１０１に記載の組成物。

【請求項１０３】

前記ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号１または３の核酸配列の部分配列を含む、請求項１０２に記載の組成物。

【請求項１０４】

前記ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～６７のうちの１つ以上の核酸配列を含む、請求項１０２に記載の組成物。

【請求項１０５】

前記ｓｉＲＮＡ分子は、ＶＩＳＴＡのＯＲＦまたはＵＴＲ領域を標的とする、請求項１０２に記載の組成物。

【請求項１０６】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーの発現を下方制御するｓｉＲＮＡを含む、請求項６２～１０５のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１０７】

前記ｓｉＲＮＡ分子は、前記ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーをコードするＤＮＡから転写されるｍＲＮＡを標的とする、請求項１０６に記載の組成物。

【請求項１０８】

前記ｓｉＲＮＡ分子は、前記ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーをコードするＤＮＡから転写されるｍＲＮＡのＯＲＦまたはＵＴＲ領域を標的とする、請求項１０６に記載の組成物。

【請求項１０９】

前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡの天然の結合パートナーに対する抗体を

含む、請求項６２～１０８のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１１０】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、抗癌免疫を刺激するのに十分な量で存在する、請求項６２～６５または７３～１０９のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１１１】
前記癌は、結腸直腸癌である、請求項６２～６５または７３～１１０のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１１２】
前記癌は、肉腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、または癌腫である、請求項６２～６４または７３～１１１のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１１３】
ＰＤ－１アンタゴニスト、任意で抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、ＰＤ－１の発現を標的とするｓｉＲＮＡ、ＰＤ－Ｌ１の発現を標的とするｓｉＲＮＡ、またはＰＤ－１もしくはＰＤ－Ｌ１のペプチド、フラグメント、ドミナント陰性形態、もしくは可溶性形態をさらに含む、請求項６２～１１２のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１１４】
ＣＴＬＡ－４アンタゴニスト、任意で抗ＣＴＬＡ－４抗体、ＣＴＬＡ－４の発現を標的とするｓｉＲＮＡ、またはＣＴＬＡ－４のペプチド、フラグメント、ドミナント陰性、もしくは可溶性形態をさらに含む、請求項６２～１１３のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１１５】
Ｂ７－Ｈ４アンタゴニスト、任意で抗Ｂ７－Ｈ４抗体、Ｂ７－Ｈ４の発現を標的とするｓｉＲＮＡ、またはＢ７－Ｈ４のペプチド、フラグメント、ドミナント陰性、もしくは可溶性形態をさらに含む、請求項６２～１１４のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１１６】
前記ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、薬学的に許容される担体中に含有される、請求項６２～１１５のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１１７】
免疫応答を上方制御する１つ以上の追加の薬剤を投与することをさらに含む、請求項１～１１６のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１１８】
前記１つ以上の追加の薬剤は、共刺激性受容体を介してシグナルを伝達し、それによって前記免疫応答をさらに増大させる、Ｂ７ファミリーメンバーの形態を含むか、または１つ以上のサイトカイン、アジュバント、共刺激性分子の刺激性形態、もしくはそれらのリガンドを含む、請求項１１７に記載の組成物。
【請求項１１９】
別の抗癌治療、任意で放射線療法、化学療法、および／または抗癌生物製剤の投与と組み合わせて有効であり、それによって前記他の抗癌治療の有効性を増加させる、請求項６２～６５または７３～１１８のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１２０】
前記癌は、棘細胞腫、腺房細胞癌、聴神経腫、末端黒子型黒色腫、先端汗腺腫、急性好酸球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性巨核芽球性白血病、急性単球性白血病、成熟急性骨髄芽球性白血病、急性骨髄樹状細胞性白血病、急性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、アダマンチノーマ、腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫、腺様歯原性腫瘍、副腎皮質癌、成人Ｔ細胞性白血病、侵攻性ＮＫ細胞性白血病、ＡＩＤＳ関連癌、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、胞状軟部肉腫、エナメル上皮線維腫、肛門癌、未分化大細胞リンパ腫、未分化甲状腺癌、血管免疫芽球性Ｔ細胞リンパ腫、血管筋脂肪腫、血管肉腫、虫垂癌、星状細胞腫、非定型奇形腫様　横紋筋様腫瘍、基底細胞癌、基底細胞様癌、Ｂ細胞性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、ベリーニ管癌、胆道癌、膀胱癌、芽細胞腫、骨癌、骨腫瘍、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、乳癌、ブレンナー腫瘍、気管支腫瘍、細気管支肺胞癌、褐色腫、バーキットリンパ腫、未知の原発部位の癌、カルチノイド腫瘍、癌腫、上皮内癌、陰茎の癌腫、未知の原発部位の

癌腫、癌肉腫、キャッスルマン病、中枢神経系胚芽腫、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫、子宮頸癌、胆管癌、軟骨腫、軟骨肉腫、脊索腫、絨毛腫、脈絡叢乳頭腫、慢性リンパ球性白血病、慢性単球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性疾患、慢性好中球性白血病、明細胞腫瘍、結腸癌、結腸直腸癌、頭蓋咽頭腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、デゴス病、隆起性皮膚線維肉腫、皮様嚢腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、胚芽異形成性神経上皮腫瘍、胎生期癌、内胚葉洞腫瘍、子宮内膜癌、子宮内膜性子宮癌、子宮内膜性腫瘍、腸疾患関連Ｔ細胞リンパ腫、上衣芽細胞腫、上衣腫、類上皮肉腫、赤白血病、食道癌、鼻腔神経芽細胞腫、ユーイングファミリーの腫瘍、ユーイングファミリーの肉腫、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管癌、乳房外ページェット病、卵管癌、封入奇形、線維腫、線維肉腫、濾胞性リンパ腫、濾胞性甲状腺癌、胆嚢癌、胆嚢癌、神経節膠腫、神経節細胞腫、胃癌（Ｇａｓｔｒｉｃ　Ｃａｎｃｅｒ）、胃リンパ腫、消化管癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、消化管間質腫瘍、胚細胞腫瘍、胚細胞腫、妊娠性絨毛癌、妊娠性絨毛腫瘍、骨巨細胞腫、多形性膠芽腫、神経膠腫、大脳膠腫症、グロムス腫瘍、グルカゴノーマ、性腺芽細胞腫、顆粒膜細胞腫、有毛細胞性白血病、有毛細胞性白血病、頭頸部癌、頭頸部癌、心臓癌、血管芽細胞腫、血管周囲細胞腫、血管肉腫、血液学的悪性腫瘍、肝細胞癌腫、肝脾Ｔ細胞リンパ腫、遺伝性乳癌卵巣癌症候群、ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、視床下部膠腫、炎症性乳癌、眼内黒色腫、島細胞癌、島細胞腫、若年性骨髄単球性白血病、カポジ肉腫、カポジ肉腫、腎臓癌、クラッキン腫瘍、クルッケンベルグ腫瘍、喉頭癌、喉頭癌、悪性黒子型黒色腫、白血病、白血病、口唇および口腔癌、脂肪肉腫、肺癌、黄体腫、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ上皮腫、リンパ性白血病、リンパ腫、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、悪性線維性組織球腫、骨の悪性線維性組織球腫、悪性神経膠腫、悪性中皮腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、悪性横紋筋様腫瘍、悪性トリトン腫瘍、ＭＡＬＴリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肥満細胞性白血病、縦隔胚細胞腫瘍、縦隔腫瘍、甲状腺髄様癌、髄芽細胞腫、髄芽細胞腫、髄様上皮腫、黒色腫、黒色腫、髄膜腫、メルケル細胞癌、中皮腫、中皮腫、原発不明転移性扁平上皮性頸部癌、転移性尿路上皮癌、ミュラー管混合腫瘍、単球性白血病、口腔癌（Ｍｏｕｔｈ　Ｃａｎｃｅｒ）、粘液性腫瘍、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫、菌状息肉腫、菌状息肉腫、骨髄異形成疾患、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、骨髄性肉腫、骨髄増殖性疾患、粘液腫、鼻腔癌、鼻咽頭癌、鼻咽頭癌腫、新生物、神経線維腫症、神経芽細胞腫、神経芽細胞腫、神経線維腫、神経腫、結節型黒色腫、非ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、非黒色腫皮膚癌、非小細胞肺癌、眼癌、乏突起星細胞腫、乏突起神経膠腫、好酸性顆粒細胞腫、視神経鞘髄膜腫、口腔癌（Ｏｒａｌ　Ｃａｎｃｅｒ）、口腔癌（Ｏｒａｌ　ｃａｎｃｅｒ）、口腔咽頭癌、骨肉腫、骨肉腫、卵巣癌、卵巣癌、上皮性卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、乳房パジェット病、パンコースト腫瘍、膵臓癌、膵臓癌、甲状腺乳頭癌、乳頭腫、傍神経節腫、副鼻腔癌、副甲状腺癌、陰茎癌、血管周囲類上皮細胞腫瘍、咽頭癌、褐色細胞腫、中間分化型松果体実質腫瘍、松果体芽細胞腫、下垂体細胞腫、下垂体腺腫、下垂体部腫瘍、形質細胞腫、胸膜肺芽腫、多胚芽腫、前駆Ｔリンパ芽球性リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、原発性肝細胞癌、原発性肝臓癌、原発性腹膜癌、原始神経外胚葉腫瘍、前立腺癌、腹膜偽粘液腫、直腸癌、腎細胞癌、第１５染色体上のＮＵＴ遺伝子が関与する気道癌、網膜芽細胞腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、リヒタートランスフォーメーション、仙尾部奇形腫、唾液腺癌、肉腫、シュワン細胞腫、脂腺癌、続発性腫瘍、セミノーマ、漿液腫、セルトリライディッヒ細胞腫瘍、性索間質腫瘍、セザリー症候群、印環細胞癌、皮膚癌、小青色円形細胞腫瘍、小細胞癌腫、小細胞肺癌、小細胞リンパ腫、小腸癌、軟部組織肉腫、ソマトスタチン産生腫瘍、煤煙性疣贅、脊髄腫瘍（Ｓｐｉｎａｌ　Ｃｏｒｄ　Ｔｕｍｏｒ）、脊髄腫瘍（Ｓｐｉｎａｌ　ｔｕｍｏｒ）、脾性辺縁帯リンパ腫、扁平上皮細胞癌、胃癌（Ｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）、表在拡大型黒色腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、表層上皮性間質性腫瘍、滑膜肉腫、Ｔ細胞急性リンパ性白血病、Ｔ細胞大型顆粒リンパ球性白血病、Ｔ細胞性白血病、Ｔ細胞リンパ腫、Ｔ細胞前リンパ球性白血病、奇形腫、末端リンパ腺癌、精巣癌、莢膜細胞腫、咽喉癌、胸腺癌、胸腺腫

、甲状腺癌、腎盂および尿管の移行上皮癌、移行上皮癌、尿膜管癌、尿道癌、泌尿生殖器腫瘍、子宮肉腫、ブドウ膜黒色腫、膣癌、ヴァーナーモリソン症候群、疣状癌、視経路神経膠腫、外陰癌、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ワルチン腫瘍、ウィルムス腫瘍、またはこれらの組み合わせである、請求項６２～６５または７３～１１９のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１２１】

ＰＤ－１リガンド、例えば、ＰＤ－Ｌ１に対する抗体を含む、請求項１～１２０のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項１２２】

感染因子に対する免疫を誘起するために使用される、請求項１～６１または２１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２３】

前記感染因子は、細菌、酵母、真菌、原虫、マイコプラズマ、ウイルス、プリオン、および寄生虫を含む、請求項１２２に記載の方法。

【請求項１２４】

前記感染因子は、例として、（ａ）ウイルス性疾患、例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、ＨＳＶ－Ｉ、ＨＳＶ－ＩＩ、ＣＭＶ、もしくはＶＺＶ）、ポックスウイルス（例えば、オルソポックスウイルス、例えば天然痘もしくはワクシニア、または伝染性軟属腫）、ピコマウイルス（ｐｉｃｏｍａｖｉｒｕｓ）（例えば、ライノウイルスまたはエンテロウイルス）、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、および呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ））、コロナウイルス（例えば、ＳＡＲＳ）、パポーバウイルス（例えば、パピローマウイルス、例えば陰部疣贅、尋常性疣贅、もしくは足底疣贅を引き起こすもの）、ヘパドナウイルス（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス）、フラビウイルス（例えば、Ｃ型肝炎ウイルスもしくはデング熱ウイルス）、またはレトロウイルス（例えば、ＨＩＶ等のレンチウイルス）による感染の結果としてもたらされる疾患等、（ｂ）細菌性疾患、例えば、例えば、大腸菌属、エンテロバクター属、サルモネラ属、ブドウ球菌属、赤痢菌属、リステリア属、アエロバクター属、ヘリコバクター属、クレブシエラ属、プロテウス属、シュードモナス属、連鎖球菌属、クラミジア属、マイコプラズマ属、肺炎球菌属、ナイセリア属、クロストリジウム属、バチルス属、コリネバクテリウム属、マイコバクテリウム属、カンピロバクター属、ビブリオ属、セラチア属、プロビデンシア属、クロモバクテリウム属、ブルセラ属、エルシニア属、ヘモフィルス属、またはボルデテラ属の細菌による感染の結果としてもらされる疾患等、（ｃ）他の感染性疾患、例えば、クラミジア感染症、カンジダ症、アスペルギルス症、ヒストプラズマ症、クリプトコッカス髄膜炎等を含むがこれらに限定されない真菌性疾患、ならびにマラリア、ニューモシスチスカリニ肺炎（ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｎｉｉ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）、リーシュマニア症、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、およびトリパノソーマ感染症を含むがこれらに限定されない寄生虫性疾患に関与するものを含む、請求項１２２に記載の方法。

【請求項１２５】

前記感染因子に特異的な抗原の使用をさらに含む、請求項１２２、１２３、または１２４に記載の方法。

【請求項１２６】

前記抗原は、前記感染因子に対して特異的な免疫応答、例えば、抗体または細胞に媒介される免疫応答を誘起する、ペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、糖タンパク質等、またはその複合体、フラグメント、もしくは変異体である、請求項１２５に記載の方法。

【請求項１２７】

同じかまたは異なる組成物、感染因子の抗原、およびそれを必要とする対象に投与すると、前記感染因子に対して特異的な免疫応答を誘起する組成物（複数可）を含む、請求項６２～１２１のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１２８】
前記感染因子は、例として、細菌、酵母、真菌、原虫、マイコプラズマ、ウイルス、プリオン、および寄生虫を含む、請求項１２７に記載の組成物（複数可）。
【請求項１２９】
前記感染因子は、例として、（ａ）ウイルス性疾患、例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、ＨＳＶ－Ｉ、ＨＳＶ－ＩＩ、ＣＭＶ、もしくはＶＺＶ）、ポックスウイルス（例えば、オルソポックスウイルス、例えば天然痘もしくはワクシニア、または伝染性軟属腫）、ピコマウイルス（ｐｉｃｏｍａｖｉｒｕｓ）（例えば、ライノウイルスまたはエンテロウイルス）、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、および呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ））、コロナウイルス（例えば、ＳＡＲＳ）、パポーバウイルス（例えば、パピローマウイルス、例えば陰部疣贅、尋常性疣贅、もしくは足底疣贅を引き起こすもの）、ヘパドナウイルス（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス）、フラビウイルス（例えば、Ｃ型肝炎ウイルスもしくはデング熱ウイルス）、またはレトロウイルス（例えば、ＨＩＶ等のレンチウイルス）による感染の結果としてもたらされる疾患等、（ｂ）細菌性疾患、例えば、例えば、大腸菌属、エンテロバクター属、サルモネラ属、ブドウ球菌属、赤痢菌属、リステリア属、アエロバクター属、ヘリコバクター属、クレブシエラ属、プロテウス属、シュードモナス属、連鎖球菌属、クラミジア属、マイコプラズマ属、肺炎球菌属、ナイセリア属、クロストリジウム属、バチルス属、コリネバクテリウム属、マイコバクテリウム属、カンピロバクター属、ビブリオ属、セラチア属、プロビデンシア属、クロモバクテリウム属、ブルセラ属、エルシニア属、ヘモフィルス属、またはボルデテラ属の細菌による感染の結果としてもらされる疾患等、（ｃ）他の感染性疾患、例えば、クラミジア感染症、カンジダ症、アスペルギルス症、ヒストプラズマ症、クリプトコッカス髄膜炎等を含むがこれらに限定されない真菌性疾患、ならびにマラリア、ニューモシスチスカリニ肺炎（ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｎｉｉ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）、リーシュマニア症、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、およびトリパノソーマ感染症を含むがこれらに限定されない寄生虫性疾患に関与するものを含む、請求項１２７または１２８に記載の組成物（複数可）。
【請求項１３０】
前記抗原は、前記感染因子に対して特異的な免疫応答、例えば、抗体または細胞に媒介される免疫応答を誘起する、ペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、糖タンパク質等、またはその複合体、フラグメント、もしくは変異体である、請求項１２７、１２８、または１２９に記載の組成物（複数可）。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の開示
本出願は、２０１２年９月７日に出願された米国仮出願第６１／６９８，００３号に対する優先権を主張する。加えて、本出願は、２０１２年６月２２日に出願された、「ＶＩＳＴＡ－ＩＧ ＦＯＲ ＴＲＥＡＴＭＥＮＴ ＯＦ ＡＵＴＯＩＭＭＵＮＥ ＤＩＳＯＲＤＥＲＳ ＡＮＤ ＩＮＦＬＡＭＭＡＴＯＲＹ ＤＩＳＯＲＤＥＲＳ」と題される米国仮出願第６１／６６３，４３１号（弁理士整理番号７６７９９．０００６００）および２０１２年６月２５に出願された「ＶＩＳＴＡ－ＩＧ ＦＯＲ ＴＲＥＡＴＭＥＮＴ ＯＦ ＡＵＴＯＩＭＭＵＮＥ ＤＩＳＯＲＤＥＲＳ ＡＮＤ ＩＮＦＬＡＭＭＡＴＯＲＹ ＤＩＳＯＲＤＥＲＳ」と題される米国仮出願第６１／６６３，９６９号（弁理士整理番号７６７９９．０００６００）に関する。上に特定された特許出願のすべては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
分野

本開示は、免疫応答の活性化を、それを必要とする患者において行うための組成物および治療方法に関する。好ましい実施形態において、本主題の方法および組成物は、免疫寛容に寄与する天然の「チェックポイント」タンパク質であるＶＩＳＴＡの活性に、任意にＰＤ－１等の第２のチェックポイント経路のアンタゴニストとの組み合わせで、拮抗することができる。例えば、そのような方法および組成物は、結腸癌または別の癌の防止および治療に好適であり得る。例示的なＶＩＳＴＡアンタゴニスト、特に、抗ＶＩＳＴＡ抗体は、インビトロおよびインビボで癌細胞に対する免疫応答を活性化し、それによって、防御的抗腫瘍免疫を与え、これが腫瘍量を減少させることが、本明細書に示される。さらに、ＶＩＳＴＡアンタゴニストを、第２のチェックポイントタンパク質アンタゴニスト、特に、ＰＤ－１リガンド（ＰＤ－Ｌ１）に対する抗体と組み合わせて使用した場合に、付加的利益が観察された。

【０００３】

別の態様において、本開示は、免疫寛容によって媒介される疾患を診断するためにＶＩＳＴＡの発現レベルを測定することを含む、診断方法に関する。例えば、患者試料における高レベルのＶＩＳＴＡ発現（例えば、ＶＩＳＴＡタンパク質またはｍＲＮＡ）の検出は、癌の存在を示し得る。さらに、これらの診断試験は、例えば、患者の試料における高レベルのＶＩＳＴＡ発現の検出に基づいてＶＩＳＴＡアンタゴニストを投与することによる、治療を患者に割り当てるために使用することができる。

【背景技術】

【０００４】

外来性病原体および癌に対する免疫応答は、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－Ｌ１／ＰＤ－１、およびＢ７－Ｈ４経路を含む、複数のチェックポイントによって制御される。それらは、Ｔｒｅｇ、骨髄系由来サプレッサー（ＭＤＳＣ）、および寛容原性ＤＣを含む複数の免疫抑制細胞上で「エフェクター分子」として機能して、腫瘍特異的Ｔ細胞応答を停止させる。

【０００５】

ＣＴＬＡ－４は、活性化によりＴ細胞上に誘導され、Ｆｏｘｐ３＋ＣＤ４＋ＣＤ２５＋天然のＴｒｅｇ（ｎＴｒｅｇ）に構成的に発現される。ＣＴＬＡ－４は、末梢寛容を決定的に制御し、Ｔ細胞応答を抑制し、Ｔｒｅｇに媒介される免疫抑制に寄与する（参考文献６～１０）。細胞性ワクチンと組み合わせた抗体媒介性ＣＴＬＡ－４の封鎖が、確立された免疫原性に乏しいＢ１６黒色腫の退縮を誘導した場合、腫瘍特異的免疫の抑制におけるＣＴＬＡ－４の重要な役割が示される（１１）。ヒトａＣＴＬＡ－４　ｍＡｂであるイピリムマブは、進行性黒色腫の治療に認可されているが、転移性黒色腫における生存応答はそれほどでもない（１２）。それは、他の癌での初期臨床試験も行われている（１３）。しかしながら、ＣＴＬＡ－４ノックアウト（ＫＯ）マウスにおける重度の自己免疫表現型と一致して、ａＣＴＬＡ－４治療は、患者における重大な自己免疫毒性を伴った（１４）。

【０００６】

プログラム死－１（ＰＤ－１）およびそのリガンドＰＤ－Ｌ１は、別の免疫チェックポイント経路を表す（参考文献１５、１６）。ＰＤ－１　ＫＯマウスは、自己免疫疾患を発症した（参考文献１７、１８）癌では、異常なＰＤ－Ｌ１発現が腫瘍細胞に見られ、これは、癌患者の予後不良と相関する（参考文献１９、２０）。ＰＤ－Ｌ１／ＰＤ－１軸は、Ｔ細胞アポトーシス、アネルギー、細胞傷害性Ｔ細胞媒介性溶解に対する耐性、機能消耗、およびＩＬ１０産生を誘導することによって、腫瘍特異的免疫を下方制御する（参考文献２１～２３）。我々および他の研究者は、ＤＣ上のＰＤ－Ｌ１の発現がＦｏｘｐ３＋適応性Ｔｒｅｇ（ａＴｒｅｇ）の誘導を促進し、ＰＤ－Ｌ１がＴＭＥ内でのａＴｒｅｇの強力な誘導因子であることを前に実証した（２）。ＰＤ－Ｌ１／ＰＤ－１経路の遮断は、ＣＴＬＡ－４封鎖等の他の免疫療法と併せて、腫瘍進行を抑制する（参考文献２４～２９）。ヒトａＰＤ－１　ｍＡｂであるＭＤＸ－１１０６は、見込みのある抗腫瘍効果を示して臨床試験に入っており、イピリムマブ（Ｉｐｉｌｕｍｉｍａｂ）と比較して毒性が低減されている（３０）。

【０００７】
Ｂ７－Ｈ４は、Ｂ７阻害性リガンドファミリーのより新しいメンバーである（参考文献３１～３３）。Ｂ７－Ｈ４発現は、多数のヒト癌に検出される。ヒト卵巣癌において、Ｂ７－Ｈ４の発現が腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）上に誘導され、その封鎖は、腫瘍特異的Ｔ細胞応答を回復させ、腫瘍退縮に寄与した（３４）。ヒトＴｒｅｇはまた、ＡＰＣによって産生されるＩＬ１０を通じてＢ７－Ｈ４発現を上方制御することによって、抑制活性をＡＰＣに伝える（３５）。
【０００８】
まとめると、免疫チェックポイント封鎖は、内在性およびワクチン誘起性の両方の抗腫瘍免疫応答を改善したが、臨床試験では限定された応答をもたらしたのみであった。
【０００９】
Ｆｏｘｐ３＋ＣＤ４＋ＣＤ２５＋制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）は、正常な生理学的条件下における末梢寛容の維持、ならびに癌における抗腫瘍免疫応答の抑制に重要である（３６～３８）。ヒト卵巣癌において、Ｆｏｘｐ３＋Ｔｒｅｇの広範囲の浸潤は、生存率の低下と関連する（３９）。Ｔｒｅｇの系統的除去またはそれらの機能の減弱化は、天然およびワクチン誘導性の抗腫瘍Ｔ細胞応答を強化し、結果として治療的有効性の改善をもたらす（３７、４０）。ＩＤＯ＋形質細胞様ＤＣにより活性化されたＴｒｅｇは、標的ＤＣ上でのＢ７－Ｈ１発現を上方制御し、ＰＤ－Ｌ１依存性様式でＴ細胞応答を抑制する（４１）。
【００１０】
単球は、組織マクロファージおよび単球由来のＤＣ（ｍｏ－ＤＣ）の前駆体であり、これらは、自然免疫および獲得免疫の両方に重要な役割を果たす（４２～４６）。マウスの単球は、ＣＤ１１５＋ＣＤ１１ｂ＋Ｆ４／８０＋として特定され（４７）、ＬＹ６Ｃ＋ＣＸ３ＣＲ１^{int}およびＬＹ６Ｃ－ＣＸ３ＣＲ１^{hi}の２つのサブセットからなる（４８、４９）。ヒトの対応物は、それぞれ、ＣＤ１４＋ＣＤ１６－ＣＣＲ２＋ＣＸ３ＣＲ１^{int}およびＣＤ１４ｌｏＣＤ１６＋ＣＸ３ＣＲ１^{hi}単球である。マウスのＬｙ６Ｃ＋炎症性単球（ＩＭＣ）は、炎症部位に動員され、Ｍ１マクロファージおよび炎症性ｍｏ－ＤＣに分化し、これらは、高レベルのＴＮＦ／ｉＮＯＳ（Ｔｉｐ　ＤＣ）を産生し、微生物クリアランスに重要である４３、５０～５３。対照的に、常在性ＬＹ６Ｃ^{neg}単球は、定常状態で血管を巡回し、感染および炎症時にはＭ２様マクロファージへと分化する（４６）。
【００１１】
ＩＭＣは、獲得免疫応答に決定的に影響を及ぼす。ヒトでは、ＴＬＲは、単球からマクロファージおよびｍｏ－ＤＣへの分化を誘導し、これらは、最適なＴ細胞応答に必要である（５４、５５）。マウスモデルにおいては、単球由来のＭ１マクロファージおよびｍｏ－ＤＣは、ＩＬ－１２等の炎症性サイトカインの産生を介した微生物感染またはワクチン接種に対するＴ細胞免疫の誘導、および直接的なＴ細胞予備刺激に必須である（５６～５８）。
【００１２】
腫瘍保持マウスおよび癌患者において、ＩＭＣは、異常に増殖し、骨髄系由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）の単核サブセットに寄与する（５９～６１）。ＭＤＳＣは、集合的にＣＤ１１ｂ＋Ｇｒ１＋として示され、単核（Ｌｙ６Ｇ＋／－ＬＹ６Ｃ$^{-hi}$）および顆粒球（Ｌｙ６Ｇ＋ＬＹ６Ｃ^{low}）のサブセットからなる（６２）。ＭＤＳＣは、Ｔ細胞応答を抑制し、癌免疫療法の有効性を妨げる（６０、６２～６４）。ＭＤＳＣの排除、またはそれらの活性の中和、またはそれらの分化の誘導のための戦略は、癌免疫療法における有効性を示している（６０、６３）。腫瘍関連ＤＣの大部分は、単球由来のＤＣである。それらは、典型的に、抗原提示に欠損があり、共刺激分子が欠落し、ＰＤ－Ｌ１等の阻害性分子を上方制御する（２９、６５、６６）。したがって、これらのｍｏ－ＤＣは、Ｔ細胞応答を効果的に予備刺激せず、結果として欠失した寛容または機能的に不活性なＴ細胞の誘導をもたらし、さらにはＴｒｅｇの増殖および誘導をもたらす（４０、６０、６２

、６３、６７、６８）。ＰＤ－Ｌ１封鎖、ＣＤ４０／ＴＬＲ刺激、または免疫毒素媒介性枯渇による、腫瘍ＤＣの治療的標的化は、腫瘍特異的Ｔ細胞応答を増加させ、生存率を高めた（２９、６９～７４）。

【００１３】

我々は、Ｔ細胞活性化のＶドメイン免疫グロブリン抑制因子（ＶＩＳＴＡ）と指定される新規な免疫グロブリン（Ｉｇ）ファミリーリガンドを最近発見した（Ｇｅｎｂａｎｋ：ＪＮ６０２１８４）７５。ＶＩＳＴＡの主要な特徴には次のものが含まれる。ＶＩＳＴＡは、ＰＤ－Ｌ１に対する限定された相同性を有するが、その固有の特徴のため、Ｂ７ファミリーには属さない。ＶＩＳＴＡは、造血コンパートメント内に限定して発現し、ＣＤ１１ｂ^{high}骨髄性細胞上に非常に高いレベルで発現し、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞、ならびにＴｒｅｇには低いレベルで発現する。可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質またはＡＰＣ上に発現したＶＩＳＴＡは、リガンドとして機能して、ＰＤ－１から独立した未確認の受容体を介して、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖ならびにサイトカイン産生を抑制する。抗ＶＩＳＴＡ　ｍＡｂ（１３Ｆ３）は、抗腫瘍Ｔ細胞応答を強化することによって、インビトロでＶＩＳＴＡ媒介性Ｔ細胞応答を逆転させ、複数のマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍成長を抑制した。腫瘍細胞上でのＶＩＳＴＡの過剰発現は、ワクチン接種した宿主における防御的抗腫瘍免疫を損傷させた。ＶＩＳＴＡ　ＫＯマウスは、炎症性表現型を発達させ、これは、末梢寛容の消失の方向へと向かわせる。米国特許第８，２３６，３０４号および同第８，２３１，８７２号、公開済みの国際出願第ＷＯ／２０１１／１２００１３号および同第ＷＯ／２００６／１１６１８１号、米国公開出願第２００８／０２８７３５８号、同第２０１１／００２７２７８号、および同第２０１２／０１９５８９４号、ならびに米国仮特許出願第６０／６７４，５６７号（２００５年４月２５日出願）、同第６１／６６３，４３１号（２０１２年６月２２日出願）、同第６１／６６３，９６９号（２０１２年６月２５日出願）、同第６１／３９０，４３４号（２０１０年１０月０６日出願）、同第６１／４３６，３７９号（２０１１年１月２６日出願）、および同第６１／４４９，８８２号（２０１１年３月０７日出願）を参照されたく、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００１４】

したがって、我々は、ＶＩＳＴＡが、決定的に、免疫応答を制御する、新規な免疫チェックポイントタンパク質リガンドであること、およびＶＩＳＴＡ封鎖が、腫瘍内微小環境（ＴＭＥ）の抑制特性を逆転させ、防御的抗腫瘍免疫の発達をもたらすことを仮定する。

【００１５】

免疫系は、共刺激性および共阻害性のリガンドならびに受容体によって、緊密に制御される。これらの分子は、Ｔ細胞活性化のための第２のシグナルだけでなく、自己に対する免疫を制限しながら感染に対する免疫応答を最大化するように、正および負のシグナルのバランスのとれたネットワークも提供する。

【００１６】

免疫応答の誘導は、Ｔ細胞増殖、分化、収縮、およびＴ細胞記憶の確立を必要とする。Ｔ細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）に遭遇し、ＡＰＣ上でのＴ細胞受容体（ＴＣＲ）／主要組織適合複合体（ＭＨＣ）相互作用を介して情報交換しなければならない。ＴＣＲ／ＭＨＣ相互作用が確立されると、Ｔ細胞とＡＰＣとの間の他の組の受容体－リガンドの接触、すなわち、ＣＤ１５４／ＣＤ４０およびＣＤ２８／Ｂ７．１－Ｂ７．２の共刺激が必要とされる。これらの接触間の相乗効果は、病原体および腫瘍を除去することができ、および自己免疫を誘導することができる場合のある、生産的免疫応答をもたらす。

【００１７】

別のレベルの制御、すなわち、制御性Ｔ細胞（Ｔ$_{reg}$）が特定されている。Ｔ細胞のこの特定のサブセットは、胸腺で生成され、末梢に送達され、Ｔ細胞応答を一定かつ誘導可能に制御することができる。Ｓａｋａｇｕｃｈｉ（２０００）Ｃｅｌｌ　１０１（５）：４５５－８、Ｓｈｅｖａｃｈ（２０００）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８：４２３－４９、Ｂｌｕｅｓｔｏｎｅ　ａｎｄ　Ａｂｂａｓ（２００３）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．

Ｉｍｍｕｎｏｌ．３（３）：２５３－７。Ｔ$_{ｒｅｇ}$は、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋表現型によって表され、高レベルの細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原－４（ＣＴＬＡ－４）、ＯＸ－４０、４－１ＢＢ、およびグルココルチコイド誘導性ＴＮＦ受容体関連タンパク質（ＧＩＴＲ）もまた発現する。ＭｃＨｕｇｈ，ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １６（２）：３１１－２３、Ｓｈｉｍｉｚｕ，ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎ．３（２）：１３５－４２。５日齢の新生児胸腺摘出または抗ＣＤ２５を用いた抗体枯渇によるＴ$_{ｒｅｇ}$細胞の排除は、自己免疫病理の誘導、ならびに増大した抗腫瘍応答を含む、外来および自己抗原に対するＴ細胞応答の悪化をもたらす。Ｓａｋａｇｕｃｈｉ，ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６１（１）：７２－８７、Ｓａｋａｇｕｃｈｉ，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５５（３）：１１５１－６４、Ｊｏｎｅｓ，ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎ．２：１。加えて、Ｔ$_{ｒｅｇ}$は、抗ＣＤ２５モノクローナル抗体によるＴ$_{ｒｅｇ}$の枯渇が移植寛容の消失および急速な移植片拒絶をもたらすため、移植寛容の誘導および維持にも関与している。Ｊａｒｖｉｎｅｎ，ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ７６：１３７５－９。Ｔ$_{ｒｅｇ}$によって発現される受容体の中でも、ＧＩＴＲは、Ｔｒｅｇの表面におけるＧＩＴＲとアゴニストモノクローナル抗体とのライゲーションが、Ｔ$_{ｒｅｇ}$活性の迅速な終結をもたらし、結果として自己免疫病理および移植寛容の消失をもたらすため、重要な構成要素であると見られる。

【００１８】

共刺激性および共阻害性のリガンドならびに受容体は、Ｔ細胞活性化のために「第２のシグナル」だけでなく、自己に対する免疫を制限しながら感染に対する免疫応答を最大化するように、正および負のシグナルのバランスのとれたネットワークも提供する。最もよく特徴付けられている共刺激性リガンドは、Ｂ７．１およびＢ７．２であり、これらは、プロフェッショナルＡＰＣによって発現され、それらの受容体は、ＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４である。Ｇｒｅｅｎｗａｌｄ，ｅｔ ａｌ．（２００５）Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２３，５１５－５４８、Ｓｈａｒｐｅ ａｎｄ Ｆｒｅｅｍａｎ（２００２）Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２，１１６－１２６。ＣＤ２８は、ナイーブＴ細胞および活性化Ｔ細胞によって発現され、最適なＴ細胞活性化にとって極めて重要である。対照的に、ＣＴＬＡ－４は、Ｔ細胞の活性化により誘導され、Ｂ７．１／Ｂ７．２に結合することによってＴ細胞活性化を阻害し、したがって、ＣＤ２８媒介性共刺激を障害させる。ＣＴＬＡ－４はまた、その細胞質ＩＴＩＭモチーフを通じて負のシグナルも伝達する。Ｔｅｆｔ，ｅｔ ａｌ．（２００６）．Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２４，６５－９７。Ｂ７．１／Ｂ７．２ ＫＯマウスは、獲得免疫応答に障害を有し（Ｂｏｒｒｉｅｌｌｏ，ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ６，３０３－３１３、Ｆｒｅｅｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６２，９０７－９０９）、一方でＣＴＬＡ－４ ＫＯマウスは、炎症を適切に制御することができず、全身性自己免疫疾患を発症する。Ｃｈａｍｂｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ７，８８５－８９５、Ｔｉｖｏｌ，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ３，５４１－５４７、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０，９８５－９８８。Ｂ７ファミリーリガンドは、共刺激性Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳリガンド）およびＢ７－Ｈ３、ならびに共阻害性Ｂ７－Ｈ１（ＰＤ－Ｌ１）、Ｂ７－ＤＣ（ＰＤ－Ｌ２）、Ｂ７－Ｈ４（Ｂ７Ｓ１もしくはＢ７ｘ）、およびＢ７－Ｈ６を含むまでに拡張している。Ｂｒａｎｄｔ，ｅｔ ａｌ．（２００９）Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ ２０６，１４９５－１５０３、Ｇｒｅｅｎｗａｌｄ，ｅｔ ａｌ．（２００５）Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２３：５１５－５４８を参照されたい。

【００１９】

誘導型共刺激性（ＩＣＯＳ）分子は、活性化されたＴ細胞上に発現され、Ｂ７－Ｈ２に結合する。Ｙｏｓｈｉｎａｇａ，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ ４０２，８２７－８３２を参照されたい。ＩＣＯＳは、Ｔ細胞の活性化、分化、および機能に重要であり、ならびに、Ｔヘルパー細胞誘導性Ｂ細胞活性化、Ｉｇクラススイッチ、および胚中心

（ＧＣ）形成に必須である。Ｄｏｎｇ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　４０９，９７－１０１、Ｔａｆｕｒｉ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　４０９，１０５－１０９、Ｙｏｓｈｉｎａｇａ，ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ　４０２，８２７－８３２。プログラム死１（ＰＤ－１）は、一方で、Ｔ細胞応答を負に制御する。ＰＤ－１　ＫＯマウスは、遺伝的背景に応じて、ループス様自己免疫疾患、または自己免疫拡張型心筋症を発症する。Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ，ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１１，１４１－１５１。Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２９１：３１９－３２２。自己免疫は、リガンドＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２の両方によるシグナル伝達の消失に起因する可能性が最も高い。最近、ＣＤ８０が、Ｔ細胞に阻害性シグナルを伝達するＰＤ－Ｌ１の第２の受容体として特定された。Ｂｕｔｔｅ，ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　２７：１１１－１２２。Ｂ７－Ｈ３およびＢ７－Ｈ４の受容体は、依然として未知のままである。

【００２０】

最もよく特徴付けられている共刺激性リガンドは、Ｂ７．１およびＢ７．２であり、これらは、Ｉｇスーパーファミリーに属し、プロフェッショナルＡＰＣ上に発現し、それらの受容体は、ＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４である。Ｇｒｅｅｎｗａｌｄ，ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：５１５－５４８。ＣＤ２８は、ナイーブＴ細胞および活性化Ｔ細胞によって発現され、最適なＴ細胞活性化にとって極めて重要である。対照的に、ＣＴＬＡ－４は、Ｔ細胞の活性化により誘導され、Ｂ７．１／Ｂ７．２に結合することによってＴ細胞活性化を阻害し、ＣＤ２８媒介性共刺激を障害させる。Ｂ７．１およびＢ７．２　ＫＯマウスは、獲得免疫応答に障害を有し（Ｂｏｒｒｉｅｌｌｏ，ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　６：３０３－３１３）、一方でＣＴＬＡ－４　ＫＯマウスは、炎症を適切に制御することができず、全身性自己免疫疾患を発症する。Ｔｉｖｏｌ，ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　３：５４１－５４７、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ，ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７０：９８５－９８８、Ｃｈａｍｂｅｒｓ，ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　７：８８５－８９５。

【００２１】

Ｂ７ファミリーリガンドは、共刺激性Ｂ７－Ｈ２（誘導型Ｔ細胞共刺激因子［ＩＣＯＳ］リガンド）およびＢ７－Ｈ３、ならびに共阻害性Ｂ７－Ｈ１（ＰＤ－Ｌ１）、Ｂ７－ＤＣ（ＰＤ－Ｌ２）、Ｂ７－Ｈ４（Ｂ７Ｓ１もしくはＢ７ｘ）、およびＢ７－Ｈ６を含むまでに拡張している。Ｇｒｅｅｎｗａｌｄ，ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：５１５－５４８、Ｂｒａｎｄｔ，ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２０６：１４９５－１５０３。したがって、さらなるＣＤ２８ファミリー受容体が特定されている。ＩＣＯＳは、活性化Ｔ細胞上に発現し、Ｂ７－Ｈ２に結合する。ＩＣＯＳは、正の共制御因子であり、これは、Ｔ細胞の活性化、分化、および機能にとって重要である。Ｙｏｓｈｉｎａｇａ，ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ　４０２：８２７－８３２、Ｄｏｎｇ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．８１：２８１－２８７。対照的に、ＰＤ－１（プログラム死１）は、Ｔ細胞応答を負に制御する。ＰＤ－１　ＫＯマウスは、ループス様自己免疫疾患または自己免疫拡張型心筋症を発症した。Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ，ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１１：１４１－１５１、Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２９１：３１９－３２２。自己免疫は、リガンドＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２の両方によるシグナル伝達の消失に起因する可能性が最も高い。最近、ＣＤ８０が、Ｔ細胞に阻害性シグナルを伝達するＰＤ－Ｌ１の第２の受容体として特定された。Ｂｕｔｔｅ，ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　２７：１１１－１２２。

【００２２】

２つの阻害性Ｂ７ファミリーリガンドＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２は、明確に異なる発現パターンを有する。ＰＤ－Ｌ２は、ＤＣおよびマクロファージ上に誘導可能に発現し、一方でＰＤ－Ｌ１は、造血細胞型および非造血細胞型の両方に広範に発現する。Ｏｋａｚ

ａｋｉ＆Ｈｏｎｊｏ（２００６）Ｔｒｅｎｄｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２７（４）：１９５－２０１、Ｋｅｉｒ，ｅｔ ａｌ．（２００８）Ａｎｎ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２６：６７７－７０４。ＰＤ－１受容体の免疫抑制性の役割と一致して、ＰＤ－Ｌ１$^{-/-}$およびＰＤ－Ｌ２$^{-/-}$マウスを用いた研究は、両方のリガンドが、Ｔ細胞増殖およびサイトカイン産生の阻害において重複する役割を有することを示した。Ｋｅｉｒ，ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７５（１１）：７３７２－９。ＰＤ－Ｌ１欠損は、自己免疫性糖尿病の非肥満性糖尿病モデル、および多発性硬化症（実験的自己免疫性脳脊髄炎［ＥＡＥ］）のマウスモデルの両方において、疾患の進行を強める。Ａｎｓａｒｉ，ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９８：６３－６９、Ｓａｌａｍａ，ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９８：７１－７８、Ｌａｔｃｈｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．１０１：１０６９１－１０６９６。ＰＤ－Ｌ１$^{-/-}$Ｔ細胞は、両方の疾患モデルにおいて、上昇したレベルの炎症促進性サイトカインを産生する。加えて、ＢＭキメラ実験は、ＰＤ－Ｌ１の組織発現（すなわち、膵臓内）が、炎症を局部的に制御するその能力に固有に寄与することを示している。Ｋｅｉｒ，ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２０３：８８３－８９５、Ｋｅｉｒ，ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７９：５０６４－５０７０、Ｇｒａｂｉｅ，ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １１６：２０６２－２０７１。ＰＤ－Ｌ１はまた、同種異系胎児に対する母体免疫応答を決定的に制御する、胎盤の合胞体栄養細胞上に高度に発現する。Ｇｕｌｅｒｉａ，ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２０２：２３１－２３７。

【００２３】

その免疫抑制的な役割と一致して、ＰＤ－Ｌ１は、抗腫瘍免疫応答を強力に抑制し、腫瘍が免疫監視から逃れることを補助する。ＰＤ－Ｌ１は、高レベルのＰＤ－１を発現する浸潤性細胞傷害性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のアポトーシスを誘導し得る。Ｄｏｎｇ，ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．８：７９３－８００、Ｄｏｎｇ ａｎｄ Ｃｈｅｎ（２００３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．８１：２８１－２８７。他の免疫療法と併せて、ＰＤ－Ｌ１－ＰＤ－１シグナル伝達経路を遮断することで、抗腫瘍ＣＴＬ活性およびサイトカイン産生を強化することにより腫瘍の進行を防止する。Ｉｗａｉ，ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９９：１２２９３－１２２９７、Ｂｌａｎｋ，ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６４：１１４０－１１４５、Ｂｌａｎｋ，ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．５４：３０７－３１４、Ｇｅｎｇ，ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ １１８：２６５７－２６６４。ＤＣでのＰＤ－Ｌ１発現は、適応性Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$制御性Ｔ細胞（T_{reg}細胞）の誘導を促進し、ＰＤ－Ｌは、腫瘍内微小環境におけるaT_{reg}細胞の強力な誘導因子である。Ｗａｎｇ，ｅｔ ａｌ．（２００８）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０５：９３３１－９３３６。Ｂ７ファミリー制御性分子を標的とすることにおける最近の進歩により、自己免疫および癌等の免疫関連疾患の治療が期待される。Ｋｅｉｒ，ｅｔ ａｌ．（２００８）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２６：６７７－７０４、Ｚｏｕ ａｎｄ Ｃｈｅｎ（２００８）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．８：４６７－４７７。

【発明の概要】

【００２４】

ＣＴＬＡ－４およびＰＤ－１等の免疫チェックポイントタンパク質を標的とする癌免疫療法は、臨床試験において有望な成果を示している。これは、関与する患者に対する予後不良および治療の選択肢を考慮すると、特に有望である。しかしながら、全体的奏効率は残念ながら低く、種々のイピリムマブ（ａＣＴＬＡ－４）臨床試験において６～２１％の患者が客観的応答を有する３～５。したがって、重複しない役割を果たし、既知のチェックポイント経路との相乗効果を有する、新規なチェックポイントタンパク質を特定することが、極めて必要とされている。新規な免疫チェックポイント経路として、ＶＩＳＴＡは、癌における免疫介入のための新たな標的を提供する。ＶＩＳＴＡ封鎖は、ＴＭＥの抑制

性特徴を逆転させ、防御的抗腫瘍免疫の発達をもたらす。本明細書に記載される結果は、ＶＩＳＴＡ封鎖が、結腸直腸癌（ＣＲＣ）等の癌において、ＴｒｅｇおよびＭＤＳＣを含む代表的な免疫抑制細胞を標的とするための効果的な治療的戦略であることを示す。

【００２５】

一態様において、本開示は、新規な免疫チェックポイント経路であるＶＩＳＴＡが、抗腫瘍免疫応答を決定的に制御するという新しいパラダイムを提供する。このパラダイムは、ＶＩＳＴＡ経路を標的とする新規な治療戦略の設計のための基礎を構築する。ＶＩＳＴＡと別の免疫チェックポイント経路ＰＤ－Ｌ１／ＰＤ－１との間の協同的な相互作用は、「冗長性」に対向し、最大の効果を得るには免疫抑制経路のすべてを標的とする必要性を強調する。それに基づいて、本出願は、新規な組み合わせ戦略を提供し、癌免疫療法において単一の経路を標的とする現在の治療計画に変化をもたらす。さらに、自然な腫瘍形成の際のＶＩＳＴＡの役割についての研究は、より臨床的に関連する情報をもたらし、より優れた腫瘍療法の開発を導くであろう。

【００２６】

特定の態様において、本発明は、免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための方法であって、ＶＩＳＴＡアンタゴニストを投与し、それによって、ＶＩＳＴＡに媒介される免疫応答の抑制を阻害し、その結果免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態が治療されることを含む、方法を提供する。

【００２７】

他の特定の態様において、本発明は、免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための方法であって、対象から免疫細胞を取り出し、インビトロで前記免疫細胞をＶＩＳＴＡアンタゴニストと接触させ、それによって前記免疫細胞をインビトロで刺激し、前記インビトロで刺激した免疫細胞、例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞（免疫細胞の集団はインビトロで増殖され得る）を前記対象に再導入することを含む、方法を提供する。

【００２８】

別の態様において、本発明は、免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための方法であって、対象から免疫細胞を取り出し、前記免疫細胞に、その天然の結合パートナー（複数可）に結合することができないＶＩＳＴＡの形態をコードする核酸分子をトランスフェクトし、その結果、細胞が、ＶＩＳＴＡ分子のすべてまたは一部分を発現し、前記トランスフェクトした細胞を対象に再導入し、それによって前記トランスフェクトした細胞が、ＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞、例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞（任意でインビトロで増殖され得る）への阻害性シグナルを防止し、それによって免疫応答を上方制御することを含む、方法を提供する。

【００２９】

別の態様において、本発明は、対象における癌を治療するための方法であって、前記対象に由来する癌細胞に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を阻害する核酸分子をトランスフェクトし、それによって前記トランスフェクトした細胞が、ＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞への阻害性シグナルを防止し、それによって前記癌に対する免疫応答を上方制御することを含み、前記免疫細胞は、任意に、ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含み、これらは任意にインビトロで増殖され得る、方法を提供する。

【００３０】

別の態様において、本発明の前述の方法のいずれも、前記癌細胞に、免疫系共刺激を達成する１つ以上の追加のポリペプチド、例えば、Ｂ７－１および／もしくはＢ７－２、ならびに／またはＭＨＣクラスＩ　α鎖ポリペプチド、β２ミクログロブリンポリペプチド、ＭＨＣクラスＩＩ　α鎖ポリペプチド、および／もしくはＭＨＣクラスＩＩ　β鎖ポリペプチドのすべてまたは一部分をトランスフェクトし、それによって、当該癌細胞に、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩ　ポリペプチドを細胞表面に発現させることをさらに含み得る。

【００３１】

別の態様において、本発明のこれらの前述の方法は、ＭＨＣクラスＩＩ関連ポリペプチド、任意で、不変鎖の発現を阻害する、ｓｉＲＮＡまたはｓｉＲＮＡをコードする遺伝子を導入し、それによって、任意でエキソビボで達成され得る腫瘍関連抗原の提示を促進し、当該癌細胞の当該対象への再導入がインビボで達成され得ることをさらに含み得る。

【００３２】

別の態様において、本発明は、対象における癌を治療するための方法であって、当該対象に由来する癌細胞に、ＶＩＳＴＡ活性を阻害する核酸分子をトランスフェクトし、それによって、当該トランスフェクトした細胞がＶＩＳＴＡに媒介される免疫細胞への阻害性シグナルを防止し、対象から免疫細胞を取り出し、当該トランスフェクトした細胞と当該免疫細胞とを接触させ、それによって免疫細胞を上方制御し、当該インビトロで刺激した免疫細胞を当該対象に再導入することを含む、方法を提供する。

【００３３】

別の実施形態において、本発明は、試料を抗ＶＩＳＴＡ抗体または抗体フラグメントと接触させ、抗ＶＩＳＴＡ抗体－ＶＩＳＴＡ複合体を検出することを含み得る、試料中のＶＩＳＴＡを検出するための方法を提供する。別の実施形態において、試料は、生物学的試料であり得る。別の実施形態において、抗ＶＩＳＴＡ抗体は、配列番号２、３、または５のアミノ酸配列に結合する。

【００３４】

別の実施形態において、治療、診断、または免疫調節用途のための組成物は、好ましくは、インビボでＶＩＳＴＡを調節する配列番号１または３に特異的にハイブリダイズする遺伝子によってコードされる、配列番号２、４、もしくは５に記載されるヒトまたはマウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド、またはそのオルソログ、もしくはフラグメントに少なくとも７０～９０％同一であり得るアミノ酸配列を含み得る単離された可溶性ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質またはＶＩＳＴＡ融合タンパク質（例えば、可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質もしくは多量体ＶＩＳＴＡタンパク質）と、薬学的に許容される担体と、を含み得る。いくつかの実施形態において、可溶性または多量体ＶＩＳＴＡタンパク質は、直接的もしくは間接的に異種（非ＶＩＳＴＡ）タンパク質に連結され得るか、またはを含有するウイルスベクターもしくは細胞（例えば、トランスフェクトした免疫細胞、例えばＴ細胞）によって発現され得る。

【００３５】

ある実施形態において、単離または組み換えＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド（例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはそのフラグメントもしくは部分）。一実施形態において、単離ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）融合タンパク質は、次のドメイン、すなわちシグナルペプチドドメイン、ＩｇＶドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインのうちの少なくとも１つを含む。

【００３６】

ある実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドは、次のドメイン、すなわちシグナルペプチドドメイン、ＩｇＶドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインのうちの少なくとも１つを含み、配列番号２、４、または５のアミノ酸配列に少なくとも約７１％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一なアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドは、次のドメイン、すなわちシグナルペプチドドメイン、ＩｇＶドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインのうちの少なくとも１つを含み、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性（本明細書に記載される）を有し得る。

【００３７】

一実施形態において、単離ＶＩＳＴＡタンパク質は、配列番号２、４、５、１６～２５、３６、または３７のポリペプチド配列の細胞外ドメインに少なくとも約９０％の配列同一性を有するポリペプチドを含み得る。さらなる実施形態において、ポリペプチドは、配

列番号２、４、５、１６～２５、３６、または３７のポリペプチド配列に少なくとも約９５％の配列同一性を有し得る。

【００３８】

別の実施形態において、ＶＩＳＴＡポリペプチドは、次のドメイン、すなわちシグナルペプチドドメイン、ＩｇＶドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインのうちの少なくとも１つを含み、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号１または３のヌクレオチド配列を含み得る核酸分子の相補体にハイブリダイズするヌクレオチドを有する核酸分子によってコードされ得る。

【００３９】

別の実施形態において、ポリペプチドのフラグメントまたは部分は、配列番号２、４、または５のアミノ酸配列を含み得、ここで、このフラグメントは、配列番号２または４のアミノ酸配列の少なくとも１５個のアミノ酸（すなわち、連続したアミノ酸）を含む。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドは、配列番号２、４、または５のアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなる。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドは、配列番号１または３のヌクレオチド配列に少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一なヌクレオチド配列またはその相補体を含み得る核酸分子によってコードされ得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で核酸分子の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列からなる核酸分子によってコードされ得るＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドは、配列番号１または３のヌクレオチド配列を含み得る。

【００４０】

一実施形態において、ＶＩＳＴＡポリペプチドは、アゴニストであり得、これらは、抑制を誘導する。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡポリペプチドは、アンタゴニストであり得、これらは、抑制を妨害する。

【００４１】

本発明のポリペプチドまたはその部分、例えば、その生物学的に活性な部分は、非ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド（例えば、異種アミノ酸配列）に動作可能に連結して、融合ポリペプチドを形成し得る。

【００４２】

一実施形態において、発現ベクターは、配列番号２、４、または５に記載されるヒトまたはマウスＶＩＳＴＡアミノ酸配列、またはそのフラグメントもしくはオルソログに少なくとも約７０～９０％同一であり得るＶＩＳＴＡタンパク質をコードし、場合によってはＩｇポリペプチド（例えば、Ｆｃ領域）またはレポーター分子といった別のタンパク質をコードする配列に融合され得る、単離核酸を含み得、宿主細胞は、当該ベクターを含有する。

【００４３】

別の実施形態において、ＶＩＳＴＡポリペプチドをコードする単離核酸分子、好ましくは可溶性融合タンパク質、および多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、ならびにＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）をコードする核酸を検出するためのプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとして好適な核酸フラグメント。一実施形態において、本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子は、配列番号１もしくは３のヌクレオチド配列またはその相補体に（例えば、ヌクレオチド配列の全長に）、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であり得る。

【００４４】

別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子は、配列番号２、４、または５のアミノ酸配列に対して特定のパーセント同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。ある実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子は、配列番号２、４、もしくは５のアミノ酸配列の全長、またはその

細胞外ドメインに、少なくとも約７１％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【００４５】

別の実施形態において、単離核酸分子は、ヒトもしくはマウスまたはＶＩＳＴＡのアミノ酸配列、またはその中の保存領域もしくは機能的ドメインをコードする。さらに別の実施形態において、核酸分子は、配列番号２、４、または５のアミノ酸配列を含み得るポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。さらに別の実施形態において、核酸分子は、長さが少なくとも約５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０、１１００、１１５０ヌクレオチドであり得る。さらなる実施形態において、核酸分子は、長さが少なくとも約５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０、１１００、１１５０ヌクレオチドであり得、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を有するかまたはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）機能を調節するポリペプチドをコードする。

【００４６】

別の実施形態は、非ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドをコードする核酸分子と比較して、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子を特異的に検出する核酸分子、好ましくはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子を特徴とする。例えば、一実施形態において、核酸分子は、長さが少なくとも約８８０、９００、９５０、１０００、１０５０、１１００、１１５０ヌクレオチドであり得、ストリンジェントな条件下で、配列番号２、４、もしくは５に示されるポリペプチドまたはその相補体をコードする核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態において、核酸分子は、長さが少なくとも　２０、３０、４０、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００ヌクレオチドであり得、ストリンジェントな条件下で、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のフラグメントをコードする核酸分子にハイブリダイズし、例えば、少なくとも約２０、３０、４０、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０ヌクレオチド長を含み得、配列番号２、４、もしくは５のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたはその相補体をコードする、少なくとも１５個の（すなわち、１５個の連続する）配列番号１および３の開示される核酸配列を含み、ストリンジェントな条件下で、配列番号１もしくは３に示されるヌクレオチド配列またはその相補体を含み得る核酸分子にハイブリダイズする。

【００４７】

一実施形態において、核酸分子は、配列番号２もしくは４もしくは５のアミノ酸配列を含み得るポリペプチドの天然の対立遺伝子変異体をコードし、核酸分子は、ストリンジェントな条件下で、配列番号１もしくは３を含み得る核酸分子またはその相補体にハイブリダイズする。

【００４８】

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

【００４９】

本発明の別の態様は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子を含み得るベクターを提供する。ある特定の実施形態において、ベクターは、組み換え発現ベクターであり得る。

【００５０】

別の実施形態において、宿主細胞が、本発明のベクターを含む。さらに別の実施形態において、宿主細胞は、本発明の核酸分子を含む。本発明はまた、ポリペプチドが産生され得るように、組み換え発現ベクターを含有する本発明の宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞、例えば非ヒト哺乳動物細胞を、好適な培地において培養することによって、ポリペ

プチド、好ましくはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドを産生するための方法を提供する。

【００５１】

一実施形態において、ＶＩＳＴＡ　ＤＮＡから転写されるＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号１または３の核酸配列を含み得る。別の実施形態において、配列番号２、４、または５に記載されるアミノ酸配列をコードするＶＩＳＴＡ　ＤＮＡから転写されるＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子。さらなる実施形態において、ＶＩＳＴＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～６７のうちのいずれか１つの核酸配列を含み得る。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡのＯＲＦまたはＵＴＲ領域のいずれかを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～４７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含み得る。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡのＵＴＲ領域のみを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号４８～５７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含み得る。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡのＯＲＦ領域のみを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号５８～６７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含み得る。一実施形態において、ＶＩＳＴＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～６７のうちのいずれか１つの核酸配列からなり得る。一実施形態において、ＶＩＳＴＡのＯＲＦまたはＵＴＲ領域のいずれかを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～４７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列からなり得る。一実施形態において、ＶＩＳＴＡのＵＴＲ領域のみを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号４８～５７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列からなり得る。一実施形態において、ＶＩＳＴＡのＯＲＦ領域飲みを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号５８～６７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列からなり得る。

【００５２】

さらなる実施形態において、組成物は、配列番号３８～６７のうちのいずれか１つの核酸配列を含むｓｉＲＮＡ分子を含み得る。さらなる実施形態において、組成物は、配列番号３８～６７のうちのいずれか１つの核酸配列からなるｓｉＲＮＡ分子を含み得る。さらなる実施形態において、組成物は、薬学的組成物であり得る。

【００５３】

一実施形態において、アンタゴニストは、配列番号２、４、もしくは５に記載のアミノ酸配列、またはその変異体、フラグメント、もしくはオルソログを含み得る、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質に特異的に結合し得る。ある実施形態において、結合剤は、インビトロまたはインビボでＶＩＳＴＡ活性を調節（作動または拮抗）する。

【００５４】

一実施形態において、ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、ＶＩＳＴＡリガンドであり得る。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡリガンドは、タンパク質であり得る。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、抗体もしくはその抗体フラグメント、ペプチド、グリコアルコイド（ｇｌｙｃｏａｌｋｏｉｄ）、アンチセンス核酸、リボザイム、レチノイド、アベミール（ａｖｅｍｉｒ）、小分子、またはこれらの組み合わせであり得る。

【００５５】

一実施形態において、ＶＩＳＴＡアンタゴニストは、免疫に対するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の特定の作用、例えば、ＴＣＲ活性化に対するタンパク質の抑制作用、抗ＣＤ３へのＣＤ４　Ｔ細胞増殖応答に対するタンパク質の抑制作用、同族ＣＤ４Ｔ細胞の抗原特異的増殖応答の抑制、特定のサイトカイン（例えば、ＩＬ－２およびγインターフェロン）の発現に対するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の抑制作用を調節することを含むがこれらに限定されない、機能的特性を有し得る。

【００５６】

一実施形態において、ＶＩＳＴＡポリペプチド、多量体ＶＩＳＴＡポリペプチド、またはＶＩＳＴＡ融合タンパク質に特異的に結合する、アンタゴニスト、場合によってはタンパク質性アンタゴニスト。別の実施形態において、アンタゴニスト、場合によっては、タンパク質性アンタゴニストは、抗腫瘍または抗転移活性を呈し得る。別の実施形態におい

て、アンタゴニスト、場合によっては、タンパク質性アンタゴニストは、残基１～２０、２０～４０、３０～５０、６０～８０、７０～９０、８０～１００、または９０～１１０に含まれるエピトープに特異的に結合し得る。別の実施形態において、アンタゴニスト、場合によってはタンパク質性アンタゴニストは、当該ＶＩＳＴＡタンパク質のＩｇＶ、ストーク領域、細胞質領域、または膜貫通領域に含まれるエピトープに結合し得る。別の実施形態において、アンタゴニスト、場合によっては、タンパク質性アンタゴニストは、次の活性のうちの少なくとも１つを誘起し得る：（ａ）サイトカインの上方制御、（ｂ）Ｔ細胞の発現の誘導、（ｃ）抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進、または（ｄ）ＣＤ４＋および／もしくはＣＤ８＋Ｔ細胞活性化の促進。

【００５７】

別の実施形態において、単離結合剤、好ましくは、抗体または抗体フラグメントは、配列番号２、４、もしくは５に記載のアミノ酸配列、またはその変異体、フラグメント、もしくはオルソログを含み得るＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質に特異的に結合し得る。ある実施形態において、結合剤は、インビトロまたはインビボでＶＩＳＴＡ活性を調節（作動または拮抗）する。一実施形態において、結合剤は、アゴニスト性またはアンタゴニスト性抗ＶＩＳＴＡ抗体であり得る。

【００５８】

一実施形態において、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体は、免疫に対するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の特定の作用、例えば、ＴＣＲ活性化に対するタンパク質の抑制作用、抗ＣＤ３へのＣＤ４　Ｔ細胞増殖応答に対するタンパク質の抑制作用、同族ＣＤ４Ｔ細胞の抗原特異的増殖応答の抑制、特定のサイトカイン（例えば、ＩＬ－２およびγインターフェロン）の発現に対するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の抑制作用を調節することを含むがこれらに限定されない、機能的特性を有し得る。

【００５９】

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

【００６０】

一実施形態において、ＶＩＳＴＡポリペプチド、多量体ＶＩＳＴＡポリペプチド、またはＶＩＳＴＡ融合タンパク質に特異的に結合する単離抗体、またはその抗体フラグメント。別の実施形態において、抗体またはその抗体フラグメントは、抗腫瘍または抗転移活性を呈し得る。別の実施形態において、抗体またはその抗体フラグメントは、残基１～２０、２０～４０、３０～５０、６０～８０、７０～９０、８０～１００、または９０～１１０に含まれるエピトープに特異的に結合し得る。別の実施形態において、抗体またはその抗体フラグメントは、当該ＶＩＳＴＡタンパク質のＩｇＶ、ストーク領域、細胞質領域、または膜貫通領域に特異的に結合し得る。別の実施形態において、抗体またはその抗体フラグメントは、次の活性のうちの少なくとも１つを誘起し得る：（ａ）サイトカインの上方制御、（ｂ）Ｔ細胞の発現の誘導、（ｃ）抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進、または（ｄ）ＣＤ４＋および／もしくはＣＤ８＋Ｔ細胞活性化の促進。別の実施形態において、抗体またはフラグメントは、組み換えであり得る。別の実施形態において、抗体またはフラグメントは、抗腫瘍活性を有し得る。別の実施形態において、抗体フラグメントは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ＣＤＲ、パラトープ、または抗原に結合することができる抗体の部分であり得る。別の実施形態において、抗体は、キメラ、ヒト化、抗イディオタイプ、一本鎖、二機能性、または共特異的（ｃｏ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ）であり得る。別の実施形態において、抗体またはフラグメントは、標識、細胞毒性剤、治療剤、または免疫抑制剤に直接的または間接的に複合体化され得る。さらなる実施形態において、化学発光標識、常磁性標識、ＭＲＩ造影剤、蛍光標識、生物発光標識、または放射標識であり得る。

【００６１】

一実施形態において、本発明は、抗ＶＩＳＴＡ抗体およびその抗体フラグメントを提供

する。一実施形態において、抗体フラグメントは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、およびｓｃＦｖ フラグメントである。一実施形態において、抗体またはその抗体フラグメントは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、ＩｇＮＡＲ、ＳＭＩＰ、ラクダ抗体、またはナノボディを含み得る。別の実施形態において、組み換えタンパク質は、抗ＶＩＳＴＡ抗体の超可変領域を含み、ＶＩＳＴＡに選択的に結合し得る。別の実施形態において、抗体フラグメントは、配列番号２、４、または５のアミノ酸配列を含み得るＶＩＳＴＡに選択的に結合し得る。

【００６２】

加えて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド（もしくはその生物学的に活性な部分）またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子の調節剤（例えば、抗ＶＩＳＴＡ抗体）は、薬学的に許容される担体を任意に含み得る薬学的組成物に組み込まれ得る。

【００６３】

別の実施形態において、本発明は、抗原と、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を調節（強化または阻害）する薬剤と、を含み得るワクチンを提供する。ある実施形態において、ワクチンは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する。別の実施形態において、ワクチンは、抗原と、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する薬剤と、を含み得る。別の実施形態において、ワクチンは、抗原と、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を促進する薬剤と、を含み得る。一実施形態において、ワクチンは、賦形剤、アジュバント、または担体を含む。

【００６４】

一実施形態において、キットは、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質を含み得る。別の実施形態において、キットは、多量体ＶＩＳＴＡタンパク質を含み得る。さらなる実施形態において、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質または多量体ＶＩＳＴＡタンパク質は、固相支持体に直接的または間接的に固定され得る。さらなる実施形態において、固相支持体は、ビーズ、試験管、シート、培養皿、または試験紙であり得る。別の実施形態において、固相支持体は、アレイであり得る。

【００６５】

別の実施形態において、免疫細胞は、活性化され得、免疫細胞と、ＶＩＳＴＡポリペプチド、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、または抗ＶＩＳＴＡ抗体とを接触させることを含み得る。別の実施形態において、免疫細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、または抗原提示細胞であり得る。本発明の方法に従って活性化された免疫細胞は、次いで、エキソビボで増殖され、種々の疾患の治療または防止に使用され得る；例えば、インビトロでクローニングされ、増殖されたヒトＴ細胞は、それらの制御性活性を維持する。増殖の前に、Ｔ細胞源を、対象（例えば、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、またはそれらのトランスジェニック種等の哺乳動物）から得ることができる。Ｔ細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、脾臓組織、腫瘍、またはＴ細胞株を含む、多数の源から得ることができる。Ｔ細胞は、ＦＩＣＯＬＬ（登録商標）分離といった当業者に既知の多数の技術を使用して対象から採取した血液単位から得ることができる。

【００６６】

別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を調節するための方法は、細胞におけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性が調節され得るように、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を発現することができる細胞と、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を調節する薬剤、好ましくは、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体とを接触させることを含み得る。一実施形態において、この薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を阻害する。別の実施形態において、この薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を刺激する。さらなる実施形態において、この薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を妨害するか、または強化する。一実施形態において、この薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドに特異的に結合する抗体であり得る。別の実施形態において、この薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドに結合するペプチド

、ペプチド模倣体、または他の小分子であり得る。

【００６７】

別の実施形態において、この薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）遺伝子の転写、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ｍＲＮＡの翻訳、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの翻訳後修飾を調節することによって、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の発現を調節する。別の実施形態において、この薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ｍＲＮＡまたはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）遺伝子のコード鎖に対してアンチセンスであり得るヌクレオチド配列を有する核酸分子であり得る。さらなる実施形態において、この薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子であり得る。

【００６８】

一実施形態において、免疫細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を調節するための方法は、免疫細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用が調節され得るように、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を発現する抗原提示細胞と、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の形態からなる群から選択される薬剤またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を調節する薬剤と、を接触させること、ならびにＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を評価することを含み得る。ある実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を調節する薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）に特異的に結合する抗体であり得る。一実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用は、上方制御され得る。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用は、下方制御され得る。一実施形態において、本方法は、免疫細胞または抗原提示細胞と、免疫応答を調節する追加の薬剤と、を接触させることをさらに含む。一実施形態において、接触のステップは、インビトロで行われ得る。別の実施形態において、接触のステップは、インビボで行われ得る。一実施形態において、免疫細胞は、Ｔ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、Ｂ細胞、および骨髄性細胞からなる群から選択される。

【００６９】

一実施形態において、免疫細胞における活性化を阻害するための方法は、免疫細胞活性化が阻害され得るように、細胞におけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の活性または発現を阻害することを含み得る。一実施形態において、免疫細胞における活性化を増加させるための方法は、免疫細胞活性化が増加され得るように、細胞におけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の活性または発現を増加させることを含み得る。

【００７０】

別の実施形態において、免疫応答を上方制御するための方法は、免疫細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する薬剤を投与することを含み得る。一実施形態において、この薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）に結合し、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する、遮断抗体または小分子を含む。別の実施形態において、本方法は、免疫応答を上方制御する第２の薬剤を対象に投与することをさらに含む。別の実施形態において、免疫応答を下方制御するための方法は、免疫細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を刺激する薬剤を投与することを含み得る。

【００７１】

一実施形態において、腫瘍、病原体感染、炎症性免疫応答もしくは状態、好ましくはあまり顕著でない炎症性状態、または免疫抑制疾患からなる群から選択される状態を治療するための方法は、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の有効量の投与を含み得る。具体的な例には、多発性硬化症、甲状腺炎、リウマチ性関節炎、ＩＩ型およびＩ型糖尿病、ならびに転移性癌（例えば、膀胱癌、卵巣癌、黒色腫、肺癌）を含む癌（進行期または初期形態の両方）が挙げられ、この場合、ＶＩＳＴＡは、有効な抗

腫瘍応答を抑制する。対象は、抗ＶＩＳＴＡ抗体またはＶＩＳＴＡ融合タンパク質をコードする核酸を発現する細胞またはウイルスベクターを投与され得る。

【００７２】

一実施形態において、移植、アレルギー、感染性疾患、癌、および炎症性もしくは自己免疫障害（例えば、炎症性免疫障害）からなる群から選択される状態を治療するための方法は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質、結合剤、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アンタゴニストもしくはアゴニストの有効量の投与を含み得る。別の実施形態において、１型糖尿病、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス、リウマチ性疾患、アレルギー性障害、喘息、アレルギー性鼻炎、皮膚障害、クローン病および潰瘍性大腸炎等の胃腸障害、移植片拒絶、連鎖球菌感染後および自己免疫性腎不全、敗血症性ショック、全身性炎症応答症候群（ＳＩＲＳ）、成人性呼吸促迫症候群（ＡＲＤＳ）、および毒物注入；自己炎症性疾患、ならびに骨関節炎、結晶性関節炎、および包炎を含む変形性骨関節疾患、ならびに他の関節症が治療され得、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質、結合剤、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アンタゴニストもしくはアゴニストの有効量の投与を含み得る。さらに、本方法および組成物は、腱炎、靭帯炎、および外傷性関節傷害を治療するために使用され得る、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質、結合剤、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アンタゴニストもしくはアゴニストの有効量を含み得る。一実施形態において、薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を刺激する抗体または小分子を含む。別の実施形態において、本方法は、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、もしくはＣＴＬＡ－４融合タンパク質、またはそれらの特異的な抗体といった、免疫応答を下方制御する第２の薬剤を対象に投与することをさらに含む。

【００７３】

実施形態において、本主題のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質、核酸、およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）に特異的なリガンド、好ましくは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）機能に対する所望の作用を有する抗体を使用して、癌、自己免疫疾患、アレルギー、炎症性障害もしくは感染症、ならびにより具体的には、免疫系障害、例えば、重度の複合免疫不全、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、Ｉ型真性糖尿病、リンパ球増殖性症候群、炎症性腸疾患、アレルギー、喘息、移植片対宿主病、および移植片拒絶、細菌およびウイルスといった感染病原体に対する免疫応答、ならびにリンパ腫および白血病といった免疫系の癌を含むがこれらに限定されない状態を治療することができる。一実施形態において、ＶＩＳＴＡの活性を調節する薬剤は、Ｔ細胞枯渇を軽減し、感染性疾患に対する免疫を強化し得る。

【００７４】

一実施形態において、癌の治療を、それを必要とする患者に行う方法は、ＶＩＳＴＡタンパク質、多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の有効量を投与することを含み得、ここで、当該ＶＩＳＴＡタンパク質、多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、および／またはＶＩＳＴＡ融合タンパク質は、骨髄樹状サプレッサー細胞によって発言されるＶＩＳＴＡの免疫抑制活性を抑制することによって、抗腫瘍免疫を強化する。さらなる実施形態において、治療前の患者は、免疫細胞上で上昇したレベルのＶＩＳＴＡタンパク質を発現すると考えられ得る。

【００７５】

一実施形態において、放射線療法、化学療法、または抗癌生物製剤の有効性を強化する方法は、放射線療法、化学療法、および抗癌生物製剤の投与を含む治療レジメンにおいて、ＶＩＳＴＡタンパク質、多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の有効量を投与することを含み得る。さらなる実施形態において、治療前の患者は、当該放射線療法、化学療法、または抗癌生物製剤に対して応答しない癌を有し得る。

【００７６】

一実施形態において、結腸直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、または黒色腫を治療する方法は、

ＶＩＳＴＡタンパク質、多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の有効量を投与することを含み得、ここで、当該癌は、早期（非転移性）または転移性形態であり、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇの形態は、その受容体との相互作用を遮断する。

【００７７】

一実施形態において、免疫細胞応答を調節するための方法は、免疫細胞の応答が調節されるように、一次シグナルの存在下で、免疫細胞と、ＶＩＳＴＡタンパク質、多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質とを接触させることを含み得る。

【００７８】

一実施形態において、Ｔｒｅｇ細胞の調節を、それを必要とする対象において行う方法は、ＶＩＳＴＡタンパク質、多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の有効量を投与することを含み得る。

【００７９】

一実施形態において、免疫に対するＶＩＳＴＡの抑制作用を解除する方法は、ＶＩＳＴＡタンパク質、多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の有効量を投与することを含み得る。別の実施形態において、治療される患者は、治療の前に、上昇したレベルのＶＩＳＴＡを発現すると考えられ得る。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡのレベルは、免疫応答が強化され得たことを評価するために、治療後に監視され得る。

【００８０】

一実施形態において、細胞媒介性免疫の強化を、それを必要とする対象において行う方法は、ＶＩＳＴＡタンパク質、多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の有効量を投与することを含み得る。

【００８１】

一実施形態において、免疫細胞応答を調節するための方法は、免疫細胞の応答が調節されるように、一次シグナルの存在下で、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、または多量体ＶＩＳＴＡタンパク質の有効量を投与することを含み得る、免疫細胞を接触させることを含み得る。別の実施形態において、接触は、インビトロ、インビボ、またはエキソビボで行われ得る。

【００８２】

一実施形態において、Ｔ細胞と骨髄系由来ＡＰＣとの間の同族相互作用の際のＴ細胞応答を制御する方法は、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、または多量体ＶＩＳＴＡタンパク質の有効量を投与することを含み得る。

【００８３】

一実施形態において、免疫抑制の誘起を、それを必要とする個体において行う方法は、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質、場合によってはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、または多量体ＶＩＳＴＡタンパク質の有効量を投与することを含み得る。

【００８４】

別の実施形態において、免疫細胞の活性化を減少させるための方法は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の有効量を対象に投与することを含み得、ここで、当該ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質は、免疫細胞活性化を減少させるための阻害性シグナルとして作用する。一実施形態において、免疫細胞活性化は、阻害される。別の実施形態において、免疫細胞活性化は、有意に減少される。一実施形態において、阻害性シグナルは、免疫細胞上で阻害性受容体（例えば、ＣＴＬＡ－４またはＰＤ－１）に結合し、それによって、活性化受容体に結合する（例えば、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＢＣＲ、またはＦｃポリペプチドを介して）一次シグナルに拮抗する。一実施形態において、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質は、第２のメッセンジャー生成を阻害する；免疫細胞増殖を阻害する；免疫細胞におけるエフェクター機能を阻害する（例えば、食作用の低減、抗

体産生の低減、細胞傷害性の低減、免疫細胞によるメディエーター産生（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）の不全；またはアネルギーの発達）。

【００８５】

一実施形態において、一次シグナルは、ＴＣＲに結合し、一次刺激シグナルを開始させる、リガンド（例えば、ＣＤ３または抗ＣＤ３）であり得る。ＴＣＲリガンドには、抗ＣＤ３抗体ＯＫＴ３および抗ＣＤ３モノクローナル抗体Ｇ１９－４が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、一次シグナルは、タンパク質キナーゼＣ活性化因子、例えばホルボールエステル（例えば、酢酸ミリスチン酸ホルボール）、およびカルシウムイオノフォア（例えば、細胞質カルシウム濃度を上昇させる、イオノマイシン）を含む、他の機序を通じてＴ細胞に送達され得る。そのような薬剤の使用は、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体を回避するが、Ｔ細胞に刺激性シグナルを送達する。一次シグナルとして作用する他の薬剤には、天然および合成のリガンドが含まれ得る。天然のリガンドは、ペプチドの提示ありまたはなしでＭＨＣを含み得る。他のリガンドには、ペプチド、ポリペプチド、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、糖ペプチド、可溶性受容体、ステロイド、ホルモン、マイトジェン（例えば、ＰＨＡ）、または他の超抗原、ペプチド－ＭＨＣテトラマー、および可溶性ＭＨＣダイマーが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８６】

別の実施形態において、生体試料中のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子、タンパク質、またはポリペプチドの存在を検出するための方法は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子、タンパク質、またはポリペプチドの存在が生体試料中で検出され得るように、生体試料と、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子、タンパク質、またはポリペプチドを検出することができる薬剤と、を接触させることを含む。このＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現を使用して、炎症部位等、ある特定の疾患部位を検出することができる。

【００８７】

別の実施形態において、生体試料中のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の存在を検出するための方法は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の存在が生体試料中で検出され得るように、生体試料と、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の指標を検出することができる薬剤と、を接触させることを含む。さらなる実施形態において、生体試料中の可溶性ＶＩＳＴＡを検出するための方法は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の存在が生体試料中で検出され得るように、生体試料と、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の指標を検出することができる薬剤と、を接触させることを含み得る。別の実施形態において、生体試料中の可溶性ＶＩＳＴＡを検出するための方法は、生体試料と、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）、場合によっては抗ＶＩＳＴＡ抗体、または抗体フラグメントに結合することができる薬剤と、を接触させること、ならびにＶＩＳＴＡ－抗体複合体の存在を検出することを含み得る。さらなる実施形態において、測定は、定量的、場合によってはウエスタンブロット濃度測定、比色分析、または蛍光測定であり得る。

【００８８】

別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ遺伝子における遺伝子改変の存在または不在を特定するための診断アッセイは、核酸を含み得る試料を得ること、およびその試料を分析することを含み、ここで、当該遺伝子改変は、（ｉ）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドをコードする遺伝子の異常な修飾または突然変異、（ｉｉ）遺伝子の誤制御、ならびに（ｉｉｉ）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの異常な翻訳後修飾のうちの少なくとも１つを特徴とし、ここで、遺伝子の野生型形態は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を有するポリペプチドをコードする。一実施形態において、核酸は、ＤＮＡまたはｍＲＮＡであり得る。

【００８９】

一実施形態において、治療剤または免疫調節剤として使用される可能性を有する抗ＶＩＳＴＡ抗体の選択の方法は、（ａ）免疫細胞または宿主にＶＩＳＴＡタンパク質、その免疫原性フラグメント、または複合体で免疫付与を行うこと、（ｂ）ＶＩＳＴＡに特異的に

結合する抗体を発現するリンパ系細胞を選択すること、（ｃ）抗ＶＩＳＴＡ抗体またはその抗体フラグメントを選択すること、（ｄ）当該抗ＶＩＳＴＡ抗体またはその抗体フラグメントを、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの次の活性：（ｉ）Ｔ細胞活性化もしくは分化の抑制、（ｉｉ）ＣＤ４＋もしくはＣＤ８＋Ｔ細胞増殖の抑制、またはＴ細胞によるサイトカイン産生の抑制のうちの少なくとも１つを阻害または強化する能力に関してスクリーニングすること、を含み得、（ｉｉｉ）ここで、（ｄ）の活性のうちの少なくとも１つを有する抗体もしくはその抗体フラグメントが、治療剤または免疫調節剤として使用される可能性を有する。

【００９０】

さらなる実施形態において、所望される機能的特性を有する抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体を選択する方法は、免疫に対するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の特定の作用、例えば、ＴＣＲ活性化に対するタンパク質の抑制作用、抗ＣＤ３へのＣＤ４　Ｔ細胞増殖応答に対するタンパク質の抑制作用、同族ＣＤ４Ｔ細胞の抗原特異的増殖応答の抑制、特定のサイトカイン（例えば、ＩＬ－２およびγインターフェロン）の発現に対するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の抑制作用を調節することを含む、所望される機能的特性に基づいて、このタンパク質またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇ融合タンパク質をに対して産生されるモノクローナル抗体のパネルをスクリーニングすること、ならびに所望される抗体を選択すること、を含み得る。

【００９１】

別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドに結合するか、またはその活性を調節する、化合物を特定するための方法は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を有するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドを含み得る指標組成物を提供すること、この指標組成物と試験化合物とを接触させること、および指標組成物におけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性に対する試験化合物の作用を判定して、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの活性を調節する化合物を特定すること、を含み得る。

【００９２】

別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の活性を調節する化合物のスクリーニングのための細胞に基づくアッセイは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）標的分子を発現する細胞と、試験化合物とを接触させ、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）標的分子の活性を調節する試験化合物の能力を判定することを含み得る。

【００９３】

別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）と標的分子との結合を調節する化合物のスクリーニングのための無細胞アッセイは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分と、試験化合物とを接触させ、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分に結合する試験化合物の能力を判定することを含み得る。

【００９４】

別の実施形態において、第１および第２の抗原濃度でＴ細胞活性化またはサイトカイン産生に対するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の作用を調節する化合物、例えば、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体を特定する方法は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）標的分子を発現するＴ細胞と、試験化合物とを第１の抗原濃度で接触させ、第１の濃度でのＴ細胞増殖またはサイトカイン産生を調節する試験化合物の能力を判定し、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）標的分子を発現するＴ細胞と、試験化合物とを第２の抗原濃度で接触させ、第２の濃度でのＴ細胞増殖またはサイトカイン産生を調節する試験化合物の能力を判定し、それによって、第１および第２の抗原濃度でＴ細胞活性化またはサイトカイン産生を調節する化合物を特定することを含み得る。

【００９５】

他の実施形態において、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質のパネルをスクリーニングし、どの抗ＶＩＳＴＡ抗体がＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の分化、増殖、ならびに／またはサイトカイン産生に対するＶＩＳＴＡ（Ｐ

Ｄ－Ｌ３）の作用を阻害または促進するかに基づいて、選択することができる。さらなる実施形態において、ヒトＶＩＳＴＡを発現するように操作されたマウスを使用して、免疫の制御における抗ヒトＶＩＳＴＡ抗体の機能を試験することができる。

【図面の簡単な説明】

【００９６】

【図１－１】配列分析を示す。（Ａ）マウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の全長アミノ酸配列（配列番号１７）。（Ｂ）マウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）（配列番号２５）と、Ｂ７－Ｈ１（ＰＤ－Ｌ１）（配列番号２６）、Ｂ７－ＤＣ（ＰＤ－Ｌ２）（配列番号２７）、Ｂ７－Ｈ３（ＣＤ２７６）（配列番号２８）、およびＢ７－Ｈ４（Ｂ７Ｓ１）（配列番号２９）を含む選択されたＢ７ファミリーリガンドとの間の細胞外Ｉｇドメインのアミノ酸配列アライメント。（Ｃ）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）（配列番号３０）Ｉｇドメインと、ＰＤ－１（配列番号３１）、ＣＴＬＡ－４（配列番号３２）、ＣＤ２８（配列番号３３）、ＢＴＬＡ（配列番号３４）、およびＩＣＯＳ（配列番号３５）を含むＢ７ファミリー受容体とのアライメント。Ｉｇ－ｖドメインは「．．．．」、Ｉｇ－ｃドメインは「＿＿＿」。アライメントは、ＭＵＳＣＬＥアルゴリズム（Ｍｕｌｔｉｐｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ　ｂｙ　Ｌｏｇ－Ｅｘｐｅｃｔａｔｉｏｎ）を使用して行った。（Ｄ）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）と、他のＢ７ファミリーリガンドおよび受容体との間のＩｇ－Ｖドメインの配列同一性（％）は、ＣｌｕｓｔａｌＷ２プログラムを使用して計算する。（Ｅ）ヒト（配列番号３７）およびマウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）（配列番号３６）の間の配列相同性を示す配列アライメント。同一の残基は、黒色の網掛けで示す。高保存および半保存の残基は、それぞれ、濃い灰色および薄い灰色の網掛けで示す。

【図１－２】同上。

【図１－３】同上。

【図２】マウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）と他の免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーメンバーとの系統学的分析を示す。マウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の全長配列、ならびにＣＤ２８、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、ＢＴＬＡ、ＰＤ－１、Ｂ７－Ｈ１（ＰＤ－Ｌ１）、Ｂ７－ＤＣ（ＰＤ－Ｌ２）、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－１、Ｂ７－２、ＢＴＮＬ２、ＢＴＮ３Ａ３、ＢＴＮ２Ａ２、およびＢＴＮ１Ａ１を含む他のＩｇスーパーファミリーメンバーを、ＰｈｙＭＬアルゴリズム（Ｐｈｙｌｏｇｅｎｅｔｉｃ　Ｍａｘｉｍｕｍ　Ｌｉｋｅｌｉｈｏｏｄ）を使用して分析した。分岐距離は、系統樹の分岐部に示される。

【図３】ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の組織発現および造血細胞発現のパターンを示す。Ａ。マウス組織由来の全長ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のＲＴ－ＰＣＲ。レーン：（１）筋肉（２）心臓（３）眼（４）胸腺（５）脾臓（６）小腸（７）腎臓（８）肝臓（９）脳（１０）乳腺（１１）肺（１２）卵巣（１３）骨髄。Ｂ。精製された造血細胞型に由来する全長ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のＲＴ－ＰＣＲ。レーン（１）腹膜マクロファージ（２）脾臓ＣＤ１１ｂ＋単球（３）脾臓ＣＤ１１ｃ＋ＤＣ（４）脾臓ＣＤ４＋Ｔ細胞（５）脾臓ＣＤ８＋Ｔ細胞（６）脾臓Ｂ細胞。Ｃ～Ｅ。胸腺および脾臓由来の脾臓ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞（Ｃ）、ＣＤ１１ｂ＋単球（Ｄ）、ならびに脾臓および腹膜腔由来のＣＤ１１ｃ＋ＤＣサブセット（Ｅ）におけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現のフローサイトメトリー分析。（Ｆ）脾臓Ｂ細胞、ＮＫ細胞、および顆粒球もまた分析する。（Ｇ）腸間膜リンパ節、末梢リンパ節、脾臓、血液、および腹膜腔を含む、異なる組織部位に由来する造血細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の異なる発現。少なくとも３回の独立した実験からの代表的なデータを示す。

【図４】ＶＩＳＴＡ、新規な構造的に異なるＩｇ－スーパーファミリー阻害性リガンドであり、その細胞外ドメインが、他のＣＤおよびＢ７ファミリーメンバーとともに抗原提示細胞上に提示される、Ｂ７ファミリーリガンドＰＤ－Ｌ１に対して最も高い相同性を有する、ＶＩＳＴＡを示す。ＶＩＳＴＡは、可能性のあるタンパク質キナーゼＣ結合部位を除き、明らかなシグナル伝達モチーフを有さない、９３アミノ酸の細胞質ドメインを有する。

【図５】ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ハムスターモノクローナル抗体の特異性を示す。ＲＦＰに融合されたＰＤ－Ｌ１またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のいずれかを過剰発現するマウスＥＬ４細胞株を、ハイブリドーマ培養物からの上清を用いて染色し、フローサイトメトリーによって分析した。８Ｄ８および６Ｅ７の２つの代表的な陽性クローンを示す。

【図６】インビトロ培養した脾臓細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現と他のＢ７ファミリーリガンドとの比較。ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ１１ｂｈｉ単球、およびＣＤ１１ｃ＋ＤＣを含む、造血細胞型上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）および他のＢ７ファミリーリガンド（すなわち、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、およびＢ７－Ｈ４）の発現。細胞は、活性化ありまたはなしで、新たに単離したか、またはインビトロで２４時間培養したかのいずれかであった。ＣＤ４＋Ｔ細胞は、プレートに結合したαＣＤ３（５μｇ／ｍｌ）で活性化し、ＣＤ１１ｂｈｉ単球およびＣＤ１１ｃ＋ＤＣは、ＩＦＮα（２０ｎｇ／ｍｌ）およびＬＰＳ（２００ｎｇ／ｍｌ）で活性化した。３回の独立した実験からの代表的な結果を示す。

【図７】免疫付与の際のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）およびＢ７ファミリーリガンドのインビボ発現パターンの比較を示す。ＤＯ１１．１０ＴＣＲトランスジェニックマウスに、フロイント完全アジュバント（ＣＦＡ）中に乳化させたトリ卵白アルブミン（ＯＶＡ）で脇腹に免疫付与を行った。流入領域および非流入領域リンパ節細胞を、免疫付与の２４時間後に採取し、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）、ＰＤ－Ｌ１、およびＰＤ－Ｌ２の発現についてフローサイトメトリーによって分析した。少なくとも４回の独立した実験からの代表的な結果を示す。（Ａ）高レベルのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を発現するＣＤ１１ｂ＋細胞集団が、ＣＦＡ／ＯＶＡでの免疫付与の２４時間後に誘導されたが、流入領域リンパ節内でＣＦＡ単独では誘導されなかった。これらの細胞は、Ｆ４／８０＋マクロファージおよびＣＤ１１Ｃ＋樹状細胞の混合表現型のものである。（Ｂ）ＣＤ１１ｂｈｉ単球、ＣＤ１１ｃ＋ＤＣ、およびＣＤ４＋Ｔ細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）、ＰＤ－Ｌ１、およびＰＤ－Ｌ２の発現を、免疫付与の２４時間後に分析した。

【図８】免疫応答に応答して、活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ１１ｂ$^{+}$、およびＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現の消失を示す。ＤＯ１１．１０マウスに、フロイント完全アジュバント（ＣＦＡ）中に乳化させたトリ卵白アルブミン（ＯＶＡ）で脇腹に免疫付与を行った。流入領域および非流入領域リンパ節細胞を免疫付与の４８時間後に採取し、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現についてフローサイトメトリーによって分析した。２回の独立した実験からの代表的な結果を示す。

【図９－１】固定化ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇ融合タンパク質が、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を阻害したことを示す。（Ａ）ＣＦＳＥ標識化ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞を、共吸収ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇありまたはなしでプレートに結合したαＣＤ３によって刺激した。ＣＦＳＥ－ｌｏｗ細胞の割合を定量し、（Ｂ）に示す。（Ｃ）ＰＤ－１　ｋｏマウスに由来するＣＤ４＋Ｔ細胞もまた、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇによって抑制された。（Ｄ）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇに媒介される抑制は、持続性であり、遅くに作用し得る。ＣＤ４＋Ｔ細胞を、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇまたは対照Ｉｇの存在下で、７２時間（ｉ）または２４時間（ｉｉ、ｉｉｉ、およびｉｖ）のいずれかで活性化した。２４時間事前活性化させた細胞を採取し、指定される条件下でさらに４８時間刺激した。細胞増殖を、７２時間の培養の最後に分析した。（ｉｉ）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇでの事前活性化および抗ＣＤ３での再刺激、（ｉｉｉ）抗ＣＤ３での事前活性化およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇでの再刺激。（ｉｖ）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇでの事前活性化およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇでの再刺激。二連のウェルを、すべての条件について分析した。４回の実験からの代表的な結果を示す。

【図９－２】同上。

【図１０】ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖に対するＰＤ－Ｌ１－ＩｇおよびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇ融合タンパク質の類似の作用を示す。バルク精製したＣＤ４＋Ｔ細胞をＣＦＳＥ標識し、ＰＤ－Ｌ１－ＩｇまたはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇ融合タンパク質の滴定

量とともにプレートに結合したαＣＤ３で刺激した。ＣＦＳＥ希釈物を、７２時間で分析し、ＣＦＳＥｌｏｗ細胞の割合を定量した。二連のウェルを、すべての条件について分析した。２回の独立した実験からの代表的な結果を示す。

【図１１】ナイーブおよびメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖に対するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇの抑制影響を示す。（Ａ）ナイーブ（ＣＤ２５－ＣＤ４４ｌｏｗＣＤ６２Ｌｈｉ）およびメモリー（ＣＤ２５－ＣＤ４４ｈｉＣＤ６２Ｌｌｏｗ）ＣＤ４＋Ｔ細胞サブセットを分類し、ＣＦＳＥ標識し、示される比率でＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇまたは対照Ｉｇとともにプレートに結合した抗ＣＤ３（２．５μｇ／ｍｌ）で刺激した。７２時間で、ＣＦＳＥ分裂プロファイルを試験することにより細胞増殖を分析した。ＣＦＳＥｌｏｗ細胞の割合によって判定される、増殖した細胞の割合を計算し、Ｂに示す。二連のウェルを、すべての条件について分析した。２回の独立した実験からの代表的な結果を示す。

【図１２】ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇ融合タンパク質が、初期ＴＣＲ活性化および細胞増殖を抑制したが、アポトーシスを直接誘導することはなかったことを示す。バルク精製したＣＤ４＋Ｔ細胞を、１－２の比率でＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇまたは対照Ｉｇとともにプレートに結合した抗ＣＤ３で刺激した（それぞれ、２．５μｇ／ｍｌおよび５μｇ／ｍｌ）。２４時間および４８時間で、細胞を、ＣＤ６９、ＣＤ６２Ｌ、およびＣＤ４４の発現についてフローサイトメトリーによって分析した。細胞はまた、初期アポトーシスマーカーであるアネキシン－Ｖ、および細胞死マーカーである７－アミノアクチノマイシンＤ（７－ＡＡＤ）で染色した。２回の独立した実験からの代表的な結果を示す。

【図１３－１】ＶＩＳＴＡ－Ｉｇが、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞によるサイトカイン産生を阻害したことを示す。（Ａ～Ｂ）バルク精製したＣＤ４＋Ｔ細胞を、示される比率で、プレートに結合した抗ＣＤ３およびＶＩＳＴＡ－Ｉｇもしくは対照－Ｉｇで刺激した。培養上清を、２４時間および４８時間後に回収した。ＩＬ－２およびＩＦＮγを、ＥＬＩＳＡによって分析した。（Ｃ～Ｄ）ＣＤ４＋Ｔ細胞を、ナイーブ（ＣＤ２５－ＣＤ４４ｌｏｗＣＤ６２Ｌｈｉ）およびメモリー（ＣＤ２５－ＣＤ４４ｈｉＣＤ６２Ｌｌｏｗ）細胞集団に分類した。細胞を、１：２の比率で、プレートに結合したαＣＤ３およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇもしくは対照Ｉｇで刺激した。培養上清を、４８時間で回収し、ＩＬ－２およびＩＦＮγのレベルをＥＬＩＳＡによって分析した。（Ｅ）バルク精製したＣＤ８＋Ｔ細胞を、示される比率で、プレートに結合したαＣＤ３、およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇもしくは対照Ｉｇで刺激した。培養上清中のＩＦＮγを、ＥＬＩＳＡによって分析した。すべての条件について、６つの重複するウェルの上清を、ＥＬＩＳＡ分析のためにプールした。３回の実験からの代表的な結果を示す。

【図１３－２】同上。

【図１４－１】ＶＩＳＴＡ－Ｉｇに媒介される抑制は、ＣＤ２８によって提供される中等度のレベルの共刺激を克服し得るが、高レベルの共刺激によって完全に逆転され、同様に外因性ＩＬ－２によって部分的に救出されたことを示す。Ａ～Ｂ。マウスＣＤ４＋Ｔ細胞を、１－１の比率および１－２の比率で、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇまたは対照Ｉｇのいずれかとともに、プレートに結合したαＣＤ３によって活性化した。サイトカイン救出については、可溶性ｍＩＬ－２、ｍＩＬ７、ｍＩＬ１５、およびｍＩＬ－２３（すべて４０ｎｇ／ｍｌ）を、細胞培養物に添加した（Ａ）。共刺激の作用を試験するために、αＣＤ２８（１μｇ／ｍｌ）を、示される比率で、αＣＤ３およびＩｇタンパク質とともに固定した（Ｂ）。７２時間で、ＣＦＳＥ分裂プロファイルを試験することにより細胞増殖を分析した。Ｃ～Ｄ。より低いレベルの共刺激の存在下でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の抑制活性を試験するために、滴定量のαＣＤ２８を、抗ＣＤ３（２．５μｇ／ｍｌ）およびＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質もしくは対照Ｉｇ融合タンパク質（１０μｇ／ｍｌ）とともにコーティングして、マウスＣＤ４＋Ｔ細胞増殖を刺激した。７２時間で、細胞増殖を分析した。増殖したＣＦＳＥｌｏｗ細胞の割合を定量し、Ｄに示す。二連のウェルを、すべての条件について分析した。３回の独立した実験からの代表的なＣＦＳＥプロフ

ァイルを示す。
【図１４－２】同上。
【図１４－３】同上。
【図１５－１】抗原提示細胞上に発現したＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）が、ＣＤ４　Ｔ細胞増殖を抑制したことを示す。Ａ～Ｃ　ＭＨＣＩＩ分子Ｉ－Ａｄおよび共刺激分子Ｂ７－２を安定に発現するＣＨＯ細胞株を、親Ｔ細胞株として使用した。細胞に、ＶＩＳＴＡ－ＲＦＰまたはＲＦＰ対照分子のいずれかを発現するレトロウイルスを形質導入した。形質導入した細胞は、均一な発現レベルを達成するように分類した。抗原提示細胞としてのそれらの能力を試験するために、ＣＨＯ－ＶＩＳＴＡまたはＣＨＯ－ＲＦＰ細胞を、マイトマイシンＣで処理し、滴定量のＯＶＡペプチドの存在下で、ＯＶＡ－特異的トランスジェニックＣＤ４＋Ｔ細胞Ｄ０１１．１０と混合した。７２時間で、ＣＦＳＥ分裂プロファイル（Ａ～Ｂ）またはトリチウム組み込み（Ｃ）のいずれかによってＤＯ１１細胞の増殖を分析した。（Ｄ）骨髄由来の樹状細胞に、１０日間の培養期間中にＲＦＰまたはＢ７Ｂ－Ｈ５－ＲＦＰレトロウイルスを形質導入した。形質導入したＣＤ１１ｃ＋ＲＦＰ＋ＤＣおよび形質導入していないＣＤ１１ｃ＋ＲＦＰ－ＤＣを分類し、これらを使用して、滴定量のＯＶＡペプチドの存在下で、ＯＶＡ－特異的トランスジェニックＣＤ４＋Ｔ細胞ＯＴＩＩを刺激した。３日目に、ＣＦＳＥ分裂を試験することによって細胞増殖を分析した。すべての実験について、二連のウェルを、すべての条件に関して分析し、３回の独立した実験からの代表的な結果を示す。
【図１５－２】同上。
【図１６】レトロウイルスを形質導入した骨髄由来ＤＣにおけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の表面発現レベルを示す。骨髄由来ＤＣ（ＢＭＤＣ）を、ＧＭ－ＣＳＦ（２０ｎｇ／ｍｌ）の存在下で培養し、本明細書に記載されるようにＲＦＰまたはＶＩＳＴＡ－ＲＦＰレトロウイルスのいずれかを形質導入した１０日目に、ＶＩＳＴＡの表面発現レベルを、培養ＢＭＤＣ上で分析し、新たに単離した腹膜マクロファージと比較した。
【図１７】抗ＰＤＬ３モノクローナル抗体が、受動的移入ＥＡＥモデルにおいて有効性を呈することを示す。この養子移入ＥＡＥモデルにおいて、ドナーＳＪＬマウスに、ＣＦＡおよびＰＬＰペプチドで免疫付与を行った。１０日目に、流入領域リンパ節由来の総リンパ球を単離し、インビトロでＰＬＰペプチド、ＩＬ－２３（２０ｎｇ／ｍｌ）、および抗ＩＦＮｇ（１０μｇ／ｍｌ）とともに４日間培養した。次いで、増殖したＣＤ４Ｔ細胞を精製し、ナイーブレシピエントマウスに養子移入した。疾患進行を監視し、次のようにスコア付けした：０、疾患なし；０．５、尾部の正常な状態の喪失；１：尾部を引きずる；２：尾部を引きずる＋後肢麻痺；２．５：片方の後肢麻痺；３：両方の後肢麻痺；３．５：前肢衰弱；４：後肢麻痺＋片方の前肢麻痺。疾患スコアが４に達したときに、マウスを屠殺した。＊マウスを屠殺した。
【図１８】抗原提示細胞上に発現したＶＩＳＴＡが、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖を抑制したことを示す。
【図１９】抗ＶＩＳＴＡ抗体が、ＭＢ４９腫瘍細胞を移植したマウスにおいて腫瘍成長を阻害したことを示す。
【図２０－１】４つの異なるマウス抗腫瘍モデル（Ａ～Ｄ）におけるＶＩＳＴＡモノクローナル抗体の抗腫瘍効果を示す。図２１Ｅは、ＩＤ８モデルにおける異なる細胞上でのＶＩＳＴＡの発現を示す。異なる解剖学的位置では、骨髄性樹状細胞上での発現が非常に高い。示されるように、腫瘍が成長し、白血球が浸潤する部位である腹水細胞では、骨髄性樹状細胞上のレベルが非常に高い。
【図２０－２】同上。
【図２０－３】同上。
【図２１】ＣＤ４０／ＴＬＲアゴニストワクチン（アゴニスト性αＣＤ４０ｍａｂ、ＴＬＲアゴニスト、およびＯＶＡペプチド）の有効性に対するＶＩＳＴＡモノクローナル抗体の増強作用を示す
【図２２】健常なマウスまたはＥＡＥを発症するマウスにおけるＣＮＳ細胞上でのＶＩＳ

ＴＡ発現を示す。
【図２３－１】ＶＩＳＴＡの配列および構造分析を示す。（Ａ）マウスＶＩＳＴＡの一次アミノ酸配列、Ｉｇ－Ｖドメイン、ストークセグメント、および膜貫通領域は、それぞれ、太字、イタリック、およびＴｉｍｅｓ　Ｎｅｗ　Ｒｏｍａｎで強調表示する。細胞外ドメイン領域のシステインは、下線で示す。（Ｂ）複数のＢ７ファミリーメンバーおよびＶＩＳＴＡのＩｇ－Ｖドメインの多重配列アライメント。予測される二次構造（矢印、スプリング、および「Ｔ」を、それぞれ、鎖、ヘリックス、およびβ折り返しに使用して）を、アライメントの上に記し、これは、ＶＩＳＴＡ構造モデルに基づく。ＶＩＳＴＡ（配列番号１５）、ＰＤ１Ｌ１（配列番号１１）、ＰＤ１Ｌ２（配列番号１２）、Ｂ７Ｈ４（配列番号１３）、およびＢ７Ｈ３（配列番号１４）。（Ｃ）ＶＩＳＴＡオルソログの多重配列アライメント。不変残基を赤色の背景で表し、物理化学的に保存される位置を赤色の文字で表す。保存アミノ酸は、青色の四角で記す。保存は、３６個のＶＩＳＴＡオルソログタンパク質に基づいて計算されるが、９個の代表例のみを示す。ほとんどすべてのＩｇスーパーファミリーメンバーで保存される標準システイン対（「Ｂ」および「Ｆ」鎖内）を、赤色の円で強調表示し、一方でＶＩＳＴＡに特異的なシステインを、青色の円で記す。固有なＶＩＳＴＡシステインパターンが、マウス（配列番号１７）、ヒト（配列番号１６）、カンガルー（配列番号１８）、イルカ（配列番号１９）、トリ（配列番号２０）、アフリカツメガエル（配列番号２１）、キンカチョウ（配列番号２２）、ゼブラフィッシュ、およびフグ（配列番号２３）に由来するすべてのオルソログで保存される。
【図２３－２】同上。
【図２４】腫瘍細胞上でのＶＩＳＴＡの過剰発現は、防御的抗腫瘍免疫を克服することを示す。ＶＩＳＴＡまたはＲＦＰ対照タンパク質を過剰発現するＭＣＡ１０５腫瘍細胞を、レトロウイルス形質導入により生成し、均一性で分類した。防御的免疫を生成するために、ナイーブマウスに、左脇腹の皮下に、照射したＭＣＡ１０５腫瘍細胞をワクチン接種した。（Ａ）ワクチン接種したマウスを、１４日後に、右脇腹の皮下に、生ＭＣＡ１０５ＶＩＳＴＡまたはＭＣＡ１０５ＲＦＰ腫瘍細胞でチャレンジした。腫瘍成長を２日毎に監視した。腫瘍寸法は、平均±標準誤差として示す。３回の独立した反復からの代表的な結果を示す。（Ｂ）ワクチン接種したマウスは、未処理であったか、または生腫瘍チャレンジの前にＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の両方がモノクローナル抗体によって枯渇されたかのいずれかであった。腫瘍寸法を、Ａにあるように監視し、平均±標準誤差として示す。２回の独立した反復からの代表的な結果を示す。すべての実験について、比率は、１群あたりのマウス合計数中の腫瘍保持マウスの数を示す。統計学的差異（ｐ－値）を、対応のないマンホイットニー試験で評価した。
【図２５－１】図２５Ａ～Ｆは、特異的モノクローナル抗体を用いたＶＩＳＴＡ封鎖が、インビトロおよびインビボでＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答を強化したことを示す。（Ａ）モノクローナル抗体クローン１３Ｆ３は、インビトロでＶＩＳＴＡ媒介性抑制を中和する。Ａ２０－ＲＦＰおよびＡ２０－ＶＩＳＴＡ細胞を使用して、同族ＯＶＡペプチドの存在下で、ＣＦＳＥで標識したＤＯ１１．１０ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を刺激した。２０μｇ／ｍｌのＶＩＳＴＡ特異的モノクローナル抗体１３Ｆ３または対照Ｉｇを、示されるように添加した。ＣＦＳＥ希釈物を、７２時間後に分析し、ＣＦＳＥ^{low}細胞の割合を、平均±標準誤差として示す。二連のウェルを、すべての条件について分析した。ナイーブ脾細胞から分類された（ＢおよびＣ）総ＣＤ１１ｂ^{hi}骨髄性細胞（Ｂ）またはＣＤ１１ｂ－ＣＤ１１ｃ$^{-}$単球（Ｃ）およびＣＤ１１ｂ^{hi}ＣＤ１１ｃ$^{+}$骨髄性ＤＣ（Ｄ）を照射し、これらを使用して、ＯＶＡペプチドの存在下で、ＣＦＳＥで標識したＯＴ－ＩＩトランスジェニックＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を刺激した。細胞増殖は、７２時間の培養期間の最後の８時間に滴定チミジンを組み込むことによって測定し、平均±標準誤差として示す。三連のウェルを、すべての条件において分析した。
【図２５－２】同上。
【図２６】ＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ２ａが、実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）（多発性硬化症のモデル）の進行を低減させることを示す。マウスを、１７５μｇのＭＯＧ／ＣＦＡ

および百日咳毒素（ＰＴ）３００ｎｇ（０日目、２日目）で固定し、活性なＥＡＥを誘導した。１４、１７、および２０日目に、１５０μｇのＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ　２ａ（ｎ＝８）または１５０μｇの対照ＩｇＧ２ａ（ｎ＝８）を投与した。データを、平均±標準誤差として示す。

【図２７】実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）進行に対するＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ１およびＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ２ａの治療効果を示す。マウスを、１７５μｇのＭＯＧ／ＣＦＡおよび百日咳毒素（ＰＴ）３００ｎｇ（０日目、２日目）で固定し、活性なＥＡＥを誘導した。６日目に、マウスを、１週間当たり３用量の１５０μｇの対照ＩｇＧ１（ｎ＝３）、１５０μｇの対照ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）、１５０μｇのｍＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ１（ｎ＝３）、または１５０μｇのｍＶＩＳＴＡ　ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）で処置した（合計２週間）。データを、平均±標準誤差として示す。

【図２８】実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）進行に対するＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ２ａ融合タンパク質の治療効果を示す。マウスを、１７５μｇのＭＯＧ／ＣＦＡおよび百日咳毒素（ＰＴ）３００ｎｇ（０日目、２日目）で固定し、活性なＥＡＥを誘導した。１４日目に、マウスを、１週間当たり３用量のＰＢＳ（ｎ＝６）、１００μｇの対照ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）、３００μｇの対照ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）、１００μｇのＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）、または３００μｇのｍＶＩＳＴＡ　ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）で処置した（合計２週間）。データを、平均±標準誤差として示す。

【図２９】健常ヒト組織をｃＤＮＡ組織パネル（Ｏｒｉｇｅｎｅ）のリアルタイムＰＣＲ分析によって試験した、ＶＩＳＴＡの発現を示す。（Ａ）ＶＩＳＴＡは、造血組織または著しい数の造血組織を含有する組織において優勢に発現した。これは、免疫関連機能におけるＶＩＳＴＡの重要性と一致する。（Ｂ）発現の発現パターンは、ＶＩＳＴＡの最も近い相同体であるＰＤ－Ｌ１のものと類似の傾向に従うことがわかった。

【図３０】単球、樹状細胞における、ならびにおおよそ２０％のＣＤ４およびＣＤ８Ｔ細胞による、ＶＩＳＴＡタンパク質の発現を図示する（図３０）。ＶＩＳＴＡ発現は、血中単球の「巡回性」（ＣＤ１４^{dim}ＣＤ１６$^{+}$）サブセットおよび「炎症性」（ＣＤ１４$^{+}$ＣＤ１６$^{+/-}$）サブセットの両方において、ならびに樹状細胞のリンパ球サブセットおよび骨髄サブセットの両方において観察された。

【図３１】バルク精製したＣＤ４（図３１Ａ）およびＣＤ８（図３１Ｂ）Ｔ細胞のＣＦＳＥ希釈物の抑制を示す。ＶＩＳＴＡの細胞外ドメインおよびＦｃ受容体結合の低下のために突然変異を含むヒトＩｇＧのＦｃ領域からなるＩｇ融合タンパク質を作成した。１０μｇ／ｍｌのＶＩＳＴＡ－Ｉｇまたは対照Ｉｇを、２．５μｇ／ｍｌの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）とともにプレートに固定し、次いで、増殖を、ＣＦＳＥ希釈によって測定した。

【図３２】より高い濃度のＯＫＴ３が、より高い濃度のＶＩＳＴＡによって克服され得ることを示した、異なる濃度のＯＫＴ３にわたるヒトＶＩＳＴＡ－ＩｇおよびヒトＶＩＳＴＡ－Ｉｇの滴定を示す（図３２Ａおよび３２Ｂ）。

【図３３－１】図３３Ａ～Ｃは、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇの存在下または不在下での活性化の後に試験した細胞の状態を示す。２日間の培養中に、抗ＣＤ３による初期活性化マーカーＣＤ２５およびＣＤ６９の上方制御が、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇによって遮断された（図３３Ａおよび３３Ｂ）。同様に、５日間の培養後、抗原経験を示すＣＤ４５ＲＡの発現からＣＤ４５ＲＯへの偏移が防止された（図３３Ｃ）。ＶＩＳＴＡは、細胞生存に影響を有さなかった。図３４Ｄは、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇが、ＦｏｘＰ３変換を増加させたことを示す。

【図３３－２】同上。

【図３４】細胞を２日間抗ＣＤ３およびＶＩＳＴＡ－Ｉｇ上で培養し、次いで、３日間抗ＣＤ３単独に移した、ＶＩＳＴＡによって誘導された抑制を示す。このさらなる刺激は、抑制を救出することができなかった（図３４Ａおよび３４Ｂ）。

【図３５】ＶＩＳＴＡ－Ｉｇが、ＣＤ４（図３５Ａ）およびＣＤ８（図３５Ｂ）Ｔ細胞によるＩＬ－１０、ＴＮＦα、およびＩＦＮγの産生を有意に低減させ、ＩＬ－１７産生における軽度の減少傾向があったことを示す。

【図３６】抗ＣＤ２８アゴニスト性抗体は、Ｔ細胞に対して強力な共刺激を提供し、ＶＩ

ＳＴＡ抑制にチャレンジするために培養物中に滴定した（図３６Ａ～Ｃ）。
【図３７】ＶＩＳＴＡ　ｍＡｂ処理は、腫瘍成長を低減させた。マウスに、Ａ．ＭＢ４９、Ｂ．ＭＣＡ１０５、Ｃ．ＥＧ７腫瘍細胞、Ｄ．ＩＤ８－ルシフェラーゼ、Ｅ．Ｂ１６Ｆ１０を注入した。マウスを、０日目（Ａ～Ｄ）または２日目（Ｅ）で開始して、１日おきにＶＩＳＴＡ　ｍＡｂ　１３Ｆ３（３００μｇ）で処理した。ＰＤ－Ｌ１　ｍＡｂ（ＭＩＨ５）もまた、Ｂ１６Ｆ１０に投与した。皮下腫瘍成長を、キャリパーを用いて監視し、mm^2として記録した。腹腔内ＩＤ８－ルシフェラーゼ腫瘍については、Ｘｅｎｏｇｅｎ　ＩＶＩＳを使用して、３０日目および５５日目にマウスを撮像した。ＭＢ４９　ＥＬＩＳＰＯＴ分析（Ａ）については、腫瘍流入領域リンパ節細胞を、照射した腫瘍細胞で刺激した。
【図３８】ヒト固有層ＤＣは、ＶＩＳＴＡａを発現する。健常な結腸から単離したＬＭＰＣを、ビオチン複合化抗ヒトＶＩＳＴＡ（抗体クローンＧＡ１）で染色して、Ｌｉｎ－ＨＬＡ－ＤＲ＋ＬＰ樹状細胞におけるＶＩＳＴＡ発現を特定した。
【図３９】Ｖｉｓｔａ－Ｉｇは、ヒトＣＤ４Ｔ細胞を抑制する。ＣＦＳＥ標識したヒトＣＤ４Ｔ細胞を、プレートに結合した抗ＣＤ３（２．５μｇ／ｍｌ）およびＶＩＳＴＡ－Ｉｇ（示される濃度）で刺激した。（Ａ）代表的なＣＦＳＥ希釈プロファイル。（Ｂ）ＣＦＳＥ－ｌｏｗ細胞の割合を定量し、平均±標準誤差として示す。
【図４０】ＶＩＳＴＡは、ＰＤ－Ｌ１／ＰＤ－１経路と協働して作用する。Ａ．αＶＩＳＴＡとαＰＤ－Ｌ１　ｍＡｂとのコンビナトリアル治療（＋４日目）は、Ｂ１６Ｆ１０腫瘍成長を阻害した。Ｂ．インビトロ相乗性：ＶＩＳＴＡ－ＩｇおよびＰＤ－Ｌ１－Ｉｇを、αＣＤ３／ＣＤ２８と一緒に固定して、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋ナイーブＴ細胞を刺激した。細胞増殖を、７２時間で、ＣＦＳＥ希釈によって評価した。Ｃ．Ｂ１６Ｆ１０腫瘍のＴＭＥ内でのＰＤ－Ｌ１およびＶＩＳＴＡの差次的発現パターン。ＶＩＳＴＡは、腫瘍浸潤白血球（ＴＩＬ）上にのみ発現するが、一方でＰＤ－Ｌ１は、腫瘍細胞およびＴＩＬの両方に発現する。
【図４１】αｈ　ＶＩＳＴＡ　ｍＡｂでの骨髄性細胞上のＶＩＳＴＡの検出。ＰＢＬを、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇの不在下（上）または存在下（下）で染色して、特異性を確認した。
【発明を実施するための形態】
【００９７】
Ｔ細胞活性化のＶドメインＩｇ抑制因子（ＶＩＳＴＡ）と指定され、マウスにおける防御的抗腫瘍免疫の破壊に重要な役割を果たす、新規な阻害性リガンドを発見した（１）。ＶＩＳＴＡは、ＰＤＬ１に対して限定された相同性を有し、ＰＤ－１から独立して、未知の受容体を介してＴ細胞活性化を決定的に抑制する。ＶＩＳＴＡ　ＫＯマウスは、炎症性表現型を呈し、末梢寛容の維持におけるＶＩＳＴＡの重要な役割を示す。ＶＩＳＴＡは、腫瘍内微小環境（ＴＭＥ）に高度に発現され、最適な抗腫瘍免疫の生成を直接障害させる。ＶＩＳＴＡ　ｍＡｂに媒介される封鎖は、複数のマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍成長を有意に抑制した。
【００９８】
これらの発見に基いて、ＶＩＳＴＡが腫瘍浸潤白血球上に発現し、この発現がＴＭＥにおけるＴ細胞応答を抑制するという仮説を立てる。本出願は、マウスモデルにおける既存のＶＩＳＴＡ研究を、ヒト患者に拡張する。具体的には、本出願は、患者試料におけるＶＩＳＴＡ発現の検討、およびこれがＴ細胞機能にどのように影響するかについての試験に関して、さらに説明する。それに基づいて、ＶＩＳＴＡの阻害は、（機能的に関連するタンパク質ＣＴＬＡ－４およびＰＤ－Ｌ１での成功と同様に）癌の治療に使用することができる。別の態様において、本開示は、この目的で開発するのに好適な遮断抗体を特定する方法を提供する。
【００９９】
別の態様において、本発明は、活性を調節する方法、および／または特定の制御性Ｔ細胞タンパク質に特異的に結合するか、もしくはその対抗受容体との結合を遮断する方法に関する。ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡと指定されるこのタンパク質は、新規な構造的に異

なるＩｇ－スーパーファミリー阻害性リガンドであり、その細胞外ドメインは、Ｂ７ファミリーリガンドＰＤ－Ｌ１に対する相同性を有する。この分子は、本明細書において互換的に、ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ、またはＴ細胞活性化のＶドメイン免疫グロブリン抑制因子（ＶＩＳＴＡ）と称される。ＶＩＳＴＡは、主に造血コンパートメント内で発現し、骨髄性ＡＰＣおよびＴ細胞上では高度に制御される。ＶＩＳＴＡ阻害性経路の治療介入は、広範な癌の治療のためにＴ細胞媒介性免疫を調節するための興味深いアプローチを表す。

【０１００】

本発明は、具体的に、結腸直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、および黒色腫を含む、特定の癌を治療するためのＶＩＳＴＡまたはＰＤ－Ｌ３に特異的な抗体の使用に関する。

【０１０１】

以下に開示されるように、ＶＩＳＴＡの発現は、造血コンパートメントに限定的であると見られ、このタンパク質は、成熟骨髄性細胞（ＣＤ１１ｂ^{bright}）上で高度に発現し、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、Ｔ^{reg}、およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞上では発現レベルが低い。ＡＰＣ上での可溶性ＶＩＳＴＡタンパク質、例えば、可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、またはＶＩＳＴＡの発現は、インビトロでのＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖、ならびにサイトカイン産生を抑制する。抗ＶＩＳＴＡ抗体、例えば、抗ＶＩＳＴＡ　ｍａｂ（１３Ｆ３）が、インビトロでＶＩＳＴＡ$^{+}$ＡＰＣによるＴ細胞応答のＶＩＳＴＡ誘導性抑制を遮断したことも観察される。また、抗ＶＩＳＴＡ　ｍａｂが、ＥＡＥを悪化させ、インビボで脳炎誘発性Ｔｈ１７の頻度を増加させたことも発見された。なおもさらに、以下に詳細に開示されるように、抗ＶＩＳＴＡ　ｍａｂが、複数（４つ）の腫瘍モデルにおいて腫瘍寛解を誘導することが発見された。これらのモデルにおける骨髄系由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）上でのＶＩＳＴＡの発現は、非常に高度であり、ＶＩＳＴＡ$^{+}$ＭＤＳＣが、腫瘍特異的免疫を抑制することを示唆する。本明細書に示されるように、ＶＩＳＴＡは、インビトロおよびインビボの両方で、マウスおよびヒト（インビトロのみ）において、Ｔ細胞上で免疫抑制活性を発揮し、自己免疫の発達および癌に対する免疫応答の制御における重要なメディエーターである。具体的には、データは次のことを示す：

【０１０２】

（１）ＶＩＳＴＡは、Ｉｇスーパーファミリーの新しいメンバーであり、ＰＤ－Ｌ１にわずかな配列類似性を有するＩｇ－Ｖドメインを含有する。Ｉｇ融合タンパク質として産生される場合、または人工的なＡＰＣ上で過剰発現される場合、ＶＩＳＴＡは、マウスおよびヒトＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖、ならびにサイトカイン産生の両方を阻害することを、本明細書に開示する。

【０１０３】

（２）骨髄性ＡＰＣでのＶＩＳＴＡ発現は、インビトロでＴ細胞応答に対して阻害性である。

【０１０４】

（３）腫瘍内微小環境におけるＭＤＳＣ上でのＶＩＳＴＡ発現は、極めて高度である。多数の細胞表面分子の表現型および機能の分析が、ＭＤＳＣに媒介されるＴ細胞の抑制に関与することが既に示唆されている：ＣＤ１１５、ＣＤ１２４、ＣＤ８０、ＰＤ－Ｌ１、およびＰＤ－Ｌ２は、ＭＤＳＣによって発現されたが、ＭＤＳＣと免疫抑制活性を欠く腫瘍を有さないマウスに由来する細胞との間に、それらの発現レベルまたは陽性細胞の割合に差は見られなかった。したがって、ＶＩＳＴＡが、ＭＤＳＣ上の主要なＢ７の負の制御因子であろうことを予測する。

【０１０５】

（４）抗体に媒介されるＶＩＳＴＡの封鎖は、自己腫瘍に対する防御的免疫を誘導する。

【０１０６】

それに基づいて、ＶＩＳＴＡは、防御的抗腫瘍免疫の発達を妨害するＭＤＳＣ上の優性な負の免疫制御性分子であると考えられる。したがって、この分子の活性を抗ＶＩＳＴＡ

抗体で遮断することは、ヒトおよび他の哺乳動物における防御的抗腫瘍免疫の発達を可能にするであろう。

【０１０７】

したがって、本発明は、ＶＩＳＴＡ細胞外ドメインまたはそのフラグメントの複数のコピーと、ＶＩＳＴＡ結合剤、例えば、小分子および抗体またはそのフラグメントと、を含み、免疫調節剤としてＶＩＳＴＡに結合するか、またはその活性を調節（作動もしくは拮抗）する、様々な癌、例えば、結腸直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、およびリンパ腫、自己免疫疾患、アレルギー、感染症、ならびに炎症性状態、例えば、多発性硬化症および関節炎の治療のための、可溶性ＶＩＳＴＡタンパク質、例えば、融合タンパク質および多量体ＶＩＳＴＡタンパク質を使用する方法に関する。

【０１０８】

以下に詳細に記載されるように、ＶＩＳＴＡは、新規な阻害性リガンドであり、その細胞外Ｉｇ－Ｖドメインは、２つのＢ７ファミリーリガンド、すなわちプログラム死リガンド１および２（ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２）に対する相同性を有し、固有の配列特性、ならびにインビトロおよびインビボにおいてＡＰＣおよびＴ細胞のサブセット上で独特の発現パターンを呈する（これが、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡを他のＢ７ファミリーリガンドと区別する）。このタンパク質は、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖および分化対する機能的影響を有することが示されている（ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖、ならびにサイトカイン産生を抑制する）。その発現パターンおよびＴ細胞に対する阻害性影響に基づいて、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡは、Ｔ細胞と骨髄系由来のＡＰＣとの間の同族相互作用の際にＴ細胞応答を負に制御する制御性リガンドとして機能するとみられる。

【０１０９】

ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡは、Ｂ７ファミリーリガンドのメンバーと見られるが、他のＢ７ファミリーリガンドとは異なり、この分子は、Ｉｇ－Ｃドメインを有さずにＩｇ－Ｖドメインのみを含有し、系統発生学的には、Ｂ７ファミリー受容体プログラム死－１（ＰＤ－１）により近似する。それに基づいて、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ、およびそれに特異的なアゴニストもしくはアンタゴニストは、Ｔ細胞活性化および分化の制御、ならびにより広義には、免疫応答を制御する制御性ネットワークの調節に使用され得る。特に、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡタンパク質およびＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡアゴニストまたはアンタゴニストは、好ましくは、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡに特異的な抗体は、自己免疫、炎症性応答および疾患、アレルギー、癌、感染性疾患、ならびに移植における免疫応答の調節に有用である。

【０１１０】

したがって、本発明は、インビボでＶＩＳＴＡを調節する、配列番号１または３に特異的にハイブリダイズする遺伝子によってコードされる、配列番号２、４、もしくは５に記載されるヒトもしくはマウスＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡポリペプチド、またはそのオルソログ、もしくはフラグメントに、少なくとも７０～９０％同一である、アミノ酸配列を含む、単離可溶性ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡタンパク質または融合タンパク質、例えば、可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質または多量体ＶＩＳＴＡタンパク質と、薬学的に許容される担体と、を含む、例えば、治療、診断、または免疫調節用途のための、組成物に部分的に関する。いくつかの実施形態において、可溶性または多量体ＶＩＳＴＡタンパク質は、直接的もしくは間接的に異種（非ＶＩＳＴＡ）タンパク質に連結され得るか、または（例えば、トランスフェクトした免疫細胞、例えばＴ細胞）を含有するウイルスベクターもしくは細胞によって発現され得る。

【０１１１】

本発明はまた、配列番号２、４、もしくは５に記載されるヒトもしくはマウスＶＩＳＴＡアミノ酸配列、またはそのフラグメントもしくはオルソログに少なくとも７０～９０％同一であるＶＩＳＴＡタンパク質をコードする単離核酸を含み、Ｉｇポリペプチド、例えば、Ｆｃ領域またはレポーター分子といった別のタンパク質をコードする配列に任意に融合される、発現ベクター、および当該ベクターを含有する宿主細胞を提供する。

【０１１２】
本発明はまた、具体的には、配列番号２、４、もしくは５に記載されるアミノ酸配列、またはその変異体、フラグメント、もしくはオルソログを含む、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡタンパク質に特異的に結合する、単離結合剤、好ましくは、抗体または抗体フラグメントに関する。好ましい実施形態において、結合剤は、インビトロまたはインビボでＶＩＳＴＡ活性を調節（作動または拮抗）する。最も好ましい実施形態において、結合剤は、アゴニスト性またはアンタゴニスト性抗体である。
【０１１３】
本発明は、免疫細胞の応答が調節されるように、一次シグナルの存在下で、インビトロまたはインビボで免疫細胞と、ＶＩＳＴＡタンパク質またはそれに特異的な結合剤とを接触させることによって、免疫細胞応答を調節するための方法をさらに提供する。（ＶＩＳＴＡまたはその調節剤の相互作用は、免疫細胞にシグナルを伝送し、免疫応答を制御する。ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡタンパク質は、骨髄性樹状細胞（ＤＣ）およびマクロファージを含む骨髄性抗原提示細胞において高度に発現し、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞上では低密度で発現する。免疫活性化により、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ発現は、骨髄性ＡＰＣでは上方制御されるが、ＣＤ４＋Ｔ細胞では下方制御される）。したがって、本発明のＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ核酸およびポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストまたはアンタゴニストは、例えば、免疫応答の調節に有用である。
【０１１４】
加えて、ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡポリペプチド（もしくはその生物学的に活性な部分）またはＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ分子の調節剤、すなわち、前述の方法を用いて選択されるもの等である抗体は、薬学的に許容される担体を任意に含む、薬学的組成物に組み込まれ得る。
【０１１５】
本発明の方法に従って活性化された免疫細胞は、次いで、エキソビボで増殖され、種々の疾患の治療または防止に使用され得る；例えば、インビトロでクローニングされ、増殖されたヒトＴ細胞は、それらの制御性活性を維持する（Ｇｒｏｕｘ，ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ　３８９（６６５２）：７３７－４２）。増殖の前に、Ｔ細胞源は、対象（例えば、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、またはそれらのトランスジェニック種等の哺乳動物）から得られる。Ｔ細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、脾臓組織、腫瘍、またはＴ細胞株を含む、多数の源から得ることができる。Ｔ細胞は、ｆｉｃｏｌｌ（商標）分離といった当業者に既知の多数の技術を使用して対象から採取した血液単位から得ることができる。別の態様において、本発明は、ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ核酸分子、タンパク質、またはポリペプチドの存在が生体試料中で検出されるように、生体試料と、ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ核酸分子、タンパク質、またはポリペプチドを検出することができる薬剤とを接触させることによって、生体試料中のＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ核酸分子、タンパク質、またはポリペプチドの存在を検出するための方法を提供する。このＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ発現を使用して、癌性部位を含む、ある特定の疾患部位を検出することができる。
【０１１６】
別の態様において、本発明は、細胞におけるＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ活性が調節されるように、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡを発現することができる細胞と、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ活性を調節する薬剤、好ましくは抗ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ抗体とを接触させることを含む、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ活性を調節するための方法を提供する。一実施形態において、この薬剤は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ活性を阻害する。別の実施形態において、この薬剤は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ活性を刺激する。さらなる実施形態において、この薬剤は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡポリペプチドとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を妨害するか、または強化する。一実施形態において、この薬剤は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡポリペプチドに特異的に結合する抗体である。別の実施形態において、この薬剤は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡポリペプ

チドに結合するペプチド、ペプチド模倣体、または他の小分子である。

【０１１７】

さらに別の実施形態において、この薬剤は、ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ遺伝子の転写、ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡの翻訳、またはＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡポリペプチドの翻訳後修飾を調節することによって、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の発現を調節する。別の実施形態において、この薬剤は、ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡまたはＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ遺伝子のコード鎖に対してアンチセンスであるヌクレオチド配列を有する核酸分子である。

【０１１８】

一実施形態において、本発明の方法を使用して、異常な、不十分な、または望ましくないＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡポリペプチドまたは核酸の発現または活性を特徴とする障害または状態を有する対象を、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ調節剤である薬剤を対象に投与することによって治療することができる。１つの好ましい実施形態において、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ調節剤は、以下に記載されるＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡポリペプチド、好ましくは、可溶性融合タンパク質もしくは多量体ＶＩＳＴＡタンパク質、または抗ＶＩＳＴＡ抗体である。別の実施形態において、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ調節剤は、例えばアデノウイルスベクター中の、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ核酸分子である。別の実施形態において、本発明は、免疫応答を調節する追加の薬剤を用いて対象を治療することをさらに提供する。

【０１１９】

さらに別の実施形態において、本発明は、抗原と、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ活性を調節（強化または阻害）する薬剤とを含む、ワクチンを提供する。好ましい実施形態において、ワクチンは、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する。

【０１２０】

別の態様において、本発明は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ活性を有するＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡポリペプチドを含む指標組成物を提供し、この指標組成物と試験化合物とを接触させ、指標組成物におけるＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ活性に対する試験化合物の作用を判定して、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡポリペプチドの活性を調節する化合物を特定することによって、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドに結合するか、またはその活性を調節する、化合物を特定するための方法を提供する。

【０１２１】

一態様において、本発明は、免疫細胞上でのＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用が調節されるように、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡを発現する抗原提示細胞と、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡの形態からなる群から選択される薬剤またはＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を調節する薬剤とを接触させることを含む、免疫細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を調節するための方法を特徴とする。好ましい実施形態において、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を調節する薬剤は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡに特異的に結合する抗体である。一実施形態において、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用は、上方制御される。別の実施形態において、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用は、下方制御される。一実施形態において、本方法は、免疫細胞または抗原提示細胞と、免疫応答を調節する追加の薬剤と、を接触させることをさらに含む。

【０１２２】

一実施形態において、接触のステップは、インビトロで行われる。別の実施形態において、接触のステップは、インビボで行われる。一実施形態において、免疫細胞は、Ｔ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、Ｂ細胞、および骨髄性細胞からなる群から選択される。

【０１２３】
別の態様において、本発明は、免疫細胞活性化が阻害または増加されるように、細胞におけるＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡの活性または発現を増加または阻害することを含む、免疫細胞における活性化を阻害または増加させるための方法に関する。
【０１２４】
さらに別の実施形態において、本発明は、抗原と、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する薬剤と、を含む、ワクチンに関する。
【０１２５】
別の態様において、本発明は、免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態が治療されるように、対象の免疫細胞上でのＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する薬剤を投与することを含む、免疫応答の上方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための方法に関する。１つの好ましい実施形態において、この薬剤は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡに結合し、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を阻害する、遮断抗体または小分子を含む。別の実施形態において、本方法は、免疫応答を上方制御する第２の薬剤を対象に投与することをさらに含む。別の態様において、本発明は、免疫応答の下方制御により利益を得るであろう状態が治療されるように、対象の免疫細胞上でのＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を刺激する薬剤を投与することを含む、免疫応答の下方制御により利益を得るであろう状態を有する対象を治療するための方法に関する。
【０１２６】
例えば、ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡタンパク質または結合剤で治療される状態は、腫瘍、病原体感染、炎症性免疫応答もしくは状態、好ましくはあまり顕著でない炎症性状態、または免疫抑制疾患からなる群から選択される。具体的な例には、多発性硬化症、甲状腺炎、リウマチ性関節炎、ＩＩ型およびＩ型糖尿病、ならびに結腸直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、黒色腫、肺癌等の転移性癌、または他の癌を含む、癌（進行期または初期形態の両方）が挙げられ、ここで、ＶＩＳＴＡは、有効な抗腫瘍応答を抑制する。いくつかの場合において、個体は、抗ＶＩＳＴＡ抗体またはＶＩＳＴＡ融合タンパク質をコードする核酸を発現する細胞またはウイルスベクターを投与され得る。
【０１２７】
本発明によるＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡタンパク質、結合剤、またはＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡアンタゴニストもしくはアゴニストを用いて治療可能な例示的な状態には、例として、移植、アレルギー、感染性疾患、癌、および炎症性もしくは自己免疫疾患、例えば、炎症性免疫障害が挙げられる。前述のものの具体的な例には、１型糖尿病、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス、リウマチ性疾患、アレルギー性障害、喘息、アレルギー性鼻炎、皮膚障害、クローン病および潰瘍性大腸炎等の胃腸障害、移植片拒絶、連鎖球菌感染後および自己免疫性腎不全、敗血症性ショック、全身性炎症応答症候群（ＳＩＲＳ）、成人性呼吸促迫症候群（ＡＲＤＳ）、および毒物注入；自己炎症性疾患、ならびに骨関節炎、結晶性関節炎、および包炎を含む変形性骨関節疾患、ならびに他の関節症が挙げられる。さらに、本方法および組成物は、腱炎、靭帯炎、および外傷性関節傷害を治療するために使用することができる。
【０１２８】
好ましい実施形態において、本主題のＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡタンパク質、核酸、およびＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡに特異的なリガンド、好ましくは、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ機能に対する所望の作用を有する抗体を使用して、癌、自己免疫疾患、アレルギー、炎症性障害もしくは感染症、ならびにより具体的には、免疫系障害、例えば、重度の複合免疫不全、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、Ｉ型真性糖尿病、リンパ球増殖性症候群、炎症性腸疾患、アレルギー、喘息、移植片対宿主病、および移植片拒絶、細菌およびウイルスといった感染病原体に対する免疫応答、ならびにリンパ腫および白血病

）といった免疫系の癌といった状態を治療することができる

【０１２９】

上述の感染因子および寄生因子に加えて、非感染因子に対する望ましい強化された免疫原性のための別の分野は、癌を含むがこれに限定されない増殖不全疾患の分野に含まれ、ここで、癌抗原を発現する細胞は、望ましくは体外に排出される。本発明の組成物および方法に使用され得る腫瘍抗原には、前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）、乳癌抗原、膀胱癌抗原、卵巣癌抗原、精巣癌抗原、黒色腫抗原、結腸直腸癌抗原、テロメラーゼ；Ｐ－糖タンパク質等の多剤耐性タンパク質；ＭＡＧＥ－１、αフェトタンパク質、癌胎児性抗原、突然変異体ｐ５３、パピローマウイルス抗原、ガングリオシド、または黒色腫もしくは他の腫瘍細胞の他の炭水化物含有成分が挙げられるが、これらに限定されない。任意の種類の腫瘍細胞に由来する抗癌が、本明細書に記載される組成物および方法に使用され得ることが、本明細書によって企図される。抗原は、癌細胞、または癌細胞から単離された免疫原性材料、例えば膜タンパク質であり得る。サバイビンおよびテロメラーゼ普遍的抗原、および癌精巣抗原のＭＡＧＥファミリーが、含まれる。自己免疫に関与することが示されており、本発明の方法において寛容を誘導するために使用することができる抗原には、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質、および多発性硬化症のプロテオリピドタンパク質、およびリウマチ性関節炎のＣＩＩコラーゲンタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３０】

定義

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者によって通常理解されるもの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、本発明に使用され得るが、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、および例は、例示に過ぎず、限定的であることは意図されない。

【０１３１】

本明細書および以下の特許請求の範囲全体で使用される際、「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、文脈により別途指定されない限り、複数形の言及を含む。

【０１３２】

「癌」および「癌性」という用語は、典型的に、制御されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか、または説明する。癌の例としては、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。そのような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）または胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ ｃａｎｃｅｒ）（消化管癌を含む）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（ｋｉｄｎｅｙ ｃａｎｃｅｒ）または腎臓癌（ｒｅｎａｌ ｃａｎｃｅｒ）、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、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、高悪性度免疫芽細胞性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非開裂細胞性ＮＨＬ、巨大病変性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、および、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、有毛細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、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。

【０１３３】

本発明により治療に適した例示的な癌には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病、またはリンパ系悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。そのような癌のより具体的な例としては、結腸直腸癌、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）または胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）（消化管癌を含む）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（ｋｉｄｎｅｙ　ｃａｎｃｅｒ）または腎臓癌（ｒｅｎａｌ　ｃａｎｃｅｒ）、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、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、高悪性度免疫芽細胞性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非開裂細胞性ＮＨＬ、巨大病変性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、および、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、有毛細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、多発性骨髄腫、および移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ）、ならびに母斑症と関連する異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍と関連するもの等）、およびメイグス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、カポジ肉腫、カルチノイド癌腫、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、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、早期または進行期（転移性）膀胱癌、卵巣癌、または黒色腫である。別の実施形態において、癌は、結腸直腸癌である。本発明の治療に適した癌性状態には、転移性癌が含まれ、骨髄系由来サプレッサー細胞によるＶＩＳＴＡ発現が、抗腫瘍応答および抗浸潤免疫応答を抑制する。本発明の方法は、血管新生腫瘍の治療に特に好適である。

【０１３４】

本発明はまた、化学療法もしくは放射線療法または他の生物製剤と組み合わせて、癌、すなわち、骨髄系由来サプレッサー細胞によるＶＩＳＴＡ発現が抗腫瘍応答および化学療法もしくは放射線療法の有効性または生物学的有効性を抑制する個体における癌の治療、およびそれらの活性の強化に好適である。抗癌活性を呈する任意の化学療法剤を、本発明に従って使用することができる。好ましくは、化学療法剤は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体、および関連阻害剤、ビンカアルカロイド、エピポドピロトキシン（ｅｐｉｐｏｄｏｐｙｙｌｌｏｔｏｘｉｎ）、抗生物質、Ｌ－アスパラギナーゼ、トポイソメラーゼ阻害剤、インターフェロン、白金配位錯体、アントラセンジオン置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制物質、副腎皮質ステロイド、プロゲスチン、エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン、およびゴナドトロピン放出ホルモン類似体からなる群から選択される。より好ましくは、化学療法剤は、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、ロイコボリン（ＬＶ）、イレノテカン（ｉｒｅｎｏｔｅｃａｎ）、オキサリプラチン、カペシタビン、パクリタキセル、およびドセタキセルからなる群から選択される。２つ以上の化学療法剤を、抗ＶＥＧＦ抗体の投与と組み合わせて投与される混合液中に使用することができる。１つの好ましい組み合わせ化学療法は、５－ＦＵと１つ以上の他の化学療法剤（複数可）とを含む、フルオロウラシルに基づくものである。組み合わせ化学療法の好適な投薬レジメンは、当業者に既知であり、例えば、Ｓａｌｔｚ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ　ＡＳＣＯ　１８：２３３ａおよびＤｏｕｉｌｌａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｌａｎｃｅｔ　３５５：１０４１－７に記載されている。生物製剤（ｂｉｌｏｇｉｃ）は、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＣＴＬＡ－４、およびＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＣＴＬＡ－４融合タンパク質に対する抗体、ならびにサイトカイン、成長因子アンタゴニストおよびアゴニスト、ホルモン、および抗サイトカイン抗体といった、別の免疫増強物質であり得る。

【０１３５】

「活性化受容体」は、本明細書に使用される際、抗原、複合抗原（例えば、ＭＨＣ分子との関連で）、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義に指す。活性化受容体は、しかしながら、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受容体に限

定されない。例えば、Ｔ細胞受容体は、Ｔ細胞上に存在し、ＣＤ３分子と会合する。Ｔ細胞受容体は、ＭＨＣ分子との関連で抗原によって（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、膜脂質の変化、イオン流出、環状ヌクレオチドの改変、ＲＮＡ転写の変化、タンパク質合成の変化、および細胞体積の変化をもたらす。例えば、Ｔ細胞受容体は、Ｔ細胞上に存在し、ＣＤ３分子と会合する。Ｔ細胞受容体は、ＭＨＣ分子との関連で抗原によって（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、膜脂質の変化、イオン流出、環状ヌクレオチドの改変、ＲＮＡ転写の変化、タンパク質合成の変化、および細胞体積の変化をもたらす。

【０１３６】

「抗原提示細胞」は、本明細書に使用される際、プロフェッショナル抗原提示細胞（例えば、Ｂリンパ球、単球、樹状細胞、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）を広義に指す。

【０１３７】

「アミノ酸」は、本明細書に使用される際、天然および合成のアミノ酸、ならびに天然のアミノ酸に類似の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を広義に指す。天然のアミノ酸は、遺伝子コードによってコードされるもの、ならびに後に修飾されるアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタミン酸、およびＯ－ホスホセリン）である。アミノ酸類似体は、天然のアミノ酸（すなわち、水素に結合する炭素、カルボキシル基、アミノ基）と同じ基本化学構造を有し、Ｒ基（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）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し得るが、天然のアミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般化学構造とは異なる構造を有するが、天然のアミノ酸と類似の様式で機能する、化合物を指す。

【０１３８】

「アネルギー」または「寛容」は、本明細書に使用される際、活性化受容体に媒介される刺激に対する屈折性を広義に指す。屈折性は、概して、抗原特異的であり、寛容化抗原への曝露が停止した後に持続する。例えば、Ｔ細胞におけるアネルギーは（非応答性とは対照的に）、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のシグナルの不在下で第１のシグナル（Ｔ細胞受容体またはＣＤ－３に媒介されるシグナル）を受容すると、発生する。これらの条件下では、同じ抗原への細胞の再曝露は（再曝露が共刺激性分子の存在下で起こったとしても）、サイトカイン産生不全、したがって、増殖不全をもたらす。アネルギーＴ細胞は、しかしながら、無関係の抗原への応答を増加させ得、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２）とともに培養されると、増殖し得る。例えば、Ｔ細胞アネルギーはまた、ＥＬＩＳＡによって、または指標細胞株を用いた増殖アッセイによって測定すると、Ｔリンパ球によるＩＬ－２産生の欠如によって観察され得る。あるいは、レポーター遺伝子構築物を使用してもよい。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って、またはエンハンサー内に見ることができるＡＰ１配列の多量体によって誘導される、ＩＬ－２遺伝子の転写を開始することができない（Ｋａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５７：１１３４）。共刺激性シグナルの調節は、免疫細胞のエフェクター機能の調節をもたらす。したがって、「ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡ活性」という用語は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡポリペプチドが、その天然の結合パートナー（複数可）に結合する能力、免疫細胞共刺激性または阻害性シグナルを調節する能力、および免疫応答を調節する能力を含む。免疫細胞における阻害性シグナルの調節は、免疫細胞の増殖および／またはそれによるサイトカイン分泌の調節をもたらす。

【０１３９】

「抗体」は、本明細書に使用される際、抗体の「抗原結合部分」（また「抗体部分」、「抗原結合フラグメント」、「抗体フラグメント」と互換的に使用される）、ならびに全抗体分子を広義に指す。「抗原結合部分」という用語は、本明細書に使用される際、抗原（例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３））に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上のフラグメントを指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体のフラグメントによって実行され得る。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される抗原結合フラグメントの例としては、（ａ）Ｆａｂフラグメント、すなわちＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、およびＣＨ１ドメインからなる一価フラグメント、（ｂ）Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、すなわちヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結した２つのＦａｂフラグメントを含む二価フラグメント、（ｃ）ＶＨおよびＣＨ１ドメインからなるＦｄフラグメント、（ｄ）抗体の単一アームのＶＬおよびＶＨドメインからなるＦｖフラグメント、（ｅ）ＶＨドメインからなるｄＡｂフラグメント（Ｗａｒｄ，ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ　３４１：５４４－５４６）、ならびに（ｆ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）が挙げられる。さらに、ＦｖフラグメントのＶＬおよびＶＨは、別個の遺伝子によってコードされるが、これらは、組み換え方法を使用して、それらが単一のタンパク質鎖として作製され得るようにする合成リンカーによって接合され得、ここでＶＬおよびＶＨ領域は、対合して一価分子（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）としても知られるを形成する。例えば、Ｂｉｒｄ，ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－４２６、Ｈｕｓｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：５８７９－５８８３、およびＯｓｂｏｕｒｎ，ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：７７８を参照されたい。一本鎖抗体もまた、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ｓｃＦｖの任意のＶＨおよびＶＬ配列は、完全なＩｇＧ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ｃＤＮＡまたはゲノム配列に連結され得る。ＶＨおよびＶｌはまた、タンパク質化学または組み換えＤＮＡ技術のいずれかを使用して、免疫グロブリンのＦａｂ、Ｆｖ、または他のフラグメントの生成に使用され得る。一本鎖抗体の他の形態、例えば二特異性抗体もまた、包含される。二特異性抗体は、ＶＨおよびＶＬドメインが、単一のポリペプチド鎖に発現する二価の二重特異性抗体であるが、同じ鎖上の２つのドメイン間の対合をもたらすには短すぎるリンカーを使用し、それによって、強制的に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作出する。例えば、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８、Ｐｏｌｊａｋ，ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　２：１１２１－１１２３を参照されたい。

【０１４０】

なおもさらに、抗体またはその抗原結合部分（抗原結合フラグメント、抗体フラグメント、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または非共有結合によって形成される、より大きな免疫付着分子の一部であり得る。免疫付着分子の例には、四量体ｓｃＦｖ分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ　６：９３－１０１）および二価のビオチニル化ｓｃＦｖ分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチド、およびＣ末端ポリヒスチジンタグの使用が挙げられる。Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｍｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．３１：１０４７－１０５８。ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２フラグメント等の抗体部分は、それぞれ、全抗体のパパインもしくはペプシン分解といった、従来的な技術を使用して全抗体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分、および免疫付着分子は、本明細書に記載される標準的な組み換えＤＮＡ技術を使用して得ることができる。

【０１４１】

抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、異種、同種、同系、または、例えばヒト化、キメラといった、それらの修飾形態であり得る。好ましくは、本発明の抗体は、ＶＩＳ

ＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子に特異的または実質的に特異的に結合する。「モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体組成物」という用語は、本明細書に使用される際、抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる１種のみの抗原結合部位を含有する抗体分子の集団を指すが、「ポリクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、特定の抗原と相互作用することができる複数種の抗原結合部位を含有する抗体分子の集団を指す。モノクローナル抗体組成物は、典型的に、それが免疫反応する特定の抗原に対して、単一の結合親和性を示す。

【０１４２】

「抗原」は、本明細書に使用される際、抗体によって結合され得、さらに、その抗原のエピトープに結合することができる抗体を産生するように動物を誘導することができる、分子または分子の部分を広義に指す。抗原は、１つのエピトープを有し得るか、または１つを上回るエピトープを有してもよい。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するが、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。目的とされる特定の抗原に対して強化免疫応答が所望される場合、抗原は、防御的免疫応答が誘発され得る感染性疾患の抗原を含むがこれに限定されず、これらは、例示である。

【０１４３】

「アレルギー性疾患」は、本明細書に使用される際、アレルギー反応を伴う疾患を広義に指す。より具体的には、「アレルギー性疾患」は、アレルゲンが特定される疾患として定義され、ここで、そのアレルゲンへの曝露と病的変化の発症との間には強い相関関係があり、またこの病的変化は、免疫学的機序を有することが実証されている。本明細書において、免疫学的機序とは、白血球が、アレルゲンの刺激に対して免疫応答を示すことを意味する。

【０１４４】

「アンチセンス核酸分子」は、本明細書に使用される際、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）か、ｍＲＮＡ配列に相補的か、または遺伝子のコード鎖に相補的な、ヌクレオチド配列を広義に指す。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。

【０１４５】

「喘息」とは、本明細書に使用される際、炎症、気道狭窄、および吸気した作用物質に対する気道の反応性の増加を特徴とする、呼吸器系の障害を広義に指す。喘息は、アトピー性またはアレルギー性症状と関連することが多いが、そうとは限らない。

【０１４６】

「アポトーシス」は、本明細書に使用される際、当業者に既知の技術を使用して特徴付けられ得る、プログラム細胞死を広義に指す。アポトーシス細胞死は、細胞の断片化に至る細胞収縮、膜ブレブ形成、およびクロマチン凝縮を特徴とし得る。アポトーシスを受けた細胞はまた、ヌクレオソーム間ＤＮＡ開裂の特徴的なパターンを示す。

【０１４７】

「自己免疫」または「自己免疫疾患もしくは状態」は、本明細書に使用される際、個体自身の組織から生じ、それに対する疾患もしくは障害、またはその共分離もしくは顕在化、またはそれによってもたらされる状態を広義に指す。

【０１４８】

「Ｂ細胞受容体」（ＢＣＲ）は、本明細書に使用される際、膜Ｉｇ（ｍＩｇ）とＢ細胞上に見られる他の膜貫通ポリペプチド（例えば、ＩｇαおよびＩｇβ）との間の複合体を広義に指す。ｍｌｇのシグナル伝達機能は、オリゴマーまたは多量体抗原による受容体分子の架橋によって引き起こされる。Ｂ細胞はまた、抗免疫グロブリン抗体によって活性化され得る。ＢＣＲが活性化されると、チロシンリン酸化を含む多数の変化がＢ細胞に発生する。

【０１４９】

「癌」は、本明細書に使用される際、異常および制御されない細胞分裂が悪性の成長ま

たは腫瘍（例えば、制御されない細胞成長）を引き起こすことを特徴とする、任意の新生物性疾患（浸潤性または転移性に関わらない）を広義に指す。

【０１５０】

「キメラ抗体」は、本明細書に使用される際、抗原結合部位（可変領域）が、異なるかもしくは変化したクラス、エフェクター機能、および／もしくは種の定常領域に連結されるように、定常領域またはその一部分が変化、置き換え、もしくは交換される抗体分子、またはキメラ抗体に新しい特性を与える完全に異なる分子、例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物、可変領域もしくはその一部分が、異なるもしくは変化した抗原特異性を有する可変領域に変化するか、それと置き換えられるか、もしくはそれと交換される、抗体分子を広義に指す。

【０１５１】

「コード領域」は、本明細書に使用される際、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義に指し、一方で「非コード領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域（例えば、５’および３’非翻訳領域）を指す。

【０１５２】

「保存的修飾変異体」は、本明細書に使用される際、アミノ酸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は、保存修飾変異体は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を広義に指すか、または核酸がアミノ酸配列をコードしない、本質的に同一の配列を指す。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、保存的修飾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におけるすべての核酸配列もまた、核酸のすべての可能性のあるサイレント変異を示す。当業者であれば、核酸中の各コドン（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唯一のコドンであるＴＧＧを除く）は、機能的に同一の分子を生成するように修飾され得ることを認識するであろう。

【０１５３】

「相補性決定領域」、「超可変領域」、または「ＣＤＲ」は、本明細書に使用される際、抗体の軽鎖または重さ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１つ以上を広義に指す。Ｋａｂａｔ，ｅｔ ａｌ．（１９８７）“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ”Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤを参照されたい。これらの表現には、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、または抗体の三次元構造における超可変ループが含まれる。Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ（１９８７）Ｊ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７。各鎖内のＣＤＲは、フレームワーク領域によって近接近して保持され、他の鎖のＣＤＲとともに、抗原結合部位の形成に寄与する。ＣＤＲ内には、選択アミノ酸が存在し、これらは選択性決定領域（ＳＤＲ）として記載されており、ＣＤＲによって抗体－抗原の相互作用に使用される重要な接触残基を表す。Ｋａｓｈｍｉｒｉ（２００５）Ｍｅｔｈｏｄｓ ３６：２５－３４。

【０１５４】

「対照量」は、本明細書に使用される際、試験マーカー量と比較される、任意の量またはある範囲の量であり得るマーカーを広義に指す。例えば、対照マーカー量は、特定の疾患もしくは状態を有する患者、またはそのような疾患もしくは状態を有さない者におけるマーカーの量であり得る。対照量は、絶対量（例えば、マイクログラム／ｍｌ）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。

【０１５５】

「共刺激性受容体」は、本明細書に使用される際、免疫細胞に共刺激性シグナルを伝送する受容体、、例えば、ＣＤ２８またはＩＣＯＳを広義に指す。本明細書に使用される際

、「阻害性受容体」という用語には、免疫細胞に負のシグナルを伝送する受容体が含まれる。

【０１５６】

「共刺激する」とは、本明細書に使用される際、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性シグナル（「共刺激性シグナル」）を提供する共刺激性分子の能力を広義に指す。例えば、共刺激性シグナルは、（例えば、Ｔ細胞受容体媒介性シグナルを受容したＴ細胞における）サイトカイン分泌をもたらし得る。細胞受容体媒介性シグナルを（例えば、活性化受容体を介して）受容した免疫細胞は、本明細書において「活性化免疫細胞」と称され得る。

【０１５７】

「細胞質ドメイン」は、本明細書に使用される際、細胞の細胞質に広がるタンパク質の部分を広義に指す。

【０１５８】

「診断」は、本明細書に使用される際、病的状態の存在または性質を特定することを広義に指す。診断方法は、それらの感受性および特異性の点において異なる。診断アッセイの「感受性」は、試験が陽性である罹患した個体の割合（「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罹患個体は、「偽陰性」である。罹患しておらず、アッセイにおいて試験が陰性である対象は、「真陰性」と称される。診断アッセイの「特異性」は、１から偽陽性率を差し引いたものであり、ここで、「偽陽性」率は、疾患を有さず、試験が陽性である者の割合（％）として定義される。特定の診断方法は、状態の決定的な診断を提供しない可能性があるが、その方法が診断を助ける肯定的な指標を提供すれば十分である。

【０１５９】

「診断する」とは、本明細書に使用される際、疾患または症状の分類、疾患の重症度の判定、疾患進行の監視、疾患の転帰および／または回復の見込みの予想を広義に指す。「検出する」という用語はまた、前述のもののいずれかを任意に含み得る。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中の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判定することよって影響を受け、ここで、判定されるレベルは、疾患の素因、またはその存在もしくは不在と相関し得る。「対象から得られる生体試料」はまた、対象から物理的に取り出されていない試料を任意で含み得ることに留意されたい。

【０１６０】

「有効量」は、本明細書に使用される際、疾患を治療するために患者に投与する場合に、そのような疾患治療を達成するのに十分である、化合物、抗体、抗原、または細胞の量を広義に指す。有効量は、予防に有効な量、および／または防止に有効な量であり得る。有効量は、低減に有効な量、兆候／症状の発生の防止、兆候／症状の発生の重症度の低減、兆候／症状の発生の排除、兆候／症状の発生の進行の遅延、兆候／症状の発生の進行の防止、および／または兆候／症状の発生の予防の達成に有効な量であり得る。「有効量」は、疾患およびその重症度、ならびに治療される患者の年齢、病歴、易罹患性、および既存の状態に応じて変動し得る。「有効量」という用語は、本発明の目的で「治療有効量」と同義である。

【０１６１】

「細胞外ドメイン」は、本明細書に使用される際、細胞の表面から広がるタンパク質の部分を広義に指す。

【０１６２】

「発現ベクター」は、本明細書に使用される際、原核生物、酵母、真菌、植物、昆虫、および哺乳動物細胞を含む、任意の細胞において、本発明の核酸配列を、インビトロまたはインビボで構成的または誘導可能に発現する目的で、任意の組み換え発現系を広義に指す。この用語には、線形または円形の発現系が含まれる。この用語には、エピソームに留まるかまたは宿主細胞ゲノムに組み込まれる、発現系が含まれる。発現系は、自己複製す

る能力を有し得るか、またはそうでない場合は、すなわち、細胞において一過性発現のみを駆動させる能力を有し得る。この用語には、組み換え核酸の転写に必要な最小限の要素のみを含有する、組み換え発現カセットが含まれる。

【０１６３】

「ファミリー」は、本明細書に使用される際、本発明のポリペプチドおよび核酸分子を広義に指し、共通の構造ドメインまたはモチーフを有し、本明細書に定義される十分なアミノ酸またはヌクレオチド配列相同性を有する、２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、天然または非天然であり得、同じかまたは異なる種のいずれかからであり得る。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、または代替として、非ヒト起源の相同体（例えば、サルポリペプチド）を含有し得る。ファミリーのメンバーまたは、共通の機能的特徴を有し得る。

【０１６４】

「Ｆｃ受容体」（ＦｃＲ）は、本明細書に使用される際、免疫グロブリン分子（Ｉｇ）のＦｃ部分の細胞表面受容体を広義に指す。Ｆｃ受容体は、免疫応答に関与する多くの細胞に見られる。これまでに特定されているヒトＦｃＲの中には、ＩｇＧ（ＦｃγＲと指定される）、ＩｇＥ（ＦｃεＲ１）、ＩｇＡ（ＦｃαＲ）、およびポリマー化ＩｇＭ／Ａ（ＦｃμαＲ）を認識するものがある。ＦｃＲは、次の細胞型に見出される：ＦｃεＲＩ（肥満細胞）、ＦｃεＲＩＩ（多くの白血球）、ＦｃαＲ（好中球）、およびＦｃμαＲ（腺上皮、肝細胞）。Ｈｏｇｇ（１９８８）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ９：１８５－８６。広く研究されているＦｃγＲは、細胞免疫防御の中心であり、炎症メディエーターの放出の刺激および自己免疫疾患の病因に関与する加水分解酵素に関与する。Ｕｎｋｅｌｅｓｓ（１９８８）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：２５１－８７。ＦｃγＲは、マクロファージ／単球、多形核白血球、およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞ＦｃγＲが、ＩｇＧによって媒介される特異的認識の要素を与えるため、エフェクター細胞とＩｇを分泌するリンパ球との間に非常に重要な連結を提供する。ヒト白血球は、ＩｇＧの少なくとも３つの異なる受容体、すなわちｈＦｃγＲＩ（単球／マクロファージ上に見出される）、ｈＦｃγＲＩＩ（単球、好中球、好酸球、血小板、場合によってＢ細胞、およびＫ５６２細胞株上）、ならびにＦｃγＩＩＩ（ＮＫ細胞、好中球、好酸球、およびマクロファージ上）を有する。

【０１６５】

Ｔ細胞に関して、Ｔ細胞への共刺激性シグナルの伝送は、シクロスポリンＡによって阻害されないシグナル伝達経路が関与する。加えて、共刺激性シグナルは、Ｔ細胞におけるサイトカイン分泌（例えば、ＩＬ－２および／もしくはＩＬ－１０）を誘導し得る、ならびに／またはＴ細胞における抗原に対する非応答性の誘導、アネルギーの誘導、もしくは細胞死の誘導を防止し得る。

【０１６６】

「フレームワーク領域」または「ＦＲ」は、本明細書に使用される際、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つ以上を広義に指す。Ｋａｂａｔ，ｅｔ ａｌ．（１９８７）“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ”Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤを参照されたい。これらの表現には、抗体の軽鎖および重鎖の可変領域内のＣＤＲ間に挿入されるアミノ酸配列領域が含まれる。

【０１６７】

「異種」は、本明細書に使用される際、核酸の部分を広義に指し、核酸が自然界では互いに対して同じ関係で見出されることのない２つ以上の部分配列を含むことを示す。例えば、核酸は、典型的に、組み換えによって生成され、無関係の遺伝子に由来する２つ以上の配列が、新しい機能的核酸を作製するように配置される（例えば、プロモーターは１つの源に由来し、コード領域は別の源に由来する）。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、自然界では互いに対して同じ関係で見出されることのない２つ以上の部分配列

を含むことを示す（例えば、融合タンパク質）。

【０１６８】

「高親和性」は、本明細書に使用される際、抗体が標的抗原に関して少なくとも１０$^{-8}$Ｍ、より好ましくは少なくとも１０$^{-9}$Ｍ、およびさらにより好ましくは少なくとも１０$^{-10}$ＭのＫＤを有することを広義に指す。しかしながら、「高親和性」結合は、他の抗体アイソタイプについては多様であり得る。例えば、ＩｇＭアイソタイプの「高親和性」結合は、抗体が少なくとも１０$^{-7}$Ｍ、より好ましくは少なくとも１０$^{-8}$Ｍを有することを指す。

【０１６９】

「相同性」は、本明細書に使用される際、ある核酸配列と参照核酸配列との間、またはあるポリペプチド配列と参照ポリペプチド配列との間の類似性の程度を広義に指す。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配列が同一であることを示す。部分的に相同な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に同一ではないものである。相同性の程度は、配列比較によって判定することができる。「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。

【０１７０】

「宿主細胞」は、本明細書に使用される際、本発明の組み換え発現ベクター等、本発明の核酸分子が導入された細胞を広義に指す。宿主細胞は、原核細胞（例えば、大腸菌）、または真核細胞、例えば酵母、昆虫（例えば、ＳＦ９）、両生類、または哺乳動物細胞、例えばＣＨＯ、ＨｅＬａ、ＨＥＫ－２９３、例えば、培養細胞、外植片、およびインビボ細胞であり得る。「宿主細胞」および「組み換え宿主細胞」という用語は、本明細書において互換的に使用される。そのような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または可能性のある子孫も指すことを理解されたい。ある特定の修飾が、突然変異または環境の影響のいずれかにより後継に生じ得るため、子孫は、実際には、親細胞と同一ではない場合があるが、本明細書に使用されるこの用語の範囲内に依然として含まれる。

【０１７１】

「ヒト化抗体」は、本明細書に使用される際、ヒト細胞によって作製される抗体により近似するように改変された可変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広義に指す。例えば、非ヒト抗体のアミノ酸配列を、ヒト生殖細胞系の免疫グロブリン配列に見られるアミノ酸を組み込むように改変することによる。本発明のヒト化抗体は、例えばＣＤＲにおいて、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列（例えば、インビトロで無作為または部位特異的突然変異生成によってか、またはインビボで体細胞突然変異によって導入される、突然変異）によってコードされないアミノ酸残基を含み得る。「ヒト化抗体」という用語は、本明細書に使用される際、マウス等の別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列に接合されている抗体も含む。

【０１７２】

「ハイブリダイゼーション」は、本明細書に使用される際、鎖が互いに逆平行に配置されたときに相補的ヌクレオチド間の水素結合の形成による、相補的（部分相補的を含む）ポリヌクレオチド鎖の物理的な相互作用を広義に指す。

【０１７３】

「ＩｇＶドメイン」および「ＩｇＣドメイン」は、本明細書に使用される際、Ｉｇスーパーファミリーメンバードメインを広義に指す。これらのドメインは、Ｉｇ折り畳みと呼ばれる独特な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、２つのβシートのサンドイッチから構成され、これらは、それぞれが、ほとんどであるがすべてではないドメインに２つのシート間の保存的ジスルフィド結合を有する５～１０個のアミノ酸の逆平行β鎖からなる。ＩｇのＩｇＣドメイン、ＴＣＲ、ＭＨＣ分子は、同じ種類の配列パターンを共有し、Ｉｇスーパーファミリー内でＣ１セットと称される。他のＩｇＣドメインは、他のセットの範囲に含まれる。ＩｇＶドメインもまた、配列パターンを共有し、Ｖセットドメインと称される。ＩｇＶドメインは、Ｃドメインよりも長く、β鎖の追加

の対を形成する。

【０１７４】

「免疫細胞」は、本明細書に使用される際、造血起源であり、免疫応答に役割を果たす細胞を広義に指す。免疫細胞には、リンパ球、例えばＢ細胞およびＴ細胞、ナチュラルキラー細胞、ならびに骨髄細胞、例えば、単球、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、好塩基球、および顆粒球が含まれる。

【０１７５】

「免疫測定法」は、本明細書に使用される際、抗原に特異的に結合する抗体を使用するアッセイを広義に指す。免疫測定法は、抗原を単離、標的化、および／または定量するために特定の抗体の特異的結合特性を使用することを特徴とし得る。

【０１７６】

「免疫応答」は、本明細書に使用される際、Ｔ細胞共刺激の調節によって影響を受ける、Ｔ細胞媒介性および／またはＢ細胞媒介性の免疫応答を広義に指す。例示的な免疫応答には、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、および細胞傷害性）、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含まれる。本明細書に使用される際、免疫応答に関する「下方調節」という用語には、いずれか１つ以上の免疫応答の減少が含まれ、一方で、免疫応答に関する「上方調節」という用語には、いずれか１つ以上の免疫応答の増加が含まれる。１つの種類の免疫応答の上方調節が、別の種類の免疫応答において対応する下方調節をもたらし得ることが理解されるであろう。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、細胞性免疫応答の下方調節をもたらし得る。

【０１７７】

本明細書における「感染因子」とは、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞に感染し、疾患状態を引き起こす、任意の病原体または作用物質を指す。その例としては、細菌、酵母、真菌、原虫、マイコプラズマ、ウイルス、プリオン、および寄生虫が挙げられる。そのような感染因子の例には、例として、（ａ）ウイルス性疾患、例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、ＨＳＶ－Ｉ、ＨＳＶ－ＩＩ、ＣＭＶ、もしくはＶＺＶ）、ポックスウイルス（例えば、オルソポックスウイルス、例えば天然痘もしくはワクシニア、または伝染性軟属腫）、ピコマウイルス（ｐｉｃｏｍａｖｉｒｕｓ）（例えば、ライノウイルスまたはエンテロウイルス）、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、および呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ））、コロナウイルス（例えば、ＳＡＲＳ）、パポーバウイルス（例えば、パピローマウイルス、例えば陰部疣贅、尋常性疣贅、もしくは足底疣贅を引き起こすもの）、ヘパドナウイルス（例えば、Ｂ型肝炎ウイルス）、フラビウイルス（例えば、Ｃ型肝炎ウイルスもしくはデング熱ウイルス）、またはレトロウイルス（例えば、ＨＩＶ等のレンチウイルス）による感染の結果としてもたらされる疾患等、（ｂ）細菌性疾患、例えば、例えば、大腸菌属、エンテロバクター属、サルモネラ属、ブドウ球菌属、赤痢菌属、リステリア属、アエロバクター属、ヘリコバクター属、クレブシエラ属、プロテウス属、シュードモナス属、連鎖球菌属、クラミジア属、マイコプラズマ属、肺炎球菌属、ナイセリア属、クロストリジウム属、バチルス属、コリネバクテリウム属、マイコバクテリウム属、カンピロバクター属、ビブリオ属、セラチア属、プロビデンシア属、クロモバクテリウム属、ブルセラ属、エルシニア属、ヘモフィルス属、またはボルデテラ属の細菌による感染の結果としてもらされる疾患等、（ｃ）他の感染性疾患、例えば、クラミジア感染症、カンジダ症、アスペルギルス症、ヒストプラズマ症、クリプトコッカス髄膜炎等を含むがこれらに限定されない真菌性疾患、マラリア、ニューモシスチスカリニ肺炎（ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｎｉｉ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）、リーシュマニア症、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、およびトリパノソーマ感染症を含むがこれらに限定されない寄生虫性疾患、ならびにヒト疾患、例えばクロイツフェルト・ヤコブ病（ＣＪＤ）、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（ｖＣＪＤ）、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、致死性家族性不眠症、およ

びクールー病を引き起こすプリオンに関与するものが挙げられる。

【０１７８】

本明細書における「感染因子抗原」とは、化合物、例えば、ペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、糖タンパク質等、またはそれらの複合体、フラグメント、もしくは変異体を意味し、この化合物は、特定の感染因子によって発現され、抗原は、特定の免疫応答、例えば、ウイルス等の感染因子に対する抗体または細胞に媒介される免疫応答を誘起するのに使用され得る。典型的に、抗原は、ウイルスまたは他の感染因子の表面に発現する部分、例えば、ポリペプチドまたは糖タンパク質、例えばカプシドタンパク質または他の膜タンパク質を含む。

【０１７９】

「炎症性状態または炎症性疾患」は、本明細書に使用される際、慢性または急性の炎症性疾患を広義に指す。

【０１８０】

「阻害性シグナル」は、本明細書に使用される際、免疫細胞上で阻害性受容体分子を介して伝送されるシグナルを広義に指す。シグナルは、活性化受容体を介して（例えば、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＢＣＲ、またはＦｃ分子を介して）シグナルに拮抗し、例えば、第２のメッセンジャー生成、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、もしくは細胞傷害性の低減、または免疫細胞によるメディエーター（例えば、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２）もしくはアレルギー応答のメディエーター）の生成の失敗、あるいはアネルギーの発達をもたらし得る。

【０１８１】

「単離」は、本明細書に使用される際、材料が、それが天然に存在するその元々の環境から除去され、したがって、人の手によってその天然の環境から改変されることを広義に指す。単離材料は、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、またはその元々の環境から除去され、したがって人の手によって改変された任意の材料（例えば、「単離抗体」）であり得る。例えば、「単離」または「精製」は、本明細書に使用される際、タンパク質、ＤＮＡ、抗体、ＲＮＡ、または生物学的に活性なそれらの部分が、生物学的物質が由来する細胞もしくは組織由来の細胞材料もしくは他の混入タンパク質を実質的に含まないか、または化学合成される場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないことを広義に指す。「細胞材料を実質的に含まない」という表現には、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質の調製物であり、このタンパク質が、それが単離されるかまたは組み換え産生される細胞の細胞成分から分離されていることが含まれる。

【０１８２】

「単離抗体」は、本明細書に使用される際、異なる抗体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を意図する（例えば、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡに特異的に結合する単離抗体は、ＰＤ－Ｌ３または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）。さらに、単離抗体は、他の細胞材料および／または化学物質を実質的に含まない場合がある。

【０１８３】

「Ｋ－ａｓｓｏｃ」または「Ｋａ」は、本明細書に使用される際、特定の抗体－抗原相互作用の会合速度を広義に指し、一方で「Ｋｄｉｓｓ」または「Ｋｄ」は、本明細書に使用される際、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度を指す。「ＫＤ」は、本明細書に使用される際、解離定数を指すことを意図し、これは、ＫｄとＫａとの比（すなわち、Ｋｄ／Ｋａ）から得られ、モル濃度（Ｍ）として表される。抗体のＫＤ値は、当該技術分野で十分に確立された方法を使用して決定することができる。

【０１８４】

「標識」または「検出可能部分」は、本明細書に使用される際、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、または他の物理学的手段によって検出可能な組成物を広義に指す。

【０１８５】
「低ストリンジェンシー」、「中ストリンジェンシー」、「高ストリンジェンシー」、または「超高ストリンジェンシー条件」は、本明細書に使用される際、核酸のハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を広義に指す。ハイブリダイゼーション反応を行うための案内は、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（５ｔｈ Ｅｄ．）Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹに見出すことができる。例示的な特定のハイブリダイゼーション条件には次のものが挙げられるが、これらに限定されない：（１）低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、約４５℃で６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）後、少なくとも５０℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳにおいて２回の洗浄（洗浄温度は、低ストリンジェンシー条件では５５℃まで上昇させてもよい）、（２）中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、約４５℃で６×ＳＳＣの後、６０℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳにおいて１回以上の洗浄、（３）高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、約４５℃で６×ＳＳＣの後、６５℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳにおいて１回以上の洗浄、および（４）超高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０．５Ｍリン酸ナトリウム、７％ＳＤＳの後、６５℃で０．２×ＳＳＣ、１％ＳＤＳで１回以上の洗浄である。

【０１８６】
「哺乳動物」は、本明細書に使用される際、皮膚が毛で覆われていること、および雌性の場合は幼体を育てるための乳を産生する乳腺を特徴とする、ヒトを含む、哺乳綱のありとあらゆる温血脊椎動物を広範に指す。哺乳動物の例としては、アルパカ、アルマジロ、カピバラ、ネコ、ラクダ、チンパンジー、チンチラ、畜牛、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。哺乳動物には、ウシ科、イヌ科、ウマ科、ネコ科、ネズミ科、ヒツジ、ブタ、霊長類、および齧歯類の種が挙げられるが、これらに限定されない。哺乳動物はまた、Ｍａｍｍａｌ Ｓｐｅｃｉｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｗｏｒｌｄ ｍａｉｎｔａｉｎｅｄ ｂｙ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｍｕｓｅｕｍ ｏｆ Ｎａｔｕｒａｌ Ｈｉｓｔｏｒｙ，Ｓｍｉｔｈｓｏｎｉａｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ ｉｎ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ ＤＣに列挙されるありとあらゆるものが含まれる。

【０１８７】
「天然の核酸分子」は、本明細書に使用される際、天然に発生する（例えば、天然タンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有するＲＮＡまたはＤＮＡ分子を広義に指す。

【０１８８】
「核酸」または「核酸配列」は、本明細書に使用される際、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態にある、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クレオチドを広義に指す。この用語は、天然のヌクレオチドの既知の類似体を含有する、核酸、すなわち、オリゴヌクレオチドを包含する。この用語はまた、合成の骨格を有する核酸様構造を包含する。別途示されない限り、特定の核酸配列はまた、明示的に示される配列と同様に、その保存的修飾変異体（例えば、縮重コドン置換）および相補的配列も暗に包含する。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。

【０１８９】
「オリゴマー形成ドメイン」は、本明細書に使用される際、ＶＩＳＴＡ細胞外ドメインまたはそのフラグメントに付着するとオリゴマー形成を促進するドメインを広義に指す。当該オリゴマー形成ドメインは、追加のジスルフィド結合によってさらに安定化することができる、自己会合性αヘリックス、例えば、ロイシンジッパーを含む。このドメインは、インビボでのポリペプチドの機能的結合タンパク質への折り畳みを促進すると見られるプロセスである、膜全体にわたるベクトル性折り畳みと適合するように設計される。この例は、当該技術分野で既知であり、例としては、コイルドＧＣＮ４、およびＣＯＭＰが挙

げられる。

【０１９０】

αヘリックスコイルドコイルが、おそらくは、タンパク質に見出される最も広く知られるサブユニットオリゴマー形成モチーフである。したがって、コイルドコイルは、多様な異なる機能を果たす。転写活性化因子のいくつかのファミリーにおいて、例えば、短いロイシンジッパーは、ＤＮＡ上でのＤＮＡ結合領域の位置付けに重要な役割を果たす。Ｅｌｌｅｎｂｅｒｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ　７１：１２２３－１２３７。コイルドコイルはまた、中間フィラメントタンパク質のオリゴマーの形成に使用される。コイルドコイルタンパク質は、さらに、ベシクルおよびウイルスの両方の膜融合に重要な役割を果たすとみられる。Ｓｋｅｈｅｌ　ａｎｄ　Ｗｉｌｅｙ（１９９８）Ｃｅｌｌ　９５：８７１－８７４。いずれの場合においても、融合される膜に埋め込まれた疎水性配列は、長いαヘリックスの束から構成される棒状の複合体の同じ端部に位置する。この分子配設は、膜融合のために複合体が組み立てられるときに、近接した膜の付加をもたらすと考えられる。コイルドコイルは、オリゴマー形成の制御に使用されることが多い。それは、とりわけ、ＧＣＮ４、ウイルス融合ペプチド、ＳＮＡＲＥ複合体、およびある特定のｔＲＮＡシンターゼを含むがこれらに限定されない、転写因子を含む多くの種類のタンパク質に見出される。非常に長いコイルドコイルは、トロポミオシン、中間フィラメント、および紡錘体極体要素といった、タンパク質に見られる。コイルドコイルは、平行および逆平行の配向で会合する高度に組織化された様式で互いの周りにスーパーコイル状になったいくつかのαヘリックスを伴う。しかし、二量体および三量体が最も一般的である。ヘリックスは、同じかまたは異なるタンパク質に由来し得る。コイルドコイルは、構成要素のヘリックスが一緒になって、それらの疎水性シームを埋めることによって形成される。疎水性シームが各ヘリックスに巻き付くと、ヘリックスもまた、互いに巻き付くようにねじれ、疎水性シームを包埋し、スーパーコイルを形成する。これは、この構造をコイルドコイルとして定義する、取っ手を穴に入れる（ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ）パッキングとして知られる隣接するヘリックス間の側鎖の特徴的な相互嵌合である。ヘリックスは、この種の相互作用が発生するために同じ方向に進む必要はないが、平行構造がより一般的である。逆平行構造は、三量体では非常に珍しく、五量体では知られていないが、２つのヘリックスが短いループによって接続されることの多い分子内二量体ではより一般的である。細胞外空間では、ヘテロ三量体コイルドコイルタンパク質ラミニンが、基底膜の形成に重要な役割を果たす。他の例は、３つ（トロンボスポンジン１および２）または５つ（トロンボスポンジン３、４、およびＣＯＭＰ）の鎖が接続される、トロンボスポンジンおよび軟骨オリゴマー基質タンパク質（ＣＯＭＰ）である。この分子は、花束状の外観を有し、それらのオリゴマー構造の原因は、おそらく、Ｃ末端ドメインと細胞性受容体との多価相互作用である。酵母転写活性化因子ＧＣＮ４は、基本領域ロイシンジッパー（ｂＺＩＰ）ＤＮＡ結合モチーフを含有する、３０個を上回る特定された真核生物タンパク質のうちの１つである。Ｅｌｌｅｎｂｅｒｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ　７１：１２２３－１２３７。ｂＺＩＰ二量体は、それらのカルボキシ末端の３４個の残基上に平行コイルドコイルを形成し、それらのアミノ末端に向かって徐々に分岐して、ＤＮＡ結合部位の主溝を通過する、連続するαヘリックスの対である。コイルドコイル二量体形成界面は、ＤＮＡ軸に対してほぼ垂直に配向され、複合体にＴ字の外観を与える。ｂＺＩＰは、一緒に密集して平行αヘリックスコイルドコイルになる、疎水性および非極性残基の４－３の７個ずつの繰り返しを含有する。Ｅｌｌｅｎｂｅｒｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ　７１：１２２３－１２３７。二量体の安定性は、７個ずつの繰り返しのａおよびｂの位置におけるロイシンと非極性残基が隣り合ったパッキング、ならびにＧＣＮ４ロイシンジッパーペプチドの結晶構造に示される限定された数のヘリックス内およびヘリックス間の塩橋に起因する。Ｅｌｌｅｎｂｅｒｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ　７１：１２２３－１２３７。別の例は、Ｍｒ　５２，０００のサブユニットのホモ三量体としてウシ気管軟骨から単離されるＣＭＰ（マトリリン－１）（Ｐａｕｌｓｓｏｎ＆Ｈｅｉｎｅｇａｒｄ（１９８１）Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｊ．１９７：３６７－３７５）

であり、ここで、各サブユニットは、ｖＷＦＡ１モジュール、単一のＥＧＦドメイン、ｖＷＦＡ２　モジュール、および７個ずつ５つにわたるコイルドコイルドメインからなる。Ｋｉｓｓ，ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：８１２６－８１３４、Ｈａｕｓｅｒ　ａｎｄ　Ｐａｕｌｓｓｏｎ（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２５７４７－２５７５３。精製ＣＭＰの電子顕微鏡検査は、各サブユニットがコイルドコイルに対応する共通の点から現れる楕円形を形成する、花束様の三量体構造を示した。Ｈａｕｓｅｒ　ａｎｄ　Ｐａｕｌｓｓｏｎ（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２５７４７－２５７５３。マトリリン－１におけるコイルドコイルドメインは、広く研究されている。三量体構造は、非変性条件下での鎖間ジスルフィド結合の完全な還元後にも保持される。Ｈａｕｓｅｒ　ａｎｄ　Ｐａｕｌｓｓｏｎ（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２５７４７－２５７５３。さらに別の例は、軟骨オリゴマー基質タンパク質（ＣＯＭＰ）である。非コラーゲン性糖タンパク質であるＣＯＭＰは、軟骨で初めて特定された。Ｈｅｄｂｏｍ，ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：６１３２－６１３６。このタンパク質は、Ｎ末端の７個ずつの繰り返し領域（ｃｃ）からなる５つのサブユニットの５２４ｋＤａのホモ五量体であり、４つの上皮成長因子（ＥＧＦ）様ドメイン（ＥＦ）、７つのカルシウム結合ドメイン（Ｔ３）、およびＣ末端球状ドメイン（ＴＣ）が続く。このドメイン構成により、ＣＯＭＰは、トロンボスポンジンのファミリーに属する。ａおよびｂの位置に優先的に疎水性残基を有する７個ずつの繰り返し（ａｂｃｄｅｆｇ）$_n$は、ヘリックスコイルドコイルドメインを形成する。Ｃｏｈｅｎ　ａｎｄ　Ｐａｒｒｙ（１９９４）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６３：４８８－４８９。最近、ＣＯＭＰ（ＣＯＭＰｃｃ）の組み換え五本鎖コイルドコイルドメインが結晶化され、その構造が、０．２ｎｍの分解能で解析された。Ｍａｌａｓｈｋｅｖｉｃｈ，ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７４：７６１－７６５。

【０１９１】

「動作可能に連結される」とは、本明細書に使用される際、２つのＤＮＡフラグメントが、２つのＤＮＡフラグメントによってコードされるアミノ酸配列がインフレームに留まるように接合される場合を広義に指す。

【０１９２】

「パラトープ」は、本明細書に使用される際、抗原を認識する抗体の部分（例えば、抗体の抗原結合部位）を広義に指す。パラトープは、抗体のＦｖ領域の小さな領域（例えば、１５～２２個のアミノ酸）であり得るか、または抗体の重鎖および軽鎖の部分を含有し得る。Ｇｏｌｄｓｂｙ，ｅｔ　ａｌ．Ａｎｔｉｇｅｎｓ（Ｃｈａｐｔｅｒ　３）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（５th　Ｅｄ．）Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ，ｐａｇｅｓ　５７－７５を参照されたい。

【０１９３】

「患者」は、本明細書に使用される際、疾患状態の緩和または疾患状態の発症もしくは再発の防止のいずれかのために、治療を必要とする任意の動物を広義に指す。また、「患者」は、本明細書に使用される際、危険因子、疾患の病歴、易罹患性、症状、兆候を有するか、以前に疾患が診断されたか、疾患の危険性にあるか、または疾患の患者集団のメンバーである、任意の動物を広義に指す。患者は、ヒト等の臨床患者、またはペット動物、飼いならされた動物、家畜、珍しい動物、または動物園の動物といった獣医学的患者であり得る。「対象」という用語は、「患者」という用語と互換的に使用され得る。

【０１９４】

「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、アミノ酸残基のポリマーを広義に指す。この用語は、１つ以上のアミノ酸残基が対応する天然のアミノ酸の類似体または模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然のアミノ酸ポリマーに適用される。この用語は、１つ以上のアミノ酸残基が対応する天然のアミノ酸の人工的な化学的模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然のアミノ酸ポリマーおよび非天然のアミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドは、例えば、炭水化物残基の付加によって修飾されて、糖タンパク質を形成し得る。「ポリペプチド」、「ペプチド」、およ

び「タンパク質」という用語には、糖タンパク質、ならびに非糖タンパク質が含まれる。

【０１９５】

「プロモーター」は、本明細書に使用される際、核酸の転写を支持する核酸配列のアレイを広義に指す。本明細書に使用される際、プロモーターには、ポリメラーゼＩＩ型プロモーターの場合、ＴＡＴＡ要素等の転写の開始部位付近で必要な核酸配列が含まれる。プロモーターはまた、任意に、転写の開始部位から数千塩基対程度の距離に位置し得る、遠位エンハンサーまたはリプレッサー要素を含む。「構成的」プロモーターは、ほとんど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。「誘導的」プロモーターは、環境または発達の制御下で活性なプロモーターである。

【０１９６】

「予防的有効量」は、本明細書に使用される際、疾患の予防または疾患の再発の防止のために患者に投与されるときに、疾患または再発のそのような予防を達成するのに十分である、化合物の量を広義に指す。予防的有効量は、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る。「予防的有効量」は、疾患およびその重症度、ならびに治療される患者の年齢、体重、病歴、疾患の素因、既存の状態に応じて変動し得る。

【０１９７】

「予防」とは、本明細書に使用される際、兆候および／または症状が、患者に存在していないか、寛解にあるか、または以前に患者に存在していた場合の、一連の治療を広義に指す。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。さらに、防止には、疾患を発症する可能性がある患者、特に、疾患に罹患しやすい患者（例えば、患者集団のメンバー、危険因子を有するもの、または疾患を発症する危険性にあるもの）を治療することを含む。

【０１９８】

本明細書に使用される「組み換え」は、生成物に関して、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターを広義に指し、これらの細胞、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の核酸もしくはタンパク質の改変によって修飾されていること、あるいは細胞が、そのように修飾された細胞に由来すること、を示す。したがって、例えば、組み換え細胞は、細胞の天然（非組み換え）形態では見出されない遺伝子を発現するか、またはそうでなければ異常発現されるか、過少発現されるか、もしくは全く発現されない天然の遺伝子を発現する。

【０１９９】

「シグナル配列」または「シグナルペプチド」は、本明細書に使用される際、分泌性または膜結合ポリペプチドのＮ末端に生じる約１５個以上のアミノ酸を含有し、多数の疎水性アミノ酸残基を含有する、ペプチドを広義に指す。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、およびさら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％、およびより好ましくは約４０～４５％の疎水性アミノ酸残基（例えば、バリン、ロイシン、イソロイシン、またはフェニルアラニン）を有する。「シグナル配列」はまた、当該技術分野において「シグナルペプチド」とも称され、そのような配列を含有するポリペプチドを脂質二重層へと指向するように機能し、分泌および膜結合ポリペプチドにおいて開裂される。

【０２００】

抗体に「特異的（もしくは選択的）に結合する」または「特異的（もしくは選択的）に免疫反応する」または「特異的に相互作用もしくは結合する」とは、本明細書に使用される際、タンパク質またはペプチド（または他のエピトープ）を広義に指し、いくつかの実施形態において、タンパク質または他の生物製剤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、指定の免疫測定法条件下において、指定された抗体は、バックグラウンド（非特異的シグナル）よりも少なくとも２倍多く特定のタンパク質に結合し、試料中に存在する他のタンパク質には実質的に有意な量で結合しない。典型的に、特異的または選択的反応は、少なくとも２倍のバックグラウンドシグナルまたはノイズ

、およびより好ましくは１０～１００倍を上回るバックグラウンドとなる。

【０２０１】

本明細書に使用される「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」とは、ある核酸が、従来的なワトソンクリック型または他の非従来型のいずれかによって別の核酸配列と水素結合（複数可）を形成し得ることを広義に指す。核酸分子とその相補的配列との結合自由エネルギーは、核酸の関連機能、例えば、ＲＮＡｉ活性が生じるのに十分である。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．（１９８７）ＣＳＨ　Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．ＬＩＩ：１２３－３３、Ｆｒｉｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９８６）ＰＮＡＳ　８３：９３７３－７７、Ｔｕｒｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０９：３７８３－８５を参照されたい。パーセント相補性は、第２の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソンクリック塩基対合）を形成することができる核酸分子中の連続する残基の割合を示す（例えば、１０個中約少なくとも５、６、７、８、９、１０個は、約少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、および１００％相補的である（これらの値を含む））。「完全に相補的」または１００％相補性は、核酸配列の連続する残基のすべてが、第２の核酸配列中の同じ数の連続する残基と水素結合していることを広義に指す。「実質的相補性」は、ポリヌクレオチド鎖が、非相補的となるように選択されるオーバーハング等のポリヌクレオチド鎖の領域を除き、約少なくとも９０％の相補性を示すことを指す。特異的結合は、特異的結合が所望される条件下、すなわち、インビボアッセイまたは治療的治療の場合には生理学的条件下、またはインビトロアッセイの場合には、アッセイが行われる条件下において、オリゴマー化合物と非標的配列との非特異的結合を回避するために、十分な程度の相補性を必要とする。非標的配列は、典型的に、少なくとも５個のヌクレオチドが異なり得る。

【０２０２】

疾患の「兆候」は、本明細書に使用される際、患者の検査で発見できる疾患の任意の異常性の表れ、疾患の主観的な指標である症状とは対照的な疾患の客観的な指標を広義に指す。

【０２０３】

「固体支持体」、「支持体」、および「基質」は、本明細書に使用される際、別の材料が付着し得る、固体または半固体構造を提供する任意の材料を広義に指し、平滑な支持体（例えば、金属、ガラス、プラスチック、シリコン、およびセラミック表面）、ならびに表面加工および多孔質の材料が含まれるが、これらに限定されない。

【０２０４】

本明細書に使用される「対象」は、本発明による治療に好適なものを広義に指し、鳥類および哺乳動物の対象を含むがこれらに限定されず、好ましくは、哺乳動物である。本発明による治療を必要とするいずれの哺乳動物も、好適である。いずれの性別、およびいずれの発達段階（すなわち、新生児、幼児、若年期、青年期、成人）のヒト対象も、本発明により治療することができる。本発明はまた、獣医学的目的、ならびに薬物スクリーニングおよび薬物開発の目的で、動物対象、特に、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、およびウマ等の哺乳動物対象に行うことができる。「対象」は、「患者」と互換的に使用される。

【０２０５】

「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」とは、本明細書に使用される際、ＶＩＳＴＡタンパク質の調製物であり、このタンパク質は、タンパク質の合成に関与した化学的前駆体または他の化学物質から分離されていることを広義に指す。一実施形態において、「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という表現は、ＶＩＳＴＡタンパク質の調製物が、約３０％未満（乾燥重量で）の化学的前駆体または非ＶＩＳＴＡ化学物質、より好ましくは約２０％未満の化学的前駆体または非ＶＩＳＴＡ化学物質、さらにより好ましくは約１０％未満の化学的前駆体または非ＶＩＳＴＡ化学物質、および最も好ましくは約５％未満の化学的前駆体または非ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）化学物

質を有することを含む。

【０２０６】

本明細書に使用される、疾患の「症状」とは、患者が経験し、疾患の指標である、構造、機能、または感覚における病的事象またはそれらの正常状態からの逸脱を広義に指す。

【０２０７】

「Ｔ細胞」は、本明細書に使用される際、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＣＤ８＋Ｔ細胞を広義に指す。Ｔ細胞という用語にはまた、Ｔヘルパー１型Ｔ細胞およびＴヘルパー２型Ｔ細胞の両方が含まれ得る。

【０２０８】

本明細書に使用される「Ｔｒｅｇ細胞」（サプレッサーＴ細胞と称されることもある）は、免疫系を調節し、自己抗原に対する寛容性を維持し、自己免疫疾患を抑止することができるＴ細胞の亜集団を指す。Ｆｏｘｐ３＋ＣＤ４＋ＣＤ２５＋制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇｓ）は、正常な生理学的条件下における末梢寛容の維持に極めて重要であり、癌における抗腫瘍免疫応答を抑制する。

【０２０９】

「治療法」、「治療的」、「治療する」、または「治療」は、本明細書に使用される際、疾患を治療すること、疾患もしくはその臨床症状の発症を停止もしくは低減させること、および／または疾患を軽減すること、疾患もしくは臨床症状の退行をもたらすことを広義に指す。治療法は、疾患、疾患の兆候、および／または疾患の症状の予防、治療、治療薬、低減、緩和、および／またはそれらの軽減の提供を包含する。治療法は、進行中の疾患の兆候および／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／または症状の緩和を包含する。治療法はまた、「予防」を包含する。「低減」という用語は、治療法の目的で、兆候および／または症状の臨床的に有意な低減を広義に指す。治療法には、再発または再発生する兆候および／もしくは症状（例えば、炎症、疼痛）を治療することが含まれる。治療法は、兆候および／または症状の出現を阻止すること、ならびに既存の兆候および／または症状を低減すること、ならびに既存の兆候および／または症状を排除することを包含するが、これらに限定されない。治療法には、慢性疾患の治療（「管理」）および急性疾患の治療が含まれる。例えば、治療には、兆候および／または症状（例えば、炎症、疼痛）の再発または再発生を治療または防止することが含まれる。

【０２１０】

「膜貫通ドメイン」は、本明細書に使用される際、原形質膜に及ぶ、長さが約１５アミノ酸残基のアミノ酸配列を広義に指す。より好ましくは、膜貫通ドメインは、約少なくとも２０、２５、３０、３５、４０、または４５個のアミノ酸残基を含み、原形質膜に及ぶ。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。ある実施形態において、膜貫通ドメインのアミノ酸の少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％以上は、疎水性であり、例えば、ロイシン、イソロイシン、チロシン、またはトリプトファンである。膜貫通ドメインは、例えば、Ｚａｇｏｔｔａ，ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．１９：２３５－２６３に説明されている。

【０２１１】

「トランスジェニック動物」は、本明細書に使用される際、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義に指す。「導入遺伝子」という用語は、細胞のゲノムに組み込まれ、そこからトランスジェニック動物が発達し、成体動物のゲノムに残る、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示する、外因性ＤＮＡを指す。

【０２１２】

「腫瘍」は、本明細書に使用される際、組織新生物形成の形態、特に、多少は脱阻害される内因性組織の自発的、自主的、および不可逆的な過剰成長の形態にある少なくとも１つの細胞または細胞集団を広義に指し、その成長は、原則として、特定の細胞および組織

機能の多少は顕著な消失と関連する。この細胞または細胞集団は、その成長に関して、それ自体または宿主生物の制御機序によって、効果的に阻害されず、例えば、結腸直腸癌、黒色腫、または癌腫である。腫瘍抗原は、悪性細胞自体の中またはその上に存在する抗原だけでなく、内皮細胞および他の血管成分を含む、腫瘍の間質支持組織上に存在する抗原も含む。

【０２１３】

「非応答性」は、本明細書に使用される際、刺激、例えば、活性化受容体またはサイトカインによる刺激に対する免疫細胞の屈折性を広義に指す。非応答性は、例えば、免疫抑制薬または高用量の抗原に対する曝露により生じ得る。

【０２１４】

「可変領域」または「ＶＲ」は、本明細書に使用される際、抗体と抗原と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義に指す。各重鎖は、一端に、可変ドメイン（V_H）を有し、それに続いていくつかの定常ドメインを有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン（V_L）を有し、その他端に定常ドメインを有し、この軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第１の定常ドメインと並び、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並ぶ。

【０２１５】

「ベクター」は、本明細書に使用される際、それに連結されている別の核酸分子を輸送することができる核酸分子を広義に指す。１つの種類のベクターは、「プラスミド」であり、これは、さらなるＤＮＡセグメントがそこにライゲーションされ得る、環状二本鎖ＤＮＡループを指す。別の種類のベクターは、ウイルスベクターであり、さらなるＤＮＡセグメントは、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、それらが導入された宿主細胞において自己複製することができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌性ベクターおよびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入されると、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある特定のベクターは、それらが動作可能に連結される遺伝子の発現を指示することができる。ベクターは、本明細書において「組み換え発現ベクター」または単純に「発現ベクター」と称される。一般に、組み換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。本明細書において、「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、互換的に使用され得る。しかしながら、本発明は、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）等、同等の機能を果たす他の形態の発現ベクターを含むことを意図する。技法および手順は、一般に、当該技術分野で周知の従来的な方法に従って、また本明細書を通じて引用および考察される種々の一般的およびより具体的な参考文献に記載されるように、行われる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｍｏｌｅｃ．Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ｌａｂ．Ｍａｎｕａｌ［３ｒｄ Ｅｄ］Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。標準的な技法を、組み換え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、エレクトロポレーション、リポフェクション）に使用することができる。酵素反応および精製技術は、製造業者の仕様書に従って、または当該技術分野で広く達成されるか、または本明細書に記載されるように、行うことができる。

【０２１６】

本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医化学および薬化学に関連して用いられる命名法、ならびにそれらの実験室手順および技法は、当業者に周知であり、当該技術分野で広く使用されるものである。標準的な技法を、化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、および送達、ならびに患者の治療に用いることができる。

【０２１７】

ＶＩＳＴＡ

本出願は、造血細胞に選択的に発現される、Ｔ細胞活性化のＶ領域免疫グロブリン含有

抑制因子（Ｖ－ｒｅｇｉｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ Ｔ ｃｅｌｌ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ）（ＶＩＳＴＡ）またはＰＤ－Ｌ３として指定される新規な構造的に異なるＩｇスーパーファミリー阻害性リガンドに関する。細胞外ドメインは、Ｂ７ファミリーリガンド ＰＤ－Ｌ１に対する相同性を有し、ＰＤ－Ｌ１と同様に、ＶＩＳＴＡは、免疫に対して顕著な影響を有する。しかしながら、ＰＤ－Ｌ１とは異なり、ＶＩＳＴＡは、造血コンパートメント内に選択的に発現される。発現は、骨髄性抗原提示細胞（ＡＰＣ）上で最も顕著であるが、ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、およびＦｏｘｐ３＋制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）のサブセットにおけるより高い発現もまた、大いに興味深い。ＡＰＣ上での可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質またはＶＩＳＴＡの発現は、インビトロＴ細胞増殖、サイトカイン産生を強力に阻害し、Ｔ細胞におけるＦｏｘｐ３発現を誘導する。逆に、新たに開発された抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体は、インビトロでＶＩＳＴＡ＋ＡＰＣによるＴ細胞応答のＶＩＳＴＡ誘導性免疫抑制を妨害した。さらに、インビボでの抗ＶＩＳＴＡは、Ｔ細胞媒介性自己免疫疾患実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）の発症を高め、防御的な腫瘍特異的免疫応答の発達を促進し、続く腫瘍寛解を有した。ＶＩＳＴＡ－／－マウスの初期研究は、自発性炎症性疾患の初期兆候を明らかにし、それらの最終的な病理学的運命が決定されることになる。すべての他のＰＤリガンド関連分子（例えば、Ｂ７－Ｈ３、Ｈ４、Ｈ６）とは異なり、ＶＩＳＴＡは、造血細胞に選択的に発現され、その強い抑制活性および固有な構造特性とともに、ＶＩＳＴＡが、新規な機能的に重複しない、免疫の中心的な制御因子であり、その発現が、主にＴ細胞および骨髄に限定されることを示す。国際特許第ＷＯ ２０１１／１２００１３号を参照されたい。

【０２１８】

最もよく特徴付けられている共刺激性リガンドは、Ｂ７．１およびＢ７．２であり、これらは、Ｂ７ファミリーリガンドおよび受容体といった多数の極めて重要な免疫制御因子からなるＩｇスーパーファミリーに属する。Ｉｇスーパーファミリーのメンバーは、プロフェッショナル抗原提示細胞（ＡＰＣ）上に発現し、それらの受容体は、ＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４である。ＣＤ２８は、ナイーブおよび活性化Ｔ細胞によって発現され、最適なＴ細胞活性化に極めて重要である。対照的に、ＣＴＬＡ－４は、Ｔ細胞活性化に続いて誘導され、Ｂ７．１／Ｂ７．２に結合することによってＴ細胞活性化を阻害し、ＣＤ２８媒介性共刺激を障害させる。Ｂ７．１およびＢ７．２ノックアウト（ＫＯ）マウスは、獲得免疫応答に障害を有し、一方でＣＴＬＡ－４ ＫＯマウスは、炎症を適切に制御することができず、全身性自己免疫疾患を発症する。時間が経つにつれ、Ｂ７ファミリーリガンドは、Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳリガンド）およびＢ７－Ｈ３といった共刺激性リガンド、ならびにＢ７－Ｈ１（ＰＤ－Ｌ１）、Ｂ７－ＤＣ（ＰＤ－Ｌ２）、Ｂ７－Ｈ４（Ｂ７Ｓ１またはＢ７ｘ）、およびＢ７－Ｈ６といった阻害性リガンドを含むまでに拡張した。したがって、さらなるＣＤ２８ファミリー受容体が特定されている。ＩＣＯＳは、活性化Ｔ細胞上に発現し、Ｂ７－Ｈ２に結合する。ＩＣＯＳは、Ｔ細胞の活性化、分化、および機能に重要な、正の共制御因子である。一方で、プログラム細胞死（Ｐｒｏｇｒａｍｍｅｄ Ｄｅａｔｈ）１（ＰＤ－１）は、Ｔ細胞応答を負に制御する。ＰＤ－１ ＫＯマウスは、ループス様自己免疫疾患またはＴ拡張型心筋症を発症した。ＶＩＳＴＡとは対照的に、２つの阻害性Ｂ７ファミリーリガンドＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２は、異なる発現パターンを有する。ＰＤ－Ｌ２は、ＤＣおよびマクロファージ上に誘導可能に発現し、一方でＰＤ－Ｌ１は、造血細胞型および非造血細胞型の両方に広範に発現する。ＰＤ－１受容体の免疫抑制的な役割と一致して、ＰＤ－Ｌ１－／－およびＰＤ－Ｌ２－／－マウスを用いた研究は、両方のリガンドが、Ｔ細胞増殖およびサイトカイン産生の阻害において重複する役割を有することを示している。ＰＤ－Ｌ１欠損は、自己免疫性糖尿病の非肥満正糖尿病（ＮＯＤ）モデル、および多発性硬化症（実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）のマウスモデルの両方において、疾患の進行を強める。ＰＤ－Ｌ１－／－Ｔ細胞は、両方の疾患モデルにおいて、上昇したレベルの炎症促進性サイトカインを産生する。加えて、ＮＯＤマウスにおける研究は、ＰＤ－Ｌ１の組織発現（すなわち、膵臓内）が、炎症を局部的に制御す

るその能力に固有に寄与することを示している。ＰＤ－Ｌ１はまた、同種異系胎児に対する母体免疫応答を決定的に制御する、胎盤の合胞体栄養細胞上に高度に発現する。

【０２１９】

抗ＣＴＬＡ－４抗体は、黒色腫のマウスモデルおよび臨床試験において、治療的利益の強化を示す。Ｂ１６－ＧＭ－ＣＳＦ（Ｇｖａｘ）をワクチン接種したマウスは、ＣＴＬＡ－４の抗体封鎖と組み合わせた場合、Ｂ１６黒色腫の拒絶を促進する。ＰＤ－１ならびにＰＤ－Ｌ１に対する抗体はまた、広範なマウス腫瘍モデルにおいて、抗腫瘍免疫および宿主生存の強化を立証する。最後に、ＣＴＬＡ－４およびＰＤ－１は、共阻害性分子の同じファミリーに属するが、それらが異なる重複しない機序を使用してＴ細胞活性化を阻害すること、ならびに、組み合わせて使用されると、マウス黒色腫において宿主生存を強化する抗ＣＴＬＡ－４および抗ＰＤ－１／Ｌ１の能力に相乗効果が存在することが、証拠により示唆される。

【０２２０】

免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーは、Ｂ７ファミリーリガンドおよび受容体を含む、多数の極めて重要な免疫制御因子からなる。ＶＩＳＴＡは、新規な構造的に異なるＩｇスーパーファミリー阻害性リガンドであり、その細胞外ドメインは、Ｂ７ファミリーリガンドＰＤ－Ｌ１に対する相同性を有する。この分子は、Ｔ細胞活性化のＶドメインＩｇ抑制因子（ＶＩＳＴＡ）として指定される。ＶＩＳＴＡは、主に造血細胞に発現し、ＶＩＳＴＡ発現は、骨髄性抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞では高く制御される。ＡＰＣでの可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質またはＶＩＳＴＡの発現は、インビトロでＴ細胞増殖およびサイトカイン産生を阻害する。ＶＩＳＴＡ特異的モノクローナル抗体は、インビトロでＶＩＳＴＡ発現ＡＰＣによるＴ細胞応答のＶＩＳＴＡ誘導性抑制を妨害する。さらに、抗ＶＩＳＴＡ処置は、マウスにおいてＴ細胞媒介性自己免疫疾患実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を悪化させる。最後に、腫瘍細胞におけるＶＩＳＴＡの過剰発現は、マウスにおいてインビボでの防御的抗腫瘍免疫を妨害する。これらの発見は、新規な免疫制御性分子であるＶＩＳＴＡが、他のＩｇスーパーファミリーのメンバーと重複しない機能的活性を有し、自己免疫の発達および癌における免疫監視に役割を果たし得ることを示す。Ｗａｎｇ，ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０８（３）：５７７－９２を参照されたい。

【０２２１】

ヒトＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡは、Ｔ細胞転写プロファイリングスクリーンにおいて上方制御される分子として特定された。マウスＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞ｃＤＮＡライブラリーから回収した同一の９３０塩基対の遺伝子産物の特徴付けにより、大きさおよび配列を確認した。コンピュータ上での配列および構造分析により、成熟時の３０９個のアミノ酸のＩ型膜貫通タンパク質を予測する。その細胞外ドメインは、１３６個のアミノ酸の単一の細胞外Ｉｇ－Ｖドメインを含有し、これは、２３個のアミノ酸のストーク領域、２１個の残基の膜貫通セグメント、および９７個のアミノ酸の細胞質ドメインに連結される。ＶＩＳＴＡの細胞質尾部は、いずれのシグナル伝達ドメインも含有しない。ＶＩＳＴＡ　Ｉｇ－Ｖドメインを用いたＢＬＡＳＴ配列検索により、Ｂ７ファミリーのＰＤ－Ｌ１を、ボーダーラインの有意なｅ値スコアを有する、最も近い進化的に関連するタンパク質として特定した。ＶＩＳＴＡと、Ｂ７ファミリーメンバーＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、およびＢ７－Ｈ４との構造に基づく配列アライメントは、すべてのＩｇ－Ｖドメインタンパク質において系統的に保存されるいくつかのアミノ酸を強調する。

【０２２２】

ＶＩＳＴＡの発現は、造血コンパートメントに選択的に発現するとみられ、このタンパク質は、成熟した骨髄性細胞（ＣＤ１１ｂ^{ｂｒｉｇｈｔ}）上に高度に発現し、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、Ｔ^{ｒｅｇ}、およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞では発現レベルが低い。可溶性ＶＩＳＴＡタンパク質、例えば、可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、またはＡＰＣ上でのＶＩＳＴＡの発現は、インビトロでのＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖およびサイトカイン産生を抑制する。抗ＶＩＳＴＡ抗体、例えば、抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体（１３Ｆ３）

が、インビトロでＶＩＳＴＡ$^{+}$ＡＰＣによって、ＶＩＳＴＡに誘導されるＴ細胞応答の抑制を遮断したことも観察される。また、抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体が、ＥＡＥを悪化させ、インビボで脳炎誘発性Ｔｈ１７の頻度を増加させたことも発見された。なおもさらに、本発明は、驚くべきことに、抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体が、複数のマウス腫瘍モデルにおいて、腫瘍寛解を誘導することを発見した。これらのモデルにおける骨髄系由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）上でのＶＩＳＴＡの発現は、非常に高度であり、ＶＩＳＴＡ$^{+}$ＭＤＳＣが、腫瘍特異的免疫を抑制することを示唆する。ＶＩＳＴＡは、インビトロおよびインビボの両方で、マウスおよびヒト（インビトロのみ）において、Ｔ細胞上で免疫抑制活性を発揮し、自己免疫の発達および癌に対する免疫応答の制御における重要なメディエーターである。具体的に、データは、ＶＩＳＴＡが、Ｉｇスーパーファミリーの新しいメンバーであり、ＰＤ－Ｌ１にわずかな配列類似性を有するＩｇ－Ｖドメインを含有することを示す。ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、または人工的ＡＰＣ上で過剰発現される場合、ＶＩＳＴＡは、マウスおよびヒトＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖ならびにサイトカイン産生の両方を阻害する。さらに、骨髄性ＡＰＣ上でのＶＩＳＴＡの発現は、インビトロでＴ細胞応答に対して阻害性である。

【０２２３】

腫瘍内微小環境におけるＭＤＳＣ上でのＶＩＳＴＡの発現は、極めて高度である。多数の細胞表面分子の表現型および機能の分析が、ＭＤＳＣに媒介されるＴ細胞の抑制に関与することが既に示唆されている：ＣＤ１１５、ＣＤ１２４、ＣＤ８０、ＰＤ－Ｌ１、およびＰＤ－Ｌ２は、ＭＤＳＣによって発現されたが、ＭＤＳＣと免疫抑制活性を欠く腫瘍を有さないマウスに由来する細胞との間に、それらの発現レベルまたは陽性細胞の割合に差は見られなかった。したがって、ＶＩＳＴＡは、ＭＤＳＣ上の主要なＢ７の負の制御因子である。

【０２２４】

抗体に媒介されるＶＩＳＴＡの封鎖は、自己腫瘍に対する防御的免疫を誘導する。

ＶＩＳＴＡは、防御的抗腫瘍免疫の発達を妨害するＭＤＳＣ上の優性な負の免疫制御性分子である。したがって、この分子の活性を抗ＶＩＳＴＡ抗体で遮断することは、哺乳動物（例えば、ヒト）における防御的抗腫瘍免疫を誘導するために用いることができる。

【０２２５】

ＶＩＳＴＡ細胞外ドメインまたはそのフラグメントの複数のコピーと、ＶＩＳＴＡ結合剤、例えば、小分子および抗体またはそのフラグメントと、を含む、免疫調節剤としてＶＩＳＴＡに結合するか、またはその活性を調節（作動もしくは拮抗）する、異なる癌、例えば、膀胱癌、卵巣癌、およびリンパ腫、自己免疫疾患、アレルギー、感染症、ならびに炎症性状態、例えば、多発性硬化症および関節炎の治療のための、可溶性ＶＩＳＴＡタンパク質、例えば、融合タンパク質および多量体ＶＩＳＴＡタンパク質の使用方法。

【０２２６】

ＶＩＳＴＡは、新規な阻害性リガンドであり、その細胞外Ｉｇ－Ｖドメインが、２つの既知のＢ７ファミリーリガンドである、プログラム死リガンド１および２（ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２）に対する相同性を有し、固有の配列特性、ならびにインビトロおよびインビボにおいてＡＰＣおよびＴ細胞のサブセット上で独特の発現パターンを呈する（これが、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡを他のＢ７ファミリーリガンドと区別する）。ＶＩＳＴＡは、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖および分化に対する機能的影響を有する（ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖、ならびにサイトカイン産生を抑制する）。その発現パターンおよびＴ細胞に対する阻害性影響に基づいて、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡは、Ｔ細胞と骨髄系由来のＡＰＣとの間の同族相互作用の際にＴ細胞応答を負に制御する制御性リガンドとして機能するとみられる。

【０２２７】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）は、Ｂ７ファミリーリガンドのメンバーとみられるが、他のＢ７ファミリーリガンドとは異なり、この分子は、Ｉｇ－Ｃドメインを有さずにＩｇ－Ｖドメインのみを含有し、系統発生学的には、Ｂ７ファミリー受容体プログラム死－１（Ｐ

Ｄ－１）により近似する。それに基づき、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）およびそれに特異的なアゴニストもしくはアンタゴニストは、Ｔ細胞活性化および分化の制御、ならびにより広義には、免疫応答を制御する制御性ネットワークの調節に使用され得る。特に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アゴニストまたはアンタゴニストは、好ましくは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）に特異的な抗体は、自己免疫、炎症性応答および疾患、アレルギー、癌、感染性疾患、ならびに移植における免疫応答の調節に有用である。

【０２２８】

Ｔ細胞におけるアネルギーは（非応答性とは対照的に）、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のシグナルの不在下で第１のシグナル（Ｔ細胞受容体またはＣＤ－３に媒介されるシグナル）を受容すると、発生する。これらの条件下では、同じ抗原への細胞の再曝露は（再曝露が共刺激性分子の存在下で起こったとしても）、サイトカイン産生不全、したがって、増殖不全をもたらす。アネルギーＴ細胞は、しかしながら、無関係の抗原への応答を増加させ得、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２）とともに培養されると、増殖し得る。例えば、Ｔ細胞アネルギーはまた、ＥＬＩＳＡによって、または指標細胞株を用いた増殖アッセイによって測定すると、Ｔリンパ球によるＩＬ－２産生の欠如によって観察され得る。あるいは、レポーター遺伝子構築物を使用してもよい。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って、またはエンハンサー内に見ることができるＡＰ１配列の多量体によって誘導される、ＩＬ－２遺伝子の転写を開始することができない。Ｋａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５７：１１３４。

【０２２９】

本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子は、ポリペプチドまたは対応する核酸分子における「細胞外ドメイン」の存在に基づいて特定される。別の実施形態において、本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子は、ポリペプチドまたは対応する核酸分子における「細胞質ドメイン」の存在に基づいて特定される。

【０２３０】

免疫細胞の応答が調節されるように、一次シグナルの存在下で、インビトロまたはインビボで免疫細胞と、ＶＩＳＴＡタンパク質またはそれに特異的な結合剤とを接触させることによって、免疫細胞応答を調節する方法。（ＶＩＳＴＡまたはその調節剤の相互作用は、免疫細胞にシグナルを伝送し、免疫応答を制御する。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質は、骨髄性樹状細胞（ＤＣ）およびマクロファージを含む骨髄性抗原提示細胞上では高度に発現し、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞上では低密度で発現する。免疫活性化により、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現は、骨髄性ＡＰＣ上では上方制御されるが、ＣＤ４＋Ｔ細胞上では下方制御される）。したがって、本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸およびポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストまたはアンタゴニストは、例えば、免疫応答の調節に有用である。

【０２３１】

本明細書に互換的に使用される「ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性」、「ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の生物学的活性」、または「ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の機能的活性」とは、標準的な技術に従ってインビボまたはインビトロで判定される、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）応答性細胞もしくは組織、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド結合パートナーに対して、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質、ポリペプチド、または核酸分子によって発揮される活性を指す。これらの活性には、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖ならびにサイトカイン産生の調節が含まれる。別の実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）結合パートナーとの会合等、直接的な活性である。本明細書に使用される際、「標的分子」または「結合パートナー」は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）媒介性機能が達成されるように、自然界でＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドが結合するかまたは相互作用する、すなわち、Ｔ細胞上に発現される、分子である。

あるいは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドによって媒介される細胞シグナル伝達活性等、間接的な活性である。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の生物学的活性が、本明細書に説明される。例えば、本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドおよびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アゴニストまたはアンタゴニストは、次の活性のうちの１つ以上を有し得る：（１）ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖の抑制もしくは促進、（２）サイトカイン産生の抑制もしくは促進、（３）Ｔ細胞と骨髄性由来ＡＰＣとの間の同族相互作用のときのＴ細胞応答を負に制御する制御性リガンドとしての機能、（４）初期ＴＣＲ活性を抑制し、細胞分裂を停止させることによるが、アポトーシスへの直接の影響は最小限に抑えた、ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の負の制御、（５）ＡＰＣとＴ細胞との間の同族相互作用のときの抗原特異的Ｔ細胞活性化の抑制もしくは促進、ならびに／または（６）Ｔ細胞に媒介される免疫応答の抑制もしくは促進、（７）免疫細胞、例えばＴリンパ球の活性化の調節、（８）生物、例えば、マウスもしくはヒト生物の免疫応答、例えば、炎症性免疫応答の調節。

【０２３２】

１つ以上のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を調節する単離ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質およびポリペプチド。これらのポリペプチドには、次のドメイン、すなわちシグナルペプチドドメイン、ＩｇＶドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインのうちの１つ以上、ならびに好ましくはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を有する、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドが含まれる。

【０２３３】

共刺激性シグナルの調節は、免疫細胞のエフェクター機能の調節をもたらし得る。したがって、「ＶＩＳＴＡ活性」という用語は、ＶＩＳＴＡポリペプチドが、その天然の結合パートナー（複数可）に結合する能力、免疫細胞共刺激性または阻害性シグナルを調節する能力、および免疫応答を調節する能力を含む。

【０２３４】

免疫細胞における阻害性シグナルの調節は、免疫細胞の増殖および／またはそれによるサイトカイン分泌の調節をもたらす。例えば、本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドのファミリーは、好ましくは、少なくとも１つの「シグナルペプチドドメイン」を含む。以下に記載されるように、シグナル配列は、天然のヒトＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のアミノ酸配列において特定され、また天然のマウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のアミノ酸配列においても特定された。

【０２３５】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の刺激は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）が異常に下方制御される状況、および／またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の増加が、有益な効果を有する可能性が高い状況において、望ましい。同様に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の阻害は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）が異常に上方制御される状況、および／またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の減少が、有益な効果を有する可能性が高い状況において、望ましい。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の下方調節に使用される例示的な薬剤（すなわち、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アンタゴニスト）には、例えば、アンチセンス核酸分子、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を認識および遮断する抗体、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を認識および遮断する抗体の組み合わせ、ならびにＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）対向受容体を認識および遮断する抗体、ならびに、免疫細胞上でＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を遮断する化合物（例えば、可溶性一価ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子：抗原提示細胞上でＦｃ受容体に結合しないＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子の可溶性形態；ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）結合パートナーの可溶性形態；および対象スクリーニングアッセイにおいて特定される化合物）が挙げられる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の上方調節に使用される例示的な薬剤（すなわち、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アゴニスト）には、例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドをコードする核酸分子、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の多価形態、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の発現を増加させる化合物、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナーとの相互作用を強化する化合物、およ

びＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を発現する細胞が挙げられる。

【０２３６】

受容体に結合するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子の形態に応じて、シグナルは、伝送される（例えば、受容体の架橋をもたらすＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子の形態、もしくは抗原提示細胞上でＦｃ受容体に結合するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の可溶性形態によって）か、または、例えば、受容体への結合に関してＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子の活性化形態と競合することによって、阻害される（例えば、抗原提示細胞上でＦｃ受容体に結合しないように、当該技術分野で既知の方法を用いて改変された、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子の可溶性一価形態もしくはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の可溶性形態によって）かのいずれかである。しかしながら、可溶性分子が刺激性となり得る事例が存在する。種々の調節作用薬の効果は、本明細書に記載される日常的なスクリーニングアッセイを用いて容易に実証することができる

【０２３７】

免疫応答の下方制御

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの阻害性機能の上方制御を用いて、免疫応答を下方制御することができる。下方制御は、既に進行中の免疫応答を阻害もしくは遮断する形態であり得るか、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、免疫細胞の応答を下方制御することによって、もしくは免疫細胞において特異的なアネルギーを誘導することによって、またはその両方によって、阻害することができる。例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）は、阻害性受容体に結合し得、阻害性受容体に結合するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の形態、例えば、細胞表面上の多価ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を用いて、免疫応答を下方調節することができる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を刺激するために使用され得る活性化抗体は、二重特異性抗体である。例えば、そのような抗体は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）結合部位、および免疫細胞、例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、または骨髄性細胞上の細胞表面受容体を標的とする別の結合部位を含み得る。そのような抗体は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）結合部位を含むことに加えて、分子を特定の細胞集団に標的化するために、Ｂ細胞抗原受容体、Ｔ細胞抗原受容体、またはＦｃ受容体に結合する結合部位をさらに含み得る。二重特異性抗体のこの第２の抗体の選択により、阻害の標的となる細胞集団の選択に柔軟性を提供する。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を促進するか、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性化抗体もしくはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性化小分子）との相互作用を強化する薬剤は、免疫細胞増殖および／もしくはエフェクター機能を阻害するか、またインビトロアッセイに追加されるとアネルギーを誘導する、それらの能力によって特定することができる。例えば、細胞は、活性化受容体を介してシグナル伝達を刺激する薬剤の存在下で培養され得る。多数の当該技術分野で認識される細胞活性化の読み出し値を用いて、例えば、活性化剤の存在下における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。試験薬剤がこの活性化を遮断する能力は、薬剤が測定される増殖またはエフェクター機能の減少を達成する能力を測定することによって、容易に判定することができる。一実施形態において、低抗原濃度で、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）免疫細胞の相互作用は、強力なＢ７－ＣＤ２８シグナルを阻害する。別の実施形態において、高抗原濃度で、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）免疫細胞の相互作用は、サイトカイン産生を低減させ得るが、Ｔ細胞増殖を阻害しない。したがって、試験化合物が活性化を遮断する能力は、異なる抗原濃度で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判定することができる。

【０２３８】

寛容は、抗原とＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アゴニストとを共投与することによって、特定の抗原に対して誘導することができる。例えば、寛容は、特定のポリペプチドに誘導され得る。アレルゲンまたは免疫応答が所望されない外来ポリペプチドに対する免疫応答を、阻害することができる。例えば、第ＶＩＩＩ因子を受容する患者は、この凝固因子に対する抗体を生成することが多い。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはその天然の結合パ

ートナーとの相互作用を刺激する薬剤と、組み換え第ＶＩＩＩ因子との共投与（またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を、例えば架橋によって第ＶＩＩＩ因子に物理的に連結させること）は、免疫応答の下方調節をもたらし得る。

【０２３９】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アゴニストおよび共刺激性受容体の活性を遮断する別の薬剤を使用して、免疫応答を下方調節することができる。例示的な分子には、他のＰＤリガンドのアゴニスト形態、ＣＴＬＡ－４の可溶性形態、抗Ｂ７－１抗体、抗Ｂ７－２抗体、またはこれらの組み合わせが挙げられる。あるいは、２つの別個のペプチド（例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドと、Ｂ７－２および／またはＢ７－１ポリペプチドの遮断形態）、または抗体の組み合わせ（例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドに対する活性抗体と、遮断抗Ｂ７－２および／または抗Ｂ７－１モノクローナル抗体）を、単一の組成物として組み合わせるか、または別個に投与（同時または順次）して、対象における免疫細胞媒介性免疫応答を通う調節してもよい。さらに、Ｂ７－１および／またはＢ７－１活性を有する１つ以上のポリペプチドとともに、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド活性を有する１つ以上のポリペプチドの治療的に活性な量を、他の下方調節試薬と併用して、免疫応答に影響を及ぼすことができる。免疫調節試薬の例には、共刺激性シグナル（例えば、ＣＤ２８もしくはＩＣＯＳに対する）を遮断する抗体、ＣＴＬＡ４を介した阻害性シグナルを活性化する抗体、および／または他の免疫細胞マーカー（例えば、ＣＤ４０、ＣＤ４０リガンド、もしくはサイトカイン）に対する抗体、融合タンパク質（例えば、ＣＴＬＡ４－ＦｃもしくはＰＤ－１－Ｆｃ）、ならびに免疫抑制薬（例えば、ラパマイシン、シクロスポリンＡ、もしくはＦＫ５０６）が挙げられる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドはまた、細胞の破壊によって免疫細胞機能を遮断する治療薬の構築に有用であり得る。例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの部分を毒素に連結させて、それが結合する細胞の破壊を引き起こすことができる細胞毒性剤を作製することができる。

【０２４０】

そのような細胞毒性剤（例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）リシン（単独またはＰＤ－Ｌ１－リシンとの組み合わせ）のうちの１つまたはそれらの組み合わせの患者への注入は、特に、活性化免疫細胞がより多くの量のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）結合パートナーを発現するという事実を踏まえて、免疫細胞の死滅をもたらし得る。例えば、ＰＤ－１は活性化リンパ球の表面に誘導されるため、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドを使用して、Ｆｃ－Ｒ依存性機序によって、または細胞毒性薬（例えば、リシン、サポリン、もしくはカリケアマイシン）をＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドに複合体化することによって、これらの特定の細胞の枯渇を標的として、ＶＩＳＴＡの受容体を発現する細胞を殺滅させることができる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を発現する抗原提示細胞の死滅の標的とするために、毒素を抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体と複合体化させてもよい。さらなる実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－抗体－毒素は、二重特異性抗体であり得る。そのような二重特異性抗体は、例えば、ある特定の種類の細胞、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に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ために有用である。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－免疫細胞の相互作用を活性化すること（およびしたがってＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の負のシグナル伝達機能を刺激すること）による免疫応答の下方制御は、例えば、組織、皮膚、および器官移植の状況における、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）における、またはアレルギー、または自己免疫疾患、例えば、全身性エリテマトーデスおよび多発性硬化症における、免疫応答の下方調節に有用である。例えば、免疫細胞機能の遮断は、組織移植術において組織破壊の低減をもたらす。典型的に、組織移植において、移植片の拒絶は、免疫細胞がそれを外来物として認識することによって開始され、その後、移植片を破壊する免疫反応が起こる。免疫細胞（ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの可溶性多量体形態）上でＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を促進する分子を、単独ま

たは別の下方調節剤との併用で移植の前または移植時に投与することにより、共刺激性シグナルの生成を阻害することができる、さらに、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の促進はまた、免疫細胞をアネルギー化し、それによって対象に寛容を誘導するのに十分であり得る。

【０２４１】

対象において十分な免疫抑制または寛容を達成するために、他の分子の共刺激性機能を遮断することが望ましい場合がある。例えば、移植の前または移植時に、これらの抗原またはこれらの抗原に対する遮断抗体のそれぞれの活性を有するペプチドの組み合わせの可溶性形態を（別個に、または単一の組成物中で一緒に）投与することによって、Ｂ７－１およびＢ７－２の機能を遮断することが望ましい場合がある。あるいは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の阻害性活性を促進し、Ｂ７－１および／またはＢ７－２の共刺激性活性を阻害することが望ましい場合がある。本発明の下方調節法に関連して使用され得る他の下方調節剤には、例えば、ＣＴＬＡ４、ＣＴＬＡ４の可溶性形態を介して阻害性シグナルを伝送する薬剤、ＣＴＬＡ４を介して阻害性シグナルを活性化する抗体、他の免疫細胞マーカーに対する遮断抗体、または他の受容体リガンド対の可溶性形態（例えば、ＣＤ４０とＣＤ４０リガンドとの間の相互作用を破壊する薬剤（例えば、抗ＣＤ４０リガンド抗体））、サイトカインに対する抗体、または免疫抑制薬が挙げられる。例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用の活性化は、自己免疫疾患の治療に有用である。多くの自己免疫障害は、自己組織に対して反応性であり、疾患の病因に関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の防止は、疾患症状を低減または排除し得る。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を促進する薬剤の投与は、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。さらに、Ｂ７分子の受容体－リガンドの相互作用を破壊することによって免疫細胞の共刺激を遮断する薬剤と、共刺激性受容体との共投与は、免疫細胞の活性化を阻害して、疾患過程に関与し得る自己抗体またはサイトカインの賛成を防止するのに有用であり得る。自己免疫障害の防止または緩和における試薬の有効性は、ヒト自己免疫疾患の十分に特徴付けされた多数の動物モデルを使用して判定することができる。例としては、マウス実験的自己免疫性脳炎、ＭＲＬ／ｌｐｒ／ｌｐｒマウスまたはＮＺＢハイブリッドマウスにおける全身性エリテマトーデス、マウス自己免疫性コラーゲン関節炎、ＮＯＤマウスおよびＢＢ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。Ｐａｕｌ　ｅｄ．，Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９８９，ｐａｇｅｓ　８４０－８５６を参照されたい。

【０２４２】

免疫細胞活性化の阻害は、例えば、ＩｇＥ産生を阻害することによる、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有用である。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を促進する薬剤を、アレルギー対象に投与して、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ことができる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用の刺激は、適切なＭＨＣ分子とともにアレルゲンへの曝露を伴い得る。アレルギー反応は、アレルゲンの進入経路および肥満細胞もしくは好塩基球上でのＩｇＥの堆積パターンに応じて、全身的または局所的な性質であり得る。したがって、免疫細胞に媒介されるアレルギー応答は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－免疫細胞相互作用を促進する薬剤の投与によって、局所的または全身的に阻害することができる。

【０２４３】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用の刺激を介した免疫応答の下方制御はまた、自己組織の自己免疫攻撃の治療に有用であり得る。したがって、自己免疫攻撃によって引き起こされる

か、または悪化される状態（例えば、心疾患、心筋梗塞、またはアテローム性動脈硬化）は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナーとの結合を増加させることによって、緩和または改善することができる。したがって、自己免疫攻撃によって悪化する状態、例えば、自己免疫障害（ならびに、心疾患、心筋梗塞、およびアテローム性動脈硬化等の状態）を、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその対抗受容体との相互作用を刺激することによって調節することは、本発明の範囲内である。

【０２４４】

免疫応答の上方制御

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用の阻害は、免疫応答を上方制御する手段として、治療法においても有用である。免疫応答の上方制御は、既存の免疫応答を強化するか、または最初の免疫応答を誘起する形態であり得る。例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の阻害を通じて免疫応答を強化することは、微生物、例えば、細菌、ウイルス、もしくは寄生虫による感染の場合、または免疫抑制の場合に、有用である。例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を阻害する薬剤、例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）に対する非活性化抗体（すなわち、遮断抗体）、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の可溶性形態は、ウイルス、細菌、または寄生虫のより急速または徹底的なクリアランスをもたらす抗体および細胞媒介性応答の上方制御が有益である状況において、治療的に有用である。これらの状態には、ヘルペスまたは帯状疱疹等のウイルス性皮膚疾患が挙げられ、この場合、そのような薬剤は、皮膚に局所的に送達され得る。加えて、インフルエンザ、感冒、および脳炎等の全身性ウイルス性疾患は、そのような薬剤の全身投与によって緩和され得る。ある特定の事例において、免疫応答をさらに増大させるために、免疫応答を上方制御する他の薬剤、例えば、共刺激性受容体を介してシグナルを伝達するＢ７ファミリーメンバーの形態をさらに投与することが望ましい場合がある。

【０２４５】

免疫応答は、感染患者において、患者から免疫細胞を取り出し、インビトロで免疫細胞をＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を阻害する薬剤と接触させ、インビトロで刺激した免疫細胞を患者に再導入することによって、強化され得る。別の実施形態において、免疫応答を強化する方法は、感染細胞、例えばウイルス感染細胞を患者から単離し、それらに、その天然の結合パートナー（複数可）に結合することができないＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の形態をコードする核酸分子をトランスフェクトし、そうして細胞がＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子をそれらの表面に発現するようになり、トランスフェクトした細胞を患者に再導入することを伴う。トランスフェクトした細胞は、インビボで免疫細胞への阻害性シグナルを防止し、それによって免疫細胞を活性化することが可能であり得る。

【０２４６】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を阻害する薬剤は、種々のポリペプチド、例えば、病原体に由来するポリペプチドに対するワクチンにおいて予防的に使用することができる。病原体、例えば、ウイルスに対する免疫は、適切なアジュバント中で、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を阻害する薬剤とともに、ウイルス性ポリペプチドをワクチン接種することによって誘導することができる。あるいは、病原性抗原およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）と免疫細胞との相互作用を遮断するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の形態の両方をコードする遺伝子を含むベクターを、ワクチン接種に使用してもよい。核酸ワクチンは、様々な手段によって、例えば、注入（例えば、筋肉内、皮内、または粒子を皮膚に注入するために粒子加速器もしくはを圧縮ガスを用いる遺伝子銃によるＤＮＡコーティング金粒子の表皮への微粒子銃注入によって、投与され得る。Ｈａｙｎｅｓ，ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４４：３７。あるいは、核酸ワクチンは、非侵襲的手段によって投与されてもよい。例えば、純粋または脂質製剤化されたＤＮＡを、呼吸器系または他の標的

箇所に、例えば、ＤＮＡを経口送達することによりパイエル板に、送達することができる。Ｓｃｈｕｂｂｅｒｔ（１９９７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４：９６１。弱毒化した微生物を、粘膜表面への送達に使用することができる。Ｓｉｚｅｍｏｒｅ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：２９。

【０２４７】

ワクチン中の抗原は、自己抗原であり得る。そのようなワクチンは、生物における寛容の調節に有用である。自己抗原およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナーとの相互作用を遮断する薬剤での免疫付与は、寛容を破壊し得る（すなわち、自己抗原の寛容を妨害し得る）。そのようなワクチンはまた、ミョウバンまたはサイトカイン（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－１２、Ｂ７－１、もしくはＢ７－２）等のアジュバントを含み得る。一実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を阻害する薬剤を、ＭＨＣクラスＩポリペプチドとともに、例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたは遮断抗体とＭＨＣクラスＩα鎖ポリペプチドおよびβ２ミクログロブリンとを共発現するようにトランスフェクトした細胞によって投与して、Ｔ細胞の活性化をもたらし、感染からの免疫を提供することができる。例えば、ワクチンが有用なウイルス性病原体には、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核、マラリア、および住血吸虫症が挙げられる。

【０２４８】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用の阻害は、腫瘍免疫の治療に有用であり得る。腫瘍細胞（例えば、結腸直腸癌、肉腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、または癌腫）に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を阻害する核酸分子をトランスフェクトすることができる。これらの分子は、例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）にアンチセンスであるか、または非活性化抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体をコードし得る核酸分子であり得る。これらの分子はまた、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体の可変領域であり得る。所望される場合、腫瘍細胞に、共刺激を活性化する他のポリペプチド（例えば、Ｂ７－１またはＢ７－２）をトランスフェクトしてもよい。トランスフェクトした腫瘍細胞を患者に戻し、これにより、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の阻害（例えば、局所阻害）をもたらすあるいは、遺伝子療法技術を使用して、腫瘍細胞をインビボでトランスフェクションの標的とすることができる。

【０２４９】

腫瘍細胞に対する免疫応答の刺激はまた、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を阻害する薬剤で患者を治療することによって、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を阻害することによって達成され得る。そのような薬剤の好ましい例には、例えば、アンチセンス核酸分子、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を認識および遮断する抗体、ならびに免疫細胞上でＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を遮断する化合物（例えば、可溶性の一価ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）、抗原提示細胞上でＦｃ受容体に結合しないＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）結合パートナー（複数可）の可溶性形態、および対象のスクリーニングアッセイにおいて特定される化合物）が挙げられる。加えて、ＭＨＣクラスＩもしくはＭＨＣクラスＩＩ分子を欠くか、または十分な量のＭＨＣクラスＩもしくはＭＨＣクラスＩＩ分子を発現できない腫瘍細胞に、ＭＨＣクラスＩα鎖ポリペプチドおよびβ２ミクログロブリンポリペプチドまたはＭＨＣクラスＩＩα鎖ポリペプチドおよびＭＨＣクラスＩＩβ鎖ポリペプチドのすべてまたは一部分（例えば、細胞質ドメイン切断部分）をコードする核酸をトランスフェクトし、それによって、細胞表面にＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩポリペプチドを発現させることができる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）阻害ポリペプチドまたはアンチセンス核酸と併せて、適切な

ＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩを発現させることにより、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対して、Ｔ細胞媒介性免疫応答を誘導する。任意で、ＭＨＣクラスＩＩ関連ポリペプチド、例えば不変鎖の発現を遮断するアンチセンス構築物をコードする遺伝子に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）阻害ポリペプチドまたはアンチセンス核酸をコードするＤＮＡをトランスフェクトして、腫瘍関連抗原の提示を促進し、腫瘍特異的免疫を誘導することができる。Ｂ７陰性マウス腫瘍細胞によるＢ７－１の発現は、マウスにおける腫瘍拒絶および腫瘍チャレンジに対する長期保護を伴ってＴ細胞媒介性特異的免疫を誘導することが示されている。Ｃｈｅｎ，ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ　７１：１０９３－１１０２、Ｔｏｗｎｓｅｎｄ＆Ａｌｌｉｓｏｎ（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５９：３６８－３７０、Ｂａｓｋａｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９０：５６８７－５６９０。したがって、ヒト対象における免疫細胞媒介性免疫応答の誘導は、対象における腫瘍特異的寛容を克服するのに十分であり得る。別の実施形態において、免疫応答は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用の阻害によって刺激され得、その結果、既存の寛容が克服される。例えば、対象が有意な免疫応答を開始できない抗原、例えば、腫瘍特異的抗原に対する免疫応答は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）がその天然の結合パートナーに結合する能力を阻害し、積極的免疫付与の過程において外来抗原に対する応答を上昇させるためのアジュバントとして使用され得る、薬剤を投与することによって誘導することができる。

【０２５０】

免疫細胞は、対象から得られ、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を阻害する薬剤の存在下においてエキソビボで培養され、免疫細胞の集団を増殖させ得る。さらなる実施形態において、免疫細胞は、次いで、対象に投与される。免疫細胞は、当該技術分野で既知のように、例えば、免疫細胞に一次活性化シグナルおよび共刺激性シグナルを与えることによって、インビトロで増殖するように刺激され得る。種々の形態のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を阻害する薬剤を使用して、免疫細胞の増殖を共刺激することもできる。一実施形態において、免疫細胞は、国際特許第ＷＯ　９４／２９４３６号に記載の方法に従って、エキソビボで培養される。共刺激性分子は、可溶性であり得、細胞膜に付着するか、またはビーズ等の固体表面に付着し得る。

【０２５１】

本明細書の方法のいずれかを実行する際、１つ以上の追加の薬剤を投与することによって免疫応答を上方制御することは、本発明の範囲内である。例えば、サイトカイン、アジュバント、または共刺激性分子もしくはそれらのリガンドの刺激性形態といった、免疫応答を刺激することが既知の他の薬剤は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を阻害する薬剤と併せて使用することができる。

【０２５２】

Ｔ細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその対抗受容体との相互作用の調節によって調節されるサイトカインの特定

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子を使用して、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用の調節によって産生されるか、またはその産生がそれらの調節に応じて免疫細胞において強化もしくは阻害される、サイトカインを特定することができ、免疫細胞は、一次活性化シグナルによってインビトロで最適以下に刺激され得る、例えば、Ｔ細胞は、ホルボールエステル、抗ＣＤ３抗体、または好ましくはＭＨＣクラスＩＩ分子と会合した抗原で刺激され、例えば、Ｂ７ファミリー抗原の刺激性形態によって、例えば、Ｂ７ポリペプチドをコードし、ペプチドをその表面に発現させる核酸をトランスフェクトした細胞によって、またはペプチドの可溶性刺激性形態によって、共刺激性シグナルが与えられる。細胞を、次いで、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を発現する細胞（例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ

－Ｌ３）に対する抗体と接触させる培地に放出される既知のサイトカインは、ＥＬＩＳＡによって、またはサイトカインを遮断して免疫細胞増殖もしくはサイトカインによって誘導される他の細胞型を阻害する抗体の能力によって、特定され得る。例えば、ＩＬ－４ＥＬＩＳＡキットが、Ｇｅｎｚｙｍｅ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ．）から入手可能であり、ＩＬ－７遮断抗体も同様である。ＩＬ－９およびＩＬ－１２に対する遮断抗体は、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ．）から入手可能である。サイトカインプロファイルに対するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその結合パートナー（複数可）との相互作用の刺激または遮断の効果を、次いで判定することができる。上に記述され、実施例に示されるように、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）は、免疫細胞によるＩＬ－２およびγインターフェロンの発現を抑制するとみられる。

【０２５３】

上述のインビトロ免疫細胞共刺激アッセイもまた、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の調節によって調節され得る新規なサイトカインを特定するための方法において使用することができる。例えば、ＣＤ２８／ＣＴＬＡ４経路の刺激がＩＬ－２の分泌を強化するとみられる場合、ＩＣＯＳ経路の刺激は、ＩＬ－１０の分泌を強化するとみられる。Ｈｕｔｌｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ ３９７：２６３。特定の活性が共刺激により誘導される場合、例えば、免疫細胞が既知のサイトカインに対する遮断抗体の付加により阻害されない場合、この活性は、未知のサイトカインの作用からもたらされたものであり得る。共刺激後に、従来的な方法によってこのサイトカインを培地から精製し、その活性を、免疫細胞の増殖を誘導するその能力により測定する。

【０２５４】

寛容の誘導に役割を果たし得るサイトカインを特定するために、上述のインビトロＴ細胞共刺激アッセイを使用することができる。この場合、Ｔ細胞に、一次活性化シグナルを与え、選択したサイトカインと接触させるが、共刺激性シグナルは与えない。免疫細胞を洗浄し、休ませた後、細胞に、一次活性化シグナルおよび共刺激性シグナルの両方で再チャレンジを行う。免疫細胞が応答しない（例えば、増殖するか、またはサイトカインを産生する）場合、それらは、寛容化されており、サイトカインは寛容の誘導を防止しなかった。しかしながら、免疫応答が応答する場合、寛容の誘導が、サイトカインによって防止されている。寛容の誘導を防止することができるサイトカインを、移植レシピエントまたは自己免疫疾患を有する対象において寛容を誘導するためのより有効な手段として、Ｂリンパ球抗原を遮断する試薬と合わせてインビボでの遮断の標的とすることができる。例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）と結合パートナーとの相互作用を促進する薬剤とともに、サイトカイン遮断抗体を対象に投与することができる。

【０２５５】

したがって、要約すると、Ｔｒｅｇ細胞によって発現される、プログラム死リガンド（ＰＤＬ）ファミリーの新規なメンバーが、ここに特定された。この新規なタンパク質は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）と指定されている。このＰＤ－Ｌファミリーの受容体は、単一のＩｇＶドメインを含有するＩ型膜貫通タンパク質であるが、このリガンドは、ＩｇＶおよびＩｇＣ細胞外ドメインの両方を発現するＩ型膜貫通タンパク質である。ＰＤＬファミリーの他のメンバーと同様に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）は、インビトロでＴ細胞のαＣＤ３増殖を共刺激する。加えて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の発現は、αＣＤ３活性化Ｔｒｅｇでは増加され、αＧＩＴＲの存在下では低減される。

【０２５６】

第２に、ＴＮＦ様タンパク質もまた、αＣＤ３／αＧＩＴＲ刺激により上方制御されるとして特定されている。このタンパク質は、Ｔｒｅｇ－ｓＴＮＦと指定されている。これらのタンパク質は、接触依存性およびパラクリンの免疫抑制に関与し得、したがって、免疫応答の調節（例えば、阻害または刺激）ならびにＴｒｅｇシグナル伝達が関与する疾患および状態の治療において有用である。例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質は

、免疫細胞の活性化を刺激または強化するための共刺激性シグナルとして使用することができる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質およびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）結合剤ならびにＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アゴニストおよびアンタゴニストは、Ｔ細胞免疫の制御、例えば、Ｔ細胞の活性化、分化、および増殖の調節、特に、Ｔ細胞と骨髄系由来ＡＰＣとの間の同族相互作用の際のＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖、サイトカイン産生、およびＴ細胞応答の調節が所望される免疫状態の治療に特に有用である。

【０２５７】

ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチド

本発明は、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドを提供する。本発明者らは、驚くべきことに、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドが、負の免疫調節剤として機能することを発見した。例示的なＶＩＳＴＡポリペプチドは、配列番号２、４、および５に提供される。本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子は、次のドメイン、すなわちシグナルペプチドドメイン、ＩｇＶドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインのうちの少なくとも１つ以上を含む。本発明の単離ポリペプチド、好ましくはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドは、配列番号２もしくは４、または５のアミノ酸配列に十分に同一なアミノ酸配列を含み得るか、あるいは、配列番号１もしくは３またはそれらのフラグメントもしくは構成要素に十分に同一なヌクレオチド配列によってコードされる。本明細書に使用される際、「十分に同一」という用語は、第１および第２のアミノ酸またはヌクレオチド配列が、共通の構造ドメインもしくはモチーフおよび／または共通の機能的活性を共有するように、第１のアミノ酸またはヌクレオチド配列が、第２のアミノ酸またはヌクレオチド配列に対して十分または最低限な数の同一または同等のアミノ酸残基またはヌクレオチド（例えば、類似の側鎖を有するアミノ酸残基）を含有することを指す。例えば、共通の構造ドメインを共有するアミノ酸またはヌクレオチド配列は、そのドメインのアミノ酸配列全体にわたり、少なくとも３０％、４０％、または５０％の相同性、好ましくは６０％の相同性、より好ましくは７０～８０％、およびさらにより好ましくは９０～９５％の相同性を有し、少なくとも１つ、および好ましくは２つの構造ドメインまたはモチーフを含有し、本明細書において十分に同一であると定義される。さらに、少なくとも３０％、４０％、または５０％、好ましくは６０％、より好ましくは７０～８０％、または９０～９５％の相同性を共有し、共通の機能的活性を共有する、アミノ酸またはヌクレオチド配列は、本明細書において十分に同一であると定義される。ＶＩＳＴＡポリペプチドの細胞外ドメインは、ＩｇＶドメインを含み得、またシグナルペプチドドメインを含み得る。図１および２３を参照されたい。

【０２５８】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドは、少なくとも１つの細胞外ドメインを有し得、シグナルペプチドドメイン、ＩｇＶドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインのうちの１つ以上は、好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において、本明細書における配列番号１または３のヌクレオチド配列の相補体を含む核酸分子にハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされる。例示される単離ヒトおよびマウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ｃＤＮＡのヌクレオチドおよびアミノ酸配列の配列、ならびにヒトＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の予測アミノ酸配列は、本明細書に列挙される配列に含まれる。

【０２５９】

本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドは、「膜貫通ドメイン」の存在に基づいて特定することができる。ＰＤＬ３の膜貫通ドメイン領域が、本明細書に特定される。例えば、図１および２３を参照されたい。本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）分子は、ポリペプチドまたは対応する核酸分子における「ＩｇＣドメイン」の不在および「ＩｇＶドメイン」の存在に基づいて特定され得る。ＩｇＶドメインを構築する、天然のヒトおよびマウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドのアミノ酸残基は、図１および２３に見ることができる。ＩｇＶドメインの存在が、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との結合に必要とされる可能性が高い。

【０２６０】
ＶＩＳＴＡポリペプチドをコードする核酸は、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体の特異的抗原性（例えば、ＶＩＳＴＡポリペプチドが、抗ＶＩＳＴＡ抗体によって結合される）を保持する、少なくとも１つのＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体を含む変異体ポリペプチドをもたらす、アミノ酸配列における欠失、付加、および置換を含むがこれらに限定されない、標準的な分子生物学技術を使用して修飾され得る。加えて、少なくとも１つのＶＩＳＴＡポリペプチドを含む変異体ポリペプチドはまた、ＶＩＳＴＡポリペプチドの抗原性を保持し得る（例えば、対象における免疫付与の際、それぞれ、ＶＩＳＴＡポリペプチドおよび変異体ＶＩＳＴＡポリペプチドに対する特異的免疫応答を上昇させる）。ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドを、薬学的担体とともに製剤化して、「癌ワクチン」として有用な抗原組成物（例えば、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に対する特異的免疫応答を誘起し、対象における免疫付与の後に抗腫瘍抗体を産生する、薬学的組成物）を製造することができる。本明細書に記載されるＶＩＳＴＡポリペプチドおよびＶＩＳＴＡ複合体を使用して、自己免疫障害および炎症性疾患を治療することができる。

【０２６１】
ポリペプチド誘導体および類似体
本明細書に記載されるポリペプチドは、分解産物、合成ペプチド、または組み換えペプチド、ならびにペプチド模倣体、合成ペプチド、ペプトイド、およびセミペプトイド（例えば、例として、体内中でペプチドをより安定させるか、または細胞内への侵入がより可能である、修飾を有し得る、ペプチド類似体）であり得ることが理解されるであろう。本明細書に記載されるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドの修飾には、Ｎ末端修飾、Ｃ末端修飾、ペプチド結合修飾（例えば、CH_2－ＮＨ、CH_2－Ｓ、CH_2－Ｓ＝Ｏ、Ｏ＝Ｃ－ＮＨ、CH_2－Ｏ、CH_2－CH_2、Ｓ＝Ｃ－ＮＨ、ＣＨ＝ＣＨ、またはＣＦ＝ＣＨ）、骨格修飾、および残基修飾が挙げられるが、これらに限定されない。ペプチド模倣体化合物を調製するための方法は、当該技術分野で周知である。Ｍａｒｔｉｎ，（２０１０）Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ：Ａ Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ［２ｎｄ Ｅｄ．］ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ。

【０２６２】
ペプチド内のペプチド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）は、例えば、Ｎ－メチル化結合（－Ｎ（CH_3）－ＣＯ－）、エステル結合（－Ｃ（Ｒ）Ｈ－Ｃ－Ｏ－Ｏ－Ｃ（Ｒ）－Ｎ－）、ケトメチレン結合（－ＣＯ－ＣＨ２－）、α－アザ結合（－ＮＨ－Ｎ（Ｒ）－ＣＯ－）（式中、Ｒは、アルキル、例えば、メチルである）、カルバ結合（－CH_2－ＮＨ－）、ヒドロキシエチレン結合（－ＣＨ（ＯＨ）－CH_2－）、チオアミド結合（－ＣＳ－ＮＨ－）、オレフィン二重結合（－ＣＨ＝ＣＨ－）、レトロアミド結合（－ＮＨ－ＣＯ－）、ペプチド誘導体（－Ｎ（Ｒ）－CH_2－ＣＯ－）で置換され得、式中、Ｒは、天然に炭素原子上に提示される、「通常の」側鎖である。これらの修飾は、ペプチド鎖に沿った結合のうちのいずれかに、さらには同時に複数（２～３）箇所に生じ得る。

【０２６３】
天然の芳香族アミノ酸であるＴｒｐ、Ｔｙｒ、およびＰｈｅは、フェニルグリシン、ＴＩＣ、ナフチルラニン（ｎａｐｈｔｈｙｌｅｌａｎｉｎｅ）（Ｎｏｌ）、フェニルアラニンの環メチル化誘導体、フェニルアラニンのハロゲン化誘導体、またはｏ－メチル－チロシンといった合成の非天然酸によって置換され得る。上のものに加えて、本発明のポリペプチドはまた、１つ以上の修飾アミノ酸または１つ以上の非アミノ酸モノマー（例えば、脂肪酸、複合炭水化物）、例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリン、およびホスホスレオニンと、２－アミノアジピン酸、ヒドロキシリジン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシン、およびオルニチンを含むがこれらに限定されない他の以上アミノ酸とを含み得る。さらに、「アミノ酸」という用語は、Ｄ－およびＬ－アミノ酸の両方が含まれる。

【０２６４】
本発明のポリペプチドは、好ましくは、ペプチドが可溶性形態であることを要する治療

薬に利用されるため、本発明のポリペプチドは、それらのヒドロキシル含有側鎖に起因してペプチドの可溶性を増加させることができるセリンおよびスレオニンを含むがこれらに限定されない、１つ以上の非天然または天然の極性アミノ酸を含み得る。

【０２６５】

本発明のポリペプチドは、線形形態であり得るが、ケース状（ｉｎ　ｃａｓｅｓ）もまた利用可能であることが理解されるであろう。

【０２６６】

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドは、それを発現するように改変されている細胞（例えば、組み換え）から精製され得る。ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドをコードするＤＮＡ配列が、発現ベクターに挿入され、次いで、適切な宿主細胞において形質転換（もしくはトランスフェクト）され得る、および／またはトランスジェニック動物において発現され得る。このようにして発現されるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドは、次いで、当該技術分野で既知の方法によって単離され得る。例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ［３ｒｄ　Ｅｄ．］Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０２６７】

本発明のポリペプチドは、標準的な固相技術を使用する等により、生化学的に合成され得る。これらの方法には、排他的固相合成、部分的固相合成法、フラグメント縮合、古典的溶液合成が挙げられる。これらの方法は、好ましくは、ペプチドが比較的短い（すなわち、１０ｋＤａ）場合、および／またはそれが組み換え技術によって産生できず（すなわち、核酸配列によってコードされない）、したがって異なる化学作用が関与する場合に、用いられる。固相ペプチド合成手順は、当該技術分野で周知であり、Ｓｔｅｗａｒｔ（１９８４）Ｓｏｌｉｄ　Ｐｈａｓｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｅｓ［２ｎｄ　Ｅｄ．］Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ　ａｎｄ　Ｂｅｎｏｉｔｏｎ（２００５）Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ｏｆ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓによってさらに説明されている。合成ペプチドは、分取拘束液体クロマトグラフィーによって精製することができ、その組成物は、アミノ酸シークエンシングによって確認することができる。Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ（１９９２）［２ｎｄ　Ｅｄ．］Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ、Ａｇｕｉｌａｒ（２００４）［Ｅｄ．］ＨＰＬＣ　ｏｆ　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓｉｍｐｓｏｎ（２００２）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　［２ｎｄ　Ｅｄ．］Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０２６８】

大量の本発明のポリペプチドが所望される場合、本発明のポリペプチドは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（２００２）“Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（ＢＥＶｓ）ａｎｄ　Ｉｎｓｅｃｔ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ”Ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ　Ｍａｎｕａｌ、Ｈａｔｔｉ－Ｋａｕｌ　ａｎｄ　Ｍａｔｔｉａｓｓｏｎ（２００３）［Ｅｄｓ］Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、Ａｈｍｅｄ（２００４）Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ，Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓに記載されるもの等の組み換え技術を用いて生成することができる。さらなる組み換え技術は、例えば、Ｂｉｔｔｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６－５４４、Ｓｔｕｄｉｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：６０－８９、Ｂｒｉｓｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ　３１０：５１１－５１４、Ｔａｋａｍａ

tsu, et al.（１９８７）EMBO J.６：３０７－３１１、Coruzzi, et al.（１９８４）EMBO J.３：１６７１－１６８０、およびBrogli, et al.（１９８４）Science ２２４：８３８－８４３、Gurley, et al.（１９８６）Mol. CellBiol.６：５５９－５６５、およびWeissbach&Weissbach（１９８８）Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pages ４２１－４６３によって記載されるもの等である。

【０２６９】

ポリペプチド配列変異体

本明細書に記載されるいずれのＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体配列についても、さらなる特徴付けおよび最適化は、アミノ酸残基の付加または除去のいずれかを系統的に行って、より長いかまたは短いペプチドを生成し、それらおよび生成された配列を、より長いかまたは短い大きさのウインドウをその点から抗原の上下に移動することによって試験することによって、達成することができる。新しい候補標的を生成するこのアプローチを、免疫原性アッセイにおいてそれらの配列に基づいて抗原分子の有効性の試験と連結させることは、当該技術分野で既知のように、または本明細書に記載されるように、抗原のさらなる操作をもたらし得る。なおもさらに、このように最適化された配列は、当該技術分野で既知および／または本明細書で論じられるように、例えば、付加、欠失、または他の突然変異によって調整して、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体をさらに最適化（例えば、血清安定性および循環半減期の増加、熱安定性の増加、送達の強化、免疫原性の強化、可溶性の増加、特定のインビボ位置もしくは細胞型への標的化）することができる。

【０２７０】

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドは、保存的置換突然変異（すなわち、１つ以上のアミノ酸と類似のアミノ酸との置換）を含み得る。例えば、保存的置換は、あるアミノ酸と、同じ一般的クラス内の別ののものとの置換、例えば、１つの酸性アミノ酸と別の酸性アミノ酸、１つの塩基性アミノ酸と別の塩基性アミノ酸、または中性アミノ酸と別の中性アミノ酸との置換を指す。

【０２７１】

ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチド配列は、配列番号２、４、または５のポリペプチド配列のうちのいずれか１つ以上に少なくとも約６０、６５、７０、７５、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の配列相同性を有し得る。より好ましくは、本発明は、配列番号２、４、または５のＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチド配列のポリペプチド配列のうちのいずれか１つ以上に、少なくとも約９５％の配列相同性、さらにより好ましくは少なくとも約９８％の配列相同性、およびなおもより好ましくは少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチド配列を企図する。アミノ酸配列間、ならびに核酸配列間の相同性を判定する方法は、当業者に周知である。例えば、Ｎｅｄｅｌｋｏｖ&Ｎｅｌｓｏｎ（２００６）New and Emerging Proteomic Techniques Humana Pressを参照されたい。

【０２７２】

したがって、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドは、あるポリペプチド配列と、少なくとも約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列相同性を有し得る。例えば、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドは、配列番号２、４、または５と、少なくとも約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列相同性を有し得る。

【０２７３】
相同性または同一性という用語は、他のタンパク質との一致アミノ酸の数（同一性）を意味するとして理解され、パーセントで表される。同一性は、好ましくは、所与の配列と他のタンパク質とを、コンピュータプログラムを用いて比較することによって判定される。互いに比較される配列の長さが異なる場合、同一性は、短い配列が長い配列と共有するアミノ酸の数によって同一性の割合を判定するような方法で判定されることになる。同一性は、例えば、ＣｌｕｓｔａｌＷといった、公的に利用可能な既知のコンピュータプログラムを用いて日常的に判定され得る。Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２２：４６７３－４６８０。ＣｌｕｓｔａｌＷは、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから公的に入手可能であり、種々のインターネットページから、とりわけ、ＩＧＢＭＣ（Ｉｎｓｔｉｔｕｔ ｄｅ Ｇｅｎｅｔｉｑｕｅ ｅｔ ｄｅ Ｂｉｏｌｏｇｉｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｉｒｅ ｅｔ Ｃｅｌｌｕｌａｉｒｅ）ならびにＥＢＩおよびすべてのミラーＥＢＩインターネットページ（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）からダウンロードすることができる。ＣｌｕｓｔａｌＷコンピュータプログラムバージョン１．８を使用して、例えば、本出願の参照タンパク質と他のタンパク質との間の同一性を判定する場合、次のパラメータを設定する：ＫＴＵＰＬＥ＝１、ＴＯＰＤＩＡＧ＝５、ＷＩＮＤＯＷ＝５、ＰＡＩＲＧＡＰ＝３、ＧＡＰＯＰＥＮ＝１０、ＧＡＰＥＸＴＥＮＤ＝０．０５、ＧＡＰＤＩＳＴ＝８、ＭＡＸＤＩＶ＝４０、ＭＡＴＲＩＸ＝ＧＯＮＮＥＴ、ＥＮＤＧＡＰＳ（ＯＦＦ）、ＮＯＰＧＡＰ、ＮＯＨＧＡＰ。Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＥＢＩ）ツールボックス（オンラインで利用可能）およびＳｍｉｔｈ（２００２）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ［２ｎｄ Ｅｄ．］Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓもまた参照されたい。

【０２７４】
類似の配列を見出す１つの可能性は、配列データベースリサーチを実行することである。ここで、１つ以上の配列は、クエリとして知られるものとして入力され得る。このクエリ配列を、次いで、統計的コンピュータプログラムを使用して、選択されたデータベースに存在する配列と比較する。そのようなデータベースクエリ（ｂｌａｓｔ検索）は、当業者に既知であり、異なる供給業者で実行され得る。例えば、そのようなデータベースクエリがＮＣＢＩ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）において実行される場合、それぞれの比較クエリに対する標準的な設定を使用するべきである。タンパク質配列比較（ｂｌａｓｔｐ）については、これらの設定は次の通りである：ｅｎｔｒｅｚ限定（Ｌｉｍｉｔ ｅｎｔｒｅｚ）＝非作動、フィルター（Ｆｉｌｔｅｒ）＝低複雑度作動、期待値（Ｅｘｐｅｃｔ ｖａｌｕｅ）＝１０、文字列長さ（ｗｏｒｄ ｓｉｚｅ）＝３、行列（Ｍａｔｒｉｘ）＝ＢＬＯＳＵＭ６２、ギャップコスト（Ｇａｐ ｃｏｓｔｓ）：存在（Ｅｘｉｓｔｅｎｃｅ）＝１１、伸長（Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ）＝１。そのようなクエリの結果は、他のパラメータの中でも、クエリ配列とデータベースに見出される類似配列との間の同一性の程度である。

【０２７５】
ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体は、当該ポリペプチドの機能的フラグメントを含む。当該ポリペプチドの「機能的フラグメント」には、当該ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体をコードする遺伝子またはｃＤＮＡのフラグメントが含まれ、このフラグメントは、免疫応答（例えば、体液性または細胞性免疫応答）を誘起することができる。したがって、例えば、本発明によるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体のフラグメントは、抗原の免疫原性に寄与するアミノ酸残基に対応し、これらのフラグメントは、免疫応答（例えば、体液性または細胞性免疫応答）を誘起する抗原として機能するように作用し得る。本発明のこの態様はまた、本発明によるポリペプチドの異なってスプライシングされたアイソフォームおよび転写開始部位を含む。本発明によるポリペプチドはまた、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体のフラグメント、誘導体、および対立遺伝子変異体を含め得る。ＶＩＳ

ＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドのフラグメントを作製するための方法および材料は、当該技術分野で周知である。例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ［３ｒｄ Ｅｄ．］Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０２７６】

変異体ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドは、それらのそれぞれの抗体に結合するそれらの抗原特異性を保持する（例えば、変異体ＶＩＳＴＡポリペプチドは、抗ＶＩＳＴＡ抗体によって結合される）。完全に抗原性の変異体は、保存的変異または重要でない残基もしくは重要でない領域における変異のみを含有し得る。抗原変異体はまた、抗原性に変化をもたらさないか、またはわずかな変化をもたらす、類似のアミノ酸の置換を含有し得る。あるいは、そのような置換は、抗原性にいくらかの正または負の影響を及ぼし得る。非抗原変異体は、典型的に、１つ以上の非保存的アミノ酸置換、欠失、挿入、逆転、もしくは切断、またはエピトープ中の重要な残基または重要な領域における置換、挿入、逆転、もしくは欠失を含有する。ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドを修飾しながら、同時にポリペプチドのそれらのそれぞれの抗体に対する特異的抗原性を保つための分子生物学および生化学技術は、当該技術分野で周知である。例えば、Ｈｏ，ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｅ ７７（１）：５１－５９、Ｌａｎｄｔ，ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｇｅｎｅ ９６（１）：１２５－１２８、Ｈｏｐｐ＆Ｗｏｏｄｓ（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８（６）：３８２４－３８２８、Ｋｏｌａｓｋａｒ＆Ｔｏｎｇａｏｎｋａｒ（１９９０）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ２７６（１－２）：１７２－１７４、およびＷｅｌｌｉｎｇ，ｅｔ ａｌ．（１９８５）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ １８８（２）：２１５－２１８を参照されたい。

【０２７７】

ＶＩＳＴＡアゴニスト（模倣体）またはＶＩＳＴＡアンタゴニストのいずれかとして機能するＶＩＳＴＡポリペプチドの変異体。ＶＩＳＴＡポリペプチドの変異体は、ＶＩＳＴＡポリペプチドの突然変異生成、例えば、離散点突然変異または切断によって生成され得る。ＶＩＳＴＡポリペプチドのアゴニストは、ＶＩＳＴＡポリペプチドの天然の形態と実質的に同じ生物学的活性、またはそのサブセットを保持し得る。ＶＩＳＴＡポリペプチドのアンタゴニストは、例えば、ＶＩＳＴＡポリペプチドのＶＩＳＴＡ媒介性活性を競合的に調節することによって、ＶＩＳＴＡポリペプチドの天然の形態の活性のうちの１つ以上を阻害し得る。したがって、特定の生物学的効果は、制限された機能の変異体を用いた治療によって誘起され得る。例えば、対象は、ＶＩＳＴＡポリペプチドの天然の形態での治療と比較して、対象における副作用がより少ない、ポリペプチドの天然の形態の生物学的活性のサブセットを有する変異体で治療され得る。

【０２７８】

ＶＩＳＴＡアゴニスト（模倣体）またはＶＩＳＴＡアンタゴニストのいずれかとして機能するＶＩＳＴＡポリペプチドの変異体は、ＶＩＳＴＡポリペプチドの突然変異体、例えば、切断突然変異体のコンビナトリアルライブラリーを、ＶＩＳＴＡポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって特定することができる。本主題のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）結合剤で治療可能な疾患は、既に特定されており、それらには、種々の炎症性障害、自己免疫障害、癌、アレルギー障害、および感染性障害が含まれる。特定に好ましい適応症は、多発性硬化症である。

【０２７９】

ペプチド模倣体

天然のアミノ酸のみからなるＶＩＳＴＡポリペプチドに加えて、ＶＩＳＴＡペプチド模倣体もまた提供される。ペプチド類似体は、鋳型ペプチドのものに類似の特性を有する非ペプチド薬として薬学の分野で広く使用される。これらの種類の非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣物（ｐｅｐｔｉｄｅ ｍｉｍｅｔｉｃ）」または「ペプチド模倣体（ｐｅｐｔｉｄｏｍｉｍｅｔｉｃ）」と称され（Ｆａｕｃｈｅｒｅ（１９８６）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ

Ｒｅｓ．１５：２９、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄ Ｍｉｍｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｏｍｉｍｅｔｉｃｓ（Ｖｏｌｕｍｅ ２）Ａｎｄｒｅｗ Ａｂｅｌｌ（Ｅｄ．）（１９９９）ＪＡＩ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．、およびＥｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ ３０：１２２９）、通常、コンピュータ化された分子モデリングを用いて開発される。治療的に有用なペプチドに構造的に類似するペプチド模倣体を使用して、同等の治療的または予防的効果を生成することができる。一般に、ペプチド模倣体は、ヒトまたはマウスＶＩＳＴＡ等、パラダイムポリペプチド（すなわち、生物学的または薬理学的活性を有するポリペプチド）に構造的に類似であるが、当該技術分野で既知であり、以下の参考文献にさらに説明される方法によって、-CH_2NH-、-CH_2S-、-CH_2-CH_2-、-CH＝CH-（シスおよびトランス）、-COCH_2-、-CH（OH）CH_2-、および-CH_2SO-からなる群から選択される連結によって任意に置換される１つ以上のペプチド連結を有する：Ｓｐａｔｏｌａ ｉｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ，Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ，Ｂ．，ｅｄ．，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐ．２６７（１９８３）、Ｓｐａｔｏｌａ，Ｖｅｇａ Ｄａｔａ（Ｍａｒｃｈ １９８３），Ｖｏｌ．１，Ｉｓｓｕｅ ３，“Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｂａｃｋｂｏｎｅ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ”、Ｍｏｒｌｅｙ（１９８０）Ｔｒｅｎｄｓ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．ｐｐ．４６３－４６８、Ｈｕｄｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．（１９７９）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔ．Ｒｅｓ．１４：１７７－１８５（-CH_2NH-、$CH_2$$CH_2$-）、Ｓｐａｔｏｌａ，ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｌｉｆｅ．Ｓｃｉ．３８：１２４３－１２４９（-CH2-S）、Ｈａｎｎ，（１９８２）Ｊ．Ｃｈｅｍ．ＳｏＣ Ｐｅｒｋｉｎ．Ｔｒａｎｓ．Ｉ ３０７－３１４（-CH-CH-、シスおよびトランス）、Ａｌｍｑｕｉｓｔ，ｅｔ ａｌ．（１９８０）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２３：１３９２－１３９８（-$COCH_2$-）、Ｊｅｎｎｉｎｇｓ－Ｗｈｉｔｅ，ｅｔ ａｌ．（１９８２）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．２３：２５３３（-$COCH_2$-）、（-CH（OH）CH_2-）、Ｈｏｌｌａｄａｙ，ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ．Ｌｅｔｔ．２４：４４０１－４４０４（-C（OH）CH_2-）、およびＨｒｕｂｙ（１９８２）Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．３１：１８９－１９９（-CH_2-S-）。特に好ましいい非ペプチド連結は、-CH_2NH-である。そのようなペプチド模倣体は、例えば、より経済的な産生、より優れた安定性、薬理学的特性（半減期、吸収、強度、有効性）の強化、改変された特異性（例えば、広範囲の生物学的活性）、抗原性の低減等を含む、ポリペプチドの実施形態に優る重要な利点を有し得る。ペプチド模倣体の標識化には、通常、１つ以上の標識を、直接またはスペーサー（例えば、アミド基）を通じて、定量的構造活性データおよび／または分子モデリングによって予測されるペプチド模倣体上の非干渉位置（複数可）に共有結合させることを伴う。そのような非干渉位置は、通常、ペプチド模倣体が結合して治療効果をもたらす巨大分子との直接的な接触を形成しない位置である。ペプチド模倣体の誘導体化（例えば、標識化）は、ペプチド模倣体の所望される生物学的または薬理学的活性を実質的に妨害するべきではない。

【０２８０】

ＶＩＳＴＡアミノ酸配列中の１つ以上のアミノ酸と、同じ種類のＤ－アミノ酸との系統的置換（例えば、Ｌ－リジンの代わりにＤ－リジン）を用いて、より安定なペプチドを生成することができる。加えて、ＶＩＳＴＡアミノ酸配列または実質的に同一の配列変異を含む拘束されたペプチドを、当該技術分野で既知の方法（Ｒｉｚｏ ａｎｄ Ｇｉｅｒａｓｃｈ（１９９２）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６１：３８７）によって、例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を付加することによって、生成することができる本明細書に特定されるＶＩＳＴＡポリペプチドのアミノ酸配列は、当業者によるＶＩＳＴＡペプチド配列およびその配列変異体に対応するポリペプチドの生成を可能にする。そのようなポリペプチドは、ＶＩＳＴＡペプチド配列をコードするポリヌクレオチドの発現によって、多くの場合はより大きなポリペプチドの一部として、原核生物または真核生物の宿主細胞において生成され得る。あ

るいは、そのようなペプチドは、化学的方法によって合成され得る。組み換え宿主における異種ポリペプチドの発現、ポリペプチドの化学合成、およびインビトロ翻訳のための方法は、当該技術分野で周知である。ある特定のアミノ末端および／もしくはカルボキシ末端修飾、ならびに／またはコア配列へのペプチド伸長により、安定性の強化、効力および／もしくは有効性の増加、血清プロテアーゼに対する耐性、望ましい薬物動態特異性等といった、有益な物理的、化学的、生化学的、および薬力学的特性を提供することができる。ペプチドを治療的に使用して、例えば、患者における共刺激を変化させることによって、疾患を治療することができる。

【０２８１】

機能に必須であるアミノ酸は、部位特異的突然変異生成またはアラニンスキャニング突然変異生成といった、当該技術分野で既知の方法によって特定することができる。Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ，ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｓｃｉ．２４４：１０８１－８５。後者の手順は、単一のアラニン突然変異を、分子中のすべての残基に導入する。結果として得られる突然変異分子を、次いで、エピトープ結合またはインビトロＡＤＣＣ活性といった、生物学的活性に関して試験する。リガンド－受容体の結合に極めて重要な部位はまた、結晶学、核磁気共鳴、または光親和性標識といった、構造的分析によって判定することができる。Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２４：８９９－９０４、ｄｅ　Ｖｏｓ，ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉ．２５５：３０６－１２。

【０２８２】

例えば、置換の１つのクラスは、保存アミノ酸置換である。そのような置換は、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドにおける所与のアミノ酸と、同様の特徴の別のアミノ酸とを置換するものである。典型的に保存的置換として見なされるものは、脂肪族アミノ酸Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、およびＩｌｅ間における１つと別のものとの置き換え、ヒドロキシル残基ＳｅｒとＴｈｒとの入れ替え、酸性残基ＡｓｐとＧｌｕとの交換、アミド残基ＡｓｎとＧｌｎとの間の置換、塩基性残基ＬｙｓとＡｒｇとの交換、芳香族残基Ｐｈｅ、Ｔｙｒ間の置き換えである。どのアミノ酸の変化が表現型的にサイレントであるかに関する指針は、例えば、例えば、Ｂｏｗｉｅ，ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｓｃｉ．２４７：１３０６－１０に見出される。したがって、当業者には、本発明者らがすべての特異的変異体を説明することなくペプチド変異体を有することが理解される。アミノ酸配列に関しては、当業者であれば、コードされる配列中の単一のアミノ酸またはわずかな割合のアミノ酸を改変、付加、または欠失させる、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列への個々の置換、欠失、または付加が、改変があるアミノ酸と化学的に類似するアミノ酸との置換をもたらす、「保存的修飾変異体」であることを認識するであろう。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当該技術分野で周知である。そのような保存的修飾変異体は、追加であり、本発明の多形変異体、種間相同体、および対立遺伝子を除外するものではない。例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ（１９９２）Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ［２ｎｄ　Ｅｄ．］Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎを参照されたい。

【０２８３】

さらに、ポリペプチドは、しばしば、２０個の「天然の」アミノ酸以外のアミノ酸を含む。さらに、末端アミノ酸を含む多数のアミノ酸は、プロセシングおよび他の翻訳後修飾といった自然のプロセスによって、または当該技術分野で周知の化学的修飾技術によって、修飾され得る。既知の修飾には、アセチル化、アシル化、ＡＤＰ－リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトール（ｐｈｏｓｐｈｏｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ）の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ｇ－カルボキシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解性プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化（ｓｅｌｅｎｏｙｌａｔｉｏｎ）、硫酸化、タンパ

ク質へのアミノ酸の転移ＲＮＡ媒介性付加、例えばアルギニン化、ならびにユビキチン化が挙げられるが、これらに限定されない。Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ（１９９２）Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ［２ｎｄ Ｅｄ．］およびＬｕｎｄｂｌａｄ（１９９５）Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ［１ｓｔ Ｅｄ．］を参照されたい。本主題に関して多数の詳細な考察が利用可能である。例えば、Ｗｏｌｄ（１９８３）Ｐｏｓｔｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｖａｌｅｎｔ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ａｃａｄ．Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ、Ｓｅｉｆｔｅｒ，ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２：６２６－４６、およびＲａｔｔａｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６３：４８－６２を参照されたい。

【０２８４】

フラグメント

ＶＩＳＴＡポリペプチドの生物学的に活性な部分には、ＶＩＳＴＡ分子と非ＶＩＳＴＡ分子、例えば、ＶＩＳＴＡの天然のリガンドとの間の相互作用に関与する、ＶＩＳＴＡポリペプチドのフラグメントが含まれる。ＶＩＳＴＡポリペプチドの生物学的に活性な部分には、ＶＩＳＴＡポリペプチドのアミノ酸配列、例えば、配列番号２、４、または５に示されるアミノ酸配列と十分に同一であるか、またはそれに由来するアミノ酸配列を含み、全長ＶＩＳＴＡポリペプチドよりも少ないアミノ酸を含み、ＶＩＳＴＡポリペプチドの少なくとも１つの活性を呈する、ペプチドが含まれる。典型的に、生物学的に活性な部分は、ＶＩＳＴＡポリペプチドの少なくとも１つの活性、例えば、抗ＣＤ３に対するＣＤ４Ｔ細胞の増殖性応答の調節（抑制）、抗原特異的な様式での同族ＣＤ４Ｔ細胞の増殖性応答の抑制、特定のサイトカインの発現に対する効果を有する、ドメインまたはモチーフを含む。ＶＩＳＴＡポリペプチドの生物学的に活性な部分は、例えば、２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２２５、またはそれ以上のアミノ酸長である、ポリペプチドであり得る。ＶＩＳＴＡポリペプチドの生物学的に活性な部分は、ＶＩＳＴＡ媒介性活性、例えば、免疫細胞の活性化を調節する薬剤を開発するために、標的として使用され得る。

【０２８５】

ＶＩＳＴＡポリペプチドの生物学的に活性な部分は、細胞外ドメインの少なくとも一部分を含み得る。ＶＩＳＴＡポリペプチドの生物学的に活性な部分は、細胞外ドメインの少なくとも一部分（例えば、ＩｇＶを含む）と、次のドメイン、すなわちシグナルペプチドドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞質ドメインのうちの１つ以上とを含有し得る。さらに、ポリペプチドの他の領域が欠失した、他の生物学的に活性な部分を、組み換え技術によって調製し、天然のＶＩＳＴＡポリペプチドの機能的活性のうちの１つ以上に関して評価することができる。

【０２８６】

ＶＩＳＴＡポリペプチドは、配列番号２、４、または５に示されるアミノ酸配列を有し得る。ＶＩＳＴＡポリペプチドは、配列番号２、４、または５と実質的に同一であり得、配列番号２、４、または５のポリペプチドの機能的活性を保持するが、本明細書に記載されるように、天然の対立遺伝子の変異または突然変異生成のために、依然としてアミノ酸配列が異なる。

【０２８７】

融合タンパク質

ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドを含む融合体もまた、本発明の範囲内である。例えば、融合タンパク質は、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチド配列がＧＳＴ配列のＣ末端に融合される、ＧＳＴ融合タンパク質に連結され得る。そのような融合タンパク質は、組み換えＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドの精製を促進し得る。あるいは、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドは、Ｂ細胞小胞に結合するタンパク質と融合し、したがって、体液性免疫応答およびＴ細胞の活性化の両方を開始することができる。Ｂｅｒｎｅｙ，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅ

d．１９０：８５１－６０。あるいは、例えば、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドは、抗樹状細胞抗体と遺伝的に結合して、抗原を免疫系に送達し、細胞性免疫応答を刺激することができる。Ｈｅ，ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１０：１９２０－２７。本発明のキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組み換えＤＮＡ技術によって産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするＤＮＡフラグメントを、従来的な技術に従って、例えば、平滑末端または付着末端をライゲーションに用いること、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じた付着端の補充、望ましくない接合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的ライゲーションによって、インフレームで一緒にライゲーションする。融合遺伝子は、自動化ＤＮＡ合成装置を含む従来的な技術によって合成することができる。

【０２８８】

融合タンパク質は、Ｃ末端またはＮ末端転座配列を含み得る。さらに、融合タンパク質は、例えば、タンパク質の検出、精製、または他の用途のための追加の要素を含み得る。固定化金属上での精製を可能にするポリヒスチジン域、ヒスチジン－トリプトファンモジュール、もしくは他のドメインといった金属キレート化ペプチド；マルトース結合タンパク質；固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするタンパク質Ａドメイン；またはＦＬＡＧ伸長／親和性精製システム（Ｉｍｍｕｎｅｘ　Ｃｏｒｐ，Ｓｅａｔｔｌｅ　ＷＡ．）で用いられるドメインを含むがこれらに限定されない、検出および精製を促進するドメイン。

【０２８９】

融合タンパク質は、免疫グロブリンの定常領域を含む、免疫グロブリンの一部分との融合によって、本発明のタンパク質から調製され得る。より好ましくは、免疫グロブリンの部分は、重鎖定常領域を含み、これは、任意かつより好ましくは、ヒト重鎖定常領域である。重鎖定常領域は、最も好ましくは、ＩｇＧ重鎖定常領域であり、任意かつ最も好ましくは、Ｆｃ鎖であり、最も好ましくは、ＣＨ２およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧのＦｃフラグメントである。いずれのＩｇＧサブタイプも、任意で使用することができるが、ＩｇＧ１サブタイプが好ましい。Ｆｃ鎖は、任意で、既知または「野生型」のＦｃ鎖であり得るか、または代替として、突然変異され得る。例えば、米国特許出願公開第２００６／００３４８５２号を参照されたい。「Ｆｃ鎖」という用語はまた、任意の種類のＦｃフラグメントを任意に含む。ＩｇＧサブクラスにおける抗体の定常領域に媒介される活性に関与する特定のアミノ酸残基のうちのいくつかが、特定されている。これらの特定のアミノ酸の包含、置換、または排除は、したがって、特定の免疫グロブリン定常領域媒介性活性の包含または排除を可能にする。さらに、特定の変化により、Ｆｃ鎖に対して、例えば、無グリコシル化（ａｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ）および／または他の所望される変化をもたらし得る。少なくともいくつかの変化は、望ましくない免疫系の作用といった、望ましくないと見られるＦｃの機能を遮断するためになされ得る。ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｅｄｓ．）Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０２９０】

第Ｘａ因子（例えば、Ｏｔｔａｖｉ，（１９９８）Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ　８０：２８９－９３を参照されたい）、スブチリシンプロテアーゼ認識モチーフ（例えば、Ｐｏｌｙａｋ（１９９７）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．１０：６１５－１９を参照されたい）、エンテロキナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ．）等の開裂可能なリンカーを、新たに翻訳されたポリペプチドの転座ドメイン（効率的な原形質膜発現のため）とその残りとの間に含むことは、精製を促進するのに有用であり得る。例えば、ある構築物は、６つのヒスチジン残基に続いて、チオレドキシン、エンテロキナーゼ開裂部位（例えば、Ｗｉｌｌｉａｍｓ（１９９５）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３４：１７８７－９７を参照されたい）、およびＣ末端転座ドメインに連結される、核酸配列をコードするポリペプチドを含み得る。ヒスチジン残基は、検出および精製を促進するが、一方でエンテロ

キナーゼ開裂部位は、所望されるタンパク質（複数可）を融合タンパク質の残部から精製する手段を提供する。融合タンパク質をコードするベクターおよび融合タンパク質の適用に関する技術は、科学および特許文献に十分に記載されている。例えば、Ｋｒｏｌｌ（１９９３）ＤＮＡ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１２：４４１－５３を参照されたい。

【０２９１】

融合タンパク質は、ＶＩＳＴＡ配列がＧＳＴ配列のＣ末端に融合される、ＧＳＴ－ＶＩＳＴＡ融合タンパク質であり得る。そのような融合タンパク質は、組み換えＶＩＳＴＡの精製を促進し得る。別の実施形態において、融合タンパク質は、そのＮ末端に異種シグナル配列を含有するＶＩＳＴＡポリペプチドである。ある特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物の宿主細胞）において、ＶＩＳＴＡの発現および／または分泌は、異種シグナル配列の使用を通じて増加させることができる。ある実施形態において、融合タンパク質は、ＶＩＳＴＡ配列がＩｇ分子の一部分に融合される、Ｉｇ－ＶＩＳＴＡ融合タンパク質である。融合タンパク質のＩｇ部分は、免疫グロブリン定常領域、例えば、ヒトＣγ１ドメインまたはＣγ４ドメイン（例えば、ヒトＩｇＣγ１またはヒトＩｇＣγ４のヒンジ、ＣＨ２、およびＣＨ３領域を含み得る（例えば、米国特許第５，１１６，９６４号、同第５，５８０，７５６号、同第５，８４４，０９５号を参照されたい）。結果として得られる融合タンパク質は、改変されたＶＩＳＴＡの可溶性、結合親和性、安定性、および／または価数（すなわち、分子当たりの結合部位の数）を有し得、タンパク質精製の効率を増加させ得る。

【０２９２】

特に好ましいＶＩＳＴＡ Ｉｇ融合タンパク質には、免疫グロブリン定常領域（例えば、Ｆｃ領域）に結合したＶＩＳＴＡの細胞外ドメイン部分が含まれる。免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリン構造に固有のエフェクター活性を低減または排除する、遺伝子修飾を含有し得る。例えば、ＶＩＳＴＡポリペプチドの細胞外部分をコードするＤＮＡは、例えば、国際特許第ＷＯ ９７／２８２６７号に教示されるような、部位特異的突然変異生成によって修飾された、ヒトＩｇＧγ１および／またはＩｇＧγ４のヒンジ、ＣＨ２、およびＣＨ３領域に接合され得る。本発明のＶＩＳＴＡ融合タンパク質は、薬学的組成物に組み込まれ、インビボで対象に投与され得る。ＶＩＳＴＡ融合タンパク質を使用して、ＶＩＳＴＡ結合パートナーのバイオアベイラビリティに影響を及ぼすことができる。ＶＩＳＴＡ融合タンパク質の使用は、免疫応答の調節により利益を得るであろう状態または障害の治療に、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のＶＩＳＴＡ－融合タンパク質を免疫原として使用して、対象において抗ＶＩＳＴＡ抗体を産生し、ＶＩＳＴＡ結合タンパク質を精製し、スクリーニングアッセイにおいて、ＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナーとの相互作用を阻害する分子を特定することができる。

【０２９３】

複合体

ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に結合する抗体、ならびにそれらのフラグメントは、他の部分に複合体化させることができる。そのような複合体は、ワクチンの調製に使用されることが多い。ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドは、炭水化物（例えば、マンノース、フコース、グルコース、ＧｌｃＮＡｓ、マルトース）に複合体化され得、これが、樹状細胞およびマクロファージ上に存在するマンノース受容体によって認識される。続く結合、凝集、ならびに受容体に媒介されるエンドサイトーシスおよび食作用機能は、自然および獲得免疫の強化を提供する。Ｍａｈｎｋｅ，ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１５１：６７３－８４、Ｄｏｎｇ，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｉｍｍｏｎｏｌ．１６３：５４２７－３４を参照されたい。

【０２９４】

免疫応答を誘起するための複合体形成に好適な他の部分には、キーホールリンペットヘモシアニン（Ｋｅｙｈｏｌｅ Ｌｉｍｐｉｔ Ｈｅｍｏｃｙａｎｎｉｎ）（ＫＬＨ）、ジフテリアトキソイド、コレラトキソイド（ｃｈｏｌｅｒａ ｔｏｘｏｉｄ）、シュードモ

ナス外タンパク質Ａ、および微生物外膜タンパク質（ＯＭＰＳ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９５】

ポリペプチド単離

本発明はまた、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドの単離のための方法を提供する。例えば、適切な細胞株または腫瘍試料は、癌患者から得ることができる。界面活性剤中で均質化および可溶化した後、抗原を、クロマトグラフィーで精製する。サイズ排除または親和性クロマトグラフィーをこれに使用することができ、また、抗ＶＩＳＴＡおよび抗ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ複合体抗体と併せて使用することができる。例えば、抗ＶＩＳＴＡまたは抗ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ複合体抗体を、単純な抗原の吸収、洗浄、および固体支持体からの溶出のために、固体支持体上に固定（例えば、樹脂、磁気ビーズに結合）することができる。溶出したタンパク質を、次いで、抗原の存在、特徴付け、および特定について、さらに試験する。Ｗａｌｋｅｒ（２００２）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ［２ｎｄ Ｅｄ.］Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ ａｎｄ Ｃｕｌｔｕｒｅ（２００３）［Ｅｄ.］Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０２９６】

この方法で単離した抗原は、従来的な薬学的賦形剤および担体物質を用いて医薬品を調製するために使用することができる。例えば、生理ＮａＣｌ溶液中の精製抗原のインビボ投与。

【０２９７】

加えて、本発明によるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体　ポリペプチドは、高スループットのスクリーニングの一部として活性を特定する際に抗原として機能し得る。高スループットのスクリーニング方法は、当業者に既知である。Ｗｅｌｌｓ（２００２）Ｈｉｇｈ Ｔｈｒｏｕｇｈｏｕｔ Ｂｉｏａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｓａｍｐｌｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ。

【０２９８】

ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体をコードするポリヌクレオチド

本発明はまた、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体をコードするヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ＶＩＳＴＡポリペプチドをコードする、配列番号１および３の核酸配列を含む、ポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチド配列のフラグメント、それらにハイブリダイズする配列、およびそれらに相同な配列を提供し、これらは、少なくとも約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％である。

【０２９９】

本発明はまた、異なるコドン使用頻度で類似のポリペプチドをコードする少なくとも１つのＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体配列、天然または人工的のいずれかで、無作為または標的化された様式のいずれかで、１つ以上のヌクレオチドの突然変異、例えば欠失、挿入、または置換によって特徴付けられる改変された配列を含む、ポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドに固有な配列領域を含む、相同な核酸配列（例えば、本発明のポリヌクレオチド配列の一部を形成する）を包含する。

【０３００】

本発明はまた、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドの相同体をコードする核酸を包含し、そのような相同体は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｏｆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアをデフォルトのパラメータで使用して判定され得る、本明細書に記載のアミノ酸配列に少なくとも約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一な相同であり得る。本発明はまた、上述のポリヌクレオチ

ド、および天然もしく人工的のいずれかで、無作為もしくは標的化された様式のいずれかで、１つ以上の核酸の突然変異、例えば、欠失、挿入、もしくは置換を有するポリヌクレオチドのフラグメントを包含する。

【０３０１】

核酸分子は、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体、または当該核酸分子の機能的フラグメントをコードし得る。当該核酸の「機能的フラグメント」には、当該ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体をコードする遺伝子またはｃＤＮＡのフラグメントが含まれ、このフラグメントは、免疫応答を誘起することができるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体（例えば、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体）を産生するように発現され得る。したがって、例えば、抗原の免疫原性に寄与するアミノ酸残基に対応し、フラグメントが免疫応答（例えば、体液性または細胞性免疫応答）を誘起する抗原として機能し得る、本発明によるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体のフラグメント。本発明のこの態様には、本発明による核酸の異なってスプライシングされたアイソフォームおよび転写開始部位が含まれる。本発明による核酸分子はまた、本発明によるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体をコードする上述の核酸分子のフラグメント、誘導体、および対立遺伝子変異体を含む。ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体のフラグメントをコードする核酸を作成するための方法および材料は、当該技術分野で周知である。例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ［３ｒｄ Ｅｄ．］Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０３０２】

配列番号１、３のすべてもしくは一部分を包含する核酸分子、またはオルソログもしくは変異体は、配列番号１、２、３、４、または５に基づいて設計された合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって単離することができる。

【０３０３】

本発明の核酸分子は、標準的なＰＣＲ増幅技術に従って、鋳型としてｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、または代替としてゲノムＤＮＡを使用して、ならびに適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅させることができる。このようにして増幅された核酸分子は、適切なベクターにクローニングされ、ＤＮＡ配列分析によって特徴付けされ得る。さらに、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば、自動化ＤＮＡ合成装置を使用して、標準的な合成技術によって調製することができる。

【０３０４】

ある実施形態において、本発明の核酸分子をコードする単離ＶＩＳＴＡは、配列番号１または３に示されるヌクレオチド配列、またはそのフラグメントを含む。別の実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号１または３に示されるヌクレオチド配列、またはこれらのヌクレオチド配列のいずれかの一部分の相補体である、核酸分子を含む。配列番号１または３に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、それぞれ、配列番号１または３に示されるヌクレオチドにハイブリダイズし、それによって安定な二重鎖を形成することができるように、配列番号１または３に示されるヌクレオチド配列に十分に相補的なものである。

【０３０５】

別の実施形態において、本発明の単離核酸分子は、配列番号１または３のヌクレオチド配列の全長、またはこれらのヌクレオチド配列のいずれかの一部分に、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または９９．５％同一であるヌクレオチド配列を含む。

【０３０６】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号１または３の核酸配列の一部分のみ、例えば、ＶＩＳＴＡポリペプチドの一部分、プローブまたはプライマーまたはフラグメントとして使用され得るフラグメント、例えば、ＶＩＳＴＡポリペプチドの生物学的に活性な部分を

コードするフラグメントのみを含み得る。ヒトＰＤ－Ｌ２遺伝子のクローニングにより決定されるヌクレオチド配列が、他のＰＤ－Ｌ２ファミリーメンバー、ならびに他の種に由来するＶＩＳＴＡ相同体の特定および／またはクローニングにおける使用のために設計されるプローブおよびプライマーの生成を可能にする。プローブ／プライマーは、典型的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、典型的に、ストリンジェントな条件下で、配列番号１もしくは３のセンス配列、配列番号１、３のアンチセンス配列、または配列番号１もしくは３の天然の対立遺伝子変異体もしくは突然変異体の、少なくとも約１２または１５、好ましくは約２０または２５、より好ましくは約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、または７５個の連続するヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【０３０７】

一実施形態において、本発明の核酸分子は、約５０～１００を上回る、１００～１５０、１５０～２００、２００～２５０、２５０～３００、３００～３５０、３５０～４００、４００～４５０、４５０～５００、５００～５５０、５５０～６００、６００～６５０、６５０～７００、７００～７５０、７５０～８００、８００～８５０、８５０～９００、９００～９５０、またはそれ以上のヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含み、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号１もしくは３の核酸分子、またはその相補体にハイブリダイズする。さらなる実施形態において、本発明の核酸分子は、約８８０～９００を上回る、９００～９５０、９５０～１０００、１０００～１０５０、１０５０～１１００、１１００～１１５０、またはそれ以上のヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含み、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号１もしくは３の核酸分子、またはその相補体にハイブリダイズする。さらに別の実施形態において、本発明の核酸分子は、５０～１００を上回る、１００～１５０、１５０～２００、２００～２５０、２５０～３００、またはそれ以上のヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含み、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号１もしくは３にコード領域を含む核酸分子、またはその相補体にハイブリダイズする。なおもさらなる実施形態において、本発明の核酸分子は、約５０～１００を上回る、１００～１５０、１５０～２００、２００～２５０、２５０～３００、３００～３５０、３５０～４００、４００～４５０、４５０～５００、５００～５５０、５５０～６００、６００～６５０、６５０～７００、７００～７５０、７５０～８００、８５０～９００、９００～９５０、またはそれ以上のヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含み、配列番号１もしくは３のコード領域を含む配列またはその相補体の少なくとも約１５個の（すなわち、１５個の連続する）ヌクレオチドを含み、ストリンジェントな条件下で、配列番号１もしくは３に示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子、またはその相補体にハイブリダイズする。

【０３０８】

ＶＩＳＴＡヌクレオチド配列に基づくプローブを使用して、同じまたは相同なポリペプチドをコードする転写産物またはゲノム配列を検出することができる。実施形態では、プローブは、さらに、そこに付着される標識基を含み、例えば、標識基は、放射同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。そのようなプローブは、例えば、対象由来の細胞におけるＶＩＳＴＡをコードする核酸の標識を測定すること、例えば、ＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡレベルを検出すること、またはゲノムＶＩＳＴＡ遺伝子が突然変異もしくは欠失しているかを判定することによる、ＶＩＳＴＡポリペプチドを誤発現する細胞または組織を特定するための診断試験キットの一部として使用することができる。

【０３０９】

配列番号１および３のＶＩＳＴＡヌクレオチド配列に加えて、当業者であれば、ＶＩＳＴＡポリペプチドのアミノ酸配列に変化をもたらすＤＮＡ配列の多形性が、集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることを理解するであろう。ＶＩＳＴＡ遺伝子におけるそのような遺伝的多形性は、天然の対立遺伝子変異に起因して、集団内の個体間に存在し得る。本明細書に使用される際、「遺伝子」および「組み換え遺伝子」という用語は、ＶＩＳＴＡポリペプチド、好ましくは、哺乳動物ＶＩＳＴＡポリペプチドをコードするオープンリ

ーディングフレームを含む核酸分子を指し、非コード制御性配列およびイントロンをさらに含み得る。

【０３１０】

ヒトまたはマウスＶＩＳＴＡの対立遺伝子変異体は、機能的および非機能的ＶＩＳＴＡポリペプチドの両方を含む。機能的対立遺伝子変異体は、ＶＳＩＴＡ結合パートナー（複数可）に結合する能力、ならびに／またはＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖およびサイトカイン産生ならびにリンパ球活性化を調節する能力を維持する、ヒトまたはマウスＶＩＳＴＡポリペプチドの天然のアミノ酸配列変異体である。機能的対立遺伝子変異体は、典型的に、配列番号２、４、もしくは５の１つ以上のアミノ酸の保存的置換のみ、またはポリペプチドの重要でない領域中の重要でない残基の置換、欠失、もしくは挿入を含有する。

【０３１１】

非機能的対立遺伝子変異体は、天然のＶＩＳＴＡ結合パートナーに結合する能力、および／または本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ活性のうちのいずれかを調節する能力のいずれも有さない、ヒトまたはマウスＶＩＳＴＡポリペプチドの天然のアミノ酸配列変異体である。非機能的対立遺伝子変異体は、典型的に、配列番号２、４、もしくは５のアミノ酸配列の非保存的置換、欠失、もしくは挿入、または中途切断、あるいはポリペプチドの重要な残基または重要な領域、例えば、ＩｇＶドメインにおける置換、挿入、または欠失を含有する。

【０３１２】

本発明はさらに、ヒトまたはマウスＶＩＳＴＡポリペプチドの非ヒト非マウスオルソログを提供する。ヒトまたはマウスＶＩＳＴＡポリペプチドのオルソログは、非ヒト、非マウスの生物から単離されたポリペプチドであり、本明細書に記載されるヒトおよびマウスＶＩＳＴＡと同じ結合活性および／またはリンパ球活性化調節活性ならびにＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖およびサイトカイン産生を調節する能力を有する。ヒトまたはマウスＰＤ－Ｌ３ポリペプチドのオルソログは、配列番号２、４、または５と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むとして容易に特定され得る。

【０３１３】

突然変異体ＶＩＳＴＡポリペプチドは、天然のＶＳＩＴＡ結合パートナーに結合するおよび／またはその活性を調節する能力、細胞内もしくは細胞間シグナル伝達を調節する、Ｔリンパ球の活性化を調節する、および／または生物の免疫応答を調節する能力に関して、アッセイすることができる。

【０３１４】

ＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ融合タンパク質をコードする単離核酸分子。少なくとも、ＶＩＳＴＡもしくはＶＩＳＴＡタンパク質をコードする第１のヌクレオチド配列、非ＶＩＳＴＡタンパク質をコードする第２のヌクレオチド配列に動作可能に連結されたポリペプチドもしくはペプチドを含む、核酸分子、ポリペプチド、またはペプチドは、標準的な組み換えＤＮＡ技術によって調製することができる。

【０３１５】

さらに、同一性とは、関連の核酸分子間またはそれらによってコードされるタンパク質間に存在する機能的および／または構造的同等性を広義に指す。上述の分子に相同であり、これらの分子の誘導体を構築する核酸分子は、概して、修飾を構築し、同じ生物学的機能を実行する、これらの分子の変異体である。同時に、変異体は、天然に生じ得る、例えば、それらは、他の種に由来する配列であり得るか、またはそれらは突然変異体であり得、これらの突然変異体は、天然の様式で生じるか、または客観的突然変異によって導入され得る。変異はまた、合成で製造された配列であってもよい。対立遺伝子変異体は、天然の変異体および合成で製造される変異体または組み換えＤＮＡ技術によって産生される変異体の両方であり得る。遺伝子コードの縮重のために本発明による核酸分子から派生した核酸分子は、誘導体の特別な形態を構築する。

【０３１６】

ＶＩＳＴＡおよびそのＶＩＳＴＡ複合体のアミノ酸配列をコードする任意のヌクレオチド配列もまた、本明細書の範囲内に含まれる。遺伝子コードの縮重のため、１つを上回るコドンが、特定のアミノ酸をコードするために使用され得る。遺伝子コードを使用して、それぞれがアミノ酸をコードすることができるであろう、１つ以上の異なるヌクレオチドを特定することができる。実際に、特定のヌクレオチドが、配列をコードする実際のコドンを構築する確率は、異常な塩基対合関係およびＶＩＳＴＡおよびそのＶＩＳＴＡ複合体を発現する真核生物または原核生物の細胞において、特定のコドンが実際に（特定のアミノ酸をコードするために）使用される頻度を考慮して推定され得る。そのような「コドン使用頻度規則」は、Ｌａｔｈｅ，ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．１２：４４１－５３に開示されている。

【０３１７】

修飾ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリヌクレオチド

本発明のヌクレオチドは、修飾ポリヌクレオチドであり得る。非修飾ヌクレオチドは、一部の用途ではあまり最適でないことが多く、例えば、細胞のヌクレアーゼによる分解を受けやすい。オリゴヌクレオチドのサブユニットのうちの１つ以上に対する化学修飾は、改善された特性を与え得、例えば、ポリヌクレオチドを、ヌクレアーゼに対してより安定にし得る。典型的なオリゴヌクレオチド修飾は、当該技術分野で周知であり、次のうちの１つ以上が含まれ得る：（ｉ）ホスホジエステル糖間連結における非連結リン酸酸素および／または１つ以上の連結リン酸酸素のうちの１つまたは両方の改変、例えば、置き換え、（ｉｉ）リボース糖の構築物の改変、例えば、置き換え、例えば、リボース糖上の２’ヒドロキシルの修飾または置き換え、（ｉｉｉ）リン酸部分の大規模な置き換え、（ｉｖ）天然の塩基の修飾またと非天然の塩基との置き換え、（ｖ）リボース－リン酸骨格の置き換え（例えばペプチド核酸（ＰＮＡ）との）または修飾、（ｖｉ）オリゴヌクレオチド（ｏｌｉｇｏｎｕｃｅｌｏｔｉｄｅ）の３’末端または５’末端の修飾、ならびに（ｖｉｉ）糖、例えば６員環の修飾。本発明に従って使用されるポリヌクレオチドは、当該技術分野で周知の多数の手段によって合成され得るか、または種々の市販供給業者（ＬＣ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ、Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）から購入され得る。

【０３１８】

アンチセンス

上述のＶＩＳＴＡポリペプチドをコードする核酸分子に加えて、本発明の別の実施形態は、それに対してアンチセンスな単離核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、ペプチドをコードする「センス」核酸に相補的である、例えば、二本鎖ｃＤＮＡ分子のコード鎖に相補的またはｍＲＮＡ配列に相補的である、ヌクレオチド配列を含む。したがって、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合し得る。アンチセンス核酸は、全長ＶＩＳＴＡコード鎖またはその一部分のみに相補的であり得る。一実施形態において、アンチセンス核酸分子は、ＶＩＳＴＡをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」にアンチセンスである。「コード領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を指す。別の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、ＰＤ－Ｌをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」にアンチセンスである。「非コード領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されない、コード領域に隣接する５’および３’配列を指す（５’および３’非翻訳領域とも称される）。ヒトまたはマウスＶＩＳＴＡまたは本明細書に開示されるＶＩＳＴＡをコードするコード鎖配列を考慮すると、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソンクリック塩基対合則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、ＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡの全長コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、ＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡのコードまたは非コード領域の一部分にのみアンチセンスなオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡの翻訳開始部位の周囲の領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセ

ンス核酸分子は、当該技術分野で既知の手順を用いて化学合成および酵素ライゲーション反応を使用して構築することができる。例えば、アンチセンス核酸分子（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然のヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増加させるか、もしくはアンチセンスおよびセンス核酸の間で形成される二重鎖の物理的安定性を増加させるように設計される様々に修飾されたヌクレオチドを使用して化学合成することができ、例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用され得る。アンチセンス核酸を生成するために使用することができる修飾ヌクレオチドの例には、５－フルオロウラシル、５－ブロもウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン－ｅ，５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルキューオシン（ｇａｌａｃｔｏｓｙｌｑｕｅｏｓｉｎｅ）、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウル－アシル、β－Ｄ－マンノシルキューオシン（ｍａｎｎｏｓｙｌｑｕｅｏｓｉｎｅ）、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン（ｗｙｂｕｔｏｘｏｓｉｎｅ）、シュードウラシル、キューオシン（ｑｕｅｏｓｉｎｅ）、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、および２，６－ジアミノプリンが挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸が、アンチセンス配向にサブクローニングされている、発現ベクターを使用して生物学的に産生され得る（すなわち、挿入された核酸から転写されるＲＮＡは、目的の標的核酸に対してアンチセンスな配向のものであり、以下の小節にさらに記載される）。

【０３１９】

本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的に、それらが、ＶＩＳＴＡもしくはＶＩＳＴＡポリペプチドをコードする細胞ｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡとハイブリダイズするかまたはそれら結合し、それによってポリペプチドの発現を阻害する、例えば、転写および／または翻訳を阻害するように、対象に投与されるか、またはインサイツで生成され得る。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成するように従来的なヌクレオチド相補性によって、または、例えば、ＤＮＡ二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重鎖へリックスの主要な溝における特異的な相互作用を通じて、行われ得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例には、組織部位での直接注入が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的とするように修飾され、その後に全身投与され得る。例えば、全身投与については、アンチセンス核酸分子は、それらが、選択された細胞表面に発現される受容体または抗原に特異的に結合するように、例えば、アンチセンス核酸分子と、細胞表面受容体もしくは抗原に結合するペプチドまたは抗体とを連結させることによって、修飾され得る。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書に記載されるベクターを使用して細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なｐｏｌ　ＩＩもしくはｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターの制御下で配置されるベクター構築物が、好ましい。

【０３２０】

ＶＩＳＴＡアンチセンス核酸分子は、αアノマー核酸分子であり得る。αアノマー核酸分子は、通常のβ単位とは対照的に鎖が互いに平行に伸びる、相補的なＲＮＡとの特異的な二重鎖ハイブリッドを形成する。Ｇａｕｌｔｉｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１５：６６２５－６６４１。アンチセンス核酸分子はまた、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド（Ｉｎｏｕｅ，ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｎｕｃ

leic Acids Res.１５：６１３１－６１４８）またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡ類似体（Ｉｎｏｕｅ，ｅｔ ａｌ．（１９８７）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．２１５：３２７－３３０）を含み得る。

【０３２１】

ＶＩＳＴＡアンチセンス核酸は、リボザイムであり得る。リボザイムは、それらが相補性領域を有するｍＲＮＡ等の一本鎖核酸を開裂させることができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡ分子である。したがって、リボザイム（例えば、ハンマーヘッド型リボザイム（Ｈａｓｅｌｏｆｆ ａｎｄ Ｇｅｒｌａｃｈ（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３４：５８５－５９１に記載される））を使用して、ＶＩＳＴＡ ｍＲＮＡ転写産物を触媒的に開裂させ、それによって、ＶＩＳＴＡ ｍＲＮＡの翻訳を阻害することができる。ＶＩＳＴＡをコードする核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示されるＶＩＳＴＡ ｃＤＮＡのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号１または３）に基づいて設計することができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、ＶＩＳＴＡをコードするｍＲＮＡにおいて開裂されるヌクレオチド配列に相補的であるテトラヒメナＬ－１９ ＩＶＳ ＲＮＡの誘導体を構築することができる。例えば、米国特許第４，９８７，０７１号および米国特許第５，１１６，７４２号を参照されたい。あるいは、ＶＩＳＴＡ ｍＲＮＡを使用して、ＲＮＡ分子プールから、特定のリボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡを選択することができる。例えば、Ｂａｒｔｅｌ ａｎｄ Ｓｚｏｓｔａｋ（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１４１１－１４１８を参照されたい。

【０３２２】

あるいは、ＶＩＳＴＡ遺伝子の発現は、ＶＩＳＴＡの制御性領域（例えば、ＶＩＳＴＡプロモーターおよび／またはエンハンサーに相補的なヌクレオチド配列を標的とし、標的細胞におけるＰＤ－Ｌ３遺伝子の転写を防止する三重ヘリックス構造を形成することによって阻害することができる。一般には、Ｈｅｌｅｎｅ（１９９１）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．６（６）：５６９－８４、Ｈｅｌｅｎｅ，ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６０：２７－３６、およびＭａｈｅｒ，Ｌ．Ｊ．（１９９２）Ｂｉｏｅｓｓａｙｓ １４（１２）：８０７－１５を参照されたい。

【０３２３】

ペプチド核酸

さらに別の実施形態において、本発明のＶＩＳＴＡ核酸分子は、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または可溶性を改善するために、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格において修飾され得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生成するように修飾され得る。Ｈｙｒｕｐ ａｎｄ Ｎｉｅｌｓｅｎ（１９９６）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４（１）：５－２３を参照されたい。本明細書に使用される際、「ペプチド核酸」または「ＰＮＡ」という用語は、デオキシリボースリン酸骨格が、シュードペプチド骨格によって置き換えられ、４つの天然の核酸塩基のみが保持される、核酸模倣体、例えば、ＤＮＡ模倣体を指す。ＰＮＡの天然の骨格は、低イオン強度の条件下で、ＤＮＡおよびＲＮＡへの特異的なハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。ＰＮＡオリゴマーの合成は、Ｈｙｒｕｐ ａｎｄ Ｎｉｅｌｓｅｎ（１９９６）（上記）およびＰｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１４６７０－６７５に記載される標準的な固相ペプチド合成プロトコルを使用して行うことができる。

【０３２４】

ＶＩＳＴＡ核酸分子のＰＮＡは、治療および診断用途に使用することができる。例えば、ＰＮＡスキャンを、例えば、転写もしくは翻訳の停止の導入または複製の阻害による遺伝子発現の配列特異的修飾のためのアンチセンスまたは抗遺伝子剤として使用することができる。ＶＩＳＴＡ核酸分子のＰＮＡはまた、遺伝子における単一塩基対突然変異の分析（例えば、ＰＮＡ指向性ＰＣＲクランピングによる）において、他の酵素と組み合わせて用いる際の「人工的な制限酵素」として（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ（Ｈｙｒｕｐ ａｎｄ Ｎｉｅｌｓｅｎ（１９９６）（上記））、またはＤＮＡシークエンシングもしくはハ

イブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーとして（Ｈｙｒｕｐ ａｎｄ Ｎｉｅｌｓｅｎ（１９９６）（上記）、Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）（上記））、使用することができる。

【０３２５】

ＶＩＳＴＡのＰＮＡは、親油性基もしくは他のヘルパー基をＰＮＡに付着させることによって、ＰＮＡ－ＤＮＡキメラを形成することによって、またはリポソームもしくは当該技術分野で既知の他の薬物送達技術を使用することによって、（例えば、それらの安定性もしくは細胞取り込みを強化するために）修飾され得る。例えば、ＰＮＡおよびＤＮＡの有利な特性を組み合わせることができるＶＩＳＴＡ核酸分子のＰＮＡ－ＤＮＡキメラを生成することができる。そのようなキメラは、ＤＮＡ認識酵素（例えば、ＲＮＡｓｅ Ｈおよびポリメラーゼ）がＤＮＡ部分と相互作用し、同時にＰＮＡ部分が高い結合親和性および特異性を提供することを可能にする。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラは、塩基の積み重ね、核酸塩基間の結合数、および配向の観点から選択される、適切な長さのリンカーを使用して連結され得る（Ｈｙｒｕｐ ａｎｄ Ｎｉｅｌｓｅｎ（１９９６）（上記））。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの合成は、Ｈｙｒｕｐ ａｎｄ Ｎｉｅｌｓｅｎ（１９９６）（上記）およびＦｉｎｎ Ｐ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２４（１７）：３３５７－６３に記載のように行うことができる。例えば、ＤＮＡ鎖は、標準的なホスホラミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成することができ、修飾ヌクレオチド類似体、例えば、５’－（４－メトキシトリチル）アミノ－５’－デオキシ－チミジンホスホラミダイトは、ＰＮＡとＤＮＡの５’末端との間の架橋として使用され得る（Ｍａｇ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：５９７３－８８）。ＰＮＡモノマーを、次いで、段階的な様式でカップリングさせ、て、５’ＰＮＡセグメントおよび３’ＤＮＡセグメントを有するキメラ分子を産生する（Ｆｉｎｎ Ｐ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）（上記））。あるいは、キメラ分子は、５’ＤＮＡセグメントおよび３’ＰＮＡセグメントを用いて合成することができる（Ｐｅｔｅｒｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．（１９７５）Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．５：１１１９－１１１２４）。

【０３２６】

オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドは、ペプチド等の他の付加基（例えば、インビトロで宿主細胞受容体を標的とするため）、または細胞膜（例えば、Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：６５５３－６５５６、Ｌｅｍａｉｔｒｅ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：６４８－６５２、ＰＣＴ公開第ＷＯ ８８／０９８１０号を参照されたい）もしくは血液脳関門（例えば、ＰＣＴ公開第ＷＯ ８９／１０１３４号を参照されたい）を超える輸送を促進するための薬剤を含み得る。加えて、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発型開裂剤（例えば、Ｋｒｏｌ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：９５８－９７６を参照されたい）または挿入剤（例えば、Ｚｏｎ（１９８８）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．５：５３９－５４９を参照されたい）によって修飾され得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発型架橋剤、輸送剤、またはハイブリダイゼーション誘発型開裂剤）に複合体化され得る。

【０３２７】

ｓｉＲＮＡ

低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、特定のｍＲＮＡに結合し、それｍＲＮＡ分解へと誘導し、そうして遺伝子の転写（例えば、発現）を抑制する、通常約２０～２５ヌクレオチド長の二本鎖ＲＮＡ分子のクラスである。Ｈａｍｉｌｔｏｎ＆Ｂａｕｌｃｏｍｂｅ（１９９９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８６（５４４１）：９５０－２およびＥｌｂａｓｈｉｒ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ ４１１（６８３６）：４９４－８を参照されたい。メッセンジャーＲＮＡを破壊することによって遺伝子が機能的タンパク質を産生するの

を防止する、リボザイムまたはＲＮＡ干渉（ｓｉＲＮＡ）技術を利用することも可能である。ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号１または３の核酸配列を含むＶＩＳＴＡ　ＤＮＡから転写されたＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡに結合し得る。ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号２、４、または５に記載されるアミノ酸配列をコードするＶＩＳＴＡ　ＤＮＡから転写されたＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡに結合し得る。

【０３２８】

ＶＩＳＴＡ　ＤＮＡから転写されたＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号１または３の核酸配列を含み得る。配列番号２、４、または５に記載されるアミノ酸配列をコードするＶＩＳＴＡ　ＤＮＡから転写されたＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子。ＶＩＳＴＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～６７のうちのいずれか１つの核酸配列を含み得る。ＶＩＳＴＡのＯＲＦまたはＵＴＲ領域のいずれかを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～４７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含み得る。ＶＩＳＴＡのＵＴＲ領域のみを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号４８～５７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含み得る。ＯＶＩＳＴＡＲＦ領域のみを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号５８～６７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含み得る。ＶＩＳＴＡを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～６７のうちのいずれか１つの核酸配列からなり得る。ＶＩＳＴＡのＯＲＦまたはＵＴＲ領域のいずれかを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号３８～４７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列からなり得る。ＶＩＳＴＡのＵＴＲ領域のみを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号４８～５７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列からなり得る。ＶＩＳＴＡのＯＲＦ領域飲みを標的とするｓｉＲＮＡ分子は、配列番号５８～６７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列からなり得る。

【表１】

ヒトＶＩＳＴＡのｓｉＲＮＡ

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

【０３２９】

発現

本発明のＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体の単離および発現は、本出願に開示されるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体の核酸配列に基づいて構築されるプローブまたはプライマーを使用して、十分に確立されたクローニング手順によって、達成され得る。関連するＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体の配列はまた、本明細書に開示される配列、または既知のコンピュータに基づく検索技術、例えば、ＢＬＡＳＴ配列検索を使用して、ヒトまたは他の種のゲノムデータベースから特定することができる。本明細書に開示される偽遺伝子を使用して、機能的対立遺伝子または関連遺伝子を特定することができる。

【０３３０】

次いで、発現ベクターを使用して、これらの配列の機能的発現のために宿主細胞を感染させるか、またはトランスフェクトすることができる。これらの遺伝子およびベクターは、インビトロまたはインビボで作製および発現させることができる。当業者であれば、核酸発現の改変および制御に所望される表現型が、本発明のベクター内における遺伝子および核酸（例えば、プロモーター、エンハンサー）の発現または活性を調節することによって得ることができることを理解するであろう。発現または活性を増加または減少させることに関して説明された既知の方法農地のいずれかを使用することができる。

【０３３１】

別の実施形態において、組み換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型に優先的に核酸の発現を指示することができる（例えば、核酸を発現するために組織特異的制御性要素を用いる）。組織特異的制御性要素は、当該技術分野で既知である。好適な組織特異的プ

ロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的、Ｐｉｎｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ球特異的プロモーター（Ｃａｌａｍｅ ａｎｄ Ｅａｔｏｎ（１９８８）Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、Ｔ細胞受容体（Ｗｉｎｏｔｏ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ（１９８９）ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９－７３３）および免疫グロブリン（Ｂａｎｅｒｊｉ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０、Ｑｕｅｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ（１９８３）Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８）の特定のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター（例えば、神経フィラメントプロモーター、Ｂｙｒｎｅ ａｎｄ Ｒｕｄｄｌｅ（１９８９）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）、ならびに乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター、米国特許第４，８７３，３１６号および欧州出願公開第２６４，１６６号）が挙げられる。例えば、マウスホメオボックスプロモーター（Ｋｅｓｓｅｌ ａｎｄ Ｇｒｕｓｓ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）およびα－フェトタンパク質プロモーター（Ｃａｍｐｅｓ ａｎｄ Ｔｉｌｇｈｍａｎ（１９８９）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６）による、発生的に制御されるプロモーターもまた包含される。

【０３３２】

本明細書に提供されるポリヌクレオチド配列は、酵素合成または固相合成といった、当該技術分野で既知の任意のオリゴヌクレオチド合成方法に従って生成され得る。固相合成を実行するための装置および試薬は、例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓから市販入手可能である。そのような合成の任意の他の手段もまた利用され得、ポリヌクレオチドの実際の合成は、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ［３ｒｄ Ｅｄ．］Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｓｗａｍｙ（２００８）Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ｏｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｒａｓｔｏｇｉ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｈｅｒｄｅｗｉｊｎ（２００５）［Ｅｄ．］Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇ：Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｖｏｌｕｍｅ ２８８ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、およびＲａｐｌｅｙ（２０００）［Ｅｄ．］Ｔｈｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。次いで、相補鎖を合成し、適切な条件下で鎖を一緒にアニーリングすること、または適切なプライマー配列を用いるＤＮＡポリメラーゼを使用して相補鎖を付加することのいずれかによって、二本鎖ＤＮＡフラグメントを得ることができる。

【０３３３】

例えば、配列における突然変異の精製、サブクローニング、プローブの標識化、シークエンシング、ハイブリダイゼーション等のために、核酸を操作するための技術は、科学および特許文献に十分に記載されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．（２００１）（Ｅｄｓ．）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ Ｅｄ．）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｅｄ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｔｉｊｓｓｅｎ（１９９３）［Ｅｄ．］Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｐａｒｔ Ｉ，Ｔｈｅｏｒｙ ａｎｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，ＮＹを参照されたい。

【０３３４】

ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強度（例えば、ポリヌクレオ

チド間の会合の強度）は、ポリヌクレオチド間の相補性の程度、および関与する条件のストリンジェンシー（塩の濃度等の条件によって影響を受ける）、他の構成要素の存在（例えば、ポリエチレングリコールの存在または不在）、ハイブリダイズする鎖のモル濃度、ならびにポリヌクレオチドのＧ＋Ｃ含量を含む、当該技術分野で周知の要因によって影響を受け、これらのすべては、形成されるハイブリッドの特徴的な融解温度（T_m）をもたらす。核酸ハイブリダイゼーションの技術は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．（２００１）（Ｅｄｓ．）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ Ｅｄ．）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、およびＨａｙｒｎｅｓ，ｅｔ ａｌ．（１９８５）ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ，ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，ＤＣ）によって開示される。ハイブリダイゼーション洗浄条件には、０．２×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳの洗浄溶液および１０分間室温で回転によるインキュベーション（低ストリンジェンシー洗浄）、事前に温めた（４２℃）０．２×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳの洗浄溶液および１５分間４２℃で回転によるインキュベーション（中ストリンジェンシー洗浄）、ならびに事前に温めた（６８℃）０．１×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳの洗浄溶液および１５分間６８℃で回転によるインキュベーション（高ストリンジェンシー洗浄）を挙げることができる。Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．（２０１１）［Ｅｄ．］Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃを参照されたい。

【０３３５】

オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体をコードする核酸を増幅させることができる。本明細書に記載される核酸はまた、増幅技術を使用して定量的にクローニングまたは測定することができる。増幅の方法はまた、当該技術分野で周知であり、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）（Ｉｎｎｉｓ（１９９０）［Ｅｄ．］ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ．、Ｉｎｎｉｓ（１９９５）［Ｅｄ．］ＰＣＲ Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ．）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）（Ｗｕ（１９８９）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ４：５６０、Ｌａｎｄｅｇｒｅｎ（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：１０７７、Ｂａｒｒｉｎｇｅｒ（１９９０）Ｇｅｎｅ ８９：１１７）、転写増幅（Ｋｗｏｈ（１９８９）ＰＮＡＳ ８６：１１７３）、自立的配列複製（ｓｅｌｆ ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ）（Ｇｕａｔｅｌｌｉ（１９９０）ＰＮＡＳ ８７：１８７４）、Ｑβレプリカーゼ増幅（Ｓｍｉｔｈ（１９９７）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３５：１４７７－９１））、自動化Ｑβレプリカーゼ増幅アッセイ（Ｂｕｒｇ（１９９６）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ １０：２５７－７１）、および他のＲＮＡポリメラーゼに媒介される技術（例えば、ＮＡＳＢＡ，Ｃａｎｇｅｎｅ，Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ，Ｏｎｔａｒｉｏ）が挙げられる。Ｂｅｒｇｅｒ（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５２：３０７－１６、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．（２００１）（Ｅｄｓ．）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ Ｅｄ．）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．（２０１１）［Ｅｄ．］Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｍａｎｉａｔｉｓ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ［３ｒｄ Ｅｄ．］Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、米国特許第４，６８３，１９５号および同第４，６８３，２０２号、Ｓｏｏｋｎａｎａｎ（１９９５）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３：５６３－６４もまた、参照されたい。

【０３３６】

縮重プライマー対を設計するためのパラダイムは、当該技術分野で周知である。例えば

、コンセンサス縮重ハイブリッドオリゴヌクレオチドプライマー（ＣＯｎｓｅｎｓｕｓ－ＤＥｇｅｎｅｒａｔｅ Ｈｙｂｒｉｄ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｐｒｉｍｅｒ）（ＣＯＤＥＨＯＰ）戦略コンピュータプログラムは、容易にアクセス可能であり、本明細書に提供されるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体配列等の関連タンパク質配列のセットで開始するハイブリッドプライマー予測のためのＢｌｏｃｋＭａｋｅｒの多重配列アライメントサイトから直接リンクしている。例えば、Ｒｏｓｅ（１９９８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ.２６：１６２８－３５、Ｓｉｎｇｈ（１９９８）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２４：３１８－１９を参照されたい。

【０３３７】

本明細書に開示されるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に実質的に同一である多形変異体、対立遺伝子、および種間相同体は、上述の核酸プローブを用いて単離することができる。あるいは、発現ライブラリーを用いて、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に対して作製された抗血清または精製抗体（これらもまたＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体相同体を認識し、選択的に結合する）を用いて、発現され流想動態を免疫的に検出することによって、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体、ならびにそれらの多形変異体、対立遺伝子、および種間相同体をクローニングしてもよい。

【０３３８】

ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体をコードする核酸は、適切な（完全または縮重）プライマー対を使用して、適切な核酸配列を増幅（例えば、ＰＣＲ）することによって生成され得る。増幅された核酸は、任意の細胞もしくは組織に由来するゲノムＤＮＡ、またはＶＩＳＴＡもしくはＶＩＳＴＡ複合体を発現する細胞に由来するｍＲＮＡもしくはｃＤＮＡであり得る。宿主細胞における異種配列の発現のための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ，ｅｔ ａｌ.（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ［３ｒｄ Ｅｄ.］Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０３３９】

ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体を含む融合タンパク質

転座配列に融合されるＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体をコードする核酸を含むハイブリッドタンパク質コード配列が、構築され得る。また、モチーフおよび抗原領域を含むハイブリッドＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体も提供される。これらの核酸配列は、転写または翻訳制御要素、例えば、転写および翻訳開始配列、プロモーターおよびエンハンサー、転写および翻訳ターミネーター、ポリアデニル化配列、ならびにＤＮＡをＲＮＡに転写するために有用な他の配列に動作可能に連結され得る。組み換え発現カセット、ベクター、およびトランスジェニックの構築において、プロモーターフラグメントを用いて、すべての所望の細胞または組織における所望の核酸の発現を指示することができる。

【０３４０】

融合タンパク質は、Ｃ末端またはＮ末端転座配列を含み得る。さらに、融合タンパク質は、例えば、タンパク質検出、精製、または他の用途のためのさらなる要素を含み得る。検出および精製促進ドメインには、例えば、固定化金属上での精製を可能にするポリヒスチジン域、ヒスチジン－トリプトファンモジュール、もしくは他のドメインといった金属キレート化ペプチド；マルトース結合タンパク質；固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするタンパク質Ａドメイン；またはＦＬＡＧＳ伸長／親和性精製システム（Ｉｍｍｕｎｅｘ Ｃｏｒｐ，Ｓｅａｔｔｌｅ ＷＡ）で用いられるドメインが含まれる。

【０３４１】

第Ｘａ因子（例えば、Ｏｔｔａｖｉ，（１９９８）Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ ８０：２８９－９３を参照されたい）、スブチリシンプロテアーゼ認識モチーフ（例えば、Ｐｏｌｙａｋ（１９９７）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ.１０：６１５－１９を参照されたい）、エンテロキナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ.）等の開裂可能なリンカーを、新たに翻訳されるポリペプチドの転座ドメイン（効率的な原形質膜発現のため）とその残りとの間に含むことは、精製を促進するのに有用であり得る。例えば、１つの構

築物は、６つのヒスチジン残基に連結され、チオレドキシン、エンテロキナーゼ開裂部位（例えば、Ｗｉｌｌｉａｍｓ（１９９５）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３４：１７８７－９７を参照されたい）、およびＣ末端転座ドメインが続く核酸配列をコードするポリペプチドを含み得る。ヒスチジン残基は、検出および精製を促進するが、一方でエンテロキナーゼ開裂部位は、所望されるタンパク質（複数可）を融合タンパク質の残部から精製する手段を提供する。融合タンパク質をコードするベクターおよび融合タンパク質の適用に関する技術は、科学および特許文献に十分に記載されている。例えば、Ｋｒｏｌｌ（１９９３）ＤＮＡ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１２：４４１－５３を参照されたい。

【０３４２】

ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体の組み換え発現のための系

配列をコードするリガンド結合領域を含む発現ベクターは、個々の発現ベクターまたは発現ベクターのライブラリーのいずれかとして、ゲノム内または細胞質もしくは細胞の核内に導入され、科学および特許文献に十分に記載されている種々の従来的な技術によって発現され得る。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．（２００１）［Ｅｄｓ．］Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ Ｅｄ．）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．（２０１１）［Ｅｄ．］Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃを参照されたい。

【０３４３】

核酸は、細胞内で安定に、または一過的に発現される発現カセット、ベクター、またはウイルスにおいて発現され得る（例えば、エピソーム発現系）。選択マーカーが、形質転換された細胞および配列上に選択可能な表現型を与えるために発現カセットおよびベクターに組み込まれ得る。例えば、選択マーカーは、宿主ゲノムへの統合を必要としないように、エピソームの維持および複製をコードし得る。例えば、マーカーは、抗生物質耐性（例えば、クロラムフェニコール、カナマイシン、Ｇ４１８、ブレオマイシン、ハイグロマイシン）または除草剤耐性（例えば、クロロスルフロン（ｃｈｌｏｒｏｓｕｌｆｕｒｏｎｅ）もしくはＢａｓｔａ）をコードし、所望のＤＮＡ配列が形質転換された細胞の選択を可能にし得る。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．（２０１１）［Ｅｄ．］Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．、およびＷａｌｋｅｒ＆Ｐａｐｌｅｙ（２００９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ［５ｔｈ Ｅｄ．］Ｒｏｙａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙを参照されたい。ネオマイシンまたはハイグロマイシンのような、基質に耐性を与える選択可能なマーカー遺伝子は組織培養においてのみ利用され得るため、化学療法耐性遺伝子もまた、インビトロおよびインビボで選択可能なマーカーとして使用される。

【０３４４】

本発明のポリヌクレオチドの細胞発現を可能にするために、少なくとも上記の核酸配列のうちの１つのコード領域を含み、さらに少なくとも１つのシス作用性制御要素を含む、本発明による核酸構築物が使用され得る。好ましくは、本発明の核酸構築物によって利用されるプロモーターは、形質転換された特定の細胞集団において活性である。細胞型特異的および／または組織特異的プロモーターの例は、当該技術分野で周知である。Ｂｅｒｎａｒｄｉ（２００３）［Ｅｄ．］Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ Ｖｏｌｕｍｅ ３８ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｂ．Ｖを参照されたい。本発明の核酸構築物は、プロモーター配列に隣接し得るか、または遠位であり得るエンハンサーをさらに含み得、そこからの転写の上方制御において機能し得る。

【０３４５】

本発明の核酸構築物は、好ましくは、適切な選択可能なマーカーおよび／または複製の起源をさらに含む。好ましくは、利用される核酸構築物は、大腸菌（構築物が適切な選択

可能なマーカーおよび複製の起源を含む）内で増殖し、細胞内での増殖または最適な遺伝子および組織中における統合に適合し得る、シャトルベクターである。本発明による構築物は、例えば、プラスミド、バクミド、ファージミド、コスミド、ファージ、ウイルス、または人工染色体であり得る。

【０３４６】

好適な構築物の例には、ｐｃＤＮＡ３、ｐｃＤＮＡ３．１（＋／－）、ｐＧＬ３、ＰｚｅｏＳＶ２（＋／－）、ｐＤｉｓｐｌａｙ、ｐＥＦ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏが含まれるが、これらに限定されず、そのそれぞれは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏ．（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ．）から市販入手可能である。レトロウイルス性ベクターおよびパッケージ系の例は、Ｒｅｔｒｏ－Ｘ　ｖｅｃｔｏｒｓ　ｐＬＮＣＸおよびｐＬＸＳＮを含むＣｌｏｎｔｅｃｈ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ．）から販売されているものであり、それらは複数のクローニング部位へのクローニングが可能であり、その導入遺伝子はＣＭＶプロモーターから転写される。導入遺伝子が５’ＬＴＲプロモーターから転写されるｐＢａｂｅ等のＭｏ－ＭｕＬＶに由来するベクターもまた、含まれる。

【０３４７】

本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞での核酸の発現に好適な形態の本発明の核酸を含み、それは、組み換え発現ベクターが、発現に使用される宿主細胞、すなわち、発現される核酸配列に動作可能に連結される宿主細胞に基づいて選択される１つ以上の制御性配列を含むことを意味する。組み換え発現ベクター内において、「動作可能に連結される」とは、目的とするヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で（例えば、インビトロ転写／翻訳系において、またはベクターが導入宿主細胞に導入される場合は宿主細胞において）、制御性配列（複数可）に連結されることを意味することが意図される。

【０３４８】

「制御性配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御要素（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。そのような制御性配列は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ（１９９０）Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ．に記載される。制御性配列は、多くの種類の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、およびある特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的制御性配列）を含む。当業者であれば、発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベル等の要因に左右され得ることを理解するであろう。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載される核酸によってコードされる融合タンパク質またはペプチドを含む、タンパク質またはペプチドを産生することができる。

【０３４９】

本発明の組み換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞における変異体タンパク質の産生のために設計され得る。例えば、本発明のタンパク質は、大腸菌等の細菌細胞、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、酵母細胞、または哺乳動物細胞において、発現され得る。好適な宿主細胞は、Ｇｏｅｄｄｅｌ（１９９０）Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡにおいて、さらに論じられる。あるいは、組み換え発現ベクターは、Ｔ７プロモーター制御性配列およびＴ７ポリメラーゼを使用してインビトロで転写され、翻訳され得る

【０３５０】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質のいずれかの発現を指示する構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターを含有するベクターを用いて、大腸菌において行われることが最も多い。融合ベクターは、いくつかのアミノ酸を、その中でコードされるタンパク質、組み換えタンパク質のアミノ末端またはＣ末端に付加

する。そのような融合ベクターは、典型的には、３つの目的に役立つ：（ｉ）組み換えタンパク質の発現を増加させる、（ｉｉ）組み換えタンパク質の可溶性を上昇させる、および（ｉｉｉ）親和性精製におけるリガンドとして作用することによって組み換えタンパク質の精製を補助する。しばしば、融合発現ベクターにおいて、融合タンパク質の精製後の融合部分からの組み換えタンパク質の分離を可能にするために、融合部分および組み換えタンパク質の接合部にタンパク質開裂部位が導入される。そのような酵素およびそれらの同族認識配列は、第Ｘａ因子、トロンビン、ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ、ＴＥＶ、およびエンテロキナーゼを含む。典型的な融合発現ベクターには、それぞれ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはタンパク質Ａを標的組み換えタンパク質に融合させるｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ；Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｊｏｈｎｓｏｎ（１９８８）Ｇｅｎｅ ６７：３１－４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ．）、およびｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）が挙げられる。

【０３５１】

組み換え哺乳動物発現ベクターは、ことによると、特定の細胞型において核酸の発現を指示することができる（例えば、組織特異的制御性要素を使用して、核酸を発現する）。組織特異的制御性要素は、当該技術分野で既知である。タンパク質の効率的な産生のため、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、所望の宿主における発現に最適化された発現制御配列の制御下に置くことが好ましい。例えば、配列は、最適化された転写および／または翻訳制御性配列を含み得る（例えば、改変Ｋｏｚａｋ配列）。

【０３５２】

大腸菌中で組み換えタンパク質発現を最大化するための１つの戦略は、組み換えタンパク質をタンパク分解開裂させる能力に障害を有する宿主細菌において、タンパク質を発現させることである。例えば、Ｇｏｔｔｅｓｍａｎ（１９９０）Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ．１８５：１１９－１２８を参照されたい。別の戦略は、各アミノ酸に対する個々のコドンが大腸菌で優先的に利用されるものとなるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を改変することである。例えば、Ｗａｄａ，ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：２１１１－２１１８を参照されたい。本発明の核酸配列のそのような改変は、標準的なＤＮＡ合成技術によって行われ得る。コドンバイアスを解消するための別の戦略は、細菌の菌株（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）またはＲｏｓｅｔｔａ細菌の菌株（Ｎｏｖａｇｅｎ）を加えたＢＬ２１－コドンを使用することによるものであり、これらの菌株は、珍しい大腸菌ｔＲＮＡ遺伝子の余分なコピーを含有する。

【０３５３】

本発明のタンパク質をコードする発現ベクターは、酵母発現ベクターであってもよい。酵母サッカロマイセスセレビシエにおける発現のためのベクターの例には、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Ｂａｌｄａｒｉ，ｅｔ ａｌ．（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：２２９－２３４）、ｐＭＦａ（Ｋｕｒｊａｎ ａｎｄ Ｈｅｒｓｋｏｗｉｔｚ（１９８２）Ｃｅｌｌ ３０：９３３－９４３）、ｐＪＲＹ８８（Ｓｃｈｕｌｔｚ，ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｇｅｎｅ ５４：１１３－１２３）、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ．）、およびｐｉｃＺ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ．）が挙げられる。

【０３５４】

あるいは、本発明のポリペプチドは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して昆虫細胞内で生成され得る。培養された昆虫細胞（例えば、ＳＦ９細胞）でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターには、ｐＡｃ系（Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２１５６－２１６５）およびｐＶＬ系（Ｌｕｃｋｌｏｗ ａｎｄ Ｓｕｍｍｅｒｓ（１９８９）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ１７０：３１－３９）が挙げられる。さらに別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクター

を使用して哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ３２９：８４０）およびｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８７）ＥＭＢＯ Ｊ．６：１８７－１９５）、ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）、ｐＵＢ６（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ｐＣＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ｐＲＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ｐｃＤＮＡ３（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）が挙げられる。哺乳動物細胞において使用される際、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルス制御性要素から提供される。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルス、ラウス肉腫ウイルス、およびサルウイルス４０に由来する。原核細胞および真核細胞の両方に対する他の好適な発現系に関しては、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．（２００１）（Ｅｄｓ．）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ Ｅｄ．）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙを参照されたい。

【０３５５】

宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、本発明のタンパク質は、大腸菌等の細菌細胞、昆虫細胞、酵母、植物、または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）、ＣＯＳ、ＨＥＫ２９３細胞）で産生され得る。他の好適な宿主細胞は、当業者に既知である。

【０３５６】

ベクターＤＮＡは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術によって、原核細胞または真核細胞に導入され得る。本明細書に使用される際、「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラン－媒介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含む、外来核酸（例えば、ＤＮＡ）を宿主細胞内に導入するための種々の当該技術分野で認識される技術を指すことが意図される。宿主細胞を形質転換する、またはトランスフェクトするための好適な方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．（２００１）［Ｅｄｓ．］Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ Ｅｄ．）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙおよび他の実験マニュアルに見出すことができる。

【０３５７】

外来ヌクレオチド配列を宿主細胞に導入するための周知の手順のいずれもが、使用され得る。これらには、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム、マイクロインジェクション、プラズマベクター、ウイルスベクター、およびクローニングされたゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、合成ＤＮＡ、または他の外来遺伝物質を宿主細胞に導入するための他の周知の方法のいずれの使用も含まれる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．（２００１）（Ｅｄｓ．）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ Ｅｄ．）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ ＬａｂｏｒａｔｏｒｙおよびＷａｌｋｅｒ＆Ｐａｐｌｅｙ（２００９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ［５ｔｈ Ｅｄ．］Ｒｏｙａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙを参照されたい。使用される特定の遺伝子操作手順が、少なくとも１つの核酸分子を、目的とするＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体、フラグメント、または変異体を発現することができる宿主細胞にうまく導入できることだけが必要である。

【０３５８】

哺乳動物細胞の安定したトランスフェクションに関して、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に応じて、細胞の小さい画分のみが、外来ＤＮＡをそれらのゲノムに組み込み得ることが知られている。これらの組み込み体を特定および選択するために、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、一般に、目的とする遺伝子とともに宿主細胞に導入される。様々な選択可能なマーカーには、それらのＧ４１８、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジン、および

メトトレキサート等の薬物に耐性を与えるものが含まれる。選択可能なマーカーをコードする核酸は、本発明のタンパク質をコードするものと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、または別々のベクター上で導入され得る。導入された核酸が安定にトランスフェクトされる細胞は、薬物選択によって特定され得る（例えば、選択可能なマーカー遺伝子を組み込まれた細胞が生存する一方、他の細胞は死滅する）。

【０３５９】

培養物中の原核生物または真核生物の宿主細胞等の本発明の宿主細胞を使用して、本発明のタンパク質を産生する（すなわち、発現させる）ことができる。したがって、本発明は、本発明の宿主細胞を使用して本発明のタンパク質を産生するための方法をさらに提供する。一実施形態において、方法は、本発明のタンパク質が産生されるように、好適な培地中で、（中に本発明のタンパク質をコードする組み換え発現ベクターが導入された）本発明の宿主細胞を培養することを含む。別の実施形態において、本方法は、培地または宿主細胞から本発明のタンパク質を単離することをさらに含む。

【０３６０】

発現ベクターが細胞に導入された後、トランスフェクトされた細胞は、目的とする受容体、フラグメント、または変異体の発現を支持する条件下で培養され、これが、次いで、標準的な技術を使用して、培養物から回収される。そのような技術の例は、当該技術分野で周知である。例えば、国際特許第ＷＯ　００／０６５９３号を参照されたい。

【０３６１】

ＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体に結合する抗体

本発明はまた、モノクローナルおよびヒト化モノクローナル抗体を含むがこれらに限定されない、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体も提供する。ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体は、薬学的担体および追加の抗体（例えば、抗ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、またはＣＴＬＡ－４抗体）とともに組成物中で混合され得る。

【０３６２】

単離ＶＩＳＴＡポリペプチド、またはその一部分もしくはフラグメントを免疫原として使用して、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を用いて、ＶＩＳＴＡに結合する抗体を生成することができる。全長ＶＩＳＴＡポリペプチドが使用され得るか、または代替として、本発明は、免疫原として使用するためのＶＩＳＴＡの抗原ペプチドフラグメントを提供する。一実施形態において、ＶＩＳＴＡの抗原ペプチドは、配列番号２、４、または５に示されるアミノ酸配列の少なくとも８個のアミノ酸残基を含み、ペプチドに対して生じる抗体がＶＩＳＴＡポリペプチドとともに特異的免疫複合体を形成するように、ＶＩＳＴＡのエピトープを包含する。好ましくは、抗原ペプチドは、少なくとも１０個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも１５個のアミノ酸残基、さらにより好ましくは少なくとも２０個のアミノ酸残基、および最も好ましくは少なくとも３０個のアミノ酸残基を含む。抗原ペプチドによって包含される好ましいエピトープは、ポリペプチドの細胞外ドメインに位置するＶＩＳＴＡの領域、例えば、親水性領域ならびに高い抗原性を有する領域である。

【０３６３】

ＶＩＳＴＡ免疫原が、典型的には、好適な対象（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物）に免疫原で免疫付与を行うことによって抗体を調製するために使用される。適切な免疫原性調製物は、例えば、組み換えによって発現されるＶＩＳＴＡポリペプチドまたは化学的に合成されるＶＩＳＴＡポリペプチドを含有し得る。調製物は、フロイント完全もしくは不完全アジュバント等のアジュバント、または類似の免疫賦活性剤をさらに含み得る。好適な対象に免疫原性ＶＩＳＴＡ調製物で免疫付与を行うことにより、ポリクローナル抗ＶＩＳＴＡ抗体応答を誘導する。

【０３６４】

抗体は、分子量約２３，０００ダルトンの２つの同一な軽ポリペプチド鎖（「軽鎖」）ならびに分子量５３，０００～７０，０００の２つの同一な重鎖（「重鎖」）を含み得る

。Ｅｄｅｌｍａｎ（１９７１）Ａｎｎ．ＮＹ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９０：５．を参照されたい。４つの鎖は、軽鎖が「Ｙ」配置の口で始まる重鎖を一括する「Ｙ」配置で、ジスルフィド結合によって連結される。「Ｙ」配置の「分岐」部分は、$Ｆ_{ａｂ}$領域と指定され、「Ｙ」配置の茎部分は、$Ｆ_{Ｃ}$領域と指定される。アミノ酸配列の配向は、「Ｙ」配置の上部のＮ末端終端から、各鎖の下部のＣ末端終端に進む。Ｎ末端終端は、それを誘起した抗原に対する特異性を有する可変領域を持ち、約１００アミノ酸長であるが、軽鎖と重鎖との間、および抗体間でわずかな違いがある。

【０３６５】

可変領域は、鎖の残りの長さに延在し、抗体の特定のクラス内では、抗体の特異性（すなわち、それを誘発する抗原）によって変化しない、定常領域に各鎖内で連結される。免疫グロブリン分子のクラスを決定する、５つの既知の主要な定常領域のクラスがある（例えば、γ、μ、α、δ、およびε重鎖定常領域に対応するＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＥ）。定常領域またはクラスが、補体の活性化（Ｋａｂａｔ（１９７６）Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｃｏｎｃｅｐｔｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ［$２^{ｎｄ}$ Ｅｄ．］ｐａｇｅｓ ４１３－４３６、Ｈｏｌｔ，Ｒｉｎｅｈａｒｔ，Ｗｉｎｓｔｏｎ）および他の細胞応答（Ａｎｄｒｅｗｓ，ｅｔ ａｌ．（１９８０）Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ １－１８、Ｋｏｈｌ，ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ４８：１８７）を含む、抗体のその後のエフェクター機能を決定し、一方で可変領域は、それが反応する抗原を決定する。軽鎖は、κ（カッパ）またはλ（ラムダ）のいずれかに分類される。各重鎖クラスは、κまたはλ軽鎖のいずれかと調製され得る。軽鎖および重鎖は互いに共有結合され、２つの重鎖の「尾」部分は、免疫グロブリンがハイブリドーマまたはＢ細胞のいずれかによって生成されるときに、共有ジスルフィド連結によって互いに結合される。

【０３６６】

そのような条件下での抗体への特異的結合は、特定のタンパク質に対するその特異性について選択された抗体を必要とし得る。例えば、ラット、マウス、またはヒト等の特定の種に由来する精液塩基性タンパク質に対して生じたポリクローナル抗体を選択して、精液塩基性タンパク質と特異的に免疫反応するが、精液塩基性タンパク質の多形変異体および対立遺伝子を除く他のタンパク質とは免疫反応しないポリクローナル抗体のみを得ることができる。この選択は、他の種由来の精液塩基性タンパク質分子と交差反応する抗体を差し引くことによって、達成され得る。種々の免疫測定形式を使用して、特定のタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択することができる。例えば、固相ＥＬＩＳＡ免疫測定法が、タンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するために日常的に使用される。例えば、特異的免疫反応性を決定するために使用することができる免疫測定形式および条件の説明に関しては、Ｈａｒｌｏｗ＆Ｌａｎｅ（１９９８）ＵＳＩＮＧ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙを参照されたい。典型的に、特異的または選択的反応は、少なくとも２倍のバックグラウンドシグナルまたはノイズ、およびより好ましくは１０～１０倍を上回るバックグラウンドとなる。

【０３６７】

抗体は、例えば、ＩｇＶドメインまたは他の特異的ドメイン中のＶＩＳＴＡの特異的エピトープに結合するものを特定するため、および／またはＶＩＳＴＡタンパク質に対する高親和性および結合力を有する抗体を選択するためにスクリーニングされ得る。加えて、これらの抗体は、インビトロおよびインビボでの免疫および免疫細胞に対するＶＩＳＴＡの特定の機能および作用を調節するものを特定するためにスクリーニングされる。例えば、アッセイを行って、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞によるサイトカイン産生、ＣＤ２８共刺激、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖、ならびにナイーブおよびメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖等を含む、ＶＩＳＴＡによって負に制御される免疫機能対す特定の抗ＶＩＳＴＡ抗体の調節作用がある場合は、それを確認することができる。ある実施形態において、アッセイを行って、インビトロではＶＩＳＴＡ－Ｉｇが存在するとき、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇによって抑制

を高めるが、これらの抗ＶＩＳＴＡ抗体がインビボでは反対に挙動する、すなわち、それらは免疫抑制性である、可能性のある治療用抗ＶＩＳＴＡ抗体を特定する。本発明は、１３６個のアミノ酸の細胞外ドメインに、例えば、アミノ酸１～５０、５０～１００、１００～１３６に特異的に結合する抗ＶＩＳＴＡ抗体およびその使用、ＩｇＶに特異的に結合する抗体、ストーク領域に特異的に結合する抗体、膜貫通領域に特異的に結合する抗体、ならびにＶＩＳＴＡの細胞質性領域に特異的に結合する抗体を包含する。これらの特異的領域は、本出願中で特定される。

【０３６８】

別の実施形態において、組み換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型に優先的に核酸の発現を指示することができる（例えば、核酸を発現するために組織特異的制御性要素を用いる）。組織特異的制御性要素は、当該技術分野で既知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的、Ｐｉｎｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ球特異的プロモーター（Ｃａｌａｍｅ ａｎｄ Ｅａｔｏｎ（１９８８）Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、Ｔ細胞受容体（Ｗｉｎｏｔｏ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ（１９８９）ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９－７３３）および免疫グロブリン（Ｂａｎｅｒｊｉ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０、Ｑｕｅｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ（１９８３）Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８）の特定のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター（例えば、神経フィラメントプロモーター、Ｂｙｒｎｅ ａｎｄ Ｒｕｄｄｌｅ（１９８９）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）、ならびに乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター、米国特許第４，８７３，３１６号および欧州出願公開第２６４，１６６号）が挙げられる。例えば、マウスホメオボックスプロモーター（Ｋｅｓｓｅｌ ａｎｄ Ｇｒｕｓｓ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）およびα－フェトタンパク質プロモーター（Ｃａｍｐｅｓ ａｎｄ Ｔｉｌｇｈｍａｎ（１９８９）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６）による、発生的に制御されるプロモーターもまた包含される。

【０３６９】

ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、抗原で免疫付与した動物の血清に由来する抗体分子の異種集団である。ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合するポリクローナル抗体は、当該技術分野で周知である方法によって作製され得る。例えば、Ｈｏｗａｒｄ＆Ｋａｓｅｒ（２００７）Ｍａｋｉｎｇ ａｎｄ Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０３７０】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、抗原に特異的な抗体の実質的に同種の集団を含有し、この集団は、実質的に同様のエピトープ結合部位を含有する。モノクローナル抗体は、当業者に既知の方法によって得ることができる。例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）Ｎａｔｕｒｅ２５６：４９５－４９７、米国特許第４，３７６，１１０号、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．［Ｅｄｓ．］（２０１１）ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，ＮＹ．、およびＨａｒｌｏｗ＆Ｌａｎｅ（１９９８）ＵＳＩＮＧ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ；Ｃｏｌｌｉｇａｎ，ｅｔ ａｌ．（２００５）［Ｅｄｓ．］Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，ＮＹを参照されたい。そのような抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＧＩＬＤ、およびそれらの任意のサ

ブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスのものであり得る。本発明の抗体を産生するハイブリドーマは、インビトロ、インサイツ、またはインビボで培養され得る。

【０３７１】

キメラ抗体

キメラ抗体は、異なる動物種に由来するものの異なる部分の分子、例えば、マウス抗体に由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものであり、これらは、主に、適用時に免疫原性を低減させ、産生時の収率を増加させるために使用され、例えば、マウスのモノクローナル抗体はハイブリドーマからのより高い収率を有するが、ヒトにおいてより高い免疫原性を有する場合、結果として、ヒトマウスキメラモノクローナル抗体が使用される。キメラ抗体およびそれらの産生のための方法は、当該技術分野で既知である。Ｃａｂｉｌｌｙ，ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８１：３２７３－３２７７、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８１：６８５１－６８５５，Ｂｏｕｌｉａｎｎｅ，ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ３１２：６４３－６４６、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ３１４：２６８－２７０、欧州特許出願第１７３４９４号（１９８６）、国際公開第ＷＯ ８６／０１５３３号（１９８６）、欧州特許出願第１８４１８７号（１９８６）、欧州特許出願第７３４９４号（１９８６）、Ｓａｈａｇａｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３７：１０６６－１０７４、Ｌｉｕ，ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８４：３４３９－３４４３、Ｓｕｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８４：２１４－２１８、Ｂｅｔｔｅｒ，ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２４０：１０４１－１０４３、およびＨａｒｌｏｗ＆Ｌａｎｅ（１９９８）ＵＳＩＮＧ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、米国特許第５，６２４，６５９号を参照されたい。

【０３７２】

ヒト化抗体

ヒト化抗体は、さらに多くのヒト様免疫グロブリンドメインを含有するように操作され、動物由来抗体の相補性決定領域のみを組み込む。これは、モノクローナル抗体の可変領域の超可変ループの配列を検査し、それらをヒト抗体鎖の構造に当て嵌めることによって達成され得る。例えば、米国特許第６，１８７，２８７号を参照されたい。同様に、ヒト化抗体を産生する他の方法が、現在、当該技術分野で周知である。例えば、米国特許第５，２２５，５３９号、同第５，５３０，１０１号、同第５，５８５，０８９号、同第５，６９３，７６２号、同第６，０５４，２９７号、同第６，１８０，３７０号、同第６，４０７，２１３号、同第６，５４８，６４０号、同第６，６３２，９２７号、および同第６，６３９，０５５号、Ｊｏｎｅｓ，ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ３２１：５２２－５２５、Ｒｅｉｃｈｍａｎｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ３３２：３２３－３２７、Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２３９：１５３４－３６、ならびにＺｈｉｑｉａｎｇ Ａｎ（２００９）［Ｅｄ．］Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｆｒｏｍ Ｂｅｎｃｈ ｔｏ Ｃｌｉｎｉｃ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃを参照されたい。

【０３７３】

抗体フラグメント

全免疫グロブリン（またはそれらの組み換え対応物）に加えて、エピトープ結合部位（例えば、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、または他のフラグメント）を含む免疫グロブリンフラグメントが合成され得る。「フラグメント」または最小免疫グロブリンは、組み換え免疫グロブリン技術を利用して設計され得る。例えば、本発明において使用される「Ｆｖ」免疫グロブリンは、融合された可変軽鎖領域と可変重鎖領域との合成によって産生され得る。抗体の組み合わせ、例えば、２つのはっきりと異なるＦｖ特異性を含む二特異性抗体もまた興味深い。免疫グロブリンの抗原結合フラグメントには、ＳＭＩＰ（小分子免疫薬

）、ラクダ抗体、ナノボディ、およびＩｇＮＡＲを含むが、これらに限定されない。

【０３７４】

抗イディオタイプ抗体

抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体は、一般に、抗体の抗原結合部位と会合している固有の決定基を認識する抗体である。Ｉｄ抗体は、抗体源として同じ種および遺伝子型の動物（例えば、マウス株）に、抗Ｉｄが調製される抗体で免疫付与を行うことによって調製することができる。免疫付与した動物は、これらのイディオタイプ決定基に対する抗体（抗ｌｄ抗体）を産生することによって、免疫付与抗体のイディオタイプ決定基を認識し、応答するようになる。例えば、米国特許第４，６９９，８８０号を参照されたい。抗Ｉｄ抗体はまた、さらに別の動物における免疫応答を誘導するための「免疫原」として使用され、いわゆる抗－抗Ｉｄ抗体を産生し得る。抗－抗Ｉｄ抗体は、抗Ｉｄを誘導した元の抗体とエピトープ的に（ｅｐｉｔｏｐｉｃａｌｌｙ）同一であり得る。したがって、抗体のイディオタイプ決定基に対する抗体を使用することにより、同一の特異性の抗体を発現する他のクローンを特定することができる。

【０３７５】

操作および修飾抗体

本発明の抗体は、抗体開始物質に由来するＶＨおよび／またはＶＬ配列のうちの１つ以上を有する抗体を使用して、開始抗体からの改変された特性を有し得る修飾抗体を操作して、さらに調製され得る。抗体は、片方または両方の可変領域（すなわち、ＶＨおよび／またはＶＬ）内、例えば、１つ以上のＣＤＲ領域内および／または１つ以上のフレームワーク領域内の１つ以上の残基を修飾することによって操作され得る。追加または代替として、、抗体は、例えば、抗体のエフェクター機能（複数可）を改変するために、定常領域（複数可）内の残基を修飾することによって操作され得る。

【０３７６】

実施され得る可変領域操作の１種は、ＣＤＲ移植である。抗体は、主に６個の重鎖および軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）に位置するアミノ酸残基を通して、標的抗原と相互作用する。この理由から、ＣＤＲ内のアミノ酸配列は、ＣＤＲの外側の配列よりも個々の抗体間でより多様である。ＣＤＲ配列はほとんどの抗体－抗原相互作用に関与するため、異なる特性を有する異なる抗体からのフレームワーク配列に接合されている特異的な天然の抗体からのＣＤＲ配列を含む発現ベクターを構築することによって、特異的な天然の抗体の特性を模倣する組み換え抗体を発現することが可能である。例えば、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｎａｔｕｒｅ３３２：３２３－３２７、Ｊｏｎｅｓ，ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５、Ｑｕｅｅｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８６：１００２９－１００３３、米国特許第５，２２５，５３９号、同第５，５３０，１０１号、同第５，５８５，０８９号、同第５，６９３，７６２号、同第６，１８０，３７０号を参照されたい。

【０３７７】

好適なフレームワーク配列は、公共のＤＮＡデータベースまたは生殖細胞系抗体遺伝子配列を含む公開された参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子に関する生殖細胞系ＤＮＡ配列は、「ＶＢａｓｅ」ヒト生殖細胞系配列データベース（インターネット上で利用可能である）において、ならびにＫａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ［５ｔｈ Ｅｄ．］Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９２）“Ｔｈｅ Ｒｅｐｅｒｔｏｉｒｅ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｒｍｌｉｎｅ ＶＨ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ Ｒｅｖｅａｌｓ ａｂｏｕｔ Ｆｉｆｔｙ Ｇｒｏｕｐｓ ｏｆ ＶＨ Ｓｅｇｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ Ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ Ｌｏｏｐｓ”Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７７６－７９８、およびＣｏｘ，ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｅｕｒ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：８２７－８３６に見出すことが

できる。

【０３７８】

可変領域修飾の他の種類は、ＶＨおよび／またはＶＬ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、および／またはＣＤＲ３領域内のアミノ酸残基を突然変異させ、それによって目的とする抗体の１つ以上の結合特性（例えば、親和性）を改善することである。部位特異的突然変異生成またはＰＣＲ媒介性突然変異生成を実施して、突然変異（複数可）を導入することができ、抗体結合、または他の目的とする機能的特性における効果は、適切なインビトロまたはインビボアッセイにおいて評価され得る。好ましくは、（本明細書で論じられる）保存的修飾が導入され得る。突然変異は、アミノ酸置換、付加、または欠失であり得るが、好ましくは、置換である。さらに、典型的には、ＣＤＲ領域内の１、２、３、４、または５個以下の残基が改変される。

【０３７９】

本発明の操作抗体は、その修飾が、抗体の特性を改善するためにＶＨおよび／またはＶＬ内のフレームワーク残基に行われたものを含む。典型的には、そのようなフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を減少させるために行われる。例えば、１つのアプローチは、１つ以上のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系配列へと「復帰変異（ｂａｃｋｍｕｔａｔｅ）させる」ことである。より具体的には、体細胞突然変異を経た抗体は、その抗体が由来する生殖細胞系の配列とは異なるフレームワーク残基をを含有し得る。そのような残基は、抗体のフレームワーク配列とその抗体が由来する生殖細胞系の配列とを比較することによって特定され得る。

【０３８０】

フレームワークまたはＣＤＲ領域内で行われる修飾に加えて、またはその代替として、本発明の抗体は、典型的には、血清半減期、補体結合、Ｆｃ受容体結合、および／または抗原依存性細胞傷害性等の抗体の１つ以上の機能的特性を改変するために、Ｆｃ領域内に修飾を含むように操作され得る。さらに、本発明の抗体は、抗体の１つ以上の機能的特性を改変するために、再び化学的に修飾され得る（例えば、１つ以上の化学的部分が抗体に付着され得る）か、またはそのグリコシル化を改変するように再び修飾され得る。そのような実施形態が、以下にさらに記載される。Ｆｃ領域中の残基の番号付けは、ＫａｂａｔのＥＵインデックスのものである。

【０３８１】

ＣＨ１のヒンジ領域は、ヒンジ領域中のシステイン残基の数を改変する、例えば、増加または減少させるように、修飾され得る。米国特許第５，６７７，４２５号を参照されたい。ＣＨ１のヒンジ領域中のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の会合を促進するように、または抗体の安定性を上昇もしくは減少させるように改変され得る。

【０３８２】

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ように突然変異され得る。より具体的には、１つ以上のアミノ酸突然変異が、抗体が天然のヒンジドメインＳｐＡ結合と比べて損なわれたＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｙｌタンパク質Ａ（ＳｐＡ）結合を有するように、Ｆｃ－ヒンジフラグメントのCH_2－CH_3ドメイン界面領域に導入され得る。例えば、米国特許第６，１６５，７４５号を参照されたい。

【０３８３】

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得る。種々のアプローチが可能である。例えば、次の突然変異のうちの１つ以上が、導入され得る：Ｔ２５２Ｌ、Ｔ２５４Ｓ、Ｔ２５６Ｆ。米国特許第６，２７７，３７５号を参照されたい。あるいは、生物学的半減期を増加させるために、抗体は、ＩｇＧのＦｃ領域CH_2ドメインの２つのループから採取した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領域内で改変され得る。米国特許第５，８６９，０４６号および同第６，１２１，０２２号を参照されたい。

【０３８４】

Ｆｃ領域は、抗体のエフェクター機能（複数可）を改変するために、少なくとも１つの

アミノ酸残基を異なるアミノ酸残基と置き換えることによって改変され得る。例えば、抗体がエフェクターリガンドに対する改変された親和性を有するが、親の抗体の抗原結合能力は保持するように、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つ以上のアミノ酸が、異なるアミノ酸残基と置き換えられてもよい。それに対する親和性が改変され得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。米国特許第５，６２４，８２１号および同第５，６４８，２６０号を参照されたい。

【０３８５】

抗体のグリコシル化が修飾され得る。例えば、無グリコシル化抗体が作製され得る（すなわち、抗体にはグリコシル化がない）。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように改変され得る。そのような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の１つ以上のグリコシル化部位を改変することによって達成され得る。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１つ以上のアミノ酸置換が行われ、それによってその部位におけるグリコシル化を排除することができる。そのような無グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させ得る。例えば、米国特許第５，７１４，３５０号および同第６，３５０，８６１号を参照されたい。

【０３８６】

追加または代替として、低減させ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された二分ＧｌｃＮａｃ構造を有する抗体等の改変された型のグリコシル化を有する抗体が、作製され得る。そのような改変されたグリコシル化パターンは、抗体のＡＤＣＣ能を増加させることが実証されている。そのような炭水化物修飾は、例えば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞内で抗体を発現することによって達成され得る。改変されたグリコシル化機構を有する細胞は、当該技術分野において説明されており、本発明の組み換え抗体を発現し、それによって改変されたグリコシル化を有する抗体を産生する宿主細胞として使用され得る。米国特許出願公開第２００４／０１１０７０４号およびＹａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ，ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ．８７：６１４－２２、欧州特許第ＥＰ １，１７６，１９５号、国際公開第ＷＯ ２００３／０３５８３５号、Ｓｈｉｅｌｄｓ，ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：２６７３３－２６７４０、国際公開第ＷＯ ９９／５４３４２号、Ｕｍａｎａ，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１７：１７６－１８０、ならびにＴａｒｅｎｔｉｎｏ，ｅｔ ａｌ．（１９７５）Ｂｉｏｃｈｅｍ．１４：５５１６－２３を参照されたい。

【０３８７】

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、抗体またはそのフラグメントを、典型的には、ＰＥＧの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体等のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と、１つ以上のＰＥＧ基が抗体または抗体フラグメントに結合される条件下で反応させる。好ましくは、ペグ化は、反応性ＰＥＧ分子（または同様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。

【０３８８】

本発明はまた、本明細書に示される抗体、抗体フラグメント、二特異性抗体、ＳＭＩＰ、ラクダ抗体、ナノボディ、ＩｇＮＡＲ、ポリペプチド、可変領域、およびＣＤＲと実質的に相同な変異体および同等物も提供する。これらは、例えば、保存的置換突然変異（すなわち、１つ以上のアミノ酸と同様のアミノ酸との置換）を含有し得る。例えば、保存的置換は、あるアミノ酸と、同じ一般的クラス内の別のものとの置換、例えば、１つの酸性アミノ酸と別の酸性アミノ酸、１つの塩基性アミノ酸と別の塩基性アミノ酸、または中性アミノ酸と別の中性アミノ酸との置換を指す。

【０３８９】

抗体複合体

さらに、抗体（またはそのフラグメント）は、細胞毒素、治療剤、または放射性金属イ

オンといった治療的部分に複合体化され得る。細胞毒素または細胞毒性剤は、細胞に有害な任意の薬剤を含む。例には、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそれらの類似体または相同体が挙げられる。治療剤には、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロソスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、ならびにシス－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（かつてのダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（かつてのアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（ＡＭＣ））、ならびに有糸分裂阻害剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が含まれるが、これらに限定されない。

【０３９０】

抗体を操作する方法

本明細書に開示されるＶＨおよびＶＬ配列を有する抗体を使用して、ＶＨおよび／またはＶＬ配列、またはそこに結合される定常領域（複数可）を修飾することによって、新たな変異抗体を作製することができる。このため、本発明の変異抗体の構造的特徴を使用して、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体への結合等、本発明の抗体の少なくとも１つの機能的特性を保持する構造的関連する変異抗体を作製する。例えば、１つの抗ＶＩＳＴＡ変異抗体もしくは抗ＶＩＳＴＡ複合体変異抗体の１つ以上のＣＤＲ領域、またはその突然変異を、既知のフレームワーク領域および／または他のＣＤＲと組み換えによって組み合わせて、本明細書で論じられる本発明のさらなる組み換え操作された抗ＶＩＳＴＡまたは抗ＶＩＳＴＡ複合体抗体（例えば、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に結合する抗体）を作製することができる。操作方法のための出発物質は、本明細書に提供されるＶＨおよび／またはＶＫ配列のうちの１つ以上、またはそれらの１つ以上のＣＤＲ領域であり得る。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ＶＨおよび／またはＶＫ配列のうちの１つ以上、またはそれらの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させる）必要はない。むしろ、配列（複数可）中に含有される情報が出発物質として使用され、元の配列（複数可）に由来する「第二世代」配列（複数可）を作製し、次いで、その「第二世代」配列（複数可）を調製し、タンパク質として発現させる。標準的な分子生物学技術を使用して、改変された抗体配列を調製し、発現させることができる。

【０３９１】

改変された抗体配列（複数可）によってコードされる抗体は、本明細書に提供される方法および配列によって産生される抗ＶＩＳＴＡまたは抗ＶＩＳＴＡ複合体抗体の機能的特性のうちの１つ、いくつか、またはすべてを保持し得、その機能的特性には、特定のＫＤレベル以下を有する変異ＶＩＳＴＡまたは変異ＶＩＳＴＡ複合体への結合、および／もしくは免疫細胞活性の調節、ならびに／または、例えば、結腸直腸癌腫、肺癌、前立腺癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、および肝臓癌といった所望の標的細胞への選択的結合が含まれる。改変された抗体の機能的特性は、当該技術分野で利用可能な、および／または本明細書に記載される、標準的なアッセイを使用して評価され得る。

【０３９２】

突然変異が、抗ＶＩＳＴＡまたは抗ＶＩＳＴＡ複合体抗体のコード配列のすべてまたは一部に沿って無作為または選択的に導入され得、結果として生じる修飾された抗ＶＩＳＴＡまたは抗ＶＩＳＴＡ複合体抗体は、結合活性および／または他の所望の機能的特性に関

してスクリーニングされ得る。国際特許第ＷＯ　２０１１／１２００１３号を参照されたい。

【０３９３】

ＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体をコードする核酸

本発明の別の実施形態は、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に結合する本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、全細胞、細胞ライセート、または部分的に精製されたか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、および当該技術分野で周知の他の技術を含む、標準的な技術によって、他の細胞成分または他の混入物質（例えば、他の細胞性核酸またはタンパク質）から離して、精製によって単離され得る。Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃを参照されたい。本発明の核酸は、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よく、または含有しなくてもよい。核酸は、ｃＤＮＡ分子であり得る。

【０３９４】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学技術を使用して得ることができるハイブリドーマ（例えば、以下にさら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るハイブリドーマ）によって発現される抗体に関しては、ハイブリドーマによって作製される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クローニング技術によって得ることができる。（例えば、ファージディスプレイ技術を使用して）免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから得られる抗体に関しては、抗体をコードする核酸は、ライブラリーから回収され得る。

【０３９５】

特に、縮重コドン置換が、例えば、１つ以上の選択されたコドンの第３の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成され得る。Ｂａｔｚｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１９：５０８１、Ｏｈｔｓｕｋａ，ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０：２６０５－０８、Ｒｏｓｓｏｌｉｎｉ，ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ　８：９１－９８。

【０３９６】

いったんＶＨおよびＶＬセグメントをコードするＤＮＡフラグメントが得られると、これらのＤＮＡフラグメントは、標準的な組み換えＤＮＡ技術によって、例えば、その可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子に、Ｆａｂフラグメント遺伝子に、またはｓｃＦｖ遺伝子に変換するようにさらに操作され得る。これらの操作において、ＶＬまたはＶＨをコードするＤＮＡフラグメントは、抗体定常領域または可動性リンカー等の別のタンパク質をコードする別のＤＮＡフラグメントに動作可能に連結される。

【０３９７】

ＶＨ領域をコードする単離ＤＮＡは、ＶＨをコードするＤＮＡを、重鎖定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３）をコードする別のＤＮＡ分子に動作可能に連結することによって、全長重鎖遺伝子に変換され得る。当該技術分野で既知であるヒト重鎖定常領域遺伝子の配列（例えば、Ｋａｂａｔ，ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．９１－３２４２を参照されたい）およびこれらの領域を包含するＤＮＡフラグメントは、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またはＩｇＧ４定常領域である。Ｆａｂフラグメント重鎖遺伝子に関しては、ＶＨをコードするＤＮＡは、重鎖ＣＨ１定常領域のみをコードする別のＤＮＡ分子に動作可能に連結され得る。

【０３９８】
ＶＬ領域をコードする単離されるＤＮＡは、ＶＬをコードするＤＮＡを、軽鎖定常領域ＣＬをコードする別のＤＮＡ分子に動作可能に連結することによって、全長軽鎖遺伝子（ならびにＦａｂ軽鎖遺伝子）に変換され得る。当該技術分野で既知であるヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列（例えば、Ｋａｂａｔ，ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．９１－３２４２を参照されたい）およびこれらの領域を包含するＤＮＡフラグメントは、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、κまたはλ定常領域であり得るが、最も好ましくは、κ定常領域である。

【０３９９】
ｓｃＦｖ遺伝子を作製するために、ＶＨおよびＶＬ配列が、可動性リンカーによって接合されるＶＬおよびＶＨ領域を有する連続する一本鎖タンパク質として発現され得るように、ＶＨおよびＶＬをコードするＤＮＡフラグメントは、可動性リンカーをコードする、例えば、アミノ酸配列（Ｇｌｙ４－Ｓｅｒ）$_3$をコードする別のフラグメントに動作可能に連結される。例えば、Ｂｉｒｄ，ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－４２６、Ｈｕｓｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：５８７９－５８８３、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ，ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｎａｔｕｒｅ　３４８：５５２－５５４を参照されたい。

【０４００】
抗体およびそのフラグメントを産生する方法
本発明はまた、抗体およびそのフラグメントを産生するための方法も提供する。抗体を産生する方法は、当業者に周知である。例えば、キメラ抗体を産生する方法が、当該技術分野で現在周知である。例えば、米国特許第４，８１６，５６７号、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ．（１９８４）ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　８１：８６５１－５５、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ　３１４：２６８－２７０、Ｂｏｕｌｉａｎｎｅ，ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ　３１２：６４３－４６を参照されたい。

【０４０１】
例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、遺伝子操作によって産生され得る。この技術において、他の方法と同様に、抗体を産生する細胞が、所望の抗原または免疫原に感作される。抗体を産生する細胞から単離されたメッセンジャーＲＮＡを鋳型として用いて、ＰＣＲ増幅を使用してｃＤＮＡを作製することができる。増幅された免疫グロブリンｃＤＮＡの適切な切片を発現ベクターに挿入することによって、それぞれが、初期抗原特異性を保持する１つの重鎖遺伝子および１つの軽鎖遺伝子を含有するベクターのライブラリーが産生される。コンビナトリアルライブラリーは、重鎖遺伝子ライブラリーと軽鎖遺伝子ライブラリーとを組み合わせることによって構築される。これは、重鎖および軽鎖（抗体分子のＦａｂフラグメントまたは抗原結合フラグメントに類似している）を共発現するクローンのライブラリーをもたらす。これらの遺伝子を担持するベクターは、宿主細胞にコトランスフェクトされる。抗体遺伝子の合成がトランスフェクトされた宿主において誘導されるとき、重鎖および軽鎖タンパク質が自己構築して活性抗体を産生し、これは抗原または免疫原を用いるスクリーニングによって検出することができる。

【０４０２】
本発明の抗体およびそのフラグメントはまた、当業者に周知の従来的な技術を使用して、オペロンおよび抗体重鎖をコードするＤＮＡ配列を含有する発現ベクターを構築することによって産生され得、抗体特異性に必要なＣＤＲをコードするＤＮＡ配列は、非ヒト細胞源に由来するが、抗体鎖の残りの部分をコードするＤＮＡ配列は、ヒト細胞源に由来する。さらに、本発明は、前述の本発明の核酸分子を含有するベクター、特に、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、および遺伝子操作において一般的な他のベクターに関する。ベクターに含有される核酸分子は、原核細胞および真核細胞の転写を確

実にする制御性要素に連結され得る。

【０４０３】

ベクターは、標的宿主細胞内の外来タンパク質の発現の操作を促進する要素を含有する。便宜上、形質転換のため配列の操作およびＤＮＡの産生は、まず、細菌宿主（例えば、大腸菌）で行われ、通常、ベクターは、細菌性複製起源および適切な細菌性選択マーカーを含む、そのような操作を促進するための配列を含むであろう。選択マーカーは、選択的培養培地中で成長させた形質転換された宿主細胞の生存または成長のために必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を含有するベクターが形質転換されていない宿主細胞は、培養培地中で生存しないであろう。典型的な選択遺伝子は、抗生物質もしくは他の毒素に対する耐性を与えるか、栄養要求欠乏を補完するか、または複合培地からは入手できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。酵母の形質転換のための例となるベクターおよび方法が、当該技術分野で説明されている。例えば、Ｂｕｒｋｅ，ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照されたい。

【０４０４】

目的とするポリペプチドコード配列は、酵母細胞におけるポリペプチドの発現をもたらす転写および翻訳制御性配列に動作可能に連結され得る。これらのベクター成分には、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終結配列のうちの１つ以上が含まれ得るが、これらに限定されない。ポリペプチドの分泌のための配列もまた含まれ得る（例えば、シグナル配列）。

【０４０５】

核酸は、別の核酸配列との機能的関係に配置される際、「動作可能に連結される」。例えば、シグナル配列のためのＤＮＡは、ポリペプチドの分泌に関与する前タンパク質として発現される場合、ポリペプチドのためのＤＮＡに動作可能に連結され、プロモーターまたはエンハンサーは、その配列の転写に影響する場合、コード配列に動作可能に連結される。一般に、「動作可能に連結される」とは、連続して連結されるＤＮＡ配列、および分泌性リーダーの場合、連続した、リーディングフレーム中を広義に指す。しかしながら、エンハンサーは、連続している必要はない。

【０４０６】

プロモーターは、それらが動作可能に連結される特定の核酸配列の転写および翻訳を制御する、構造遺伝子の開始コドンに対して上流（５’）（一般に、約１００～１０００ｂｐ）に位置する非翻訳配列である。そのようなプロモーターは、いくつかのクラスに分類される：誘導性、構成性、および抑制性プロモーター（例えば、リプレッサーの不在に応じて転写のレベルを上昇させるもの）。誘導性プロモーターは、培養条件のいくつかの変化（例えば、栄養素の存在もしくは不在または温度の変化）に応じて、それらの制御下で、ＤＮＡからの上昇したレベルの転写を開始し得る。

【０４０７】

第２の発現ベクターは、当業者に周知の同じ従来的な方法を使用して産生され得、当該発現ベクターは、オペロンおよび抗体軽鎖をコードするＤＮＡ配列を含有し、抗体特異性に必要なＣＤＲをコードするＤＮＡ配列は非ヒト細胞源、好ましくは、ウサギＢ細胞源に由来するが、抗体鎖の残りの部分をコードするＤＮＡ配列がヒト細胞源に由来する。

【０４０８】

発現ベクターは、当業者に周知の従来的な技術によって宿主細胞内にトランスフェクトされ、トランスフェクトされた宿主細胞を産生し、当業者に周知の従来的な技術によって培養された当該トランスフェクトされた宿主細胞が、当該抗体ポリペプチドを産生する。

【０４０９】

宿主細胞は、上述の２つの発現ベクターを用いてコトランスフェクトされ得、第１の発現ベクターはオペロンおよび軽鎖由来ポリペプチドをコードするＤＮＡを含有し、第２のベクターはオペロンおよび重鎖由来ポリペプチドをコードするＤＮＡを含有する。２つのベクターは、異なる選択可能なマーカーを含有するが、好ましくは、重鎖および軽鎖ポリ

ペプチドの実質的に同等の発現を達成する。あるいは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方をコードするＤＮＡを含む、単一のベクターが使用されてもよい。重鎖および軽鎖のコード配列は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、またはその両方を含み得る。

【０４１０】

抗体およびそのフラグメントを発現するために使用される宿主細胞は、大腸菌等の細菌細胞または真核細胞のいずれかであり得る。骨髄腫細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）、ＮＳＯ、またはＨＥＫ２９３細胞株等、この目的に対して明確に定義された種類の哺乳動物細胞が使用され得る。

【０４１１】

ベクターが構築され得る一般的方法、宿主細胞を産生するために必要とされるトランスフェクション方法、ならびに当該宿主細胞から抗体およびそのフラグメントを産生するために必要とされる培養方法はすべて、従来的な技術を含む。好ましくは、抗体を産生するために使用される細胞株は哺乳動物細胞株であるが、大腸菌由来の細菌性菌株等の細菌細胞株、または酵母細胞株等の任意の他の好適な細胞株を使用してもよい。

【０４１２】

同様に、いったん生成されると、抗体は、例えば、交流濾過、硫酸アンモニウム沈殿、および親和性カラムクロマトグラフィー等の当該技術分野で標準的な手順に従って精製され得る。

【０４１３】

動物を使用するＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体に結合する抗体の生成

ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する本発明の抗体は、ヒトモノクローナル抗体であり得る。ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に対するそのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなく、ヒト免疫系の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には、それぞれ、本明細書においてＨｕＭＡｂマウス（登録商標）およびＫＭマウス（登録商標）と称されるマウスが含まれ、本明細書において集合的に「ヒトＩｇマウス」と称される。ＨｕＭＡｂマウス（登録商標）（Ｍｅｄａｒｅｘ，Ｉｎｃ．）は、再配列されていないヒト重鎖（μおよびγ）ならびにκ軽鎖免疫グロブリン配列を、内因性μおよびκ鎖の遺伝子座を不活性化する標的とされた突然変異と一緒にコードする、ヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座（ｍｉｎｉｌｏｃｉ）を含有する。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κの発現の低減を呈し、免疫付与に応答して、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突然変異を経て、高親和性ヒトＩｇＧκモノクローナルを生成する。Ｌｏｎｂｅｒｇ（１９９４）Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ１１３：４９－１０１、Ｌｏｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｈｕｓｚａｒ（１９９５）Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３、およびＨａｒｄｉｎｇ ａｎｄ Ｌｏｎｂｅｒｇ（１９９５）Ａｎｎ．ＮＹ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７６４：５３６－５４６。ＨｕＭａｂマウス（登録商標）の調製および使用、ならびにそのようなマウスによって行われるゲノム修飾は、Ｔａｙｌｏｒ，ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２０：６２８７－６２９５、Ｃｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５：６４７－６５６、Ｔｕａｉｌｌｏｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：３７２０－３７２４、Ｃｈｏｉ，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ４：１１７－１２３、Ｃｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９３）ＥＭＢＯ Ｊ．１２：８２１－８３０、Ｔｕａｉｌｌｏｎ，ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：２９１２－２９２０、Ｔａｙｌｏｒ，ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ６：５７９－５９１、およびＦｉｓｈｗｉｌｄ，ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：８４５－８５１において、さらに説明されている。さ

らに、米国特許第５，５４５，８０６号、同第５，５６９，８２５号、同第５，６２５，１２６号、同第５，６３３，４２５号、同第５，７８９，６５０号、同第５，８７７，３９７号、同第５，６６１，０１６号、同第５，８１４，３１８号、同第５，８７４，２９９号、同第５，７７０，４２９号、および同第５，５４５，８０７号、国際公開第ＷＯ９２／０３９１８号、同第ＷＯ　９３／１２２２７号、同第ＷＯ　９４／２５５８５号、同第ＷＯ　９７／１３８５２号、同第ＷＯ　９８／２４８８４号、同第ＷＯ　９９／４５９６２号、および同第ＷＯ　０１／１４４２４号を参照されたい。

【０４１４】

本発明のヒト抗ＶＩＳＴＡおよび抗ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ複合体抗体（例えば、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体）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等の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、産生され得る。本明細書において「ＫＭマウス（登録商標）」と称されるそのようなマウスは、国際公開第ＷＯ　０２／４３４７８号において詳細に記載される。

【０４１５】

なおもさらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替的なトランスジェニック動物系が当該技術分野で利用可能であり、本発明の抗ＶＩＳＴＡおよび抗ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ複合体抗体を産生するために使用され得る。例えば、Ｘｅｎｏｍｏｕｓｅ（Ａｂｇｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．）と称される代替的なトランスジェニック系が使用されてもよく、そのようなマウスは、例えば、米国特許第５，９３９，５９８号、同第６，０７５，１８１号、同第６，１１４，５９８号、同第６，１５０，５８４号、および同第６，１６２，９６３号に記載される。

【０４１６】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替的なトランスクロモソミック動物系が当該技術分野で利用可能であり、本発明の抗ＶＩＳＴＡおよび抗ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ複合体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が使用されてもよい。Ｔｏｍｉｚｕｋａ，ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７：７２２－７２７を参照されたい。さらに、ヒト重鎖および軽鎖導入染色体を有するウシが、当該技術分野で説明されており（Ｋｕｒｏｉｗａ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２０：８８９－８９４）、本発明の抗ＶＩＳＴＡおよび抗ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ複合体抗体を産生するために使用され得る。

【０４１７】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して調製され得る。ヒト抗体を単離するためのそのような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、米国特許第５，２２３，４０９号、同第５，４０３，４８４号、同第５，５７１，６９８号、同第５，４２７，９０８号、同第５，５８０，７１７号、同第５，９６９，１０８号、同第６，１７２，１９７号、同第５，８８５，７９３号、同第６，５２１，４０４号、同第６，５４４，７３１号、同第６，５５５，３１３号、同第６，５８２，９１５号、および同第６，５９３，０８１号を参照されたい。

【０４１８】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫付与に応じてヒト抗体応答が生成され得るように、その中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され得る。例えば、米国特許第５，４７６，９９６号および同第５，６９８，７６７号を参照されたい。

【０４１９】

ヒトＩｇマウスを使用して本発明のヒト抗体を産生する場合、そのようなマウスは、Ｌｏｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｎａｔｕｒｅ　３６８（６４７４）：８５６－８５９、Ｆｉｓｈｗｉｌｄ，ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎ

ｏｌｏｇｙ　１４：８４５－８５１、国際公開第ＷＯ　９８／２４８８４号、および国際公開第ＷＯ　０１／１４４２４号で説明されるように、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ複合体ポリペプチドの精製または富化調製物で免疫付与され得る。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およびＶＩＳＴＡ複合体の精製または組み換え調製物（５～５０μｇ）を使用して、ヒトＩｇマウスに、腹腔内免疫付与を行うことができる。

【０４２０】

他者による様々な抗原を用いた先行経験は、トランスジェニックマウスは、最初に、フロイント完全アジュバント中の抗原で腹腔内（ＩＰ）免疫付与が行われ、その後、フロイント不完全アジュバント中の抗原を用いた隔週のＩＰ免疫付与（最大で合計６回）を行うと、応答することを示している。しかしながら、フロイント以外のアジュバントもまた、有効であることが発見されている。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発見されている。免疫応答は、後眼窩出血から得られる血漿試料を用いた免疫付与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得、抗ＶＩＳＴＡまたは抗ＶＩＳＴＡ－Ｉｇヒト免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスが、融合に使用され得る。マウスは、屠殺および脾臓の除去の３日前に抗原で静脈内に追加免疫され得る。各免疫付与に対して２～３回の融合を行う必要があり得ると予想される。典型的には、６～２４匹のマウスに、各抗原の免疫付与が行われる。通常は、ＨＣｏ７およびＨＣｏ１２株の両方が使用される。加えて、ＨＣｏ７およびＨＣｏ１２導入遺伝子の両方が、２つの異なるヒト重鎖導入遺伝子（ＨＣｏ７／ＨＣｏ１２）を有する単一のマウスに一緒に繁殖され得る。代替または追加として、ＫＭマウス（登録商標）株が使用されてもよい。

【０４２１】

本発明のヒトモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマの生成

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成するために、免疫付与したマウスから脾細胞および／またはリンパ節細胞が単離され、マウス骨髄腫細胞株等の適切な不死化細胞株に融合され得る。結果として生じるハイブリドーマは、抗原特異的抗体の産生に関してスクリーニングされ得る。例えば、免疫化されたマウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁液は、５０％ＰＥＧの非分泌型マウス骨髄腫細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ　１５８０）であるＰ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３の数の６分の１に融合され得る。細胞は、おおよそ2×10^{-5}で平底マイクロタイタープレートに播種した後、２０％　胎児性Ｃｌｏｎｅ　Ｓｅｒｕｍ、１８％「６５３」条件培地、５％　ｏｒｉｇｅｎ（ＩＧＥＮ）、４ｍＭのＬ－グルタミン、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、５ｍＭのＨＥＰＥＳ、０．０５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、５０ユニット／ｍｌのペニシリン、５０ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシン、５０ｍｇ／ｍｌのゲンタマイシン、および１×ＨＡＴ（Ｓｉｇｍａ；ＨＡＴは、融合の２４時間後に添加される）を含有する選択培地において２週間インキュベーションされ得る。おおよそ２週間後、細胞は、ＨＡＴをＨＴと置き換えた培地で培養され得る。次いで、個々のウェルが、ＥＬＩＳＡによってヒトモノクローナルＩｇＭおよびＩｇＧ抗体に関してスクリーニングされ得る。いったん広範囲のハイブリドーマ成長が生じると、培地は、通常１０～１４日後に観察され得る。ハイブリドーマを分泌する抗体を、再播種し、再度スクリーニングしてもよく、ヒトＩｇＧに関して依然として陽性の場合、モノクローナル抗体は、限界希釈によって少なくとも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、インビトロで培養して、特徴付けのための組織培養培地中で少量の抗体を生成することができる。

【０４２２】

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ための２リットルのスピナーフラスコ中で成長させてもよい。タンパク質Ａ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）を用いた親和性クロマトグラフィーの前に、上清が濾過および濃縮され得る。溶出した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って

確認され得る。緩衝溶液はＰＢＳに交換されてもよく、濃度は、１．４３の吸光係数を使用してＯＤ２８０で判定され得る。モノクローナル抗体は、アリコートに分け、－８０℃で保管され得る。

【０４２３】

トランスジェニック動物

本発明の宿主細胞を用いて、非ヒトトランスジェニック動物を産生することもできる。例えば、一実施形態において、本発明の宿主細胞は、ＶＩＳＴＡコード配列が導入された受精卵母細胞または胚幹細胞である。その後、そのような宿主細胞を用いて、外因性ＶＩＳＴＡ配列がそれらのゲノムまたは内因性ＶＩＳＴＡ配列が改変された相同組み換え動物に導入された、非ヒトトランスジェニック動物を作成することができる。そのような動物は、ＶＩＳＴＡの機能および／または活性の研究、ならびにＶＩＳＴＡ活性の調節剤の特定および／または評価に有用である。本明細書に使用される際、「トランスジェニック動物」は、非ヒト動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ラットまたはマウス等の齧歯類であり、これらの動物の細胞のうちの１つ以上が導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、トリ、両生類等が挙げられる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物がそこから作成され、成熟動物のゲノム内に留まる細胞のゲノムに統合され、それによって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示する、外因性ＤＮＡである。本明細書に使用される際、「相同組み換え動物」は、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであり、これらの動物が作成される前に、内因性ＶＩＳＴＡ遺伝子が、内因性遺伝子と動物の細胞（例えば、動物の胚細胞）に導入される外因性ＤＮＡ分子との間の相同組み換えによって改変されている。本発明のトランスジェニック動物は、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によってＶＩＳＴＡコード核酸を受精卵母細胞の雄前核に導入し、偽妊娠した雌里親動物における卵母細胞の成長を可能にすることによって作成され得る。配列番号１または４のＶＩＳＴＡ　ｃＤＮＡ配列は、導入遺伝子として非ヒト動物のゲノムに導入され得る。あるいは、サルまたはラットＶＩＳＴＡ遺伝子等、ヒトＶＩＳＴＡ遺伝子の非ヒト相同体を導入遺伝子として用いることができる。あるいは、別のＶＩＳＴＡファミリーメンバー等のＶＩＳＴＡ遺伝子相同体は、配列番号１または３のＶＩＳＴＡ　ｃＤＮＡ配列へのハイブリダイゼーションに基づいて単離され、導入遺伝子として用いることができる。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルを導入遺伝子に含めて、導入遺伝子の発現の効率を高めることもできる。組織特異的制御配列（複数可）は、ＶＩＳＴＡ導入遺伝子に動作可能に連結されて、特定の細胞にＶＩＳＴＡポリペプチドの発現を指示することができる。胚操作およびマイクロインジェクションによってトランスジェニック動物、具体的には、マウス等の動物を生成するための方法は、当該技術分野で定着しており、例えば、米国特許第４，７３６，８６６号および同第４，８７０，００９号（Ｌｅｄｅｒ，ｅｔ　ａｌ．）、米国特許第４，８７３，１９１号（Ｗａｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、ならびにＭａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ　ｔｈｅ　Ｍｏｕｓｅ　Ｅｍｂｒｙｏ（Ｈｏｇａｎ，Ｂ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８６）に記載されている。同様の方法他のトランスジェニック動物の産生に用いられる。トランスジェニック創始動物は、そのゲノムにおけるＶＩＳＴＡ導入遺伝子の存在および／または動物の組織もしくは細胞におけるＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡの発現に基づいて特定され得る。その後、トランスジェニック創始動物を用いて、導入遺伝子を有するさらなる動物を繁殖させることができる。さらに、ＶＩＳＴＡポリペプチドをコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物にさらに繁殖し得る。

【０４２４】

相同組み換え動物を作成するために、欠失、付加、または置換を導入し、それによってＶＩＳＴＡ遺伝子を改変、例えば、機能的に破壊した、ＶＩＳＴＡ遺伝子の少なくとも一部を含むベクターが調製される。このＶＩＳＴＡ遺伝子は、ヒトまたはマウス遺伝子（例

えば、配列番号１または３のｃＤＮＡ）であり得る。

【０４２５】

別の実施形態において、導入遺伝子の制御された発現を可能にする選択された系を含むトランスジェニック非ヒト動物を産生することができる。そのような系の一例は、バクテリオファージＰ１のｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系である。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系の説明については、例えば、Ｌａｋｓｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：６２３２－６２３６を参照されたい。リコンビナーゼ系の別の例は、サッカロマイセスセレビシエのＦＬＰリコンビナーゼ系である（Ｏ’Ｇｏｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５１：１３５１－１３５５）。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系を用いて導入遺伝子の発現を制御する場合、Ｃｒｅリコンビナーゼと選択されたポリペプチドの両方をコードする導入遺伝子を含む動物が必要とされる。そのような動物は、「二重」トランスジェニック動物の構築によって、例えば、一方が選択されたポリペプチドをコードする導入遺伝子を含み、他方がリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含む、２匹のトランスジェニック動物を交配することによって提供され得る。

【０４２６】

本明細書に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンは、Ｗｉｌｍｕｔ，ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ　３８５：８１０－８１３、国際公開第ＷＯ９７／０７６６８号、および同第ＷＯ９７／０７６６９号に記載の方法に従って産生され得る。手短には、トランスジェニック動物由来の細胞、例えば、体細胞が、単離され、成長周期を出てＧ０期に入るよう誘導され得る。その後、静止細胞は、例えば、電気パルスを用いて、静止細胞が単離される同一の種の動物由来の除核卵母細胞に融合され得る。その後、再構築された卵母細胞は、桑実胚期または胞胚期に発育し、その後、偽妊娠した雌里親動物に移されるように培養される。この雌里親動物由来の子孫は、細胞、例えば、体細胞が単離される動物のクローンである。

【０４２７】

標識

本明細書に記載されるポリペプチド、複合体、および抗体は、翻訳後に修飾されて、エフェクター部分、例えば、化学リンカー、検出可能部分、例えば、蛍光色素、酵素、基質、生物発光物質、放射性物質、化学発光部分、細胞毒性剤、放射性物質、または機能性部分等を付加することができる。

【０４２８】

様々な実体、例えば、リガンドは、当該技術分野で既知のオリゴヌクレオチドにカップリングされ得る。リガンドには、天然に存在する分子、または組み換え体、または合成分子が含まれ得る。例示的なリガンドには、アビジン、ビオチン、ペプチド、ペプチド模倣体、ポリリシン（ＰＬＬ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ｍＰＥＧ、カチオン性基、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、サイロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質Ａ、ムチン、グリコシル化ポリアミノ酸、トランスフェリン、アプタマー、免疫グロブリン（例えば、抗体）、インスリン、トランスフェリン、アルブミン、糖、親油性分（例えば、ステロイド、胆汁酸、コレステロール、コール酸、および脂肪酸）、ビタミンＡ、ビタミンＥ、ビタミンＫ、ビタミンＢ、葉酸、Ｂ１２、リボフラビン、ビオチン、ピリドキーサル、ビタミン補因子、リポ多糖、ホルモンおよびホルモン受容体、レクチン、炭水化物、多価炭水化物、放射性標識マーカー、蛍光色素、ならびにこれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。例えば、米国特許第６，１５３、７３７号、同第６，１７２，２０８号、同第６，３００，３１９号、同第６，３３５，４３４号、同第６，３３５，４３７号、同第６，３９５，４３７号、同第６，４４４，８０６号、同第６，４８６，３０８号、同第６，５２５，０３１号、同第６，５２８，６３１号、および同第６，５５９、２７９号を参照されたい。

【０４２９】

さらに、インビボにおける半減期を延長させる（例えば、血流からのクリアランスまで

の時間を長くすることによって）部分が抗原またはエピトープに付加され得る。そのような技法には、例えば、ＰＥＧ部分の付加（ペグ化とも称される）が含まれ、当該技術分野で周知である。米国特許出願公開第２００３／００３１６７１号を参照されたい。

【０４３０】

本明細書に記載される抗原、抗体、またはその抗原結合フラグメントは、それが無作為でない化学的または物理的相互作用によって固体標識と会合されるときに、基質に「結合」され得る。この結合は、共有結合を介し得る。しかしながら、結合は、共有的または恒久的である必要はない。物質は、「スペーサー分子」または「リンカー基」を介して標識に結合され得る。そのようなスペーサー分子は、生物学的物質に結合する第１の部分と標識に結合する第２の部分とを有する分子である。したがって、標識に結合されると、スペーサー分子は、標識と生物学的物質とを分離するが、これらの両方に結合される。生物学的物質（例えば、標識）と標識を結合させる方法は、当該技術分野で周知であり、化学的カップリングが含まれるが、これに限定されない。

【０４３１】

検出可能な標識

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、翻訳後に修飾されて、エフェクター標識、例えば、化学リンカー、検出可能な標識、例えば、蛍光色素、酵素、基質、生物発光物質、放射性物質、および化学発光標識等、または機能標識、例えば、ストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、細胞毒素、細胞毒性剤、および放射性物質等を付加することができる。さらなる例示的な酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、およびルシフェラーゼが含まれるが、これらに限定されない。さらなる例示的なの蛍光物質には、ローダミン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ウンベリフェロン、ジクロロトリアジニルアミン、フィコエリトリン、およびダンシルクロリドが含まれるが、これらに限定されない。さらなる例示的なの化学発光標識には、ルミノールが含まれるが、これに限定されない。さらなる例示的な生物発光物質には、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンが含まれるが、これらに限定されない。さらなる例示の放射性物質には、ビスマス－２１３（^{213}Ｂｓ）、炭素－１４（^{14}Ｃ）、炭素－１１（^{11}Ｃ）、塩素－１８（$Ｃｌ^{18}$）、クロム－５１（^{51}Ｃｒ）、コバルト－５７（^{57}Ｃｏ）、コバルト－６０（^{60}Ｃｏ）、銅－６４（^{64}Ｃｕ）、銅－６７（^{67}Ｃｕ）、ジスプロシウム－１６５（^{165}Ｄｙ）、エルビウム－１６９（^{169}Ｅｒ）、フッ素－１８（^{18}Ｆ）、ガリウム－６７（^{67}Ｇａ）、ガリウム－６８（^{68}Ｇａ）、ゲルマニウム－６８（^{68}Ｇｅ）、ホルミウム－１６６（^{166}Ｈｏ）、インジウム－１１１（^{111}Ｉｎ）、ヨウ素－１２５（^{125}Ｉ）、ヨウ素－１２３（^{124}Ｉ）、ヨウ素－１２４（^{124}Ｉ）、ヨウ素－１３１（^{131}Ｉ）、イリジウム－１９２（^{192}Ｉｒ）、鉄－５９（^{59}Ｆｅ）、クリプトン－８１（^{81}Ｋｒ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ）、ルテチウム－１７７（^{177}Ｌｕ）、モリブデン－９９（^{99}Ｍｏ）、窒素－１３（^{13}Ｎ）、酸素－１５（^{15}Ｏ）、パラジウム－１０３（^{103}Ｐｄ）、リン－３２（^{32}Ｐ）、カリウム－４２（^{42}Ｋ）、レニウム－１８６（^{186}Ｒｅ）、レニウム－１８８（^{188}Ｒｅ）、ルビジウム－８１（^{81}Ｒｂ）、ルビジウム－８２（^{82}Ｒｂ）、サマリウム－１５３（^{153}Ｓｍ）、セレン－７５（^{75}Ｓｅ）、ナトリウム－２４（^{24}Ｎａ）、ストロンチウム－８２（^{82}Ｓｒ）、ストロンチウム－８９（^{89}Ｓｒ）、硫黄－３５（^{35}Ｓ）、テクネチウム－９９ｍ（^{99}Ｔｃ）、タリウム－２０１（^{201}Ｔｌ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、キセノン－１３３（^{133}Ｘｅ）、イッテルビウム－１６９（^{169}Ｙｂ）、イッテルビウム－１７７（^{177}Ｙｂ）、およびイットリウム－９０（^{90}Ｙ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０４３２】

細胞毒性剤

細胞毒性剤を作製するために、本発明のＶＩＳＴＡポリペプチド－ＶＩＳＴＡ複合体は、当該技術分野で既知の技法を用いて毒素に連結されるか、または動作可能に結合され得

る。本発明のポリペプチドまたは抗体に複合体化され得る様々な毒素が知られている。例には、多数の有用な植物、真菌、またはさらには細菌由来の毒素が挙げられ、一例として、様々なＡ鎖毒素、具体的には、リシンＡ鎖；リボソーム不活性化タンパク質、例えば、サポリンまたはゲロニン；α－サルシン；アスペルギリン；レストリクトシン；およびリボヌクレアーゼ、例えば、胎盤リボヌクレアーゼ、血管新生、ジフテリア毒素、またはシュードモナス外毒素が挙げられる。本発明に関連した使用に好ましい毒素部分は、炭水化物残基を修飾または除去するように処理された毒素Ａ鎖、脱グリコシル化Ａ鎖である。米国特許第５，７７６，４２７号。

【０４３３】

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、メトトレキサート、アミノプテリン、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジンを含むが、これらに限定されない細胞毒性剤；アルキル化剤、例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）、マイトマイシンＣ、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、１－メチルニトロソ尿素、シクロソスファミド、メクロレタミン、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、シス－ジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）、シスプラチン、およびカルボプラチン（パラプラチン）；ダウノルビシン（かつてのダウノマイシン）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、デトルビシン、カルミノマイシン、イダルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、およびビサントレンを含むアントラサイクリン；ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ）、ブレオマイシン、カリケアマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（ＡＭＣ）を含む抗生物質；ならびに抗有糸分裂剤、例えば、ビンカアルカロイド、ビンクリスチン、およびビンブラスチンに複合体化され得る。他の細胞毒性剤には、パクリタキセル（ＴＡＸＯＬ（登録商標））、リシン、緑膿菌外毒素、ゲムシタビン、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロマイド、エメチン、エトポシド、テノポシド、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、コルチコステロイド、マイトタン（Ｏ，Ｐ’－（ＤＤＤ））、インターフェロン、およびこれらの細胞毒性剤の混合物が含まれる。

【０４３４】

さらなる細胞毒性剤には、例えば、カルボプラチン、シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、カリケアマイシン、ドキソルビシン、５－フルオロウラシル、マイトマイシンＣ、アクチノマイシンＤ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ＶＥＧＦアンタゴニスト、ＥＧＦＲアンタゴニスト、プラチン、タキソール、イリノテカン、５－フルオロウラシル、ゲムシタビン、ロイコボリン、ステロイド、シクロホスファミド、メルファラン、ビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、およびビノレルビン）、ムスチン、チロシンキナーゼ阻害剤、放射線療法、性ホルモンアンタゴニスト、選択的アンドロゲン受容体調節剤、選択的エストロゲン受容体調節剤、ＰＤＧＦアンタゴニスト、ＴＮＦアンタゴニスト、ＩＬ－１アンタゴニスト、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２またはＩＬ－２）、ＩＬ－１２Ｒアンタゴニスト、毒素抱合モノクローナル抗体、腫瘍抗原特異的モノクローナル抗体、Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標）、Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）、ペルツズマブ、抗ＣＤ２０抗体、Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標）、オクレリズマブ、オファツムマブ、ＤＸＬ６２５、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、またはこれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。リシン、ジフテリア毒素、およびシュードモナス毒素等の植物および細菌由来の毒性酵素は、ヒト化抗体、またはその結合フラグメントに複合体化されて、細胞型特異的殺試薬を生成することができる。Ｙｏｕｌｅ，ｅｔ ａｌ．（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：５４８３、Ｇｉｌｌｉｌａｎｄ，ｅｔ ａｌ．（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４５３９、Ｋｒｏｌｉｃｋ，ｅｔ ａｌ．（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ

７７：５４１９。他の細胞毒性剤には、細胞毒性リボヌクレアーゼが含まれる。米国特許第６，６５３，１０４号を参照されたい。

【０４３５】

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡタンパク質は、αまたはβ粒子を放出する放射性核種（例えば、放射性免疫複合体）に複合体化され得る。そのような放射性同位体には、β放射体、例えば、リン－３２（^{32}Ｐ）、スカンジウム－４７（^{47}Ｓｃ）、銅－６７（^{67}Ｃｕ）、ガリウム－６７（^{67}Ｇａ）、イットリウム－８８（^{88}Ｙ）、イットリウム－９０（^{90}Ｙ）、ヨウ素－１２５（^{125}Ｉ）、ヨウ素－１３１（^{131}Ｉ）、サマリウム－１５３（^{153}Ｓｍ）、ルテチウム－１７７（^{177}Ｌｕ）、レニウム－１８６（^{186}Ｒｅ）、レニウム－１８８（^{188}Ｒｅ）、およびα放射体、例えば、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ）、ビスマス－２１２（^{212}Ｂｉ）、ビスマス－２１３（^{213}Ｂｉ）、またはアクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０４３６】

Ｈｕｎｔｅｒ，ｅｔ ａｌ（１９６２）Ｎａｔｕｒｅ １４４：９４５、Ｄａｖｉｄ，ｅｔ ａｌ．（１９７４）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １３：１０１４、Ｐａｉｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．４０：２１９、およびＮｙｇｒｅｎ（１９８２）Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ ａｎｄ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ，３０：４０７によって説明される方法等の本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を標識に複合体化するための方法が当該技術分野で既知ある。

【０４３７】

基質

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、基質に結合され得る。当該技術分野で既知のいくつかの基質（例えば、固体支持体）は、本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体との使用に好適である。この基質は、チャネルまたは他の構成を含むように修飾され得る。Ｆｕｎｇ（２００４）［Ｅｄ．］Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｒｒａｙｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ ａｎｄ Ｋａｍｂｈａｍｐａｔｉ（２００４）［Ｅｄ．］Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓを参照されたい。

【０４３８】

基質物質には、アクリル、アガロース、ホウケイ酸ガラス、炭素（例えば、炭素ナノ繊維シートシートまたはペレット）、酢酸セルロース、セルロース、セラミック、ゲル、ガラス（例えば、無機、制御細孔、修飾、ソーダ石灰、または機能化ガラス）、ラテックス、電磁ビーズ、膜、金属、半金属、ニトロセルロース、ＮＹＬＯＮ（登録商標）、光ファイバー束、有機ポリマー、紙、プラスチック、ポリアクリロイルモルホリド、ポリ（４－メチルブテン）、ポリ（テレフタル酸エチレン）、ポリ（酪酸ビニル）、ポリアクリルアミド、ポリブチレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、テレフタル酸ポリエチレングリコール、ポリホルムアルデヒド、ポリメタクリレート、ポリメチルメタクリレート、ポリプロピレン、多糖、ポリスチレン、ポリウレタン、ポリビニルアセテート、ポリビニルクロリド、ポリビニリデンジフルオリド（ＰＶＤＦ）、ポリビニルピロリジノン、レーヨン、樹脂、ゴム、半導体物質、セファロース（登録商標）、シリカ、シリコン、スチレンコポリマー、ＴＥＦＬＯＮ（登録商標）、および様々な他のポリマーが含まれるが、これらに限定されない。

【０４３９】

基質は、平らでなくてもよく、球形（例えば、ビーズ）または円筒形（例えば、繊維）を含む任意の種類の形状を含んでもよい。固体支持体に結合される物質は、固体支持体の任意の部分に結合し得る（例えば、多孔性固体支持体物質の内部に結合し得る）。

【０４４０】

基質本体は、ビーズ、ボックス、カラム、円筒、ディスク、皿（例えば、ガラス皿、ペトリ皿）、繊維、フィルム、フィルター、マイクロタイタープレート（例えば、９６ウェ

ルマイクロタイタープレート）、多ブレードスティック、網、ペレット、プレート、リング、ロッド、ロール、シート、スライド、スティック、トレイ、管、またはバイアルの形態であり得る。基質は、単数の別個の本体（例えば、単一の管、単一のビース）、いくつもの複数の基質本体（例えば、１棚１０個の管、いくつかのビーズ）、またはこれらの組み合わせ（例えば、１つのトレイが、複数のマイクロタイタープレート、ビーズを充填したカラム、ビーズを充填したマイクロタイタープレートを含む）であり得る。

【０４４１】

ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、無作為でない化学的または物理的相互作用によって固体基質と会合するときに、基質に「結合」され得る。この結合は、共有結合を介し得る。しかしながら、結合は、共有的または恒久的である必要はない。物質は、「スペーサー分子」または「リンカー基」を介して基質に結合され得る。そのようなスペーサー分子は、生物学的物質に結合する第１の部分と基質に結合する第２の部分とを有する分子である。したがって、基質に結合されるとき、スペーサー分子は、基質と生物学的物質とを分離するが、これらの両方に結合している。生物学的物質（例えば、標識）を基質に結合する方法は、当該技術分野で周知であり、化学的カップリングを含むが、これに限定されない。

【０４４２】

固相合成反応のために固相を支持および含有するマイクロタイタープレート等のプレートが用いられ得る。マイクロタイタープレートは、固相として用いられるビーズを収容し得る。本明細書において「粒子」または「微小粒子」または「ナノ粒子」または「ビーズ」または「マイクロビーズ」または「ミクロスフェア」とは、様々な形状または大きさのいずれかを有する微粒子物体を意味する。形状は、一般に球形であり得るが、球形でなくてもよく、例えば、円筒形または多面体であり得る。当業者が理解するように、これらの粒子は、それらの用途に応じて様々な物質を含み得、架橋デンプン、デキストラン、セルロース、タンパク質、スチレンポリマー、例えば、ポリスチレンおよびメチルスチレン、ならびに他のスチレンコポリマーを含む有機ポリマー、プラスチック、ガラス、セラミック、アクリルポリマー、磁気応答物質、コロイド、トリアゾール、炭素黒鉛、二酸化チタン、ナイロン、ラテックス、およびＴＥＦＬＯＮ（登録商標）を含むが、これらに限定されない。例えば、Ｂａｎｇｓ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｆｉｓｈｅｒｓ，ＩＮの“Ｍｉｃｒｏｓｐｈｅｒｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｇｕｉｄｅ”を参照されたい。

【０４４３】

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、本明細書に記載される基質の形態（例えば、ビーズ、ボックス、カラム、シリンダー、ディスク、皿（例えば、ガラス皿、ペトリ皿）、繊維、フィルム、フィルター、マイクロタイタープレート（例えば、９６ウェルマイクロタイタープレート）、多ブレードスティック、網、ペレット、プレート、リング、ロッド、ロール、シート、スライド、スティック、トレイ、管、またはバイアル）のうちのいずれかに結合され得る。具体的には、粒子またはビーズは、ゲル化物質の構成成分であり得るか、または様々な合成プラスチック（例えば、ポリスチレン）でできたラテックスビーズ等の別個の構成成分であり得る。標識（例えば、ストレプトアビジン）は、基質（例えば、ビーズ）に結合され得る。

【０４４４】

薬学的組成物

「薬学的組成物」とは、哺乳動物への投与に好適な化学的または生物学的組成物を指す。そのような組成物は、特に、口腔、皮膚上、硬膜外、吸入、動脈内、頸動脈内、脳室内、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、髄腔内、くも膜下腔内、静脈内、経口、非経口、かん腸または坐薬による直腸投与、皮下、真皮下、舌下、経皮、および経粘膜を含むがこれらに限定されない、いくつかの経路のうちの１つ以上による投与のために製剤化され得る。加えて、投与は、注入、粉末、液体、ゲル、ドロップ、または他の投与手段によって生じ得る。

【０４４５】

上述のような組成物は、所望の抗原、例えば、腫瘍抗原、または別の免疫調節化合物、例えば、Ｔｏｌｌ様受容体アゴニスト、１型インターフェロン、例えば、αおよびβインターフェロン、ならびにＣＤ４０アゴニスト、例えば、アゴニストＣＤ４０抗体および抗体フラグメント、好ましくは、抗ヒトＣＤ４０アゴニスト性抗体および抗体フラグメント、または他の免疫エンハンサーもしくはサプレッサー、例えば、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＣＴＬＡ４融合タンパク質、およびそれに特異的な抗体をさらに含み得る。

【０４４６】

一実施形態において、抗原は、癌抗原または腫瘍抗原であり得る。「癌抗原」および「腫瘍抗原」という用語は、互換的に使用され、癌細胞によって差次的に発現される抗原を指す。したがって、癌細胞に対する免疫応答を差次的に標的とするために癌抗原が活用され得る。それ故に、癌抗原は、腫瘍特異的免疫応答を刺激する可能性があり得る。ある特定の癌抗原が正常細胞によってコードされるが、必ずしも発現されるわけではない。これらの抗原のうちのいくつかは、正常細胞において通常サイレントである（すなわち、発現されない）抗原、ある特定の分化段階でのみ発現される抗原、および一過的に発現される抗原（例えば、胚および胎児抗原）と見なされ得る。他の癌抗原は、例えば、癌遺伝子（例えば、活性化ｒａｓ癌遺伝子）、サプレッサー遺伝子（例えば、変異体ｐ５３）、または内部欠失もしくは染色体転座に起因した融合タンパク質等の突然変異体細胞遺伝子によってコードされ得る。さらなる他の癌抗原は、ＲＮＡおよびＤＮＡ腫瘍ウイルスによって担持される遺伝子等のウイルス遺伝子によってコードされ得る。

【０４４７】

腫瘍抗原の例として、ＭＡＧＥ、ＭＡＲＴ－１／Ｍｅｌａｎ－Ａ、ｇｐ１００、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰＵＶ）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ＡＤＡｂｐ）、シクロフィリンｂ、結腸直腸結合抗原（ＣＲＣ）－Ｃ０１７－１Ａ／ＧＡ７３３、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）およびその抗原エピトープ（ＣＡＰ－１およびＣＡＰ－２）、ｅｔｖ６、ａｍ１１、前立腺特異抗原（ＰＳＡ）およびその抗原エピトープ（ＰＳＡ－１、ＰＳＡ－２、およびＰＳＡ－３）、前立腺特異膜抗原（ＰＳＭＡ）、Ｔ細胞受容体／ＣＤ３－ζ鎖、腫瘍抗原のＭＡＧＥファミリー（例えば、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ２、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、ＭＡＧＥ－Ａ５、ＭＡＧＥ－Ａ６、ＭＡＧＥ－Ａ７、ＭＡＧＥ－Ａ８、ＭＡＧＥ－Ａ９、ＭＡＧＥ－Ａ１０、ＭＡＧＥ－Ａ１１、ＭＡＧＥ－Ａ１２、ＭＡＧＥ－Ｘｐ２（ＭＡＧＥ－Ｂ２）、ＭＡＧＥ－Ｘｐ３（ＭＡＧＥ－Ｂ３）、ＭＡＧＥ－Ｘｐ４（ＭＡＧＥ－Ｂ４）、ＭＡＧＥ－Ｃ１、ＭＡＧＥ－Ｃ２、ＭＡＧＥ－Ｃ３、ＭＡＧＥ－Ｃ４、ＭＡＧＥ－Ｃ５）、腫瘍抗原のＧＡＧＥファミリー（例えば、ＧＡＧＥ－１、ＧＡＧＥ－２、ＧＡＧＥ－３、ＧＡＧＥ－４、ＧＡＧＥ－５、ＧＡＧＥ－６、ＧＡＧＥ－７、ＧＡＧＥ－８、ＧＡＧＥ－９）、ＢＡＧＥ、ＲＡＧＥ、ＬＡＧＥ－１、ＮＡＧ、ＧｎＴ－Ｖ、ＭＵＭ－１、ＣＤＫ４、チロシナーゼ、ｐ５３、ＭＵＣファミリー、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｐ２１ｒａｓ、ＲＣＡＳ１、α－フェトプロテイン、ε－カドヘリン、α－カテニン、β－カテニン、γ－カテニン、ｐ１２０ｃｔｎ、ｇｐ１０．ｓｕｐ．Ｐｍｅｌ１１７、ＰＲＡＭＥ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ｃｄｃ２７、腺腫様結腸ポリポーシスタンパク質（ＡＰＣ）、フォドリン、コネキシン３７、Ｉｇ－イディオタイプ、ｐ１５、ｇｐ７５、ＧＭ２およびＧＤ２ガングリオシド、ウイルス産物、例えば、ヒト乳頭腫ウイルスタンパク質、腫瘍抗原のＳｍａｄファミリー、Ｉｍｐ－１、ＰＩＡ、ＥＢＶコード核抗原（ＥＢＮＡ）－１、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、ＳＳＸ－１、ＳＳＸ－２（ＨＯＭ－ＭＥＬ－４０）、ＳＳＸ－３、ＳＳＸ－４、ＳＳＸ－５、ＳＣＰ－１、およびＣＴ－７、ならびにｃ－ｅｒｂＢ－２が挙げられる。

【０４４８】

癌または腫瘍、およびそのような腫瘍に結合する特定の（排他的ではない）腫瘍抗原には、急性リンパ芽球性白血病（ｅｔｖ６、ａｍｌ１、シクロフィリンｂ）、Ｂ細胞リンパ腫（Ｉｇ－ｉｄｉｏｔｙｐｅ）、神経膠腫（Ｅ－カドヘリン、α－カテニン、β－カテニン、γ－カテニン、ｐ１２０ｃｔｎ）、膀胱癌（ｐ２１ｒａｓ）、胆道癌（ｐ２１ｒａｓ）、乳癌（ＭＵＣファミリー、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２）、子宮頸癌腫（ｐ

５３、ｐ２１ｒａｓ）、結腸癌腫（ｐ２１ｒａｓ、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２、ＭＵＣファミリー）、結腸直腸癌（結腸直腸結合抗原（ＣＲＣ）－ＣＯ１７－１Ａ／ＧＡ７３３、ＡＰＣ）、絨毛腫（ＣＥＡ）、上皮細胞癌（シクロフィリンｂ）、胃癌（ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２、ｇａ７３３糖タンパク質）、肝細胞癌（α－フェトプロテイン）、ホジキンリンパ腫（Ｉｍｐ－１、ＥＢＮＡ－１）、肺癌（ＣＥＡ、ＭＡＧＥ－３、ＮＹ－ＥＳＯ－１）、リンパ細胞由来白血病（シクロフィリンｂ）、黒色腫（ｐ５タンパク質、ｇｐ７５、腫瘍胎児抗原、ＧＭ２およびＧＤ２ガングリオシド、Ｍｅｌａｎ－Ａ／ＭＡＲＴ－１、ｃｄｃ２７、ＭＡＧＥ－３、ｐ２１ｒａｓ、ｇｐ１００．ｓｕｐ．Ｐｍｅｌ１１７）、骨髄腫（ＭＵＣファミリー、ｐ２１ｒａｓ）、非小細胞肺癌腫（ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２）、鼻咽腔癌（Ｉｍｐ－１、ＥＢＮＡ－１）、卵巣癌（ＭＵＣファミリー、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２）、前立腺癌（前立腺特異抗原（ＰＳＡ）およびその抗原エピトープＰＳＡ－１、ＰＳＡ－２、およびＰＳＡ－３、ＰＳＭＡ、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２、ｇａ７３３糖タンパク質）、腎臓癌（ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２）、頸部および食道の扁平上皮細胞癌（ヒト乳頭腫ウイルスタンパク質等のウイルス産物）、精巣癌（ＮＹ－ＥＳＯ－１）、ならびにＴ細胞性白血病（ＨＴＬＶ－１エピトープ）が含まれる。

【０４４９】

「薬学的賦形剤」または「薬学的に許容される賦形剤」は、活性治療剤が製剤化される担体、通常、液体である。本発明の一実施形態において、活性治療剤は、本明細書に記載されるヒト化抗体、またはその１つ以上のフラグメントである。賦形剤は、一般に、製剤にいかなる薬理学的活性も提供しないが、化学的および／または生物学的安定性ならびに放出特性を提供し得る。例示的な製剤は、例えば、Ｇｒｅｎｎａｒｏ（２００５）［Ｅｄ．］Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ［２１ｓｔ Ｅｄ．］に見出され得る。

【０４５０】

薬学的組成物は、典型的には、製造および保管条件下で滅菌であり、かつ安定していなければならない。本発明は、薬学的組成物が凍結乾燥形態で存在することを企図する。この組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度に好適な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）、ならびにこれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。本発明は、薬学的組成物中への安定剤の包含をさらに企図する。

【０４５１】

本明細書に記載されるポリペプチド、複合体、および抗体は、様々な剤形の薬学的組成物に製剤化され得る。本発明の薬学的組成物を調製するために、活性成分として少なくとも１つのＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体が、薬学的製剤の当業者に周知の技法に従って適切な担体および添加物と本質的に混合され得る。Ｇｒｅｎｎａｒｏ（２００５）［Ｅｄ．］Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ［２１ｓｔ Ｅｄ．］を参照されたい。例えば、本明細書に記載される抗体は、リン酸緩衝生理食塩水（ｐＨ７．２）中で製剤化され、５．０ｍｇ／ｍＬの透明無色の液体溶液として供給され得る。

【０４５２】

同様に、液体調製物用の組成物には、水、アルコール、油、グリコール、防腐剤、香味剤、着色剤、および懸濁化剤を含むがこれらに限定されない、好適な担体および添加物を有する溶液、エマルジョン、分散液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル剤が含まれる。非経口投与用の典型的な調製物は、滅菌水、またはポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、レシチン、ラッカセイ油、またはゴマ油を含むがこれらに限定されない、非経口的に許容される油等の担体を有する活性成分を含み、溶解性または保存を支援する他の添加物も含まれ得る。溶液の場合、これは、粉末に凍結乾燥されて、その後、使用直前に再構成され得る。分散液および懸濁液の場合、適切な担体および添加物は、水性ガム

、セルロース、ケイ酸塩、または油を含む。

【０４５３】

列挙される実施形態のそれぞれにおいて、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、様々な剤形で投与され得る。当業者に既知の任意の生物学的に許容される剤形およびそれらの組み合わせが企図される。そのような剤形の例として、再構成可能な粉末、エリキシル剤、液体、溶液、懸濁液、エマルジョン、粉末、顆粒、粒子、微小粒子、分散性顆粒、カシェ剤、吸入剤、エアロゾル吸入剤、パッチ、粒子吸入剤、インプラント、デポーインプラント、注入可能物（皮下、筋肉内、静脈内、および皮内を含む）、輸液、およびこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４５４】

多くの場合、組成物中への等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムの包含が好ましい。注入可能な組成物の持続的吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを包含することによってもたらされ得る。さらに、本明細書に記載される化合物は、徐放性製剤、例えば、持続放出ポリマーを含む組成物中で製剤化され得る。ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤等の化合物の迅速な放出を防ぐ担体とともに調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸、およびポリ乳酸ポリグリコール酸コポリマー（ＰＬＧ）等の生分解性生体適合性ポリマーが用いられ得る。そのような製剤を調製するための多くの方法が当業者に既知である。

【０４５５】

補助的な活性化合物も組成物に組み込まれ得る。

【０４５６】

例えば、組成物は、所望の抗原、例えば、腫瘍抗原、または別の免疫調節化合物、例えば、Ｔｏｌｌ様受容体アゴニスト、１型インターフェロン、例えば、αおよびβインターフェロンおよびＣＤ４０アゴニスト、例えば、アゴニストＣＤ４０抗体および抗体フラグメント、好ましくは、抗ヒトＣＤ４０アゴニスト性抗体および抗体フラグメント、または他の免疫エンハンサーもしくはサプレッサー、例えば、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＣＴＬＡ４融合タンパク質、およびそれに特異的な抗体をさらに含み得る。

【０４５７】

ＶＩＳＴＡを含む組成物は、抗原または他の免疫アゴニストをさらに含み得る。この抗原は、組み合わせの他の成分と組み合わせて抗原に対する免疫応答を生成するのに有効な量で投与され得る。例えば、抗原は、約１００μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇの量で投与され得る。いくつかの実施形態において、抗原は、約１０μｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの量で投与され得る。いくつかの実施形態において、抗原は、約１ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇの量で投与され得る。しかしながら、免疫応答を生成するのに有効な量を構成する抗原の特定の量は、ある特定の要素、例えば、投与される特定の抗原、投与される特定のアゴニストおよびその量、投与される特定のアゴニストおよびその量、免疫系の状態、アゴニストおよび抗原の投与方法および順序、製剤が投与される種、ならびに所望の治療結果等にある程度依存する。したがって、有効量の抗原を構成する量を一般に記述するのは現実的ではない。しかしながら、当業者であれば、そのような要素を考慮して適切な量を容易に決定することができる。

【０４５８】

抗原は、例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞応答、ＮＫ　Ｔ細胞応答、γ／δＴ細胞応答、またはＴｈ１抗体応答のうちの１つ以上を含み得るＴｈ１免疫応答を引き起こすことができる任意の物質であり得る。好適な抗原には、ペプチド；ポリペプチド；脂質；糖脂質；多糖；炭水化物；ポリヌクレオチド；プリオン；生きているか、または不活性化された細菌、ウイルス、または真菌；および細菌、ウイルス、真菌、原虫、腫瘍由来、または生物由来抗原、毒素、またはトキソイドが含まれるが、これらに限定されない。

【０４５９】

なおもさらに、ある特定の現在のところ実験的な抗原、具体的には、強力な免疫応答を引き起こさない組み換えタンパク質、糖タンパク質、およびペプチド等の物質は、本発明のアジュバントの組み合わせとともに用いられ得る。例示的な実験的サブユニット抗原には、アデノウイルス、ＡＩＤＳ、水疱瘡、サイトメガロウイルス、デング熱、猫白血病、家禽ペスト、Ａ型肝炎、Ｂ型肝炎、ＨＳＶ－１、ＨＳＶ－２、豚コレラ、Ａ型インフルエンザ、Ｂ型インフルエンザ、日本脳炎、麻疹、パラインフルエンザ、狂犬病、呼吸器合胞体ウイルス、ロタウイルス、疣贅、および黄熱等のウイルス性疾患に関連した抗原が含まれる。

【０４６０】

この抗原は、癌抗原または腫瘍抗原であり得る。「癌抗原」および「腫瘍抗原」という用語は、互換的に使用され、癌細胞によって差次的に発現される抗原を指す。したがって、癌細胞に対する免疫応答を差次的に標的とするために癌抗原が活用され得る。それ故に、癌抗原は、腫瘍特異的免疫応答を刺激する可能性があり得る。ある特定の癌抗原が正常細胞によってコードされるが、必ずしも発現されるわけではない。これらの抗原のうちのいくつかは、正常細胞において通常サイレントである（すなわち、発現されない）抗原、ある特定の分化段階でのみ発現される抗原、および一時的に発現される抗原（例えば、胚および胎児抗原）と見なされ得る。他の癌抗原は、例えば、癌遺伝子（例えば、活性化ｒａｓ癌遺伝子）、サプレッサー遺伝子（例えば、変異体ｐ５３）、または内部欠失もしくは染色体転座に起因した融合タンパク質等の変異体細胞遺伝子によってコードされ得る。さらなる他の癌抗原は、ＲＮＡおよびＤＮＡ腫瘍ウイルスによって担持される遺伝子等のウイルス遺伝子によってコードされ得る。

【０４６１】

腫瘍抗原の例として、ＭＡＧＥ、ＭＡＲＴ－１／Ｍｅｌａｎ－Ａ、ｇｐ１００、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰＵＶ）、アデノシンデアミナーゼ結合タンパク質（ＡＤＡｂｐ）、シクロフィリンｂ、結腸直腸結合抗原（ＣＲＣ）－Ｃ０１７－１Ａ／ＧＡ７３３、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）およびその抗原エピトープ（ＣＡＰ－１およびＣＡＰ－２）、ｅｔｖ６、ａｍ１１、前立腺特異抗原（ＰＳＡ）およびその抗原エピトープ（ＰＳＡ－１、ＰＳＡ－２、およびＰＳＡ－３）、前立腺特異膜抗原（ＰＳＭＡ）、Ｔ細胞受容体／ＣＤ３－ζ鎖、腫瘍抗原のＭＡＧＥファミリー（例えば、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ２、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、ＭＡＧＥ－Ａ５、ＭＡＧＥ－Ａ６、ＭＡＧＥ－Ａ７、ＭＡＧＥ－Ａ８、ＭＡＧＥ－Ａ９、ＭＡＧＥ－Ａ１０、ＭＡＧＥ－Ａ１１、ＭＡＧＥ－Ａ１２、ＭＡＧＥ－Ｘｐ２（ＭＡＧＥ－Ｂ２）、ＭＡＧＥ－Ｘｐ３（ＭＡＧＥ－Ｂ３）、ＭＡＧＥ－Ｘｐ４（ＭＡＧＥ－Ｂ４）、ＭＡＧＥ－Ｃ１、ＭＡＧＥ－Ｃ２、ＭＡＧＥ－Ｃ３、ＭＡＧＥ－Ｃ４、ＭＡＧＥ－Ｃ５）、腫瘍抗原のＧＡＧＥファミリー（例えば、ＧＡＧＥ－１、ＧＡＧＥ－２、ＧＡＧＥ－３、ＧＡＧＥ－４、ＧＡＧＥ－５、ＧＡＧＥ－６、ＧＡＧＥ－７、ＧＡＧＥ－８、ＧＡＧＥ－９）、ＢＡＧＥ、ＲＡＧＥ、ＬＡＧＥ－１、ＮＡＧ、ＧｎＴ－Ｖ、ＭＵＭ－１、ＣＤＫ４、チロシナーゼ、ｐ５３、ＭＵＣファミリー、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｐ２１ｒａｓ、ＲＣＡＳ１、α－フェトプロテイン、ε－カドヘリン、α－カテニン、β－カテニン、γ－カテニン、ｐ１２０ｃｔｎ、ｇｐ１０．ｓｕｐ．Ｐｍｅｌ１１７、ＰＲＡＭＥ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ｃｄｃ２７、腺腫様結腸ポリポーシスタンパク質（ＡＰＣ）、フォドリン、コネキシン３７、Ｉｇ－イディオタイプ、ｐ１５、ｇｐ７５、ＧＭ２およびＧＤ２ガングリオシド、ウイルス産物、例えば、ヒト乳頭腫ウイルスタンパク質、腫瘍抗原のＳｍａｄファミリー、Ｉｍｐ－１、ＰＩＡ、ＥＢＶコード核抗原（ＥＢＮＡ）－１、脳グリコーゲンホスホリラーゼ、ＳＳＸ－１、ＳＳＸ－２（ＨＯＭ－ＭＥＬ－４０）、ＳＳＸ－３、ＳＳＸ－４、ＳＳＸ－５、ＳＣＰ－１およびＣＴ－７、ならびにｃ－ｅｒｂＢ－２が挙げられる。

【０４６２】

癌または腫瘍、およびそのような腫瘍に結合する特定の（排他的ではない）腫瘍抗原には、急性リンパ芽球性白血病（ｅｔｖ６、ａｍｌ１、シクロフィリンｂ）、Ｂ細胞リンパ腫（Ｉｇ－ｉｄｉｏｔｙｐｅ）、神経膠腫（Ｅ－カドヘリン、α－カテニン、β－カテニ

ン、γ－カテニン、ｐ１２０ｃｔｎ）、膀胱癌（ｐ２１ｒａｓ）、胆道癌（ｐ２１ｒａｓ）、乳癌（ＭＵＣファミリー、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２）、子宮頸癌腫（ｐ５３、ｐ２１ｒａｓ）、結腸癌腫（ｐ２１ｒａｓ、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２、ＭＵＣファミリー）、結腸直腸癌（結腸直腸結合抗原（ＣＲＣ）－ＣＯ１７－１Ａ／ＧＡ７３３、ＡＰＣ）、絨毛腫（ＣＥＡ）、上皮細胞癌（シクロフィリンｂ）、胃癌（ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２、ｇａ７３３糖タンパク質）、肝細胞癌（α－フェトプロテイン）、ホジキンリンパ腫（Ｉｍｐ－１、ＥＢＮＡ－１）、肺癌（ＣＥＡ、ＭＡＧＥ－３、ＮＹ－ＥＳＯ－１）、リンパ細胞由来白血病（シクロフィリンｂ）、黒色腫（ｐ５タンパク質、ｇｐ７５、腫瘍胎児抗原、ＧＭ２およびＧＤ２ガングリオシド、Ｍｅｌａｎ－Ａ／ＭＡＲＴ－１、ｃｄｃ２７、ＭＡＧＥ－３、ｐ２１ｒａｓ、ｇｐ１００．ｓｕｐ．Ｐｍｅｌ１１７）、骨髄腫（ＭＵＣファミリー、ｐ２１ｒａｓ）、非小細胞肺癌腫（ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２）、鼻咽腔癌（Ｉｍｐ－１、ＥＢＮＡ－１）、卵巣癌（ＭＵＣファミリー、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２）、前立腺癌（前立腺特異抗原（ＰＳＡ）およびその抗原エピトープＰＳＡ－１、ＰＳＡ－２、およびＰＳＡ－３、ＰＳＭＡ、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２、ｇａ７３３糖タンパク質）、腎臓癌（ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ｃ－ｅｒｂＢ－２）、頸部および食道の扁平上皮細胞癌（ヒト乳頭腫ウイルスタンパク質等のウイルス産物）、精巣癌（ＮＹ－ＥＳＯ－１）、ならびにＴ細胞性白血病（ＨＴＬＶ－１エピトープ）が含まれる。

【０４６３】

当業者であれば、例えば、本明細書の開示、ならびにＧｏｏｄｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｇｏｏｄｍａｎ＆Ｇｉｌｍａｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ［１２ｔｈ Ｅｄ．］、Ｈｏｗｌａｎｄ，ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ’ｓ Ｉｌｌｕｓｔｒａｔｅｄ Ｒｅｖｉｅｗｓ：Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ［２ｎｄ Ｅｄ．］；およびＧｏｌａｎ，（２００８）Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ：Ｔｈｅ Ｐａｔｈｏｐｈｙｓｉｏｌｏｇｉｃ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｔｈｅｒａｐｙ［２ｎｄ Ｅｄ．］における教示によって導かれる日常的な実験を用いて有効な投薬量および投与頻度を決定することができるであろう。Ｇｒｅｎｎａｒｏ（２００５）［Ｅｄ．］Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ［２１ｓｔ Ｅｄ．］も参照されたい。

【０４６４】

投与経路

本明細書に記載される組成物は、以下の経路、すなわち口腔、皮膚上、硬膜外、輸液、吸入、動脈内、頸動脈内、脳室内、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、髄腔内、くも膜下腔内、静脈内、経口、非経口、肺、かん腸または坐薬による直腸投与、皮下、真皮下、舌下、経皮、および経粘膜のうちのいずれかで投与され得る。好ましい投与経路は、静脈内注入または輸液である。投与は、局所的（組成物が、疾患、例えば、腫瘍の部位（複数可）に直接、その部位に近接して、その部位の局所に、その部位の付近に、その部位に、その部位周辺に、またはその部位の近くに投与される）であり得るか、あるいは全身的（組成物が、患者に投与され、広範囲にわたって体内を通過し、それにより疾患の部位（複数可）に到達する）であり得る。局所投与（例えば、注入）は、疾患を包含する、および／もしくは疾患を患う、細胞、組織、器官、および／もしくは器官系、ならびに／または疾患兆候および／もしくは症状が活発であるか、または生じる可能性の高い部分（例えば、腫瘍部位）への投与によって達成され得る。投与は、局所的であり局所効果をもたらし得、組成物は、その作用が所望される部分（例えば、腫瘍部位）に直接適用される。

【０４６５】

列挙される実施形態のそれぞれについて、化合物は、当該技術分野で既知の様々な剤形で投与され得る。当業者に既知の任意の生物学的に許容される剤形およびそれらの組み合わせが企図される。そのような剤形の例として、チュアブル錠剤、即溶解性錠剤、発泡錠剤、再構成可能な粉末、エリキシル剤、液体、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、多層

錠剤、二層錠剤、カプセル、軟質ゼラチンカプセル、硬質ゼラチンカプセル、カプレット、トローチ剤、チュアブルトローチ剤、ビーズ、粉末、ガム、顆粒、粒子、微小粒子、分散性顆粒、カシェ剤、潅水剤（ｄｏｕｃｈｅ）、坐薬、クリーム、局所剤、吸入剤、エアロゾル吸入剤、パッチ、粒子吸入剤、インプラント、デポーインプラント、摂取可能物、注入可能物（皮下、筋肉内、静脈内、および皮内を含む）、輸液、およびこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４６６】

混合剤に含まれ得る他の化合物は、例えば、医学的に不活性の成分（例えば、固体および液体希釈剤）、例えば、錠剤またはカプセルの場合、ラクトース、デキストローススクロース、セルロース、デンプン、またはリン酸カルシウム、軟カプセルの場合、オリーブ油またはオレイン酸エチル、および懸濁液またはエマルジョンの場合、水または植物油；滑沢剤、例えば、シリカ、滑石、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、またはステアリン酸カルシウムおよび／またはポリエチレングリコール；ゲル化剤、例えば、コロイド粘土；増粘剤、例えば、トラガカントガムまたはアルギン酸ナトリウム、結合剤、例えば、デンプン、アラビアガム、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはポリビニルピロリドン；崩壊剤、例えば、デンプン、アルギン酸、アルギン酸塩、またはグリコール酸ナトリウムデンプン；発泡混合物；染料；甘味料；湿潤剤、例えば、レシチン、ポリソルベート、またはラウリルサルフェート；および他の治療的に許容される副成分、例えば、保湿剤、防腐剤、緩衝剤、および抗酸化物質であり、これらは、そのような製剤の既知の添加物である。

【０４６７】

経口投与用の液体分散剤は、シロップ、エマルジョン、溶液、または懸濁液であり得る。シロップは、担体、例えば、スクロース、またはグリセロールおよび／もしくはマンニトールおよび／もしくはソルビトールを有するスクロースとして含有され得る。懸濁液およびエマルジョンは、担体、例えば、天然ガム、寒天、アルギン酸ナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはポリビニルアルコールを含有し得る。

【０４６８】

さらなる実施形態において、本発明は、有効量の本発明の１つ以上の抗体およびそのフラグメントを含む薬学的投薬量単位を含む１つ以上の容器を含むキットを提供する。キットは、取扱説明書、使用法、ラベル、マーケティング情報、注意事項、または情報パンフレットを含み得る。

【０４６９】

投薬量

本発明の任意の実施形態に従う治療組成物中のＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体の量は、個体の疾患状態、年齢、性別、体重、患者病歴、危険因子、疾患素因、投与経路、既存の治療レジメン（例えば、他の薬剤との可能性のある相互作用）、および体重等の要素によって異なり得る。投薬量レジメンを調整して、最適な治療応答を提供することができる。例えば、単回ボーラスが投与され得るか、いくつかに分割した用量が経時的に投与され得るか、または用量を治療状況の緊急事態によって示されるように比例的に減少または増加させてもよい。

【０４７０】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために非経口組成物を単位剤形で製剤化することが特に有利である。本明細書で使用される「単位剤形」とは、哺乳動物対象を治療するのに単位投薬量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要とされる薬学的担体に関連して所望の治療効果をもたらすように計算された所与の量の抗体およびそのフラグメントを含有する。本発明の単位剤形の仕様は、抗体およびそのフラグメントの特有の特徴、達成されるべき特定の治療効果、ならびに個体の感受性を治療するためにそのような抗体およびそのフラグメントを配合する当該技術分野に固有の制限によって決定され、それらに直接依存する。本発明の抗体およびそのフラグメントまたはその適切な薬学的組

成物が効果的である哺乳動物（例えば、ヒト）における状態の治療のための治療上の使用において、本発明の抗体およびそのフラグメントは、有効量で投与され得る。本発明に好適な投薬物は、本明細書に記載される組成物、薬学的組成物、または任意の他の組成物であり得る。

【０４７１】

投薬量は、単回用量、二回用量、三回用量、四回用量、および／または五回用量として投与され得る。投薬量は、単独で、同時に、および連続して投与され得る。

【０４７２】

剤形は、当業者に既知の任意の放出形態であり得る。本発明の組成物を製剤化して、活性成分の即時放出または活性成分の持続放出もしくは制御放出を提供することができる。持続放出または制御放出調製において、活性成分の放出は、長時間にわたって（例えば、４～２４時間）血中濃度が毒性量未満の治療域内で維持されるような速度で生じ得る。好ましい剤形は、即時放出、長時間放出、パルス放出、可変放出、制御放出、徐放性、持続放出、遅延放出、長時間作用型、およびこれらの組み合わせを含み、当該技術分野で既知である。

【０４７３】

本明細書で定義されるように、タンパク質またはポリペプチドの治療有効量（すなわち、有効投薬量）は、約０．００１～３０ｍｇ／体重ｋｇ、好ましくは約０．０１～２５ｍｇ／体重ｋｇ、より好ましくは約０．１～２０ｍｇ／体重ｋｇ、さらにより好ましくは約１～１０ｍｇ／体重ｋｇ、２～９ｍｇ／体重ｋｇ、３～８ｍｇ／体重ｋｇ、４～７ｍｇ／体重ｋｇ、または５～６ｍｇ／体重ｋｇの範囲である。当業者であれば、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の全体的な健康状態および／または年齢、ならびに存在する他の疾患を含むがこれらに限定されないある特定の要素が、対象を効果的に治療するのに必要とされる投薬量に影響を及ぼし得ることを理解する。さらに、治療有効量のタンパク質、ポリペプチド、または抗体での対象の治療は、単回治療を含み得るか、または好ましくは、一連の治療を含み得る。

【０４７４】

好ましい例において、対象は、約０．１～２０ｍｇ／体重ｋｇの範囲の抗体、タンパク質、またはポリペプチドで週１回、約１～１０週間、好ましくは２～８週間、より好ましくは約３～７週間、さらにより好ましくは約４、５、または６週間治療される。治療に用いられる抗体、タンパク質、またはポリペプチドの有効投薬量が特定の治療にわたって増加または減少し得ることも理解される。投薬量の変化は、本明細書に記載される診断アッセイの結果に起因し、かつそれから明らかになり得る。

【０４７５】

組成物の薬理学的活性を当該技術分野で既知の標準の薬理学的モデルを用いて監視することができることが理解される。なおもさらに、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体、抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む組成物を、部位特異的送達に好適なポリマーマトリックスまたは膜に組み込むか、またはカプセル封入することができ、あるいは部位特異的送達を達成することができる特異的標的剤で機能化することができることが理解される。これらの技法、ならびに他の薬物送達技法は、当該技術分野で周知である。特定の状況における最適な投薬量の決定は、当業者の能力の範囲内である。例えば、Ｇｒｅｎｎａｒｏ（２００５）［Ｅｄ．］Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ［２１ｓｔ Ｅｄ．］を参照されたい。

【０４７６】

治療方法

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を、炎症性障害、自己免疫疾患を治療し、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞増殖を抑制し、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖を抑制し、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サイトカイン産生を抑制し、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞サイトカイン産生を抑制するための方法で用いることができ、この方法は、有効量のＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を、それを必要とする対象に投与することを含む。さらに、本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複

合体を用いて、自己免疫疾患の治療、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖の抑制、ＣＤ８＋Ｔ細胞増殖の抑制、ＣＤ４＋Ｔ細胞サイトカイン産生の抑制、およびＣＤ８＋Ｔ細胞サイトカイン産生の抑制に用いるための医薬品を製造することができ、この医薬品は、有効量の本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を含む。本明細書に記載されるＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を薬学的に許容される担体と混合して、自己免疫疾患を治療し、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖を抑制し、ＣＤ８＋Ｔ細胞増殖を抑制し、ＣＤ４＋Ｔ細胞サイトカイン産生を抑制し、ＣＤ８＋Ｔ細胞サイトカイン産生を抑制するための組成物を製造することができ、この組成物は、有効量の本明細書に記載されるＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体を含む。

【０４７７】

本明細書に記載される治療方法は、ＰＤ－Ｌ３またはＶＩＳＴＡの投与を含み得、新規な構造的に異なるＩｇスーパーファミリー阻害リガンドであり、その細胞外ドメインは、Ｂ７ファミリーリガンド ＰＤ－Ｌ１との相同性を有する。この分子は、本明細書において互換的に、ＰＤ－Ｌ３もしくはＶＩＳＴＡ、またはＴ細胞活性化のＶドメイン免疫グロブリン抑制因子（ＶＩＳＴＡ）と称される。ＶＩＳＴＡは、主に造血コンパートメント内で発現し、骨髄性ＡＰＣおよびＴ細胞上では高度に制御される。ＶＩＳＴＡ阻害性経路の治療的介入は、Ｔ細胞媒介性免疫を調節して様々な癌を治療するための新規のアプローチを示す。ＶＩＳＴＡポリペプチド、複合体、核酸、リガンド、およびその調節剤は、免疫、特にＴ細胞免疫を制御して、自己免疫障害および炎症性障害を治療する際に有用であり得る。

【０４７８】

ＶＩＳＴＡ、ＶＩＳＴＡ複合体（例えば、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ）、および抗ＶＩＳＴＡ抗体を用いて、結腸直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、ならびに黒色腫、自己免疫障害、および炎症性障害を含むが、これらに限定されない癌を治療する。加えて、本発明は、具体的には、アレルギー、自己免疫障害、および炎症性状態等の免疫抑制が治療的に所望される状態を治療するための、ＶＩＳＴＡタンパク質、特に多量体ＶＩＳＴＡタンパク質およびそれを発現するウイルスベクター（例えば、アデノウイルス）の使用に関する。

【０４７９】

患者は、自己免疫疾患の症状を示し得るか、または患者は、症状を有さない。本明細書に記載される方法は、細胞、例えば、ヒト細胞上で、インビトロまたはエキソビボで用いることができる。あるいは、これらの方法を、インビボ（例えば、治療的）プロトコルの一環として対象に存在する細胞上で実施することができる。

【０４８０】

本発明は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質の不十分な産生もしくは過剰な産生、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）野生型タンパク質と比較して減少した活性もしくは異常な活性を有するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質形態の産生を特徴とする障害を有する危険性のある（またはそれにかかりやすい）対象を治療する予防的方法および治療的方法の両方を提供する。さらに、本発明の抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体を用いて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質を検出および単離し、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質の生物学的利用能を制御し、（例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその対応する受容体との相互作用を調節することによって）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を調節することができる。

【０４８１】

本発明の使用および方法

ＶＩＳＴＡ分子、例えば、ＶＩＳＴＡ核酸分子、ポリペプチド、ポリペプチド相同体、ならびに本明細書に記載される抗体および抗体フラグメントを、以下の方法、すなわちａ）スクリーニングアッセイ、ｂ）予測医学（例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、および監視臨床試験）、ならびにｃ）治療方法（例えば、治療的および予防的（例えば、免疫応答を上方または下方調節することによる））のうちの１つ以上で用いることができる。本明細書に記載されるとき、本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドは、以下の

活性、すなわち１）その天然の結合パートナー（複数可）への結合、および／またはその活性の調節、２）細胞内または細胞間シグナル伝達の調節、３）Ｔリンパ球の活性化の調節、４）生物、例えば、マウスまたはヒト等の哺乳類生物の免疫応答の調節のうちの１つ以上を有する。以下にさらに記載されるように、本発明の単離された核酸分子を用いて、例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドを発現し（例えば、遺伝子療法用途において宿主細胞中の組み換え発現ベクターにより）、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ｍＲＮＡ（例えば、生体試料中の）またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）遺伝子の遺伝子変化を検出し、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を調節することができる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドを用いて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの不十分な産生もしくは過剰な産生、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）阻害剤の産生を特徴とする状態または障害を治療することができる。加えて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドを用いて、天然のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）結合パートナー（複数可）をスクリーニングし、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を調節する薬物または化合物をスクリーニングし、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの不十分な産生もしくは過剰な産生、あるいはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）野生型ポリペプチドと比較して減少した、異常な、または望ましくない活性を有するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド形態の産生を特徴とする状態または障害（例えば、重症複合免疫不全、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、Ｉ型真性糖尿病、リンパ球増殖性症候群、炎症性腸疾患、アレルギー、喘息、移植片対宿主疾患、および移植片拒絶反応等の免疫系障害；細菌およびウイルス等の感染病原体への免疫応答；ならびにリンパ腫および白血病等の免疫系癌）を治療することができる。さらに、本発明の抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体を用いて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドを検出および単離し、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの生物学的利用能を制御し、（例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用を調節することによって）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を調節することができる。

【０４８２】

治療薬として用いる抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体は、可溶性ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質（例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）Ｉｇ融合タンパク質）の存在下において、抗ＶＩＳＴＡ抗体がＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）関連免疫機能への抑制効果を高めるという事実に基づいて選択され得る。これらの抗ＶＩＳＴＡ抗体が、インビボでは、免疫に対するそれらのインビトロ効果からの予想に反して挙動する（すなわち、これらの抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体が免疫抑制性である）ため、これは、極めて予想外のことである。

【０４８３】

本発明の重要な態様は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現もしくは活性、またはその天然の結合パートナーとの相互作用を調節する方法に関し、治療に関連して、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）が、ＣＤ２８共刺激を阻害し、免疫細胞のＴＣＲ活性化を阻害し、活性化免疫細胞（ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞）の増殖を阻害し、Ｔ細胞（ＩＬ－２、γインターフェロン）によってサイトカイン産生を阻害し、阻害性シグナルを免疫細胞に伝送することを実証している。したがって、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の活性および／または発現、ならびにＴ細胞上でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその結合パートナーとの間の相互作用を調節して、免疫応答を調節することができる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）が阻害性受容体（Ｔ細胞上）に結合するため、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の上方制御が免疫応答の下方制御をもたらすはずであり、その一方で、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の下方制御が免疫応答の上方制御をもたらすはずである。ある実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）は、阻害性受容体に結合する。前述のように、直観に反して、インビトロでは（ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇの存在下において）ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇ融合タンパク質の抑制活性を高める（すなわち、これらの抗体が、サイトカイン産生、Ｔ細胞増殖、分化、または活性化、および前述の他の機能へのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の効果等のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）関連活性の抑制を高める）、本出願者によって産生されたＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）特異的抗体は、インビボでは予想に反して挙動する（すなわ

ち、これらの抗体がインビボでは免疫抑制性であることが見出された）。

【０４８４】

本発明の調節方法は、細胞と、その細胞に関連したＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド活性の活性のうちの１つ以上を調節するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたは薬剤、例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の発現もしくは活性を調節する、および／またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）とその天然の結合パートナー（複数可）との相互作用を調節する薬剤とを接触させることを含む。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド活性を調節する薬剤は、核酸もしくはポリペプチド、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの天然の結合パートナー、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アゴニストもしくはアンタゴニスト、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アゴニストもしくはアンタゴニストのペプチド模倣体、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ペプチド模倣体、または他の小分子等の本明細書に記載される薬剤であり得る。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の可溶性形態を用いて、その天然の結合パートナー（複数可）またはリガンドのうちのいずれかへのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の結合を妨害することもできる。

【０４８５】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の発現を調節する薬剤は、例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドを発現するためのアンチセンス核酸分子、三重オリゴヌクレオチド、リボザイム、または組み換えベクターであり得る。例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド翻訳開始部位周辺の領域に相補的なオリゴヌクレオチドが合成され得る。１つ以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、典型的には２００μｇ／ｍＬで細胞培地に添加することができるか、または患者に投与してＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの合成を防止することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞によって取り込まれ、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ｍＲＮＡにハイブリダイズして翻訳を防止する。あるいは、二重鎖ＤＮＡに結合して三重鎖構築物を形成してＤＮＡ巻き戻しおよび転写を防止するオリゴヌクレオチドを用いることができる。これらいずれかの結果として、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの合成が遮断される。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現が調節されるとき、好ましくは、そのような調節は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）遺伝子のノックアウト以外の手段によって生じる。

【０４８６】

発現を調節する薬剤が細胞中のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の量を制御するといった事実に基づいて、この薬剤は、細胞におけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性の総量も調節する。一実施形態において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を調節する薬剤は、１つ以上のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を刺激する。そのような刺激剤の例として、細胞に導入されたＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）をコードする活性ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドおよび核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、１つ以上のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を阻害する。そのような阻害剤の例として、アンチセンスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）核酸分子、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）阻害剤、および本主題のスクリーニングアッセイで特定される化合物が挙げられる。さらなる実施形態において、阻害剤は、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体と抗ＰＤ－Ｌ１または抗ＰＤ－Ｌ２抗体の組み合わせである。これらの調節方法を、インビトロで（例えば、細胞をこの薬剤と接触させることによって）実施することができるか、または代替として、ある薬剤をインビボで細胞と接触させることによって（例えば、この薬剤を対象に投与することによって）実施することができる。したがって、本発明は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの上方または下方調節により利益を得る状態または障害、例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたは核酸分子の望ましくない、不十分な、または異常な発現もしくは活性を特徴とする障害に罹患している個体を治療する方法を提供する。一実施形態において、この方法は、薬剤（例えば、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイによって特定される薬剤）、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現もしくは活性を調節する（例えば、上方制御もしくは下方制御する）薬剤の組み合わせを投与することを含む。別の実施形態において、この方法は、低減した、異常な、または望ましくないＶＩ

ＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現または活性を補う治療薬としてＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたは核酸分子を投与することを含む。

【０４８７】

本発明は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現または少なくとも１つのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）活性を調節するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドまたは薬剤を対象に投与することによって、異常なまたは望ましくないＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現または活性に関連した対象にける疾患または状態を予防するための方法を提供する。異常なまたは望ましくないＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現または活性によって引き起こされるか、またはそれに寄与する疾患または障害を有する危険性のある対象を、例えば、本明細書に記載される診断または予後アッセイのうちのいずれかまたはその組み合わせによって特定することができる。予防薬の投与は、疾患または障害が予防されるか、またはあるいは、その進行を遅延させるように、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）異常を特徴とする症状が出現する前に生じ得る。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）異常の種類に応じて、例えば、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチド、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アゴニスト、またはＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）アンタゴニスト（例えば、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体）剤を用いて対象を治療することができる。適切な薬剤は、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

【０４８８】

ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、追加の化学療法剤、細胞毒性剤、抗体（例えば、抗ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、またはＣＴＬＡ－４抗体）、リンフォカイン、または造血成長因子と混合され得る。ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を、別の抗体、リンフォカイン、細胞毒性剤（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、もしくはタンパク質合成を阻害する部分、放射性核種、またはリボソーム阻害タンパク質、例えば、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{188}Ｒｅ、^{90}Ｙ、ビンデシン、メトトレキサート、アドリアマイシン、シスプラチン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、緑膿菌外毒素Ａ、リシン、ジフテリア毒素、リシンＡ鎖、または細胞毒性ホスホリパーゼ酵素）、免疫抑制剤（例えば、シクロスポリン、レフルノミド、メトトレキサート、アゾチプリン、メルカプトプリン、ダクチノマイシン、タクロリムス、もしくはシロリムス）、または造血成長因子と組み合わせて投与することもできる。ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、化学発光標識、常磁性標識（例えば、アルミニウム、マンガン、白金、酸素、ランタン、ルテチウム、スカンジウム、イットリウム、もしくはガリウム）、ＭＲＩ造影剤、蛍光性標識、生物発光標識、または放射性標識で標識され得る。本明細書に記載される方法において、第２の薬剤は、抗体と同時に、または連続して投与され得る。例えば、第２の薬剤は、免疫応答を下方制御する薬剤（例えば、それに特異的なＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、またはＣＴＬＡ－４融合タンパク質または抗体）であり得る。

【０４８９】

一実施形態において、自己免疫疾患を有する対象を治療する方法は、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を、二次療法を受け得る対象に投与することを含む。二次療法の例として、化学療法、放射線療法、免疫療法、光線療法、凍結療法、毒素療法、ホルモン療法、または手術が挙げられる。したがって、本発明は、標準の抗癌療法と併せた方法および組成物の使用を企図する。治療される患者は、任意の年齢であり得る。当業者であれば、ＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体と併せて用いられ得る他の抗癌療法の存在および開発を認識するであろう。

【０４９０】

用量の決定は、当業者のレベルの範囲内である。ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、短期治療のために１週間以下、多くの場合、１～３日間の期間にわたって投与され得るか、または長期治療において数ヶ月または数年にわたって用いられ得る。一般に、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体の治療有効量は、自己免疫疾患において臨床的に有意な変化をもたらすのに十分な量である。

【０４９１】

阻害性受容体によって形質導入されるとき、共刺激性受容体（例えば、ＣＤ２８またはＩＣＯＳ）が免疫細胞上に存在せず、それ故に、単に共刺激性分子の結合に関する阻害性受容体および共刺激性受容体との間の競合の機能ではない場合でさえも、阻害性シグナルが生じ得る（Ｆａｌｌａｒｉｎｏ，ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８８：２０５）。阻害性シグナルの免疫細胞への伝送は、免疫細胞に無応答性、アネルギー、またはプログラム細胞死をもたらし得る。好ましくは、阻害性シグナルの伝送は、アポトーシスを含まない機序によって動作する。

【０４９２】

自己免疫疾患

ＶＩＳＴＡポリペプチド、多量体ＶＩＳＴＡポリペプチド、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質（例えば、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ）、および本明細書に記載される抗ＶＩＳＴＡ抗体は、自己免疫疾患を治療するための組成物、使用、および方法において用いられ得る。

【０４９３】

Ｔ細胞活性化のＶドメイン免疫グロブリン含有抑制因子（Ｖ－ｄｏｍａｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ　Ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ　ｏｆ　Ｔ　ｃｅｌｌ　Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ）（ＶＩＳＴＡ）は、免疫系に顕著な影響を与える免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーに関連したファミリーのメンバーである。Ｉｇスーパーファミリーは、Ｂ７ファミリーリガンドおよび受容体といった多くの重要な免疫制御因子からなる。最もよく特徴付けられている共刺激性リガンドは、Ｂ７．１およびＢ７．２であり、これらは、Ｉｇスーパーファミリーに属し、プロフェッショナルＡＰＣ上に発現し、それらの受容体は、ＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４である。

【０４９４】

Ｂ７ファミリーリガンドは、共刺激性Ｂ７－Ｈ２（ＩＣＯＳリガンド）およびＢ７－Ｈ３、ならびに共阻害性Ｂ７－Ｈ１（ＰＤ－Ｌ１）、Ｂ７－ＤＣ（ＰＤ－Ｌ２）、Ｂ７－Ｈ４（Ｂ７Ｓ１もしくはＢ７ｘ）、およびＢ７－Ｈ６を含むまでに拡張している。Ｂｒａｎｄｔ，ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　２０６，１４９５－１５０３、Ｇｒｅｅｎｗａｌｄ，ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　２３：５１５－５４８。したがって、さらなるＣＤ２８ファミリー受容体が特定されている。ＩＣＯＳは、活性化Ｔ細胞上に発現し、Ｂ７－Ｈ２に結合する。ＩＣＯＳは、Ｔ細胞の活性化、分化、および機能に重要な、正の共制御因子である。Ｄｏｎｇ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　４０９，９７－１０１。一方で、プログラム細胞死（ｐｒｏｇｒａｍｍｅｄ　ｄｅａｔｈ）１（ＰＤ－１）は、Ｔ細胞応答を負に制御する。ＰＤ－１$^{-/-}$マウスは、ループス様自己免疫疾患または自己免疫拡張型心筋症を発症する。Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２９１：３１９－３２２。最近、ＣＤ８０が、Ｔ細胞に阻害性シグナルを伝達するＰＤ－Ｌ１の第２の受容体として特定された。Ｂｕｔｔｅ，ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　２７，１１１－１２２。２つの阻害性Ｂ７ファミリーリガンドＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２は、異なる発現パターンを有する。ＰＤ－Ｌ２は、ＤＣおよびマクロファージ上に誘導可能に発現され、一方でＰＤ－Ｌ１は、造血細胞と非造血細胞型の両方で広範に発現される。ＰＤ－１受容体の免疫抑制的な役割に一致して、ＰＤ－Ｌ１$^{-/-}$およびＰＤ－Ｌ２$^{-/-}$マウスを用いた研究は、両方のリガンドが、Ｔ細胞増殖およびサイトカイン産生の阻害において重複する役割を有することを示している。現時点で、ＶＩＳＴＡは、選択的に発現される造血細胞であるとみられ、これにより、分布しているＰＤ－Ｌ１と区別され、これは自己免疫疾患の発症の負の制御において重要な役割を果たす可能性が高い。

【０４９５】

新規な構造的に異なるＩｇ－スーパーファミリー阻害性リガンドであり、その細胞外ドメインは、Ｂ７ファミリーリガンドＰＤ－Ｌ１に対して最も高い相同性を有する。その系統発生学的に最も近い類縁体は、ＰＤ－Ｌ１であるが、その低レベルの類似性（２０％）のため、ＰＤ－Ｌ名を指定されていない。これは、可能性のあるタンパク質キナーゼＣ結合部位を除いて明らかなシグナル伝達モチーフを有さない９３アミノ酸の細胞質ドメイン

を有する。図４を参照されたい。ＶＩＳＴＡは、負の制御性リガンドであり、これは、以下の事実に基づいている：

【０４９６】

可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質は、インビトロＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖およびサイトカイン産生を抑制する。抑制は、ＰＤ－１$^{-}$／$^{-}$Ｔ細胞で観察され、ＰＤ－１がＶＩＳＴＡ受容体ではないことを示す。

【０４９７】

ＡＰＣでのＶＩＳＴＡの過剰発現は、インビトロＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖を抑制する。

【０４９８】

腫瘍細胞でのＶＩＳＴＡ過剰発現は、腫瘍ワクチン宿主における防御的抗腫瘍免疫を低下させた。

【０４９９】

ＶＩＳＴＡ$^{-}$／$^{-}$マウスは、炎症性表現型を発症し、ＶＩＳＴＡが免疫抑制機能を有することを確証する。ＶＩＳＴＡ$^{-}$／$^{-}$ＤＣは、野生型ＤＣよりもＴ細胞増殖を刺激する。

【０５００】

抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体（１３Ｆ３）は、インビトロでＶＩＳＴＡ$^{+}$ＡＰＣによってＴ細胞応答のＶＩＳＴＡ誘導性抑制を遮断し、Ｔ細胞活性化を高めた。

【０５０１】

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

【０５０２】

抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体は、複数の（６匹の）マウス腫瘍モデルにおいて腫瘍寛解を誘導し、これらのモデルにおける骨髄由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）でのＶＩＳＴＡ発現は、非常に高く、ＶＩＳＴＡ$^{+}$ＭＤＳＣが腫瘍特異的免疫を抑制することを示唆する。

【０５０３】

癌の治療

ＶＩＳＴＡポリペプチド、多量体ＶＩＳＴＡポリペプチド、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質（例えば、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ）、配列番号３８～６７の核酸配列のうちのいずれか１つからなるｓｉＲＮＡ分子、および本明細書に記載される抗ＶＩＳＴＡ抗体を、癌（例えば、腫瘍）を治療するための組成物、使用、および方法において用いることができる。

【０５０４】

癌の例としては、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。そのような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）または胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）（消化管癌を含む）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（ｋｉｄｎｅｙ　ｃａｎｃｅｒ）または腎臓癌（ｒｅｎａｌ　ｃａｎｃｅｒ）、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、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、高悪性度免疫芽細胞性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非開裂細胞性ＮＨＬ、巨大病変性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、および、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、有毛細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、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。

【０５０５】

「本発明による治療に適した癌」という用語には、結腸直腸癌、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疾患が挙げられるが、これらに限定されない。そのような癌のより具体的な例としては、結腸直腸癌、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）または胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）（消化管癌を含む）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（ｋｉｄｎｅｙ　ｃａｎｃｅｒ）または腎臓癌（ｒｅｎａｌ　ｃａｎｃｅｒ）、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、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、高悪性度免疫芽細胞性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非開裂細胞性ＮＨＬ、巨大病変性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、および、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、有毛細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、多発性骨髄腫、および移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ）、ならびに母斑症と関連する異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍と関連するもの等）、およびメイグス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、カポジ肉腫、カルチノイド癌腫、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、および多発性骨髄腫からなる群から選択される。癌は、初期進行性（転移性を含む）結腸直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、または黒色腫であり得る。癌は、結腸直腸癌であり得る。本発明の治療に適した癌性状態には、転移性癌が含まれ、骨髄系由来サプレッサー細胞によるＶＩＳＴＡ発現が、抗腫瘍応答および抗浸潤免疫応答を抑制する。本発明の方法は、血管新生腫瘍の治療に特に好適である。

【０５０６】

本発明は、化学療法もしくは放射線療法または他の生物製剤と組み合わせた癌の治療、およびその活性の強化、すなわち、個体におけるその活性の強化にも好適であり、骨髄由来サプレッサー細胞によるＶＩＳＴＡ発現が、抗腫瘍応答および化学療法もしくは放射線療法の有効性または生物学的有効性を抑制する。抗癌活性を呈する任意の化学療法剤を、本発明に従って使用することができる。好ましくは、化学療法剤は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体、および関連阻害剤、ビンカアルカロイド、エピポドピロトキシン、抗生物質、Ｌ－アスパラギナーゼ、トポイソメラーゼ阻害剤、インターフェロン、白金配位錯体、アントラセンジオン置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制物質、副腎皮質ステロイド、プロゲスチン、エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン、およびゴナドトロピン放出ホルモン類似体からなる群から選択され得る。より好ましくは、化学療法剤は、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、ロイコボリン（ＬＶ）、イレノテカン、オキサリプラチン、カペシタビン、パクリタキセル、およびドセタキセルからなる群から選択され得る。２つ以上の化学療法剤を、抗ＶＥＧＦ抗体の投与と組み合わせて投与される混合液中に使用することができる。１つの好ましい組み合わせ化学療法は、５－ＦＵと１つ以上の他の化学療法剤（複数可）とを含む、フルオロウラシルに基づくものである。組み合わせ化学療法の好適な投薬レジメンは、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｓａｌｔｚ，ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｐｒｏｃ　ＡＳＣＯ　１８：２３３ａおよびＤｏｕｉｌｌａｒｄ，ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｌａｎｃｅｔ　３５５：１０４１－７に記載されている。生物製剤は、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＣＴＬＡ－４、およびＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＣＴＬＡ－４融合タンパク質に対する抗体、ならびにサイトカイン、成長因子アンタゴニストおよびアゴニスト、ホルモン、ならびに抗サイトカイン抗体等の別の免疫増強物質であり得る。

【０５０７】

移植片対宿主疾患

ＶＩＳＴＡポリペプチド、多量体ＶＩＳＴＡポリペプチド、ＶＩＳＴＡ融合タンパク質（例えば、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ）、配列番号３８～６７の核酸配列のうちのいずれか１つか

らなるｓｉＲＮＡ分子、および本明細書に記載される抗ＶＩＳＴＡ抗体を、移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）を治療するための組成物、使用、および方法において用いることができる。

【０５０８】

本発明は、移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）を治療する方法も提供し、この方法は、有効量のＶＩＳＴＡ融合タンパク質、任意にＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、または多量体ＶＩＳＴＡタンパク質の投与を含む。移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）、急性移植片対宿主疾患、慢性移植片対宿主疾患、幹細胞移植に関連した急性移植片対宿主疾患、幹細胞移植に関連した慢性移植片対宿主疾患、骨髄移植に関連した急性移植片対宿主疾患、同種造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）に関連した急性移植片対宿主疾患、または骨髄移植に関連した慢性移植片対宿主疾患を治療するための方法は、有効量のＶＩＳＴＡ融合タンパク質、任意にＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、または多量体ＶＩＳＴＡタンパク質の投与を含み得る。

【０５０９】

移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）は、移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）、急性移植片対宿主疾患、慢性移植片対宿主疾患、幹細胞移植に関連した急性移植片対宿主疾患、幹細胞移植に関連した慢性移植片対宿主疾患、骨髄移植に関連した急性移植片対宿主疾患、同種造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）に関連した急性移植片対宿主疾患、または骨髄移植に関連した慢性移植片対宿主疾患であり得る。治療されるために治療される患者は、移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）の少なくとも１つの症状を有し得、任意に、患者は、急性ＧＶＨＤを呈し、腹痛、腹部痙攣、下痢、発熱、黄疸、皮膚発疹、嘔吐、および体重減少を含むが、これらに限定されない。患者は、ドライアイ、口内乾燥、脱毛、肝炎、肺障害、消化管障害、皮膚発疹、および皮膚肥厚を含むが、これらに限定されない慢性移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）の少なくとも１つの症状を有し得る。患者は、同種幹細胞または骨髄移植を受けたか、または受ける予定であり得る。患者は、自己幹細胞または骨髄移植を受けたか、または受ける予定であり得る。

【０５１０】

診断方法

ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体、配列番号３８～６７の核酸配列のうちのいずれか１つからなるｓｉＲＮＡ分子、およびその抗原結合フラグメントに選択的に結合する抗ＶＩＳＴＡおよび抗ＶＩＳＴＡ複合体抗体を、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体の存在または不在を検出するための診断方法において用いることができる。抗ＶＩＳＴＡおよび抗ＶＩＳＴＡ複合体抗体を、（ａ）試験試料をＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体に結合する抗体またはそのフラグメントと接触させることと、（ｂ）抗体－エピトープ複合体についてアッセイすることとを含む方法において用いることができる。抗体－エピトープ複合体は、ウエスタンブロット法、放射性免疫測定法、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着法）、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫組織化学的アッセイ、蛍光免疫測定法、およびタンパク質Ａ免疫測定法によって検出され得る。試料は、組織生検、リンパ液、尿、脳脊髄液、羊水、炎症性滲出液、血液、血清、大便、または結腸直腸管から収集された液体である試料であり得る。

【０５１１】

ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体は、組み換え体であり得る。ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体のフラグメントは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ＣＤＲ、パラトープ、または抗原に結合することができる抗体の一部であり得る。ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体は、キメラ、ヒト化、抗イディオタイプ、一本鎖、二機能性、または共特異的であり得る。ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体は、またはフラグメントは、化学発光標識、常磁性標識（例えば、アルミニウム、マンガン、白金、酸素、ランタン、ルテチウム、スカンジウム、イットリウム、もしくはガリウム）、ＭＲＩ造影剤、蛍光性標識、生物発

光標識、または放射性標識を含むが、これらに限定されない標識に複合体化され得る。

【０５１２】

さらに、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体、およびその抗原結合フラグメントは、アレイ等の固体支持体（例えば、ビーズ、試験管、シート、培養皿、または試験紙）に結合され得る。

【０５１３】

本方法は、陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）、ＣＣＤ高感度モニタリングシステム、Ｘ線、ＣＴスキャン、シンチグラフィー、光音響映像、単光子放出コンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）、磁気共鳴映像法（ＭＲＩ）、超音波、常磁性映像法、および内視鏡的光コヒーレンス断層撮影によるＶＩＳＴＡポリペプチドまたはＶＩＳＴＡ複合体の造影を含み得る。

【０５１４】

スクリーニングアッセイ

本発明は、調節剤、すなわち、ＶＩＳＴＡポリペプチドに結合するか、例えばＶＩＳＴＡ発現もしくはＶＩＳＴＡ活性に刺激性もしくは阻害性効果を有するか、またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用に刺激性もしくは阻害性効果を有する、候補または試験化合物または試験薬（例えば、ペプチド、ペプチド模倣体、小分子、または他の薬物）を特定するための方法（「スクリーニングアッセイ」）を提供する。

【０５１５】

ＶＩＳＴＡポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分に結合する（例えば、その天然の結合パートナー（複数可）と相互作用するＶＩＳＴＡポリペプチドの能力を調節する）候補または試験化合物をスクリーニングためのアッセイは、候補化合物をＶＩＳＴＡポリペプチドと接触させることと、その天然の結合パートナーと相互作用するＶＩＳＴＡポリペプチドの能力の調節について試験することとを含み得る。ＶＩＳＴＡタンパク質またはポリペプチドもしくはその生物学的に活性な部分に結合するか、あるいはその活性を調節する候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイは、ＶＩＳＴＡポリペプチドを接触させること、およびＶＩＳＴＡポリペプチドと候補薬との間の結合について試験することを含み得る。ＶＩＳＴＡによって負に制御される免疫機能に刺激性または阻害性効果のある候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイは、本明細書において特定されるか、またはＶＩＳＴＡとその天然の結合パートナー（複数可）との間の相互作用に対するその効果に基づいて特定される。これらのＶＩＳＴＡ関連機能は、一例として、サイトカイン産生の阻害（例えば、Ｉｌ－２、Ｔ細胞によるγインターフェロン、中程度のＣＤ２８共刺激の抑制、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞増殖の阻害、ナイーブおよびメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖の抑制、ならびにアポトーシスの誘導なしでのＴＣＲ活性化の抑制）を含む。本発明の試験化合物を、生物学的ライブラリー、空間的にアドレス可能な並列固相または溶液相ライブラリー、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法、「１ビーズ１化合物」ライブラリー法、および親和性クロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリー法を含む当該技術分野で既知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチのうちのいずれかを用いて得ることができる。生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、他の４つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに適用される。Ｌａｍ（１９９７）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．１２：１４５．

【０５１６】

アッセイは、細胞がＶＩＳＴＡポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分を発現する細胞ベースのアッセイであり得、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させること、およびＶＩＳＴＡ活性を調節する試験化合物の能力を判定することを含む。ＶＩＳＴＡ活性を調節する試験化合物の能力を判定することは、例えば、その天然の結合パートナー（複数可）に結合し、免疫細胞活性を調節するＶＩＳＴＡの能力を監視することによって達成され得る。免疫細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、または

骨髄性細胞であり得る。ＶＩＳＴＡとその対応する受容体との結合を調節する試験化合物の能力を判定することは、例えば、ＶＩＳＴＡを放射性同位体または酵素標識とカップリングさせ、ＶＩＳＴＡとＶＩＳＴＡの対応する受容体を発現するＴ細胞との結合を調節する試験化合物の能力を監視することによって達成され得る。ＶＩＳＴＡに結合する試験化合物の能力を判定することは、例えば、化合物とＶＩＳＴＡとの結合が、複合体において標識ＶＩＳＴＡ化合物を検出することによって判定され得るように、化合物と放射性同位体または酵素標識とをカップリングさせることによって達成され得る。

【０５１７】

アッセイを用いて、相互作用物のうちのいずれも標識することなくＶＩＳＴＡと相互作用する化合物の能力を判定することができる。例えば、マイクロフィジオメータを用いて、化合物もＶＩＳＴＡもいずれも標識することなく化合物とＶＩＳＴＡとの相互作用を検出することができる。ＭｃＣｏｎｎｅｌｌ，Ｈ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５７：１９０６－１９１２。マイクロフィジオメータ（例えば、Ｃｙｔｏｓｅｎｓｏｒ）は、細胞が光アドレス可能な電位差測定センサ（ＬＡＰＳ）を用いてその環境を酸性化する速度を測定する分析器具である。この酸性化速度の変化を化合物とＶＩＳＴＡとの間の相互作用の指標として用いることができる。

【０５１８】

アッセイは、細胞に基づくアッセイであり得、ＶＩＳＴＡ結合パートナーを発現するＴ細胞を試験化合物と接触させること、およびＶＩＳＴＡ結合パートナーの活性を調節する（例えば、刺激または阻害する）試験化合物の能力を判定することを含む。ＶＩＳＴＡ結合パートナーの活性を調節する試験化合物の能力を判定することは、例えば、ＶＩＳＴＡ結合パートナーに結合するか、またはそれと相互作用するＶＩＳＴＡポリペプチドの能力を判定することによって達成され得る。

【０５１９】

ＶＩＳＴＡ結合パートナーに結合するか、またはそれと相互作用するＶＩＳＴＡポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメントの能力を判定することは、直接結合を判定するための上述の方法のうちの１つによって達成され得る。ある実施形態において、ＶＩＳＴＡ結合パートナーに結合するか、またはそれと相互作用するＶＩＳＴＡポリペプチドの能力を判定することは、結合パートナーの活性を判定することによって達成され得る。例えば、結合パートナーの活性は、細胞二次メッセンジャー（例えば、チロシンキナーゼまたはホスファターゼ活性）の誘導を検出するか、適切な基質の触媒／酵素活性を検出するか、レポーター遺伝子（検出可能なマーカーをコードする核酸に動作可能に連結される標的応答性制御要素、例えば、ルシフェラーゼを含む）の誘導を検出するか、または標的制御細胞応答を検出することによって判定され得る。例えば、天然のＶＩＳＴＡ結合パートナーに結合するか、またはそれと相互作用するＶＩＳＴＡポリペプチドの能力を判定することは、増殖アッセイにおいて免疫細胞共刺激または阻害を調節する化合物の能力を測定するか、またはＶＩＳＴＡポリペプチドの一部を認識する抗体に結合するＶＩＳＴＡポリペプチドの能力を妨害することによって達成され得る。一実施形態において、Ｔ細胞活性化を調節する化合物は、Ｔ細胞増殖またはサイトカイン産生を調節する化合物の能力を判定することによって特定され得る。ある実施形態において、Ｔ細胞活性化を調節する化合物は、２つ以上の抗原濃度でＴ細胞増殖またはサイトカイン産生を調節する化合物の能力を判定することによって特定され得る。

【０５２０】

アッセイは、細胞を含まないアッセイであり得、このアッセイにおいて、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分が試験化合物と接触し、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分に結合する試験化合物の能力が判定される。本発明のアッセイで用いられるＶＩＳＴＡポリペプチドの好ましい生物学的に活性な部分は、非ＶＩＳＴＡ分子、例えば、ＶＩＳＴＡ結合パートナーに結合する細胞外ドメインの少なくとも一部分との相互作用に関与するフラグメントを含む。試験化合物のＶＩＳＴＡポリペプチドへの結合は、上述のように直接的または間接的に判定され得る。

【０５２１】
アッセイは、細胞を含まないアッセイであり得、このアッセイにおいて、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分が試験化合物と接触し、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する（例えば、刺激または阻害する）試験化合物の能力が判定される。ＶＩＳＴＡポリペプチドの活性を調節する試験化合物の能力を判定することは、例えば、直接結合を決定するための上述の方法のうちの１つを用いてＶＩＳＴＡ結合パートナーに結合するＶＩＳＴＡポリペプチドの能力を判定することによって達成され得る。本発明の細胞を含まないアッセイは、ポリペプチド（例えば、ＶＩＳＴＡポリペプチドもしくはその生物学的に活性な部分、またはＶＩＳＴＡが結合する結合パートナー）の可溶性および／または膜結合形態の両方の使用に適している。ポリペプチドの膜結合形態（例えば、細胞表面ＶＩＳＴＡ）が用いられる細胞を含まないアッセイの場合、ポリペプチドの膜結合形態が溶液中で維持されるように可溶化剤を利用することが望ましくあり得る。そのような可溶化剤の例として、非イオン性界面活性剤、例えば、ｎ－オクチルグルコシド、ｎ－ドデシルグルコシド、ｎ－ドデシルマルトシド、オクタノイル－Ｎ－メチルグルカミド、デカノイル－Ｎ－メチルグルカミド、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１１４、Ｔｈｅｓｉｔ、イソトリデシポリ（エチレングリコールエーテル）ｎ、３－［（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンミニオ］－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）、３－［（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンミニオ］－２－ヒドロキシ－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳＯ）、またはＮ－ドデシル．ｄｂｄ．Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アンモニオ－１－プロパンスルホネートが挙げられる。

【０５２２】
アッセイ方法において、ＶＩＳＴＡまたはその結合パートナーのいずれかを固定して、ポリペプチドのうちの一方または両方の複合形態と非複合形態の分離を促進すること、ならびにアッセイの自動化を提供することが望ましくあり得る。候補化合物の存在下および不在下での試験化合物のＶＩＳＴＡポリペプチドへの結合またはＶＩＳＴＡポリペプチドのその結合パートナーとの相互作用は、反応物質の含有に好適な任意の容器内で達成され得る。そのような容器の例として、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。一実施形態において、ポリペプチドのうちの一方または両方がマトリックスに結合されることを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が提供され得る。例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／ＶＩＳＴＡ融合タンパク質またはグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ／結合パートナー融合タンパク質は、グルタチオンＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）ビーズ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着され得、その後、これは、試験化合物または試験化合物および非吸着結合パートナーポリペプチドもしくはＶＩＳＴＡポリペプチドのいずれかと混合され、この混合物は、複合体形成につながる条件下（例えば、塩およびｐＨに関する生理学的条件）でインキュベートされる。インキュベーション後、このビーズまたはマイクロタイタープレートウェルは、洗浄されてあらゆる結合されていない成分を除去し、マトリックスは、ビーズの場合、固定され、複合体形成は、例えば、上述のように、直接的または間接的にのいずれかで判定される。あるいは、複合体は、マトリックスから解離され得、ＶＩＳＴＡ結合または活性のレベルは、標準の技法を用いて判定される。マトリックス上でポリペプチドを固定するための他の技法も本発明のスクリーニングアッセイにおいて用いることができる。ＶＩＳＴＡポリペプチドの活性を調節する試験化合物の能力を判定することは、ＶＩＳＴＡの下流として機能する分子の活性を調節する試験化合物の能力を判定することによって、例えば、ＶＩＳＴＡ結合パートナーの細胞質ドメインと相互作用することによって達成され得る。例えば、二次メッセンジャーのレベル、適切な標的上での相互作用分子の活性、または相互作用物の適切な標的への結合は、前述のように判定され得る。

【０５２３】
ＶＩＳＴＡ発現の調節剤は、細胞が候補化合物と接触し、その細胞におけるＶＩＳＴＡ

ｍＲＮＡまたはポリペプチドの発現が判定される方法において特定され得る。候補化合物の存在下でのＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡまたはポリペプチドの発現レベルを、候補化合物の不在下でのＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡまたはポリペプチの発現レベルと比較する。その後、この候補化合物は、変化が統計的に有意である場合、この比較に基づいてＶＩＳＴＡ発現の調節剤として特定され得る。

【０５２４】

ＶＩＳＴＡポリペプチドを、２ハイブリッドアッセイまたは３ハイブリッドアッセイ（例えば、米国特許第５，２８３，３１７号、Ｚｅｒｖｏｓ，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｃｅｌｌ　７２：２２３－２３２、Ｍａｄｕｒａ，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１２０４６－１２０５４、Ｂａｒｔｅｌ，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１４：９２０－９２４、Ｉｗａｂｕｃｈｉ，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　８：１６９３－１６９６、および国際公開第ＷＯ９４／１０３００号を参照されたい）において「おとりタンパク質」として用いて、ＶＩＳＴＡ（「ＶＩＳＴＡ結合タンパク質」、「ＶＩＳＴＡ結合パートナー」、または「ＶＩＳＴＡ－ｂｐ」）に結合するか、またはそれと相互作用する、ＶＩＳＴＡ活性に関与する他のポリペプチドを特定することができる。そのようなＶＩＳＴＡ結合タンパク質は、例えば、ＶＩＳＴＡ媒介性シグナル伝達経路の下流要素としてＶＩＳＴＡポリペプチドまたはＶＩＳＴＡ標的によるシグナルの伝播に関与する可能性も高い。あるいは、そのようなＶＩＳＴＡ結合ポリペプチドは、ＶＩＳＴＡ阻害剤であり得る。２ハイブリッド系は、分離可能なＤＮＡ結合および活性化ドメインからなる多くの転写因子のモジュール性質に基づく。手短に言えば、このアッセイは、２つの異なるＤＮＡ構築物を利用する。一方の構築物において、ＶＩＳＴＡポリペプチドをコードする遺伝子が、既知の転写因子（例えば、ＧＡＬ－４）のＤＮＡ結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。もう一方の構築物においては、特定されていないポリペプチド（「獲物」または「試料」）をコードするＤＮＡ配列のライブラリー由来のＤＮＡ配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「おとり」および「獲物」ポリペプチドがインビボで相互作用して、ＶＩＳＴＡ依存複合体を形成することができる場合、転写因子のＤＮＡ結合および活性化ドメインは、近接近になる。この近接性は、転写因子に応答する転写制御部位に動作可能に連結されるレポーター遺伝子（例えば、ＬａｃＺ）の転写を可能にする。レポーター遺伝子の発現を検出することができ、機能的転写因子を含有する細胞コロニーを単離して、ＶＩＳＴＡポリペプチドと相互作用するポリペプチドをコードするクローン化遺伝子を得ることができる。

【０５２５】

本明細書に記載されるアッセイのうちの２つ以上の組み合わせ。例えば、調節剤を、細胞に基づくか、または細胞を含まないアッセイを用いて特定することができ、ＶＩＳＴＡポリペプチドの活性を調節する調節剤の能力を、細胞形質転換および／または腫瘍形成についてインビボで、例えば、動物モデル等の動物において確認することができる。

【０５２６】

本発明はさらに、上述のスクリーニングアッセイによって特定される新規の薬剤に関する。本明細書に記載される方法で特定される薬剤は、適切な動物モデルにおけるものである。例えば、本明細書に記載されるように特定される薬剤（例えば、ＶＩＳＴＡ調節剤、アンチセンスＶＩＳＴＡ核酸分子、ＶＩＳＴＡ特異的抗体、またはＶＩＳＴＡ結合パートナー）を動物モデルで用いて、そのような薬剤による治療の有効性、毒性、または副作用を判定することができる。あるいは、本明細書に記載されるように特定される薬剤を動物モデルで用いて、そのような薬剤の作用機序を判定することができる。なおもさらに、本発明は、本明細書に記載される治療についての上述のスクリーニングアッセイで特定される新規の薬剤の使用に関する。

【０５２７】

検出アッセイ

本明細書において特定されるｃＤＮＡ配列（および対応する完全遺伝子配列）の部分ま

たはフラグメントを、ポリヌクレオチド試薬として多数の方法で用いることができる。例えば、これらの配列を用いて、（ｉ）染色体上のそれらの各遺伝子をマッピングし、それ故に、遺伝的疾患に関連する遺伝子領域を見出し、（ｉｉ）微量生体試料から個体を特定し（組織型判定）、（ｉｉｉ）生体試料の法医学的特定を支援することができる。これらの用途は、以下の小節に記載される。

【０５２８】

染色体マッピング

遺伝子の配列（または配列の一部）が単離された時点で、この配列を用いて、染色体上の遺伝子の位置をマッピングすることができる。このプロセスは、染色体マッピングと呼ばれる。したがって、本明細書に記載されるＶＩＳＴＡヌクレオチド配列の部分またはフラグメントを用いて、染色体上のＶＩＳＴＡ遺伝子の位置をマッピングすることができる。ＶＩＳＴＡ配列の染色体へのマッピングは、これらの配列を疾患に関連した遺伝子と相関させる重要な第一のステップである。手短に言えば、ＶＩＳＴＡヌクレオチド配列からＰＣＲプライマー（好ましくは、１５～２５塩基対長）を調製することによって、ＶＩＳＴＡ遺伝子を染色体にマッピングすることができる。ＶＩＳＴＡ配列のコンピュータ分析を用いて、ゲノムＤＮＡにおいて２個以上のエクソンに及ばず、それ故に増幅プロセスを複雑にするプライマーを予測することができる。その後、これらのプライマーを、個々のヒト染色体を含有する体細胞ハイブリッドのＰＣＲスクリーニングに用いることができる。ＶＩＳＴＡ配列に対応するヒト遺伝子を含有するハイブリッドのみが増幅フラグメントをもたらすことができる。体細胞ハイブリッドが、異なる哺乳動物由来の体細胞（例えば、ヒトおよびマウス細胞）を融合させるによって調製される。ヒトおよびマウス細胞のハイブリッドが増殖および分裂すると、それらは、ヒト染色体をランダムな順序で徐々に喪失するが、マウス染色体を保持する。特定の酵素を欠くためマウス細胞は成長することができないが、ヒト細胞は成長することができる培地を用いることにより、必要とされる酵素をコードする遺伝子を含有するヒト染色体が保持される。様々な培地を用いることにより、ハイブリッド細胞株のパネルを構築することができる。パネル内の各細胞株は、単一のヒト染色体または少数のヒト染色体のいずれか、および完全な組のマウス染色体を含有し、個々の遺伝子の特定のヒト染色体への容易なマッピングを可能にする。Ｄ’Ｅｕｓｔａｃｈｉｏ，ｅｔ　ａｌ．（１９８３）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２０：９１９－９２４。ヒト染色体のフラグメントのみを含有する体細胞ハイブリッドを、転座および欠失を有するヒト染色体を用いて産生することもできる。

【０５２９】

体細胞ハイブリッドのＰＣＲマッピングは、特定の配列を特定の染色体に割り当てるための迅速な方法である。単一のサーマルサイクラーを用いて１日３つ以上の配列を割り当てることができる。ＶＩＳＴＡヌクレオチド配列を用いてオリゴヌクレオチドプライマーを設計することにより、特定の染色体由来のフラグメントのパネルを用いて亜局在化を達成することができる。ＶＩＳＴＡ配列をその染色体にマッピングするために同様に用いられ得る他のマッピング戦略には、インサイツハイブリダイゼーション（Ｆａｎ，ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：６２２３－２７に記載されている）、標識フロー分類染色体を用いた事前スクリーニング、および染色体特異的ｃＤＮＡライブラリーへのハイブリダイゼーションによる事前選択が含まれる。

【０５３０】

分裂中期の染色体を分散させるためのＤＮＡ配列の蛍光インサイツハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）をさらに用いて、１ステップで正確な染色体位置を提供することができる。染色体分散を、紡錘体を崩壊させるコルセミド等の化学物質によって分裂が分裂中期で遮断された細胞を用いて行うことができる。染色体をトリプシンで短期間処理し、その後、ギムザで染色することができる。明帯および暗帯のパターンが各染色体上に生じ、それにより染色体を個別に特定することができる。ＦＩＳＨ技法を最短で５００または６００塩基のＤＮＡ配列とともに用いることができる。しかしながら、１，０００塩基よりも大きいクローンは、単純な検出に十分なシグナル強度で独特の染色体位置に結合する可能

性がより高い。好ましくは１，０００塩基、より好ましくは２，０００塩基が、妥当な時間内に良好な結果を得るのに十分である。この技法の概説については、Ｖｅｒｍａ，ｅｔａｌ．Ｈｕｍａｎ Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ １９８８）を参照されたい。染色体マッピング用の試薬を個別に用いて、その染色体上の単一の染色体または単一の部位をマーキングすることができるか、または試薬のパネルを用いて、複数の部位および／または複数の染色体をマーキングすることができる。遺伝子の非コード領域に対応する試薬は、実際には、マッピング目的に好ましい。コード配列は、遺伝子ファミリー内に保存される可能性が高く、それ故に染色体マッピング中に交差ハイブリダイゼーションの機会を増加させる。

【０５３１】

配列が正確な染色体位置にマッピングされた時点で、染色体上の配列の物理的位置を遺伝子マッピングデータと相関させることができる。最終的に、いくつかの個体由来の遺伝子の完全な配列決定を実施して、突然変異の存在を確認し、突然変異と多型を区別することができる。

【０５３２】

組織型判定

本発明のＶＩＳＴＡ配列を用いて、微量生体試料から個体を特定することもできる。なおもさらに、本発明の配列を用いて、個体のゲノムの選択された部分の実際の塩基毎のＤＮＡ配列を決定する代替の技法を提供することができる。したがって、本明細書に記載されるＶＩＳＴＡヌクレオチド配列を用いて、配列の５’および３’末端から２つのＰＣＲプライマーを調製することができる。その後、これらのプライマーを用いて、個体のＤＮＡを増幅し、その後、それを配列決定することができる。

【０５３３】

この様式で調製された個体由来の対応するＤＮＡ配列のパネルは、対立遺伝子が違うといった理由から各個体が特有の組のそのようなＤＮＡ配列を有するため、特有の個体特定を提供することができる。本発明の配列を用いて、個体および組織からそのような特定配列を得ることができる。本発明のＶＩＳＴＡヌクレオチド配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。対立遺伝子変化は、これらの配列のコーディング領域である程度生じ、非コード領域でより著しい程度生じる。個別のヒト間の対立遺伝子変化が５００塩基毎に約１回の頻度で生じると推定される。本明細書に記載される配列のそれぞれを、ある程度、個体由来のＤＮＡが特定目的で比較され得る標準物として用いることができる。より多くの多型が非コード領域で生じるため、個体を区別するのに少数の配列しか必要ではない。配列番号１または４の非コード配列は、それぞれが１００塩基の非コード増幅配列をもたらす恐らく１０～１，０００個のプライマーのパネルでの正の個体特定を十分に提供することができる。予測されるコード配列、例えば、配列番号３または６のコード配列が用いられる場合、正の個体特定により適切なプライマーの数は、５００～２０００個である。

【０５３４】

本明細書に記載されるＶＩＳＴＡヌクレオチド配列からの試薬のパネルを用いて個体の特有の特定データベースを生成する場合、後にこれらの同一の試薬を用いて、その個体由来の組織を特定することができる。特有の特定データベースを用いて、非常に小さい組織試料から個体（生きている個体または死んだ個体）の正の特定を行うことができる。

【０５３５】

法医学的生物学におけるＶＩＳＴＡ配列の使用

ＤＮＡに基づく特定技法も法医学的生物学で用いることができる。本発明の配列を用いて、ヒトゲノムにおける特定の遺伝子座を標的とするポリヌクレオチド試薬、例えば、ＰＣＲプライマーを提供することができ、これは、例えば、別の「特定マーカー」（すなわち、特定の個体に特有の別のＤＮＡ配列）を提供することによってＤＮＡに基づく法医学的特定の信頼度を高めることができる。上述のように、実際の塩基配列情報を用いて、制限酵素生成フラグメントによって形成されるパターンの正確な代替物として特定すること

ができる。配列番号１または３の非コード領域を標的とした配列は、より多くの多型が非コード領域で生じるため、この使用に特に適切であり、この技法を用いた個体の区別を容易にする。ポリヌクレオチド試薬の例として、ＶＩＳＴＡヌクレオチド配列またはその部分、例えば、少なくとも２０塩基長、好ましくは少なくとも３０塩基長の配列番号１または３の非コード領域由来のフラグメントが挙げられる。本明細書に記載されるＶＩＳＴＡヌクレオチド配列をさらに用いて、ポリヌクレオチド試薬、例えば標識プローブまたは標識可能なプローブ（例えば、インサイツハイブリダイゼーション技法で用いられ得るもの）を提供し、特定の組織、例えば、リンパ球を特定することができる。これは、法医学的病理学者が出所不明の組織を提示される場合に非常に有用であり得る。そのようなＶＩＳＴＡプローブのパネルを用いて、種および／または器官の種類別に組織を特定することができる。同様の様式で、これらの試薬、例えば、ＶＩＳＴＡプライマーまたはプローブを用いて、混入について組織培養をスクリーニングする（すなわち、培養中の異なる細胞型の混合物の存在についてスクリーニングする）ことができる。

【０５３６】

診断アッセイ

生体試料中のＶＩＳＴＡポリペプチドまたは核酸の存在または不在を検出するための例示の方法は、試験対象から生体試料を得ること、およびＶＩＳＴＡポリペプチドまたは核酸の存在が生体試料中で検出されるように、生体試料を、ＶＩＳＴＡポリペプチドをコードするＶＩＳＴＡポリペプチドまたは核酸（例えば、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡ）を検出することができる化合物または薬剤と接触させることを含む。ＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡの検出に好ましい薬剤は、ＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡにハイブリダイズすることができる標識核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、配列番号１もしくは３に記載されるＶＩＳＴＡ核酸、またはその部分、例えば、少なくとも１５、３０、５０、１００、２５０、もしくは５００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり得、ストリンジェントな条件下でＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡに特異的にハイブリダイズするのに十分であり得る。本発明の診断アッセイでの使用に他の好適なプローブは、本明細書に記載されている。ＶＩＳＴＡポリペプチドの検出に好ましい薬剤は、ＶＩＳＴＡポリペプチドに結合することができる抗体、好ましくは検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナル、またはより好ましくはモノクローナルであり得る。無傷の抗体またはそのフラグメント（例えば、ＦａｂまたはＦ（ａｂ’）$_2$）を用いることができる。プローブまたは抗体に関して「標識される」という用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングする（すなわち、物理学的に連結する）ことによるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに直接標識される別の試薬との反応によるプローブまたは抗体の間接標識を包含することを意図する。間接標識の例として、蛍光標識二次抗体を用いた一次抗体の検出、および蛍光標識ストレプトアビジンで検出され得るようなビオチンでのＤＮＡプローブの末端標識が挙げられる。「生体試料」という用語は、対象から単離された生組織、細胞、および体液、ならびに対象内に存在する組織、細胞、および体液を包含することを意図する。すなわち、本発明の検出方法を用いて、生体試料中のＶＩＳＴＡ　ｍＲＮＡ、ポリペプチド、またはゲノムＤＮＡをインビトロでもインビボでも検出することができる。例えば、ＰＤ－Ｌ２　ｍＲＮＡを検出するためのインビトロ技法には、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイツハイブリダイゼーションが含まれる。ＶＩＳＴＡポリペプチドを検出するためのインビトロ技法には、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）、ウエスタンブロット法、免疫沈降、および免疫蛍光が含まれる。ＶＩＳＴＡゲノムＤＮＡを検出するためのインビトロ技法には、サザンハイブリダイゼーションが含まれる。なおもさらに、ＶＩＳＴＡポリペプチドを検出するためのインビボ技法には、標識抗ＶＩＳＴＡ抗体の対象への導入が含まれる。例えば、抗体は、放射性マーカーで標識され得、対象におけるその存在および位置は、標準の撮像技法によって検出され得る。一実施形態において、生体試料は、試験対象由来のポリペプチド分子を含有する。あるいは、生体試料は、試験対象由来のｍＲＮＡ分子または試験対象由来のゲノムＤＮＡ分子を含有し得る。好ましい生体試料は、従来の手段により対象から単離さ

れた血清試料である。別の実施形態において、この方法は、対照対象から対照生体試料を得ること、ＶＩＳＴＡポリペプチド、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの存在が生体試料中に検出されるように、対照試料を、ＶＩＳＴＡポリペプチド、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡを検出することができる化合物または薬剤と接触させること、ならびに対照試料中のＶＩＳＴＡポリペプチド、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの存在を、試験試料中のＶＩＳＴＡポリペプチド、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの存在と比較することをさらに含む。

【０５３７】

本発明は、生体試料中のＶＩＳＴＡの存在を検出するためのキットも包含する。例えば、キットは、生体試料中のＶＩＳＴＡポリペプチドまたはｍＲＮＡを検出することができる標識化合物または薬剤、試料中のＶＩＳＴＡの量を判定するための手段、および試料中のＶＩＳＴＡの量を標準物と比較するための手段を含み得る。化合物または薬剤は、好適な容器内に包装され得る。キットは、キットを用いてＶＩＳＴＡポリペプチドまたは核酸を検出するための取扱説明書をさらに含み得る。

【０５３８】

予後アッセイ

本明細書に記載される診断方法をさらに利用して、異常なまたは望ましくないＶＩＳＴＡ発現または活性に関連した疾患または障害を有するか、あるいはそれを発症する危険性のある対象を特定することができる。本明細書に使用される際、「異常な」という用語は、野生型ＶＩＳＴＡ発現または活性から逸脱するＶＩＳＴＡ発現または活性を含む。異常な発現または活性には、増加または減少した発現または活性、ならびに発現の野生型発生パターンまたは発現の細胞内パターンに従わない発現または活性が含まれる。例えば、異常なＶＩＳＴＡ発現または活性は、ＶＩＳＴＡ遺伝子における突然変異がＶＩＳＴＡ遺伝子に過小発現または過剰発現させる事例、およびそのような突然変異が、野生型様式では機能しない非機能的ＶＩＳＴＡポリペプチドまたはポリペプチド、例えば、ＶＩＳＴＡ結合パートナーと相互作用しないポリペプチドまたは非ＶＩＳＴＡ結合パートナーと相互作用するポリペプチドをもたらす状況を含むよう意図されている。本明細書に使用される際、「望ましくない」という用語は、免疫細胞活性化等の生物学的応答に関与する望ましくない現象を含む。例えば、「望ましくない」という用語は、対象において望ましくないＶＩＳＴＡ発現または活性を含む。

【０５３９】

前述の診断アッセイまたは以下のアッセイ等の本明細書に記載されるアッセイを利用して、ＶＩＳＴＡポリペプチド活性または核酸発現の誤制御に関連する障害、例えば、自己免疫障害、免疫不全障害、免疫系障害、例えば、自己免疫、アレルギー、もしくは炎症性障害、または癌を有するか、あるいはそれを発症する危険性のある対象を特定することができる。したがって、本発明は、異常なまたは望ましくないＶＩＳＴＡ発現または活性二関連した疾患または障害を特定するための方法を提供し、この方法において、試験試料が対象から得られ、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたは核酸（例えば、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡ）が検出され、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたは核酸の存在は、異常なもしくは望ましくないＶＩＳＴＡ発現もしくは活性に関連する疾患もしくは障害を有するか、またはそれを発症する危険性のある対象の診断である。本明細書に使用される際、「試験試料」とは、目的とする対象から得られた生体試料を指す。例えば、試験試料は、生体液（例えば、脳脊髄液もしくは血清）、細胞試料、または組織であり得る。

【０５４０】

なおもさらに、本明細書に記載される予後アッセイを用いて、対象に薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣体、ポリペプチド、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬物候補）を投与して、異常なまたは望ましくないＶＩＳＴＡ発現または活性に関連した疾患または障害を治療することができるかを判定することができる。例えば、そのような方法を用いて、対象を自己免疫障害、免疫不全障害、免疫系癌、またはアレルギー性もしくは炎症性障害用の薬剤で効果的に治療することができるかを判定することができる。したがって、本発明は、対象を異常なまたは望ましくないＶＩＳＴＡ発現または

活性に関連する障害のための薬剤で効果的に治療することができるかを判定するための方法を提供し、この方法において、試験試料が得られ、ＶＩＳＴＡポリペプチドまたは核酸の発現または活性が検出される（例えば、豊富なＶＩＳＴＡポリペプチドまたは核酸の発現または活性は、異常なまたは望ましくないＶＩＳＴＡ発現または活性に関連する障害を治療するための薬剤が投与され得る対象の診断である）。本発明の方法を用いて、ＶＩＳＴＡ遺伝子における遺伝子変化を検出し、それにより変化した遺伝子を有する対象がＶＩＳＴＡポリペプチド活性または核酸発現の誤制御を特徴とする障害、例えば、自己免疫障害、免疫不全障害、免疫系癌、アレルギー性障害、または炎症性障害の危険性があるかを判定することもできる。本明細書に記載される方法を、例えば、ＶＩＳＴＡ遺伝子に関連した疾患または病気の症状または家族歴を示す患者を診断するために例えば臨床状況下で好都合に用いることができる本明細書に記載される少なくとも１つのプローブ核酸または抗体試薬を含む包装済みの診断キットを利用することによって実施することができる。なおもさらに、ＶＩＳＴＡが発現する任意の細胞型または組織を本明細書に記載される予後アッセイで利用することができる。

【０５４１】

免疫測定法

ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体に結合する抗体および抗原結合フラグメントを免疫測定法で用いて、試料中のマーカーを定性的または定量的に検出および分析することができる。この方法は、ＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体に特異的に結合する抗体を提供すること、試料を抗体と接触させること、および試料中のマーカーに結合された抗体の複合体の存在を検出することを含む。

【０５４２】

いくつかの十分に認識されている免疫学的結合アッセイのうちのいずれかを用いてＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を検出および／または定量することができる。有用なアッセイには、例えば、酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）、例えば、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）、放射性免疫測定法（ＲＩＡ）、ウエスタンブロットアッセイ、またはスロットブロットアッセイが含まれる。例えば、、米国特許第４，３６６，２４１号、同第４，３７６，１１０号、同第４，５１７，２８８号、および同第４，８３７，１６８号を参照されたい。一般に、対象から得られた試料をＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡ複合体に特異的に結合する抗体と接触させることができる。

【０５４３】

任意に、抗体を固体支持体に固定して、複合体の洗浄およびその後の単離を促進した後に、抗体を試料と接触させることができる。固体支持体の例として、例えば、マイクロタイタープレート、スティック、ビーズ、またはマイクロビーズの形態のガラスまたはプラスチックが挙げられるが、これらに限定されない。抗体は、固体支持体に結合され得る。

【０５４４】

試料を抗体とインキュベートした後、混合物を洗浄し、形成される抗体マーカー複合体を検出することができる。これは、洗浄された混合物を検出試薬とインキュベートすることによって達成され得る。あるいは、試料中のマーカーは、間接アッセイを用いて検出され得、このアッセイにおいて、例えば、二次標識抗体を用いて、結合されたマーカー特異的抗体を検出する、および／または競合もしくは阻害アッセイにおいて、例えば、マーカーのはっきりと異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体が混合物と同時にインキュベートされる。

【０５４５】

アッセイを通じて、試薬の各組み合わせの後にインキュベーションおよび／または洗浄ステップが必要であり得る。インキュベーションステップは、約５秒間～数時間、好ましくは約５分間～約２４時間と異なり得る。しかしながら、インキュベーション時間は、アッセイ形式、マーカー、溶液体積、濃度に依存する。通常、アッセイは、周囲温度で行われるが、ある温度範囲（例えば、１０℃～４０℃）にわたって行われてもよい。

【０５４６】

免疫測定法を用いて、対象由来の試料中のマーカーの試験量を判定することができる。最初に、試料中のマーカーの試験量が上述の免疫測定法を用いて検出され得る。マーカーが試料中に存在する場合、それは、上述の好適なインキュベーション条件下でそのマーカーに特異的に結合する抗体で抗体マーカー複合体を形成する。抗体マーカー複合体の量は、任意に標準物と比較することによって判定され得る。上述のように、マーカーの試験量は、測定単位を対照量および／またはシグナルと比較することができる限り、絶対単位で測定されなくてもよい。いくつかの免疫測定法が当該技術分野で既知であり、本明細書に記載されるＶＩＳＴＡポリペプチドまたはＶＩＳＴＡ複合体が、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）、磁気免疫測定法、免疫ブロット法、ウエスタンブロット法、免疫沈降アッセイ、免疫組織化学分析、および蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を含むが、これらに限定されない免疫測定法で用いられ得る。Ｗｉｌｄ，（２００８）［Ｅｄ．］Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ［３ｒｄ Ｅｄ．］Ｅｌｓｅｖｉｅｒを参照されたい。

【０５４７】

放射撮影法

ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を放射撮影法で用いて、膵臓癌および結腸直腸癌を含む癌を診断することができるか、または腫瘍の進行を監視することができる。これらの方法には、陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）、単光子放出コンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）が含まれるが、これらに限定されない。これらの技法はいずれも非侵襲性であり、例えば癌性細胞の検出等の様々な組織事象および／または機能を検出および／または測定するために用いられ得る。ＳＰＥＣＴは、任意に２つの標識を同時に用い得る。米国特許第６，６９６，６８６号を参照されたい。

【０５４８】

商業的応用および方法

本発明は、商業的量に達するＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体の産生をさらに提供する。ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、大規模に産生され、必要な場合、保管され、病院、臨床医、または他の保健施設に供給され得る。

【０５４９】

ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体の産生、保管、および流通方法は、本明細書に開示される方法によってもたらされ得る。産生後、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体は、患者の治療前に収集、精製、および任意に保管され得る。例えば、患者が、例えば、癌、自己免疫疾患、または炎症性状態等の兆候を示した時点で、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体が発注され、タイミング良く提供され得る。したがって、本発明は、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を産生して、商業規模で抗体、すなわち、ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体に選択的に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントを含む薬学的組成物を得る方法、ならびにＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体を病院および臨床医に提供する（すなわち、産生、場合によっては保管、および販売する）方法に関する。ＶＩＳＴＡ－ＶＩＳＴＡ複合体の産生を商業的用途のために規模拡大することができる。

【０５５０】

本発明は、調製物を流通させて販売するための流通システムの確立を含むか、または薬学的調製物を市販する販売グループの確立を含み得る薬品事業を行う方法も提供する。

【０５５１】

核酸のライブラリー

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）変異体の変化に富んだライブラリーが、核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異生成によって生成することができ、変化に富んだ遺伝子ライブラリーによってコードされる。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）変異体の変化に富んだライブラリーは、縮重組の潜在的ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）配列が、個々のポリペプチドとして、または代替として、その中に前述の組のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）配列を含有する一組のより大きい融合タンパク質（例えば、ファージディスプレイのために）として発現可能であるように、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的にライゲーショ

ンすることによって産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）変異体のライブラリーを産生するために用いられ得る様々な方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動ＤＮＡ合成装置で実施され得、その後、合成遺伝子が適切な発現ベクターにライゲーションされ得る。縮重組の遺伝子の使用により、１つの混合物において、所望の組の潜在的ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）配列をコードする配列のすべての提供が可能になる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法が当該技術分野で既知である。例えば、、Ｎａｒａｎｇ（１９８３）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ３９：３、Ｉｔａｋｕｒａ，ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５３：３２３、Ｉｔａｋｕｒａ，ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｓｃｉｅｎｃｅ １９８：１０５６、Ｉｋｅ，ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１１：４７７を参照されたい。

【０５５２】

加えて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドコード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドの変異体のスクリーニングおよびその後の選択のために変化に富んだＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）フラグメントの集団を生成することができる。コード配列フラグメントのライブラリーは、ニッキングが１分子当たり約１回のみ生じる条件下でＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）コード配列の二本鎖ＰＣＲフラグメントをヌクレアーゼで処理し、二本鎖ＤＮＡを変性させ、ＤＮＡを復元して異なるニッキング産物由来のセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖ＤＮＡを形成し、Ｓ１ヌクレアーゼでの処理によって再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去し、結果として生じたフラグメントライブラリーを発現ベクターにライゲーションすることによって生成され得る。この方法により、様々な大きさのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドのＮ末端、Ｃ末端、および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーを導出することができる。

【０５５３】

点突然変異または切断によって作製されるコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングし、選択された特性を有する遺伝子産物についてｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該技術分野で既知である。そのような技法は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）ポリペプチドのコンビナトリアル突然変異生成によって生成される遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適応可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための高スループット分析に適している最も広く用いられている技法は、典型的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングし、適切な細胞に結果として生じるベクターのライブラリーで形質転換を行い、所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を促進する条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現することを含む。ライブラリーにおける機能的突然変異体の頻度を高める新たな技法である再帰的アンサンブル突然変異生成（ＲＥＭ）をスクリーニングアッセイと組み合わせて用いて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）変異体を特定することができる。Ａｒｋｉｎ ａｎｄ Ｙｏｕｖａｎ（１９９２）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：７８１１－７８１５、Ｄｅｌａｇｒａｖｅ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．６（３）：３２７－３３１。

【０５５４】

予測医学

本発明は、診断アッセイ、予後アッセイ、および監視臨床試験を予後（予測）目的で用いて、それにより個体を予防的に治療する予測医学の分野にも関する。したがって、本発明の一態様は、生体試料（例えば、血液、血清、細胞、または組織）の文脈において、ＶＩＳＴＡポリペプチドおよび／または核酸の発現ならびにＶＩＳＴＡ活性を判定し、それにより個体が疾患もしくは障害に罹患しているか、または異常なもしくは望ましくないＶＩＳＴＡ発現もしくは活性に関連する障害を発症する危険性があるかを判定するための診断アッセイに関する。本発明は、個体がＶＩＳＴＡポリペプチド、核酸発現、または活性に関連する障害を発症する危険性があるかを判定するための予後（または予測）アッセイ

も提供する。例えば、ＶＩＳＴＡ遺伝子における突然変異を生体試料においてアッセイすることができる。そのようなアッセイを予後または予測目的で用いることにより、ＶＩＳＴＡポリペプチド、核酸発現、もしくは活性を特徴とするか、またはそれに関連する障害の発病前に個体を予防的に治療することができる。

【０５５５】

本発明の別の実施形態は、臨床試験における薬剤（例えば、薬物、化合物）のＶＩＳＴＡ発現または活性への影響を監視することに関する。これらおよび他の薬剤は、以下の節でさらに詳細に記載される。

【０５５６】

臨床試験中の効果の監視

ＶＩＳＴＡポリペプチド発現または活性（例えば、細胞増殖および／または移動の調節）に対する薬剤（例えば、薬物）の影響の監視は、基本的な薬物スクリーニングのみならず、臨床試験でも適用され得る。例えば、ＶＩＳＴＡ遺伝子発現を増加させるか、ポリペプチドレベルを増加させるか、またはＶＩＳＴＡ活性を上方制御するための本明細書に記載されるためのスクリーニングアッセイによって判定される薬剤の有効性を、減少したＶＩＳＴＡ遺伝子発現の低下、ポリペプチドレベルの低下、またはＶＩＳＴＡ活性の下方制御を呈する対象の臨床試験において監視することができる。あるいは、ＶＩＳＴＡ遺伝子発現を低下させるか、ポリペプチドレベルを低下させるか、またはＶＩＳＴＡ活性を下方制御するためのスクリーニングアッセイによって判定される薬剤の有効性を、ＶＩＳＴＡ遺伝子発現の増加、ポリペプチドレベルの増加、またはＶＩＳＴＡ活性の増加を呈する対象の臨床試験において監視することができる。上述のように、ＶＩＳＴＡは、ＡＰＣ（マクロファージおよび骨髄性樹状細胞）を含む多くの造血細胞型、ならびにＣＤ４＋Ｔ細胞上で発現され、より具体的には、ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＤＣ、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（Ｆｏｘｐ３$^{-}$エフェクターＴ細胞およびＦｏｘｐ３$^{+}$ｎＴｒｅｇｓの両方を含む）、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、およびＧｒ１$^{+}$顆粒球上で発現され、Ｂ細胞およびＮＫ細胞上では低レベルで発現される。そのような臨床試験において、ＶＩＳＴＡ遺伝子、好ましくは、例えばＶＩＳＴＡ関連障害に関係する他の遺伝子の発現または活性を、特定の細胞の表現型の「読み出し」またはマーカーとして用いることができる。

【０５５７】

例であり、制限するものではなく、（例えば、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにおいて特定される）ＶＩＳＴＡ活性を調節する薬剤（例えば、化合物、薬物、または小分子）での処理によって細胞において調節される、ＶＩＳＴＡを含む遺伝子が特定され得る。したがって、例えば臨床試験において、ＶＩＳＴＡ関連障害への薬剤の効果を試験するために、細胞を単離し、ＲＮＡを調製し、それぞれ、ＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ関連障害に関係する他の遺伝子の発現レベルについて分析することができる。遺伝子発現のレベル（例えば、遺伝子発現パターン）を、本明細書に記載されるようにノーザンブロット分析またはＲＴ－ＰＣＲによって定量することができ、あるいは代替として、産生されたポリペプチドの量を測定することによって、本明細書に記載される方法のうちの１つによって、またはＶＩＳＴＡもしくは他の遺伝子の活性レベルを測定することによって定量することができる。この方法において、遺伝子発現パターンは、薬剤に対する細胞の生理学的応答を示すマーカーとしての役目を果たし得る。したがって、この応答状態を、薬剤での個体の治療前、およびその間の様々な時点で判定することができる。ある実施形態において、本発明は、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣体、ポリペプチド、ペプチド、核酸、小分子、または本明細書に記載されるスクリーニングアッセイによって特定される他の薬物候補）での対象の治療の有効性を監視するための方法を提供し、この方法は、（ｉ）薬剤の投与前に対象から投与前試料を得るステップ、（ｉｉ）投与前試料中のＶＩＳＴＡポリペプチド、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現レベルを検出するステップ、（ｉｉｉ）対象から１つ以上の投与後試料を得るステップ、（ｉｖ）投与後試料中のＶＩＳＴＡポリペプチド、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現または活性レベルを検出するステップ、（ｖ）投与前の試料中のＶＩＳＴＡポリペプチド、ｍ

ＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡの発現または活性レベルを、投与後の試料（複数可）中のＶＩＳＴＡポリペプチド、ｍＲＮＡ、またはゲノムＤＮＡと比較するステップ、ならびに（ｖｉ）必要に応じて対象への薬剤の投与を変更するステップを含む。例えば、薬剤の投与の増加は、ＶＩＳＴＡの発現または活性を検出されたレベルよりも高いレベルへの増加、すなわち、薬剤の有効性の増加に望ましくあり得る。あるいは、薬剤の投与の低減は、ＶＩＳＴＡの発現または活性を検出されたレベルよりも低いレベルへの低下、すなわち、薬剤の有効性の低下に望ましくあり得る。そのような実施形態に従って、ＶＩＳＴＡ発現または活性を、観察可能な表現型応答が不在の場合であっても薬剤の有効性の指標として用いることができる。

【０５５８】

本明細書で言及されるすべての出版物（例えば、非特許文献）、特許、特許出願公開、および特許出願は、本発明が属する当業者の技能のレベルを示す。すべてのそのような出版物（例えば、非特許文献）、特許、特許出願公開、および特許出願は、各個々の出版物、特許、特許出願公開、および特許出願が参照により組み込まれると具体的かつ個別に示されるかのように同一程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【０５５９】

本明細書に記載される本発明が完全に理解され得るように、前述の発明を実施するための形態が説明される。本発明の様々な実施形態は、詳細に記載されており、提供される実施例によってさらに例証され得る。

【実施例】

【０５６０】

ここで一般に説明されている本発明は、以下の実施例を参照することによりより容易に理解され、これらの実施例は、単に本発明のある特定の態様および実施形態の例証目的のために包含されており、本発明を限定するようには意図されていない。

【０５６１】

実施例１

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のクローニングおよび配列分析

静止Ｔｒｅｇ、αＣＤ３で活性化したＴｒｅｇ、およびαＣＤ３／αＧＩＴＲで活性化したＴｒｅｇの包括的転写プロファイリングによってＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）およびＴｒｅｇ－ｓＴＮＦを特定した。Ｔｒｅｇ上でＧＩＴＲをトリガすることでそれらの接触依存性抑制活性が失われることが示されたため、αＧＩＴＲをこの分析に選択した（Ｓｈｉｍｉｚｕ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）（上記））。それらの特有の発現パターン（表２）に基づいてＡＦＦＩＭＥＴＲＩＸ（登録商標）ＤＮＡアレイ上でＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）およびＴｒｅｇ－ｓＴＮＦを特定した。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）は、αＣＤ３活性化Ｔｒｅｇにおける発現の増加およびαＧＩＴＲの存在下での発現の減少を示し、Ｔｒｅｇ－ｓＴＮＦは、αＣＤ３／αＧＩＴＲ依存性の発現の増加を示した。

【０５６２】

精製したＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞を刺激しないか、または培養物中でαＣＤ３もしくはαＣＤ３／αＧＩＴＲで一晩刺激し、リアルタイムＰＣＲ分析のためにＲＮＡを単離した。列記される発現は、アクチンに対するものである。

【表２】

mRNA	相対発現		
	なし	αCD3	αCD3/αGITR
VISTA(PD-L3)	6	10	7
T^{reg}-sTNF	0.2	0.3	1.5

【０５６３】

活性化ＣＤ２５＋ＣＤ４＋ｎＴｒｅｇｓ対静止ＣＤ２５＋ＣＤ４＋ｎＴｒｅｇｓのＡＦＦＩＭＥＴＲＩＸ（登録商標）分析は、未知の機能を有するが、Ｉｇスーパーファミリーとの配列相同性を有しない遺伝子産物（ＲＩＫＥＮ　ｃＤＮＡ　４６３２４２８Ｎ０５、または４６３２４２８Ｎ０５Ｒｉｋ）の発現を明らかにした。

【０５６４】
より具体的には、９３０塩基対の遺伝子産物をＣＤ４＋Ｔ細胞ｃＤＮＡライブラリーからクローニングし、これは、予測した大きさおよび配列と一致した。コンピュータ上の配列および構造分析は、成熟時に３０９個のアミノ酸の膜貫通タンパク質、１５９個のアミノ酸の細胞外ドメイン、２２個のアミノ酸の膜貫通ドメイン、および９５個のアミノ酸の細胞質尾部を予測する（図１Ａ）。アミノ酸配列アライメントは、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、およびＢ７－Ｈ４等のＢ７ファミリーリガンド、ならびにＢ７ファミリー受容体（すなわち、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＣＤ２８、ＢＴＬＡ、ＩＣＯＳ）に相同な細胞外免疫グロブリン（Ｉｇ）－Ｖ様ドメインを明らかにする（図１Ｂ～Ｃ）。Ｂ７ファミリーリガンドと受容体との間のＩｇ－Ｖドメインの配列同一性は一般にあまり高くないが（４０％未満）、４６３２４２８Ｎ０５ＲｉｋのＩｇ－Ｖドメインは、Ｂ７ファミリーリガンド ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２と最も高い相同性を有する。配列アライメントは、鎖内ジスルフィド結合形成に重要ないくつかの高度に保存されたシステイン（図１Ｂ）も明らかにし、これは、Ｂ７ファミリーリガンドの特徴である。図２３、Ｓｉｃａ，ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １８：８４９－８６１も参照されたい。

【０５６５】
４６３２４２８Ｎ０５Ｒｉｋの細胞外ドメインは、Ｉｇ－Ｖドメインのみを含有し、Ｉｇ－Ｃドメインを欠く（図１Ｂ～Ｃ）。この特有の特徴は、Ｂ７ファミリー受容体の特徴であり、４６３２４２８Ｎ０５Ｒｉｋを、Ｉｇ－ＶとＩｇ－Ｃドメインの両方を含有するすべての他のＢ７ファミリーリガンドと区別する。Ｆｒｅｅｍａｎ（２００８）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １０５：１０２７５－１０２７６、Ｌａｚａｒ－Ｍｏｌｎａｒ，ｅｔ ａｌ．（２００８）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １０５：１０４８３－１０４８８、Ｌｉｎ，ｅｔ ａｌ．（２００８）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １０５：３０１１－３０１６、Ｓｃｈｗａｒｔｚ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ ４１０：６０４－６０８、Ｓｔａｍｐｅｒ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ ４１０：６０８－６１。一貫して、ＰｈｙＭＬアルゴリズムを用いた系統発生学的分析（系統発生学的最大尤度）は、４６３２４２８Ｎ０５Ｒｉｋを、Ｂ７ファミリーリガンドよりも Ｂ７ファミリー受容体、具体的には、ＰＤ－１に近い進化距離に置いた（図２）。Ｇｕｉｎｄｏｎ＆Ｇａｓｃｕｅｌ（２００３）Ｓｙｓｔ Ｂｉｏｌ ５２：６９６－７０４。しかしながら、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の細胞質尾部は、いかなるシグナル伝達ドメイン（例えば、ＩＴＩＭ、ＩＴＡＭ、またはＩＴＳＭ）も含有せず、これは、Ｂ７ファミリー受容体のシグネチャドメインである。Ｓｈａｒｐｅ＆Ｆｒｅｅｍａｎ（２００２）Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：１１６－１２６。阻害性受容体ＰＤ－１とのその緊密な進化的関係にもかかわらず、４６３２４２８Ｎ０５Ｒｉｋは、新規の数のＢ７リガンドファミリーを表す。これらの構造的および系統発生学的特徴に基づいて、この分子をリガンドとしてＰＤ－１発現（ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３））と名付けた。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）はまた、マウスオルソログとヒトオルソログとの間で高度に保存され、７７％の配列同一性を共有する（図１Ｄ）。

【０５６６】
マウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）をコードする核酸配列を本明細書において配列番号１とし、マウスＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質配列を配列番号２とする。

【０５６７】
ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のヒト相同体は、染色体１０（７２．９Ｍｂ）上に位置し、６個のエクソンからなり、それにより３１１残基タンパク質をコードする４６８９塩基長の転写物を生成する。ヒト相同体ｍＲＮＡコード配列は、ＧＥＮＢＡＮＫ受入番号ＮＭ＿０２２１５３で示され、タンパク質配列をＮＰ＿０７１４３６とする。ヒトＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）をコードする核酸配列を本明細書において配列番号３とし、ヒトＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質配列を配列番号４とする。マウスおよびヒト遺伝子は、７４％の相同性を共有し、タンパク質レベルで６８％同一である。相同体が、染色体２０（２７．７Ｍｂ、ＧＥＮＢＡＮＫ受入番号ＢＣ０９８７２３）上でドブネズミ、ならびにトラフ

グおよびゼブラフィッシュにおいて特定された。一実施形態において、本発明のＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質は、配列番号５に示される共通のアミノ酸配列を共有する。ＶＩＳＴＡのさらなるオルソログが特定され、図２３Ｄに示される（例えば、（配列番号１７）、ヒト（配列番号１６）、カンガルー（配列番号１８）、イルカ（配列番号１９）、トリ（配列番号２０）、アフリカツメガエル（配列番号２１）、キンカチョウ（配列番号２２）、ゼブラフィッシュ、およびフグ（配列番号２３））。

【０５６８】

実施例２

ＲＴ－ＰＣＲ分析およびフローサイトメトリーによるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の発現研究

ＲＴ－ＰＣＲ分析を用いて、マウス組織におけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）のｍＲＮＡ発現パターンを判定した（図３Ａ）。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）は、造血組織（脾臓、胸腺、骨髄）、または十分に浸潤した白血球の組織（すなわち、肺）に主に発現する。非造血組織（すなわち、心臓、腎臓、脳、および卵巣）で弱発現も検出された。いくつかの造血細胞型の分析は、腹腔マクロファージ、脾臓ＣＤ１１ｂ＋単球、ＣＤ１１ｃ＋ＤＣ、ＣＤ４＋Ｔ細胞、およびＣＤ８＋Ｔ細胞でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の発現を明らかにするが、Ｂ細胞での発現レベルは低い（図３Ｂ）。この発現パターンは、ＧＮＦ（Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｎｏｖａｒｔｉｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ）遺伝子アレイデータベース、ならびにＮＣＢＩ ＧＥＯ（遺伝子発現オムニバス）データベース（図４Ａ～Ｄ）とも大いに一致している。Ｓｕ，ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９９：４４６５－４４７０を参照されたい。

【０５６９】

タンパク質発現を研究するために、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）特異的ハムスター８Ｄ８および６Ｅ７モノクローナル抗体を産生した。特異性は、陽性染色法によってＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）過剰発現マウスＥＬ４　Ｔ細胞上で実証され、陰性染色法によってＰＤ－Ｌ１過剰発現ＥＬ４細胞上で実証される（図５）。

【０５７０】

ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方をＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）に対して産生した。ウサギ抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）抗体を用いて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）タンパク質はリンパ器官に局在し、脳組織で顕著に見られた。特定されたモノクローナル抗体のうち、αＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）クローン８Ｄ８の特異性をさらに評価した。この分析において、クローン８Ｄ８を、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－１、Ｂ７－２、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）、およびｈｌｇを含むＰＤ－Ｌ様Ｉｇ融合タンパク質分子のパネルに対する結合について試験した。この分析の結果は、８Ｄ８αＰＤＬ－３がＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）に対して高度に特異的であることを示した。

【０５７１】

具体的には、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）モノクローナル抗体クローン８Ｄ８を用いて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現をフローサイトメトリーによって造血細胞上で分析した。Ｆｏｘｐ３ＧＦＰノックインレポーターマウスを用いてＣＤ４＋ｎＴｒｅｇを区別した。末梢リンパ器官（脾臓およびリンパ節）において、すべてのＣＤ４＋Ｔ細胞サブセット（総ＣＤ４＋Ｔ細胞、またはＦｏｘｐ３－ナイーブＴ細胞およびＦｏｘｐ３＋ｎＴｒｅｇ細胞、ならびにメモリーＣＤ４＋Ｔ細胞を参照されたい）上で著しい発現が見られる一方で、ＣＤ８＋Ｔ細胞発現は、著しく少ない量の表面ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を発現する（図３Ｃ）。胸腺において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現は、ＣＤ４＋ＣＤ８＋ダブル陽性胸腺細胞では陰性であり、ＣＤ４シングル陽性細胞では低く、ＣＤ８シングル陽性細胞では検出可能である。次に、高ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現のＣＤ１１ｂマーカーとの強い相関関係を、Ｆ４／８０マクロファージと骨髄性ＣＤ１１ｃ＋ＤＣの両方を含む脾臓細胞と腹膜細胞の両方で見ることができる（図３Ｄ～Ｅ）。その一方で、Ｂ細胞およびＮＫ細胞は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現に対してほぼ陰性である。わずかな割合のＧ

ｒ－１＋顆粒球もＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）を発現する（図３Ｆ）。

【０５７２】

差次的発現パターンが異なるリンパ器官由来の細胞の同一系列で示される（図３Ｇ）。ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＣＤ１１ｂ中間単球について、発現レベルは、腸間膜リンパ節＞末梢リンパ節および脾臓＞腹膜腔および血液のパターンに従う。このパターンは、ＣＤ１１ｂ高細胞ではあまり顕著ではない。このデータは、ある特定の細胞型におけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現が細胞成熟および／または組織微小環境によって制御され得ることを示唆する。

【０５７３】

新たに単離された細胞に加えて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現を、活性化を伴うインビトロ培養時および活性化を伴わないインビトロ培養時に、脾臓ＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ１１ｂ高単球、およびＣＤ１１ｃ＋ＤＣ上で分析した（図６）。脾臓細胞を、培地、または抗ＣＤ３（Ｔ細胞を活性化するため）もしくはＩＦＮγおよびＬＰＳ（単球およびＤＣを活性化するため）のいずれかで２４時間培養した後に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）および他のＢ７ファミリーリガンド（例えば、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、およびＢ７－Ｈ４）の発現について分析した。この比較は、これらの分子間の特徴的な発現パターンを明らかにした。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現は、活性化状態にかかわらず、インビトロ培養時にすべての細胞型ですぐに失われる。対照的に、ＰＤ－Ｌ１発現は、刺激時にＣＤ４＋Ｔ細胞上で、または培地単独での培養時にＣＤ１１ｂ高単球およびＣＤ１１ｃ＋ＤＣ上で上方制御され、刺激時にさらに強化される。ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、およびＢ７－Ｈ４の発現は、用いた培養条件下では顕著ではない。インビトロでのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現の喪失は、他のＢ７ファミリーリガンドと比較すると特有であるが、組織微小環境を模倣し損なう最適ではない培養条件を反映し得る。

【０５７４】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現が、どのようにインビボで制御されるかを考慮するために、ＣＤ４　ＴＣＲトランスジェニックマウスＤＯ１１．１０を、フロイント完全アジュバント（ＣＦＡ）中で乳化された同族抗原トリ卵白アルブミン（ＯＶＡ）で免疫した。免疫後２４時間時点で、流入領域リンパ節由来の細胞をＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現について分析した（図７Ａ）。アジュバント単独ではなく抗原（ＣＦＡ／ＯＶＡ）での免疫は、Ｆ４／８０＋マクロファージおよびＣＤ１１ｃ＋ＤＣの混合集団を含有したＣＤ１１ｂ＋ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）＋骨髄性細胞集団を劇的に増加させた。ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２とのさらなる比較は、ＰＤ－Ｌ１が最も高い構成的発現レベルを有するが、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）がそのような炎症性免疫応答中に最も高度に上方制御されることを明らかにする（図７Ｂ）。集合的に、これらのデータは、骨髄性ＡＰＣでのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の発現が、免疫系によって厳重に制御されており、免疫応答を制御し、Ｔ細胞免疫を調整するその役割に寄与し得ることを強く示唆する。

【０５７５】

そのＡＰＣでの発現の増加とは対照的に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現は、免疫時のより遅い時点で（すなわち、２４時間時点ではなく、４８時間時点で）活性化ＤＯ１１．１０　ＣＤ４＋Ｔ細胞で減少する（図８）。この結果は、インビボにおけるＣＤ４　Ｔ細胞でのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）発現が、能動免疫応答中に、その活性化状態およびサイトカイン微小環境によって制御されている可能性があることを示唆する。

【０５７６】

実施例３

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）シグナル伝達のＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答への機能的影響

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇ融合タンパク質を産生して、ＣＤ４＋Ｔ細胞応答におけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の制御的役割を試験した。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇ融合タンパク質は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に融合されたＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の細胞外ドメインを含有する。マイクロプレート上に固定化したとき、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－

Ｌ３）－Ｉｇは、停止細胞分裂によって判定すると、プレート結合された抗ＣＤ３刺激に応答して、バルク精製されたＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖を抑制したが、対照－Ｉｇは抑制しなかった（図９Ａ～Ｂ）。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）Ｉｇ融合タンパク質は、ＥＬＩＳＡによって判定すると、プラスチックウェルへの抗ＣＤ３抗体の吸収に影響を及ぼさず、それ故に非特異的阻害効果の可能性を排除した。ＰＤ－１　ＫＯ　ＣＤ４＋Ｔ細胞も抑制され（図９Ｃ）、ＰＤ－１がＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）の受容体ではないことを示す。ＰＤ－Ｌ１－ＩｇおよびＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇの阻害効果も直接比較した（図１０）。滴定量のＩｇ融合タンパク質がαＣＤ３とともにマイクロプレートに吸収されてＣＤ４＋Ｔ細胞を刺激したときに、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇは、ＰＤ－Ｌ１－Ｉｇ融合タンパク質と同様の阻害的有効性を示した。

【０５７７】

バルク精製されたＣＤ４＋Ｔ細胞が様々なサブセットを含有するため、分類されたナイーブ（ＣＤ２５－ＣＤ４４低ＣＤ６２Ｌ高い）およびメモリー（ＣＤ２５－ＣＤ４４高ＣＤ６２Ｌ低）ＣＤ４＋Ｔ細胞サブセットへのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇの影響を評価した（図１１）。メモリー細胞上での有効性ははるかに低いが、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）は、両方のサブセットの増殖を抑制することができる。

【０５７８】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）媒介性抑制の機序をさらに理解するために、初期のＴＣＲ活性化マーカーの発現およびアポトーシスを、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇの存在下または不在下でＴ細胞活性化後に測定した。細胞増殖への負の影響と一致して、初期の活性化マーカーＣＤ６９、ＣＤ４４、およびＣＤ６２Ｌの発現における包括的な抑制が存在する（補足図１２Ａ）。その一方で、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇ融合タンパク質は、アポトーシスを誘導しなかった。それとは逆に、ＴＣＲ活性化の早期（２４時間）および後期（４８時間）の両方で、対照－Ｉｇよりも少ないアポトーシス（アネキシンＶ＋７ＡＡＤ細胞の割合によって判定される）がＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇの存在下で見られた（図１２Ｂ）。例えば、２４時間時点で、全体の「非ゲート化」集団において、約２７％の細胞がＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇの存在下でアポトーシスであり、約３９％の対照細胞がアポトーシスであった。生細胞Ｒ１ゲート内の細胞を試験した際、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇで処理したときに、約７２．６％の対照細胞がアポトーシスになった一方で、４３．５％の細胞のみがアポトーシスになったという理由から、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇが活性化誘導細胞死（ＡＣＩＤ）を強力に阻害したことが明らかである。同様の結果が４８時間時点でも見られた。したがって、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡが初期ＴＣＲ活性化および停止細胞分裂を抑制することによってＣＤ４＋Ｔ細胞応答を負に制御するが、アポトーシスに最小限の直接影響しか及ぼさないようである。この抑制機序は、Ｂ７－Ｈ４のものに類似している。Ｓｉｃａ，ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１８：８４９－８６１。

【０５７９】

２段階アッセイを開発して、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇが活性化前のＣＤ４　Ｔ細胞を抑制することができるか、およびその抑制効果がどの程度持続するかを判定した。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の抑制効果が、活性化後２４時間時点でそれを除去した後に持続することが示される（図９Ｄ）。加えて、ナイーブと活性化前ＣＤ４＋Ｔ細胞の両方ともに、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇによって抑制することができた。図９Ｄ（ｉ）、９Ｄ（ｉｉｉ）、および９Ｄ（ｉｖ）を参照されたい。

【０５８０】

次に、ＣＤ４＋Ｔ細胞サイトカイン産生へのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇの影響を分析した。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、バルク精製されたＣＤ４＋Ｔ細胞培養からのＴｈ１サイトカインＩＬ－２およびＩＦＮαの産生を抑制した（図１３Ａ～Ｂ）。別個のナイーブ（ＣＤ２５－ＣＤ４４低ＣＤ６２Ｌ高）

およびメモリー（ＣＤ２５－ＣＤ４４高ＣＤ６２Ｌ低）ＣＤ４＋Ｔ細胞集団へのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの影響をさらに試験した。メモリーＣＤ４＋Ｔ細胞が、ＣＤ４＋Ｔ細胞コンパートメント内のサイトカイン産生の主な供給源であり、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡがこの産生を抑制することができることが示される（図１３Ｃ～Ｄ）。ＣＤ８＋Ｔ細胞からのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡのＩＦＮα産生への同様の阻害効果も示された（図１３Ｅ）。ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞によるサイトカイン産生へのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡのこの阻害効果は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡが免疫応答を下方制御する阻害性リガンドであるという仮説と一致する。

【０５８１】

次に、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの阻害効果を克服することができる因子を判定する研究を設計した。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡがＩＬ－２産生を抑制し、ＩＬ－２がＴ細胞生存および増殖に不可欠であることを前提に、ＩＬ－２は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの阻害活性を回避し得る。図１４Ａに示されるように、外因性ＩＬ－２は、細胞増殖へのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇの抑制効果を部分的に逆転させたが、ＩＬ－１５、ＩＬ－７、またはＩＬ－２３は逆転させなかった。高レベルのＩＬ－２による不完全な救出は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡシグナル伝達が単にＩＬ－２産生よりも広範のＴ細胞活性化経路を標的とすることを示す。その一方で、抗ＣＤ２８アゴニスト性抗体によって提供された強力な共刺激シグナルが、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ媒介性抑制を完全に逆転させた（図１４Ｂ）のに対して、中程度のレベルの共刺激は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡシグナル伝達によって引き続き抑制される（図１４Ｃ）。この結果は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ媒介性免疫抑制が、炎症程度の低い状態下でより効果的であるが、強力な正の共刺激性シグナルによって必然的に圧倒されることを示唆する。この点において、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡは、この特徴をＰＤ－Ｌ１およびＢ７－Ｈ４等の他の抑制性Ｂ７ファミリーリガンドと共有する。Ｓｉｃａ，ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１８：８４９－８６１、Ｃａｒｔｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｅｕｒ　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．３２：６３４－６４３。

【０５８２】

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質に加えて、ＡＰＣで発現されるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡが、ＡＰＣとＴ細胞との間の同族相互作用中に、抗原特異的Ｔ細胞活性化を抑制することができることを確認することが必要である。この目的のために、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－ＲＦＰまたはＲＦＰ対照タンパク質を、ＭＨＣＩＩおよびＢ７－２分子を安定的に発現する人工抗原提示細胞株（ＣＨＯ－ＡＰＣ）においてレトロウイルス形質導入によって過剰発現させた（Ｌａｔｃｈｍａｎ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　２：２６１－２６８）。ＣＨＯにおけるＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡを発現させる際の１つの課題は、恐らくＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ表面局在化への支援を欠く未知の環境のため、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの大半が細胞表面に局在化し損なったことである。制御モードを示唆するＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの細胞質尾部上に存在する明確なモチーフが存在しないが、この尾部は、その細胞内局在化に貢献し得る。したがって、尾部のないＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ変異体を設計し、ＣＨＯ細胞表面にうまく局在化することを見出した。

【０５８３】

Ｔ細胞応答を刺激するために、ＣＨＯ－ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡまたはＣＨＯ－ＲＦＰ細胞を、抗原ＯＶＡペプチドの存在下でＤＯ１１．１０　ＣＤ４＋Ｔ細胞とともにインキュベートした。図１５Ａ～Ｃに示されるように、ＣＨＯ－ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡは、ＣＨＯ－ＲＦＰ細胞よりも少ないＤＯ１１．１０細胞の増殖を誘導した。この抑制効果は、より低いペプチド濃度においてより顕著であり、

より強力な刺激性シグナルがＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの抑制効果を克服するといった概念と一致する。

【０５８４】

加えて、天然ＡＰＣへの全長ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの阻害効果が確認された。インビトロで培養された骨髄由来樹状細胞（ＢＭＤＣ）は、高レベルのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡを発現しない（図１６）。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－ＲＦＰまたはＲＦＰを、１０日間の培養期間中にレトロウイルス形質導入によってＢＭＤＣで発現させた。形質導入された細胞を、ＲＦＰ発現に基づいて同種に分類した。形質導入されたＤＣでのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの発現レベルを、抗ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡモノクローナル抗体での染色によって推定し、新たに単離された腹腔マクロファージでの発現レベルに類似しており、それ故に生理学的発現範囲内であることが見出された（図１６）。その後、分類されたＢＭＤＣを用いて、ＯＶＡペプチドの存在下でＯＶＡ特異的トランスジェニックＣＤ４＋Ｔ細胞（ＯＴＩＩ）を刺激した（図１５Ｄ）。ＢＭＤＣでのＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡの発現は、同族ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖応答を抑制した。この結果は、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質およびＣＨＯ－ＡＰＣ細胞を用いた先のデータと一致し、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡがＴ細胞媒介性免疫応答を抑制することができることを示唆する。

【０５８５】

実施例４

ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡトランスジェニックおよびノックアウトマウス

胚のレンチウイルス感染を用いて、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡを遍在的に発現する４匹のトランスジェニックマウスを産生した。これらのマウスは、ヒト伸長因子１プロモーターの制御下で全長ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡを発現する。これらのマウスを、レンチウイルスベクターｐＷＰＴを用いて生成した。他のＰＤ－Ｌ１ファミリーメンバーと同様に（Ａｐｐａｙ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６８：５９５４－８）、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡがインビボで負の制御因子として機能する一方で、αＣＤ３Ｔ細胞増殖をインビトロで共刺激する機能を果たすことが企図される。この点において、これらのマウスが自己免疫を自然発生的に発症することが見込まれ、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡトランスジェニックマウスにおけるインビボでの免疫応答（すなわち、体液性免疫応答、Ｔ細胞プライミング）を評価して、全身性自己免疫疾患の発症を評価する。

【０５８６】

ノックアウトマウスでは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡは、相同組み換えによって不活性化される。全長ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ配列を含有するＢＡＣクローンをＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ（登録商標）（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）から購入した。ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ標的ベクターを、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ遺伝子の２番目のエクソンの５’側にある１．６ｋｂフラグメントをネオマイシン遺伝子上流に挿入し、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ遺伝子の３番目のエクソンの３’側にある５ｋｂフラグメントを、ネオマイシン遺伝子下流に挿入することによって生成した。Ｂ６由来胚幹（ＥＳ）細胞を、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ標的ベクターとともに電気穿孔し、組み換えられたクローンを選択する。その後、選択されたクローンをＣ５７ＢＬ／６胚盤胞に注入し、結果として生じるキメラ雄性子孫をＦＬＰ欠失マウスと交配させて、ネオマイシンカセットを除去する。子孫における標的対立遺伝子の伝送をゲノムＤＮＡ由来のＰＣＲによって判定する。２番目および３番目のエクソンは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡドメインを含有し、それ故に結果として生じるマウスは、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ分子の不活性化形態のみを有する。

【０５８７】

抗原に対するＴ細胞応答、体液性免疫応答、顕性自己免疫（例えば、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患）、および誘発性自己免疫疾患（実験的自己免疫性脳脊髄炎）に対する感受性の増大の評価を含む、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）またはＶＩＳＴＡ欠損マウスの全体的な免疫能力を、他のＰＤ－Ｌ－／－マウスと同様に判定する（Ｃｈｅｎ（２００４）（上記））。

【０５８８】

実施例６

特定のＶＩＳＴＡによるＶＩＳＴＡ封鎖モノクローナル抗体は、インビトロでＴ細胞応答を高める。

ＶＩＳＴＡ媒介性抑制を中和するＶＩＳＴＡ特異的モノクローナル抗体（１３Ｆ３）を特定した（図１８）。ＣＤ１１ｂ^{高}骨髄性ＡＰＣをナイーブマウスから精製して、１３Ｆ３の存在下または不在下でＯＴ－ＩＩトランスジェニックＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を刺激した。その中和作用と一致して、１３Ｆ３は、ＣＤ１１ｂ^{高}骨髄性細胞によって刺激されたＴ細胞増殖を高め、高レベルのＶＩＳＴＡを発現することを示した。

【０５８９】

実施例７

抗ＶＩＳＴＡは、抗腫瘍免疫を高める。

Ｔ細胞活性化を高める抗ＶＩＳＴＡの能力のため、抗ＶＩＳＴＡが免疫原性腫瘍に対する防御的免疫応答を高めるかを評価した。我々が多くの経験を有するモデルは、膀胱癌、ＭＢ４９である。ＭＢ４９は、雄性抗原を発現し、それ故に雌マウスにおいて適度に免疫原性であるが、免疫介入がなければ、増殖し、雌マウスを死滅させる。αＶＩＳＴＡ治療の有効性を試験するために、雌マウスにＭＢ４９腫瘍細胞を皮下（ｓｑ）投与し、αＶＩＳＴＡで処理した。その数日後、マウスを安楽死させるまで腫瘍サイズを測定した。図１９は、抗ＶＩＳＴＡ治療が腫瘍成長を大いに低下させることを示す。これは、細胞媒介性免疫（ＣＭＩ）応答を強化させる抗ＶＩＳＴＡの能力に起因する。

【０５９０】

実施例８

４匹のマウス腫瘍モデルにおける腫瘍退縮に対するＶＩＳＴＡの効果

免疫原性膀胱癌腫瘍ＭＢ４９における実験は、モノクローナル抗体１３Ｆ３を用いたＶＩＳＴＡの中和が腫瘍成長から宿主を保護することを示している。このデータは、ＶＩＳＴＡが、ＭＤＳＣを非常に高度に発現するため、腫瘍の微小環境においてかなりの負の免疫制御役割を果たすことを示す。免疫原性（ＭＢ４９）および高度に非免疫原性（Ｂ１６）の腫瘍モデルへの抗マウスＶＩＳＴＡの効果を試験する研究は、αＶＩＳＴＡ治療の有効性をさらに確認し、作用機序を明らかにし、最適な用量およびタイミングを選択するための基準を提供する。各腫瘍モデルの論理的根拠が以下に詳述される。

【表３】

腫瘍名	腫瘍型	宿主	群	アッセイ
MB49	膀胱癌	B6雌	αVISTA 対照Ig	腫瘍成長 生存 免疫/ 自己免疫アッセイ
MB49	膀胱癌	B6雄		
B16.F10	黒色腫	B6雄または雌		
ID8	卵巣癌	B6雌		

【０５９１】

雌マウスにおけるＭＢ４９：このマウスモデルにおける有効性が実証されている。このモデルにおけるＭＤＳＣは、上昇したレベルのＶＩＳＴＡも発現する。このモデルにおいて、Ｈ－Ｙ抗原の存在のため、ＭＢ４９腫瘍は、適度に免疫原性である。抗ＶＩＳＴＡ治療が効果的であることが判明しているため、このモデルを「正の」対照とし、抗ＶＩＳＴＡ治療の投薬（１～１００μｇ／マウス）およびタイミング（腫瘍接種当日、または腫瘍接種の４、７、１０日後；治療的介入）を決定する。

【０５９２】

雄マウスにおけるＭＢ４９：雌マウスに有効な用量およびタイミングを用いて、（腫瘍の免疫原性がより低い）雄マウスにおける抗ＶＩＳＴＡ治療の有効性を判定する。

【０５９３】

Ｂ１６黒色腫：抗ＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体がこのモデルにおいて非常に有効であることが示され、マウスモデルがヒトにおける成功の予測に有益であった非免疫原性腫瘍を表す。投与計画およびタイミングは、ＭＢ４９モデルにおいて有効であると示される投与計画およびタイミングに類似している。

【０５９４】

ＩＤ８卵巣癌：ＶＩＳＴＡ発現がＭＤＳＣにおいて非常に高度であることが示されたのは、このモデルにおいてである。ＩＤ８腫瘍を有するマウスを、腫瘍接種時に、または接種後５、１５、２５日目にαＶＩＳＴＡで処理する。

【０５９５】

方法。Ｂ６野生型マウスを用いて、上記のすべてのマウス腫瘍モデルの寛解に最適な抗ＶＩＳＴＡ治療の用量およびタイミングを決定する。用いたモデルが表３に列記される。

【０５９６】

この用量およびタイミングアッセイの読み出しは、腫瘍成長動態である。ＭＢ４９およびＢ１６研究について、すべての腫瘍研究を皮内（ｉ．ｄ．）接種によって行い、それ故に腫瘍サイズを容易に判定することができる。腫瘍測定結果を、カリパスを用いて２～３日毎に収集する。これらのモデルのそれぞれにおいて、抗ＶＩＳＴＡまたは対照抗体の影響を、腫瘍成長を遅延させるか、または腫瘍退縮を促進するその能力について試験する。その後、ルシフェラーゼ形質導入ＩＤ８を用いてＩＤ８の成長を行い、ＩＶＩＳ　Ｗｏｒｋｓｔａｔｉｏｎを用いて全身撮像を行う。加えて、宿主生存もまた判定する。

【０５９７】

腫瘍成長におけるデータを平均腫瘍体積±標準誤差として表し、群間の差を両側ＡＮＯＶＡによって分析する。０．０５未満の可能性（ｐ）値を、統計的に有意であると見なす。生存データを、群間の生存差のの有意性を確証するために用いられるウィルコクソン順位検定およびｌｏｇ順位検定を伴うカプラン・マイヤー法を用いて分析する。Ｂ１６モデルにおいて、マウスが白斑を発症する頻度を判定する。

【０５９８】

これらの方法を用いることにより、非免疫原性腫瘍モデルのうちのいくつかにおける対照抗体で処理されたマウスと比較して、抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体で処理されたマウスにおいて腫瘍成長が遅延する、および／または腫瘍退縮がもたらされる。抗ＶＩＳＴＡ治療が免疫原性腫瘍モデルにおける腫瘍成長を遅延させることが既に示されている。これらの腫瘍モデルのそれぞれがそれら独自の特定の成長動態を有し、腫瘍成長をもたらして免疫を抑制するＶＩＳＴＡへの予測される依存を有するため、マウスに、腫瘍接種時またはその後の時点のいずれかの時点でモノクローナル抗体を投与する。さらに、少なくとも３つの異なる濃度の抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体を試験して、治療効果に最適な用量を判定する。

【０５９９】

図２０Ａ～Ｅに示されるように、ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体での処置は、（Ａ）ＭＢ４９、（Ｂ）ＭＣＡ１０５、（Ｃ）ＥＧ７腫瘍細胞を皮下（ｓｑ）接種するか、または（Ｄ）ＩＤ８ルシフェラーゼ腫瘍細胞を腹腔内（ｉｐ）接種するかのいずれかを行い、１日目から始めて１日おきにＶＩＳＴＡモノクローナル抗体１３Ｆ３で処理した（３００μｇ）これらの４つすべてのマウス腫瘍モデルにおける腫瘍成長を低下させた。皮下腫瘍成長を監視した。ＩＤ８－ルシフェラーゼ腫瘍について、マウスを、Ｘｅｎｏｇｅｎ　ＩＶＩＳを用いて３０日目に撮像した。（Ｅ）腫瘍を有するマウスにおける骨髄性白血球でのＶＩＳＴＡ発現もまた判定した。流入領域リンパ節および腫瘍組織（腹水）を、ＶＩＳＴＡ発現について分析した。これらの所見は、ＭＤＳＣで発現されたＶＩＳＴＡが防御的抗腫瘍免疫の発達を妨害する主な抑制分子であり、αＶＩＳＴＡがこの抑制活性を解除して、免疫介入を可能にし、腫瘍成長を遅延させることを示す。これらの所見は、自己免疫疾

患における骨髄性細胞上のＶＩＳＴＡが炎症程度を制御する際に極めて重要な役割を果たすという結論も支持する。

【０６００】

実施例９

オリゴマーＶＩＳＴＡおよびＶＩＳＴＡ融合タンパク質の合成

インビトロでの可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、抑制性でなく、その細胞への結合を容易に検出することができない。対照的に、プラスチックに結合されるこの分子は、大いに抑制性である。加えて、インビボでのＶＩＳＴＡ－Ｉｇを用いた研究は、明白な活性を示さなかった。これらの研究に関して、作成されたＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、ＦｃＲ結合を妨げるＣＨ２－ＣＨ３ドメインで突然変異を有し、それ故にインビボでは細胞親和性ではない。最近の研究は、四量体ＰＤ－Ｌ１が、単量体ＰＤ－Ｌ１２６よりも１００倍高く（K_d６×１０$^{-8}$Ｍ）ＰＤ－１に結合し、細胞への結合が容易に検出可能であったことを示している。四量体ＰＤ－Ｌ１をインビボで試験しなかったが、インビトロで、四量体ＰＤ－Ｌ１が天然ＰＤ－Ｌ１による機能的抑制を遮断することを示した。同様の方法を用いて、ＶＩＳＴＡ経路を標的とし、インビトロおよびインビボで強力な免疫抑制活性を誘起するオリゴマーを作製する。

【０６０１】

そのようなオリゴマーを、ＶＩＳＴＡまたはそのフラグメント、例えば、細胞外ドメインまたはその部分がオリゴマーの構成要素として用いられる少なくとも５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、または２００アミノ酸長の単量体細胞外ドメインを用いて構築する。これらの方法において、本発明者らは、十分に確立されたＭＨＣ四量体技術を利用する。これらの方法において、二価から七価に及ぶ結合価を有する一連のＶＩＳＴＡ複合体を生成するために、ＶＩＳＴＡ細胞外ドメイン構築物またはフラグメントを、（本明細書で特定された）様々なオリゴマー形成ドメインのＮ末端に連結させる。

【０６０２】

これによって、二量体、三量体、四量体、五量体、および七量体アセンブリの安定した形成をもたらす高親和性コイルドコイルドメインに基づいて、一連の非共有結合オリゴマーを作成する。これらのオリゴマー構築物を、宿主細胞（例えば、大腸菌）で発現させる。発現が大腸菌で達成されると、発現されたオリゴマーを再び折り畳み、標準の研究室プロトコルを用いて封入体から精製する。このアプローチは、ＭＨＣペプチド複合体および三量体ＧＩＴＲＬ６６を含む生物学的および構造的分析用の質の高い物質を日常的に産生している。その後、単離されたオリゴマータンパク質を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、分析ゲル濾過、分析超遠心、および質量分析によって評価する。これらの品質管理手段は、インビトロおよびインビボ研究における十分に特徴付けられた均質の物質の利用能を確実にする。各個別のＶＩＳＴＡ複合体が細胞表面結合ＶＩＳＴＡ受容体と生産的に相互作用するように位置付けられるため、これらの構築物の並列構成は、結合価がオリゴマー状態に等しい分子をもたらす。上述の構築物は、オリゴマー状態の極度の安定性および均質性を有する。（非共有結合コイルドコイルオリゴマー形成ドメインは、典型的には、９５℃の融解温度を示す七量体配列を除いて、１００℃を超える融解温度を示す。

【０６０３】

加えて、細胞親和性であるか、または細胞親和性ではない二量体ＶＩＳＴＡ－Ｉｇを四量体化する。ＩｇＧ１　Ｆｃ（野生型ＩｇＧ１および既存の非ＦｃＲ－結合ＩｇＧ１の両方）とインフレームのＶＩＳＴＡのＦｃ融合構築物を、Ｎ末端ＢｉｒＡ部位で修飾して酵素をビオチン化し、ｐＩＲＥＳ２－ＥＧＦＰベクターにクローニングした。酵素ビオチン化は、アビジン多量体化時に特定の単一残基修飾および配向を可能にする。このアプローチは、Ｂ７－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、およびＴＩＭ－３を含む多数のＩｇ融合タンパク質の生成に用いられている。その後、発現されたタンパク質をインビトロで酵素的にビオチン化し、サイズ排除ＨＰＬＣによって精製し、ＰＥ－アビジンを用いて四量体化する。結果として生じる細胞親和性または非細胞親和性の四量体をインビボで評価する。

【０６０４】

これらの操作された多量体ＶＩＳＴＡタンパク質は、ＶＩＳＴＡ経路および免疫抑制における介入が治療的に正当化される自己免疫および他の状態の治療において有用である。

【０６０５】

実施例１０

免疫抑制を誘導するためのＶＩＳＴＡアデノウイルスベクター

組み換えアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）を用いた遺伝子導入は、遺伝子療法において大きな技術開発となっている。具体的には、ＰＤ－Ｌ１遺伝子またはＣＴＬＡ４－ＩｇおよびＣＤ４０－ＩｇのＡＡＶ媒介遺伝子送達は、ループス（Ｋｙｔｔａｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）および心臓移植の自己免疫疾患モデルにおける治療的有効性を達成している。これらの方法を用いて全長ＶＩＳＴＡまたはオリゴマーＶＩＳＴＡ細胞外ドメインのいずれかを送達し、およびそれらの治療効果をＥＡＥモデルにおいて評価する。全長マウスＶＩＳＴＡまたはオリゴマーＶＩＳＴＡ細胞外ドメインのいずれかを発現する組み換えアデノウイルスベクターを、製造業者の取扱説明書に従ってアデノ－ＸＴＭ発現系（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて作成する。手短に言えば、ＶＩＳＴＡを、ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターの制御下で、Ｅ１およびＥ３を欠失したｐＡｄＤＥＳＴ系発現ベクターにクローニングする。その後、アデノウイルスを発現するＶＩＳＴＡおよび対照ｌａｃＺを細胞溶解物から精製する。ＶＩＳＴＡの全身性過剰発現の場合、アデノウイルスを、免疫化による疾患誘導の前もしくは直後、または疾患発症後のいずれかの時点で、静脈内尾静脈注入（1×10^{9}プラーク形成単位［Ｐｆｕ］）によってマウスに投与する。対照マウスは、１００μＬのＰＢＳを受ける。疾患の発症および変化をＳＪＬマウスおよびＣ５７ＢＬ／６マウスの両方で監視し、これらは、異なる疾患進行パターンを示し、ヒトＭＳ患者の臨床症状の２つのはっきりと異なる形態を表す。

【０６０６】

実施例１１

ＶＩＳＴＡの構造研究およびＶＩＳＴＡ機能を有する分子決定基の決定

組織化されたシグナル伝達複合体の親和性、特異性、オリゴマー状態、ならびに形成および局在化は、免疫機能への重要な寄与因子である。受容体－リガンド細胞外ドメインの組織化が、非共有結合した細胞質シグナル伝達および足場分子の動員、組織化、および機能を直接制御するため、これらの特徴はすべて、シグナル伝達および免疫を制御に影響を与える。ＶＩＳＴＡの高分解能結晶構造を、細菌、昆虫、および哺乳動物発現系を含む技法、ならびにハイスループット結晶化および構造決定アプローチを用いて判定する。結晶学的に観察されたジスルフィド結合パターンを確証するために、ＴＩＭ－３およびヒトＤｃＲ３５９の研究の支持に成功したアプローチを用いた高分解能質量分析を用いる。これらの構造的結果に基づいて、変化したオリゴマー特性を有する一連の突然変異体、ならびにＶＩＳＴＡ－ＩｇＶドメインの任意の摂動領域付近の突然変異体を設計する。これらの変異体タンパク質は、ＶＩＳＴＡ機能に対するさらなる直接的な機構的洞察を提供し、本明細書で特定される自己免疫、アレルギー性、および炎症性疾患等の免疫抑制が所望される治療薬に有用であるはずである。これらの突然変異体、特にオリゴマーをインビトロ系で試験し、疾患進行、疾患寛解、または自己免疫もしくは炎症性状態の発症からの動物の防御への免疫抑制効果を評価するために、自己免疫および炎症性疾患動物モデルを評価する。

【０６０７】

これらのオリゴマーＶＩＳＴＡタンパク質は、自己免疫における免疫介入の標的として、ＶＩＳＴＡ経路および機能を活性化する。この介入は、免疫を抑制し、自己免疫抑制が所望される自己免疫疾患および他の状態に治療的利益を与える。これは、ＥＡＥおよびコラーゲン誘導関節炎動物モデル等の異なる自己免疫および炎症性モデルにオリゴマー化ＶＩＳＴＡタンパク質を投与することによって達成される。加えて、上述のように、全長ＶＩＳＴＡまたはＶＩＳＴＡオリゴマーを過剰発現するアデノウイルスベクターをインビボで構築および試験する。これらの研究は、ＶＩＳＴＡオリゴマーの免疫抑制効果を確認する。

【０６０８】
実施例１２
条件付き過剰発現ＶＩＳＴＡを用いた実験
トランスジェニックマウス株（ＶＩＳＴＡトランスジェニックマウス株：Ｒ２６ＳＴＯＰＦＬＶＩＳＴＡ（ＶＩＳＴＡ）
ｌｏｘＰ隣接ＳＴＯＰカセットに先導されたＶＩＳＴＡの全長ｃＤＮＡを含有する標的構築物は、遍在的に発現したＲＯＳＡ２６遺伝子座を標的としている。複数の正しく標的されたＲ２６ＳｔｏｐＦＬ／－ＶＩＳＴＡ小マウスが生まれ、ＣＭＶ－Ｃｒｅ欠失株６０上で繁殖させる。ＶＩＳＴＡ×ＣＭＶ－ｃｒｅにおける予備データは、ＧＦＰおよびＶＩＳＴＡ発現の高まりを確認する。これらのマウスの免疫状態の研究（抗原、抗体力価へのＴ細胞応答）は、表現型の抑制を確認する。ＶＩＳＴＡ株を、ＣＤ４－ｃｒｅ、ＣＤ１１ｃ－ｃｒｅ、およびＬｙｓ－Ｃｒｅとを異種交配させて、ＶＩＳＴＡ発現の系統位置が抑制に影響を及ぼすかを判定する。Ｔ細胞の表現型および機能もまた判定し、ＶＩＳＴＡの過剰発現がａＴｒｅｇの生成をもたらすかを判定する。これらの研究において、ＯＶＡ－免疫ｃｒｅ×ＶＩＳＴＡ株由来のＴｒｅｇを野生型宿主に養子導入して、抗原免疫化が、過剰発現されたＶＩＳＴＡの存在下で、抗原特異的Ｔｒｅｇを誘導するかを確かめる。これは、ＶＩＳＴＡがＴｒｅｇ分化に影響を与えることを確証するはずである。

【０６０９】
加えて、研究は、ＥＡＥモデルにおいて達成され、これにより疾患発症に関する異なる系統へのＶＩＳＴＡタンパク質の効果（ＣＤ４－、ＣＤ１１ｃ－、Ｌｙｓ－ｃｒｅと異種交配させることによって）を評価する。疾患を、ＶＩＳＴＡ突然変異体の系統制限過剰発現によって、またはＣＭＶ×ＶＩＳＴＡ突然変異体において抑制することができると想定して、疾患発症の一時制御もＣｒｅ－ＥＲＴ２×ＶＩＳＴＡηを用いている。タモキシフェンの投与により、ＶＩＳＴＡの過剰発現を、疾患発症前、疾患発症時、または疾患ピーク時に誘導して、ＶＩＳＴＡが、免疫の誘導および／またはエフェクター相に影響を与えることができるかを決定することができる。ＢＭキメラマウスを用いて、ＶＩＳＴＡの一時的に制限された過剰発現を造血コンパートメントに制限することができる。時間窓の制御を理解するために、ＶＩＳＴＡを過剰発現させ、ＶＩＳＴＡを遺伝的にオンにし、その後、抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体の投与で血清学的にオフにする。これらの研究は、自己免疫疾患の発症および進行を制御するためにＶＩＳＴＡがいつどこで作用すべきかを判定する。

【０６１０】
実施例１３
ＣＤ４０／ＴＬＲアゴニストワクチンの有効性への抗ＶＩＳＴＡ抗体の効果
図２１に示されるように、ワクチン有効性への抗ＶＩＳＴＡ抗体の効果をアッセイする実験を行った。これらの結果は、抗ＶＩＳＴＡがＣＤ４０／ＴＬＲワクチンの治療的有効性を高めることを示す。Ｃ５７ＢＬ／６マウスの皮下に、１Ｘ１０５転移性Ｂ１６．Ｆ１０黒色腫細胞でチャレンジを行った。４日後、マウスに、抗ＶＩＳＴＡ（２００μｇ×３／週）を伴って、または伴わずに、１００μｇの腫瘍関連抗原ΔＶ、１００μｇのαＣＤ４０　ＦＧＫ４５（ＣＤ４０アゴニスト性抗体）、および１００μｇのＳ－２７６０９（ＴＬＲ７アゴニスト）をワクチン接種した。カリパス測定によって腫瘍の成長を監視した。

【０６１１】
実施例１４
発現プロファイリング
Ｔｒｅｇ細胞の確立した発現プロファイルとの比較を容易にするために、標準の増殖および活性化条件を採用した（ＭｃＨｕｇｈ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）（上記））。手短に言えば、新たに単離したＴｒｅｇ細胞（約９６％陽性）を、１０６／ｍＬで、１０％ウシ胎児血清を補充した完全ＲＰＭＩ培地に、抗ＧＩＴＲ（ＤＴＡ－１）で処理したか、または処理していない抗ＣＤ３で事前にコーティングした２４ウェルプレート中の１００単

位ＩＬ－２に接種した（Ｓｈｉｍｉｚｕ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）（上記））。これらの細胞を３７℃で０および１２時間培養し、ＲＮＡを精製し、その後、ＡＦＦＹＭＥＴＲＩＸ（登録商標）マウスゲノムＡ４３０オリゴヌクレオチドアレイを用いて分析した。

【０６１２】

静止または活性化ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞群のデータを比較することにより、遺伝子発現パターンが当該技術分野で確立された遺伝子発現パターンに類似していることが見出された（Ｇａｖｉｎ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）（上記）、ＭｃＨｕｇｈ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）（上記））。ＧＩＴＲシグナル伝達によって制御される遺伝子を特定するために、抗ＧＩＴＲで処理したか、または処理していない異なる細胞集団間の遺伝子発現プロファイルを比較した。以前に特徴付けられていないＶＩＳＴＡおよびＴｒｅｇ－ｓＴＮＦを含む、既知の遺伝子のリストおよび未知の遺伝子のリストを作成した。

【０６１３】

実施例１５

ＶＩＳＴＡの分子クローニング、レトロウイルス産生、および細胞のレトロウイルス形質導入

全長ＶＩＳＴＡを、精製されたマウスＣＤ４＋Ｔ細胞からクローニングした。Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮＡｍｉｎｉキットを用いて全ＲＮＡをＣＤ４＋Ｔ細胞から単離した。Ｂｉｏ－Ｒａｄ　ｉＳｃｒｉｐｔＴＭ　ｃＤＮＡ合成キットを用いてｃＤＮＡを生成した。全長ＶＩＳＴＡを増幅し、レトロウイルスベクターｐＭＳＣＶ－ＩＲＥＳ－ＧＦＰのＥＣｏＲＩ－ＸｈｏＩ部位（Ｚｈａｎｇ＆Ｒｅｎ（１９９８）Ｂｌｏｏｄ　９２：３８２９－３８４０）にクローニングし、ここでＩＲＥＳ－ＧＦＰフラグメントがＲＦＰに置き換えられ、それ故にＲＦＰのＮ末端に融合されたＶＩＳＴＡの融合タンパク質をもたらした。ＶＩＳＴＡ－ＲＦＰレトロウイルスベクターをエコトロピックパッケージングベクターｐＣＬ－Ｅｃｏ（ＩＭＧＥＮＥＸ　Ｃｏｒｐ．）で一緒に一過性にトランスフェクトすることにより、ヘルパーを含まないレトロウイルスをＨＥＫ２９３Ｔ細胞に生成した。８μｇ／ｍＬのポリブレン（Ｓｉｇｍａ）の存在下で、２０００ｒｐｍで室温にて４５分間スピン感染させることにより、マウスＴ細胞株ＥＬ４細胞または骨髄由来ＤＣのレトロウイルス形質導入を行った。

【０６１４】

実施例１６

ＶＩＳＴＡ－ＩＧ融合タンパク質の産生

ＶＩＳＴＡの細胞外ドメイン（アミノ酸３２～１９０）を増幅し、親ベクターＣＤＭ７ＢのＳｐｅＩ－ＢａｍＨＩ部位にクローニングした。Ｈｏｌｌｅｎｂａｕｇｈ，ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ １８８：１－７。このベクターは、ヒトＩｇＧ１の定常およびヒンジ領域の突然変異型を含有し、Ｆｃ受容体への結合がはるかに低い。結果として生じたベクターＣＤＭ７Ｂ－ＶＩＳＴＡを、ＤＨＦＲ発現ベクターｐＳＶ－ｄｈｆｒ（ＭｃＩｖｏｒ＆Ｓｉｍｏｎｓｅｎ（１９９０）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １８：７０２５－７０３２）でＣＨＯ（ｄｈｆｒ－）細胞株（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－９０９６）にコトランスフェクトした。ヌクレオチドを有しない培地ＭＥＭ－α（ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ（登録商標））中のＶＩＳＴＡ－Ｉｇを発現する安定したＣＨＯ細胞クローンを選択した。０．５～１μＭのメトトレキサート（ＳＩＧＭＡ（登録商標）Ｍ９９２９）でのさらなる増幅により、高レベルの可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質を発現するクローンを得た。標準のタンパク質Ｇカラム親和性クロマトグラフィーを用いて、この融合タンパク質を培養上清からさらに精製した。

【０６１５】

実施例１７

ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体の生成

アルメニアンハムスターを、ＶＩＳＴＡ－ＲＦＰを過剰発現するＥＬ４細胞で週に４回免疫し、その後、ＣＦＡ中で乳化されたＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質で追加免疫した。追加免疫の４週間後、ハムスターを可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質で再度追加

免疫した。最後の追加免疫の４日後、ハムスターの脾臓細胞を収集し、標準のハイブリドーマ融合技法（Ｓｈｕｌｍａｎ，ｅｔ　ａｌ．（１９７８）Ｎａｔｕｒｅ　２７６：２６９－２７０）を用いて、骨髄腫細胞株ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１５８１）に融合させた。希釈の制限後にＶＩＳＴＡ特異的抗体を分泌するハイブリドーマクローンを選択し、ＥＬＩＳＡおよびフローサイトメトリー法の両方でスクリーニングした。

【０６１６】

実施例１８

ＶＩＳＴＡの阻害活性

ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞抗原受容体トランスジェニックＴ細胞および抗原刺激を伴ってインビトロでＰＤ－Ｌ１を過剰発現する抗原提示細胞を用いて、ＰＤ－Ｌ１の阻害活性を明らかにした（Ｃａｒｔｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３２：６３４－４３）。同様に、全長ＶＩＳＴＡを発現する本明細書に開示されるレンチベクターを、クラスＩＩの主要組織適合複合体（ＭＨＣ）およびクラスＩのＭＨＣを発現する細胞株に形質導入する。確立された方法に従って空ベクター形質導入またはＶＩＳＴＡ形質導入抗原提示細胞によって提示される抗原へのＴＥａ　Ｔｇまたは２ＣトランスジェニックＴ細胞の応答を判定する。

【０６１７】

実施例１９

モノクローナル抗体産生

ＶＩＳＴＡをマウスＢ細胞株Ａ２０で過剰発現させ、組み換え細胞株を用いてアルメニアンハムスターを免疫した。細胞で５回免疫した後、ハムスターを、ＣＦＡ中で乳化された精製されたＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質で追加免疫した。４週後、可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇで最後の追加免疫を与えた。その後、ハムスター脾細胞のＳＰ２／０細胞との融合を４日目に実施した。ＥＬＩＳＡによってＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質を認識し、ＶＩＳＴＡを染色したが、マウスＴ細胞株ＥＬ４で過剰発現されたＰＤ－Ｌ１は染色しなかった１６個の異なるクローンを特定した。これらのクローンのうち１１個をうまくサブクローニングし、細胞および組織上の内因性ＶＩＳＴＡを染色し、ＶＩＳＴＡ機能を遮断するそれらの能力の評価のために調製した。

【０６１８】

実施例２０

ＶＩＳＴＡ－ＩＧ複合体はＴ細胞応答を負に制御する。

免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーは、Ｂ７ファミリーリガンドおよび受容体を含む、多数の極めて重要な免疫制御因子からなる。ＶＩＳＴＡは、新規な構造的に異なるＩｇスーパーファミリー阻害性リガンドであり、その細胞外ドメインは、Ｂ７ファミリーリガンド ＰＤ－Ｌ１に対する相同性を有する。この分子は、Ｔ細胞活性化のＶドメインＩｇ抑制因子（ＶＩＳＴＡ）として指定される。ＶＩＳＴＡは、主に造血細胞に発現し、ＶＩＳＴＡ発現は、骨髄性抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞では高く制御される。ＡＰＣでの可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質またはＶＩＳＴＡ発現は、インビトロでのＴ細胞増殖およびサイトカイン産生を阻害する。ＶＩＳＴＡ特異的モノクローナル抗体は、インビトロでのＶＩＳＴＡ発現ＡＰＣによりＴ細胞応答のＶＩＳＴＡ誘導抑制を妨害する。さらに、抗ＶＩＳＴＡ処置は、マウスにおいてＴ細胞媒介性自己免疫疾患実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を悪化させる。最終的に、腫瘍細胞でのＶＩＳＴＡ過剰発現は、マウスにおけるインビボでの防御的抗腫瘍免疫を妨害する。これらの発見は、新規な免疫制御性分子であるＶＩＳＴＡが、他のＩｇスーパーファミリーのメンバーと重複しない機能的活性を有し、自己免疫の発達および癌における免疫監視に役割を果たし得ることを示す。Ｗａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２０８（３）：５７７－５９２を参照されたい。この実施例において、ＶＩＳＴＡは、「ＰＤ－ＸＬ」とも称され得る。

【０６１９】

材料および方法

マウス。Ｃ５７ＢＬ／６マウス、ＯＴ－ＩＩ　ＣＤ４トランスジェニックマウス、およびＳＪＬ／Ｊマウスを Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから購入した。ＦｏｘＰ３－ＧＦＰレポーターマウスは、前述のものであり（Ｆｏｎｔｅｎｏｔ，ｅｔ　ａｌ．２００５）、Ａ．Ｒｕｄｅｎｓｋｙ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｓｃｈｏｏｌ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）によって提供された。ＰＤ－１　ＫＯマウスは、Ｔ．Ｈｏｎｊｏ（Ｋｙｏｔｏ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｋｙｏｔｏ，Ｊａｐａｎ、Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ，ｅｔ　ａｌ．１９９９，２００１）によって提供された。すべての動物を、Ｄａｒｔｍｏｕｔｈ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｃｈｏｏｌの病原体フリーの施設で維持した。すべての動物プロトコルは、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ　Ａｎｉｍａｌ　ＣａｒｅおよびＵｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ　ｏｆ　Ｄａｒｔｍｏｕｔｈ　Ｃｏｌｌｅｇｅの承認を受けたものであった。

【０６２０】

抗体、細胞株、および試薬。抗体α－ＣＤ３（２Ｃ１１）、α－ＣＤ２８（ＰＶ－１）、α－ＣＤ４（ＧＫ１．５）、α－ＣＤ８（５３－６．７）、α－ＣＤ１１ｂ（Ｍ１／７０）、α－Ｆ４／８０（ＢＭ８）、α－ＣＤ１１ｃ（Ｎ４１８）、α－ＮＫ１．１（ＰＫ１３６）、α－Ｇｒ１（ＲＢ６－８Ｃ５）、α－ＰＤ－Ｌ１（ＭＩＮ５）、α－ＰＤ－Ｌ２（ＴＹ２５）、α－Ｂ７－Ｈ３（Ｍ３．２Ｄ７）、およびα－Ｂ７－Ｈ４（１８８）を、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅから購入した。ＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、組み換えマウスＩＦＮ－γ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）、ヒトＩＬ－２（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）、および可溶性ＰＤ－Ｌ１－Ｉｇ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を、指示された濃度で用いた。ＣＦＡおよびトリＯＶＡをＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。Ｂ細胞リンパ腫細胞株Ａ２０（ＢＡＬＢ／ｃ由来）を、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから得た。

【０６２１】

ＶＩＳＴＡの分子クローニング、レトロウイルス産生、および細胞のレトロウイルス形質導入。全長ＶＩＳＴＡを、精製されたマウスＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞からクローニングした。ＲＮＡｍｉｎｉキット（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて、全ＲＮＡをＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞から単離した。ｉＳｃｒｉｐｔ　ｃＤＮＡ合成キット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を用いて、ｃＤＮＡを生成した。全長ＶＩＳＴＡを増幅し、レトロウイルスベクターｐＭＳＣＶ－ＩＲＥＳ－ＧＦＰのＥＣＯＲＩ－ＸｈｏＩ部位（Ｚｈａｎｇ　ａｎｄ　Ｒｅｎ，１９９８）にクローニングし、ここでＩＲＥＳ－ＧＦＰフラグメントがＲＦＰに置き換えられ、それ故にＲＦＰのＮ末端に融合されたＶＩＳＴＡ融合タンパク質をもたらした。ＶＩＳＴＡ－ＲＦＰレトロウイルスベクターをエコトロピックパッケージングベクターｐＣＬ－Ｅｃｏ（Ｉｍｇｅｎｅｘ　Ｃｏｒｐ．）で一緒に一過性にトランスフェクトすることにより、ヘルパーを含まないレトロウイルスをＨＥＫ２９３Ｔ細胞で生成した。８μｇ／ｍＬのポリブレン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）の存在下で、２，０００ｒｐｍで室温にて４５分間スピン感染させることにより、マウスＴ細胞株ＥＬ４細胞またはＢＭＤＣのレトロウイルス形質導入を実施した。

【０６２２】

ＶＩＳＴＡの生物情報学分析。ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ－Ｖ配列に進化的に関連したタンパク質を、ＢＬＡＳＴアルゴリズム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，ｅｔ　ａｌ．１９９０）で特定した。Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ（Ｂｅｒｍａｎ，ｅｔ　ａｌ．２０００）からの最も好適な構造テンプレートを、ｍＧｅｎＴＨＲＥＡＤＥＲアルゴリズム（Ｌｏｂｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．２００９）で特定した。上位のスコアリングヒットのうちの１つであるＰＤ－Ｌ１（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ受託番号３ＢＩＳ）を、比較タンパク質構造モデルリングのテンプレートとして選択した。２つのアライメント法の最適な組み合わせ、ＭＵＳＣＬＥおよびＨＨａｌｉｇｎ（Ｒａｉ　ａｎｄ　Ｆｉｓｅｒ，２００６、Ｒａｉ，ｅｔ　ａｌ．２００６）の最適な組み合わせを用いて、ＶＩＳＴＡの構造モデルをＭＭＭサーバで構築した。３６個のＶＩＳＴＡオルソログスタンパク質をＥＮＳＥＭＢＬ

データベース（Ｆｌｉｃｅｋ，ｅｔ　ａｌ．２００８）から収集した。構造および配列アライメントを、それぞれ、ＤＡＬＩ（Ｈｏｌｍ　ａｎｄ　Ｐａｒｋ，２０００）およびＣｌｕｓｔａｌｗ（Ｌａｒｋｉｎ，ｅｔ　ａｌ．２００７）で計算し、ＥＳＰｒｉｐｔ　２．２サーバ（Ｇｏｕｅｔ，ｅｔ　ａｌ．１９９９）を用いて提示した。ＢＬＡＳＴ一対比較ネットワークを、以前に説明されたように構築し（Ａｔｋｉｎｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ．２００９）、Ｃｙｔｏｓｃａｐｅ（Ｓｈａｎｎｏｎ，ｅｔ　ａｌ．２００３）を用いて分析した。

【０６２３】

ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の産生。ＶＩＳＴＡの細胞外ドメイン（アミノ酸３２～１９０）を増幅し、親ベクターＣＤＭ７ＢのＳｐｅＩ－ＢａｍＨＩ部位（Ｈｏｌｌｅｎｂａｕｇｈ，ｅｔ　ａｌ．１９９５）にクローニングした。このベクターは、ヒトＩｇＧ１の定常およびヒンジ領域の突然変異型を含有し、Ｆｃ受容体への結合がはるかに低い。結果として生じたベクターＣＤＭ７Ｂ－ＶＩＳＴＡを、ジヒドロ葉酸還元酵素発現ベクターＳＶ－ｄｈｆｒ（ＭｃＩｖｏｒ　ａｎｄ　Ｓｉｍｏｎｓｅｎ，１９９０）でチャイニーズハムスター卵巣（ｄｈｆｒ$^{-}$）細胞株（番号ＣＲＬ－９０９６、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）にコトランスフェクトした。ヌクレオチドを有しない培地ＭＥＭ－α（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中のＶＩＳＴＡ－Ｉｇを発現する安定したチャイニーズハムスター卵巣細胞クローンを選択した。０．５～１μＭのメトトレキサート（Ｍ９９２９、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）でのさらなる増幅により、高レベルの可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質を発現するクローンを得た。標準のタンパク質Ｇカラム親和性クロマトグラフィーを用いて、この融合タンパク質を培養上清からさらに精製した。

【０６２４】

ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体（ｍＡｂ）の生成。アルメニアンハムスターを、ＶＩＳＴＡ－ＲＦＰを過剰発現するＥＬ４細胞で免疫し、その後、ＣＦＡ中で乳化されたＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質で追加免疫した。追加免疫の４週間後、ハムスターを可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質で再度追加免疫した。最後の追加免疫の４日後、ハムスターの脾臓細胞を収集し、標準のハイブリドーマ融合技法（Ｓｈｕｌｍａｎ，ｅｔ　ａｌ．１９７８）を用いて、骨髄腫細胞株ＳＰ２／０－Ａｇ１４（番号ＣＲＬ－１５８１、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）に融合させた。希釈の制限後にＶＩＳＴＡ特異的抗体を分泌するハイブリドーマクローンを選択し、ＥＬＩＳＡおよびフローサイトメトリー法の両方でスクリーニングした。

【０６２５】

ＲＮＡおよびＲＴ－ＰＣＲ。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社の取扱説明書に従ってＴＲＩＺＯＬ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、様々なマウス組織試料または精製された造血細胞型由来の全ＲＮＡを収集した。ｉＳｃｒｉｐｔ　ｃＤＮＡ合成キット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を用いて、ｃＤＮＡを調製した。等量の組織ｃＤＮＡ（１０ｎｇ）をＲＴ－ＰＣＲ反応に用いて、全長ＶＩＳＴＡを増幅した。１％のアガロースゲル中で泳動させた後に、ＰＣＲ産物が見られた。

【０６２６】

フローサイトメトリーおよび分析。フローサイトメトリー分析を、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（ＢＤ）を用いてＦＡＣＳｃａｎ上で実施した。データ分析をＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ，Ｉｎｃ．）を用いて実施した。細胞増殖を定量するために、ＣＦＳＥ分割のヒストグラムプロファイルを分析し、Ｐｒｉｓｍ　４（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．）を用いて増殖性ＣＦＳＥ^{低}細胞の割合をグラフにした。

【０６２７】

細胞調製。全ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を、全ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を用いてナイーブマウスから単離した。指示される場合、濃縮されたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を、ナイーブ集団（ＣＤ４４^{低}ＣＤ２５$^{-}$ＣＤ６２Ｌ^{高}）およびメモリー集団（

ＣＤ４４^{高}ＣＤ２５$^{～}$ＣＤ６２Ｌ^{低}）にフロー分類した。インビトロ増殖アッセイの場合、ＣＤ４$^{＋}$Ｔ細胞を、３７℃で１０分間、５μＭのＣＦＳＥ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で標識化し、２回洗浄した後に刺激した。

【０６２８】

Ａ２０アッセイの場合、Ａ２０－ＲＦＰまたはＡ２０－ＰＤ－ＸＬ細胞（２０，０００個）を１００μｇ／ｍＬのマイトマイシンＣで事前処理し（１時間）、その後、ＯＶＡペプチドの存在下で、ＦＳＥ標識化ＤＯ１１．１０　ＣＤ４$^{＋}$Ｔ細胞（１００，０００個）でインキュベートした。対照Ｉｇまたは１３Ｆ３モノクローナル抗体を指示されるように添加した。細胞増殖をＣＦＳＥ希釈によって７２時間時点で分析した。ＣＤ１１ｂ^{高}骨髄性ＡＰＣを分類するために、ＣＤ１１ｂ電磁ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を用いてＣＤ１１ｂ$^{＋}$単球をナイーブ脾細胞から濃縮した。全ＣＤ１１ｂ^{高}骨髄性ＡＰＣ、またはＣＤ１１ｂ^{高}ＣＤ１１ｃ$^{－}$単球およびＣＤ１１ｂ^{高}ＣＤ１１ｃ$^{＋}$骨髄性ＤＣを分類し、照射し（２，５００ラド）、これを用いてＯＶＡペプチドの存在下でＯＴ－ＩＩトランスジェニックＣＤ４$^{＋}$Ｔ細胞を刺激した。対照Ｉｇまたは１３Ｆ３モノクローナル抗体を指示されるように添加した。７２時間アッセイの最後の８時間にわたってトリチウムを取り込むことによって細胞増殖を測定した。

【０６２９】

インビトロプレート結合Ｔ細胞活性化アッセイ。精製されたＣＤ４$^{＋}$Ｔ細胞（１００，０００細胞／ウェル）を、抗ＣＤ３（クローン２Ｃ１１）および指示された濃度比のＶＩＳＴＡ－Ｉｇまたは対照－Ｉｇのいずれかの存在下で、９６ウェル平底プレートに培養した。例えば、あらゆる種類の滴定について、９６ウェルプレートを、ＰＢＳ中で１．２５μｇ／ｍＬ（２：１の比率）、２．５μｇ／ｍＬ（１：１の比率）、５μｇ／ｍＬ（１：２の比率）、または１０μｇ／ｍＬ（１：４の比率）のＶＩＳＴＡ－Ｉｇまたは対照－Ｉｇタンパク質と一緒に４℃で一晩混合した２．５μｇ／ｍＬのα－ＣＤ３でコーティングした。ウェルをＰＢＳで３回洗浄した後に、ＣＤ４$^{＋}$Ｔ細胞を添加した。同型培養物は、１０％ＦＢＳ、１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、５０μＭ　β－ＭＥ、およびペニシリン／ストレプトマイシン／Ｌ－グルタミンを補充した完全ＲＰＭＩ１６４０培地中に存在した。指示される場合、１００Ｕ／ｍＬのヒトＩＬ－２（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）または滴定量のα－ＣＤ２８（クローンＰＶ－１、Ｂｉｏ　Ｘ　Ｃｅｌｌ）のいずれかをα－ＣＤ３でコーティングして、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇの阻害効果を救出した。培養物を３日目にＣＦＳＥプロファイルについて、または指示される時間的経過に従って分析した。

【０６３０】

ＢＭＤＣの培養、レトロウイルス形質導入、およびトランスジェニックＣＤ４$^{＋}$Ｔ細胞の刺激。ＢＭＤＣを、いくつかの修飾を伴って、以前に説明されたように生成した（Ｌｕｔｚ，ｅｔ　ａｌ．１９９９、Ｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ．２００２）。手短に、０日目に、ＢＭ細胞を、２７ゲージ針で洗い流すことによって脛骨および大腿から単離した。赤血球溶解後、１～２×１０^{6}ＢＭ細胞を、２０ｎｇ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）を含有する１ｍＬの完全ＲＰＭＩ１６４０培地中に再度懸濁した。細胞を、８μｇ／ｍＬのポリブレン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）の存在下で、ＲＦＰまたはＶＩＳＴＡ－ＲＦＰレトロウイルスに感染させた。プレートを２，０００ｒｐｍで室温にて４５分間回転させることによって感染を実施した。その後、細胞をさらに２時間培養した後に、新たな培地を添加した。同様の感染手順を１、３、および５日目に繰り返した。緩く付着した細胞（９０％はＣＤ１１ｃ$^{＋}$であった）を１０日目に収集し、ＣＤ１１ｃ$^{＋}$ＲＦＰ$^{＋}$二重陽性細胞を分類し、これを用いてＯＴ－ＩＩトランスジェニックＣＤ４$^{＋}$Ｔ細胞を刺激した。ＯＴ－ＩＩ　Ｔ細胞増殖アッセイについて、１００，０００個のＣＦＳＥ標識化ＯＴ－ＩＩ　ＣＤ４$^{＋}$Ｔ細胞を、３０，０００個の分類されたＲＦＰ$^{＋}$またはＶＩＳＴＡ－ＲＦＰ$^{＋}$ＢＭＤＣを有する９６ウェル丸底プレートにおいて、滴定量の合成ＯＶＡ$_{323-339}$ペプチド（ＡｎａＳｐｅｃ）で培養した。ＣＦＳＥプロファイルを試験することによって、７２時間時点のＯＴ－ＩＩ　Ｔ細胞の増殖を分析した。

【０６３１】

腫瘍実験。親ＭＣＡ１０５腫瘍細胞を、ＶＩＳＴＡ－ＲＦＰまたはＲＦＰ対照でレトロウイルス的に形質導入し、ＲＦＰ発現に基づいて同種に分類した。腫瘍ワクチン接種について、ナイーブＣ５７ＢＬ／６マウスを、左脇腹に皮下接種した１，０００，０００個の照射ＭＣＡ１０５（１０，０００ラド）細胞で付与した。１４日目に、ワクチン接種したマウスに、右脇腹に皮下接種した生ＭＣＡ１０５腫瘍細胞でチャレンジを行った。腫瘍成長を２日毎に監視した。腫瘍サイズが１５０ｍｍ^{2}に達したときにマウスを安楽死させた。Ｔ細胞枯渇の場合、生腫瘍細胞チャレンジの２日前に、ワクチン接種したマウスを、腹腔内（２５０μｇ）で、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（クローンＧＫ１．５）およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（クローン５３．６．７２）に対して特異的なモノクローナル抗体で事前処理し、実験が終了するまでこの処理を３～４日毎に繰り返した。腫瘍サイズが１６０ｍｍ^{2}に達したときにマウスを安楽死させた。

【０６３２】

ＥＡＥの受動誘導および中枢神経系浸潤ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の特徴付け。ＥＡＥの受動伝達のために、雌ＳＪＬマウス（６週齢）を、４００μｇのヒト結核菌Ｈ３７Ｒａおよび１００μｇのＰＬＰペプチドを含有する２００μＬのエマルジョンで皮下免疫した。インビトロ刺激のために流入領域リンパ節細胞を１０日目に収集した。赤血球を溶解した。単一細胞懸濁液（１０，０００，０００／マイクロリットル）を、１０％ＦＢＳ、５０μＭ ２－ＭＥ、１ｍＭグルタミン、１％ペニシリン／ストレプトアビジン、１ｍＭ非必須アミノ酸、２０ｎｇ／ｍＬ ＩＬ－２３、１０ｎｇ／ｍＬ ＩＬ－６、１０ｎｇ／ｍＬ ＩＬ－１β、２０μｇ／ｍＬ抗ＩＦＮ－γ、および２０μｇ／ｍＬ ＰＬＰペプチドを有する完全ＩＭＤＭ培地中で培養した。４日目に、細胞を収集し、ＣＤ４電磁ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用いて生ＣＤ４ Ｔ細胞を精製した。１，５００，０００～２，０００，０００個の精製された生ＣＤ４ Ｔ細胞をナイーブＳＪＬマウスに養子導入して、ＥＡＥを誘導した。マウスを非特異的ハムスター対照－Ｉｇまたは４００μｇのＶＩＳＴＡ特異的モノクローナル抗体のいずれかで３日毎に処理した。疾患を以下のようにスコア化した：０：疾患なし、１：後肢虚弱または尾色調の喪失、２：弛緩した尾および後肢不全麻痺、２．５：一方の後肢麻痺、３：両方の後肢麻痺、４：前肢虚弱、５：瀕死。マウスをスコア４の時点で安楽死させた。

【０６３３】

ＶＩＳＴＡのクローニングおよび配列および構造分析

活性化対静止マウスＣＤ２５$^{+}$ＣＤ４$^{+}$天然Ｔ$_{reg}$細胞（ｎＴ$_{reg}$細胞）のＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（登録商標）分析は、未知の機能を有するが、Ｉｇスーパーファミリーとの配列相同性を有する遺伝子産物（ＲＩＫＥＮ ｃＤＮＡ ４６３２４２８Ｎ０５または４６３２４２８Ｎ０５Ｒｉｋ）の発現を明らかにした。９３０塩基対の遺伝子産物をマウスＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞ｃＤＮＡライブラリーからクローニングし、予測した大きさおよび配列と一致した。シリカ配列および構造分析は、成熟時に３０９アミノ酸のＩ型膜貫通タンパク質を予測する。その細胞外ドメインは、１３６アミノ酸の単一の細胞外Ｉｇ－Ｖドメインを含有し、これは、２３アミノ酸のストーク領域、２１残基膜貫通セグメント、および９７アミノ酸の細胞質ドメイン（図２３Ａ）に連結される。４６３２４２８Ｎ０５Ｒｉｋの細胞質尾部は、いかなるシグナル伝達ドメインも含有しない。Ｉｇ－Ｖドメインの構造的特徴および本明細書に示されるその免疫抑制性機能に基づいて、この分子をＶＩＳＴＡと名付けた。

【０６３４】

ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ－ＶドメインでのＢＬＡＳＴ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，ｅｔ ａｌ．１９９０）配列検索は、Ｂ７ファミリーのＰＤ－Ｌ１を、１０$^{-4}$のボーダーラインの有意なｅ値スコアおよび２４％の配列同一性を有する最も近い進化的に関連したタンパク質と特定した。

【０６３５】

Ｂ７ファミリーリメンバーＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、およびＢ７－Ｈ４との構造に基づいたＶＩＳＴＡの配列アライメントは、すべてのＩｇ－Ｖドメインタンパク

質において系統的に保存されることが知られており、Ｉｇ－Ｖ折り畳みの安定性に重要であると考えられるいくつかのアミノ酸を明らかにする（図２３Ｃ）。例には、これらの２つのβシート間にジスルフィド結合を形成するＢおよびＦβ鎖における２つのシステインが挙げられ、これは、Ｉｇスーパーファミリータンパク質の顕著な特徴である（図２３Ｃ）。この多配列アライメントは、ＶＩＳＴＡに特有のさらなる配列特徴も明らかにする。

【０６３６】

ＲＴ－ＰＣＲ分析およびフローサイトメトリーによるＶＩＳＴＡの発現実験ＲＴ－ＰＣＲ分析を用いて、マウス組織におけるＶＩＳＴＡのメッセンジャーＲＮＡ発現パターンを判定した（図３Ａ）。ＶＩＳＴＡは、造血組織（脾臓、胸腺、およびＢＭ）または白血球の十分な浸潤を伴う組織（すなわち、肺）で主に発現される。弱発現が、非造血組織（すなわち、心臓、腎臓、脳、および卵巣）でも検出された。いくつかの造血細胞型の分析は、腹腔マクロファージ、脾臓ＣＤ１１ｂ$^{+}$単球、ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＤＣ、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞でのＶＩＳＴＡの発現を明らかにしたが、Ｂ細胞ではより低い発現レベルであった（図３Ｂ）。この発現パターンは、大部分は、ＧＮＦ（Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｏｖａｒｔｉｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ）遺伝子アレイデータベース（記号４６３２４２８Ｎ０５Ｒｉｋ、Ｓｕ，ｅｔ ａｌ．２００２）、ならびにＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ＧＥＯ（遺伝子発現オムニバス）データベース（受入番号ＧＤＳ８６８）とも一致している。

【０６３７】

タンパク質発現を研究するために、ＶＩＳＴＡ特異的ハムスターモノクローナル抗体を産生した。特異性を、ＶＩＳＴＡ過剰発現マウスＥＬ４Ｔ細胞上では陽性染色法で実証するが、ＰＤ－Ｌ１過剰発現ＥＬ４細胞上では陰性染色法で実証する。

【０６３８】

α－ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体クローン８Ｄ８を用いて、造血細胞でのＶＩＳＴＡ発現をフローサイトメトリーによって分析した。Ｆｏｘｐ３－ＧＦＰノックインレポーターマウスを用いてＣＤ４$^{+}$ｎＴ$_{ｒｅｇ}$細胞を区別した（Ｆｏｎｔｅｎｏｔ，ｅｔ ａｌ．２００５）。末梢リンパ器官（脾臓およびリンパ節）において、有意な発現がすべてのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サブセットで見られた（ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞またはＦｏｘｐ３$^{-}$ナイーブＴ細胞およびＦｏｘｐ３$^{+}$ｎＴ$_{ｒｅｇ}$細胞およびメモリーＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の合計を参照されたい）一方で、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は、著しくより低い量の表面ＶＩＳＴＡを発現した（図３Ｃ）。胸腺において、ＶＩＳＴＡ発現は、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ８$^{+}$－ダブル陽性胸腺細胞では陰性であり、ＣＤ４－シングル陽性細胞では低く、ＣＤ８－シングル陽性細胞では検出可能であった。次に、高ＶＩＳＴＡ発現のＣＤ１１ｂマーカーとの強い相関関係が、Ｆ４／８０マクロファージと骨髄性ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＤＣの両方を含む脾臓細胞と腹膜細胞の両方で見られた（図３Ｄおよび３Ｅ）。対照的に、Ｂ細胞およびＮＫ細胞は、ＶＩＳＴＡ発現に対してほぼ陰性であった。わずかな割合のＧｒ－１$^{+}$顆粒球もＶＩＳＴＡを発現した（図３Ｆ）。

【０６３９】

差次的発現パターンが異なるリンパ器官由来の細胞の同一系統で示された（図３Ｇ）。ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびＣＤ１１ｂ^{中間}単球について、発現レベルは、腸間膜リンパ節＞末梢リンパ節および脾臓＞腹膜腔および血液のパターンに従った。このパターンは、ＣＤ１１ｂ^{高}細胞ではあまり顕著ではなかった。これらのデータは、ある特定の細胞型におけるＶＩＳＴＡ発現が細胞成熟および／または組織微小環境によって制御され得ることを示唆する。

【０６４０】

新たに単離された細胞に加えて、ＶＩＳＴＡ発現を、活性化を伴うインビトロ培養時および活性化を伴わないインビトロ培養時に、脾臓ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ１１ｂ^{高}単球、およびＣＤ１１ｃ$^{+}$ＤＣ上で分析した（図６）。脾臓細胞を、培地、α－ＣＤ３（Ｔ細胞を活性化するため）、またはＩＦＮ－γおよびＬＰＳ（単球およびＤＣを活性化するため）

で２４時間培養した後に、ＶＩＳＴＡおよび他のＢ７ファミリーリガンド（例えば、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、およびＢ７－Ｈ４）の発現について分析した。この比較は、これらの分子間の特徴的な発現パターンを明らかにした。ＶＩＳＴＡ発現は、活性化状態にかかわらず、インビトロ培養時にすべての細胞型ですぐに失われた。対照的に、ＰＤ－Ｌ１発現は、培地単独での培養後に活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞またはＣＤ１１ｂ^{高}単球およびＣＤ１１ｃ$^{+}$ＤＣ上で上方制御され、刺激時にさら強化された。ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、およびＢ７－Ｈ４の発現は、用いた培養条件では顕著ではなかった。インビトロでのＶＩＳＴＡ発現の喪失は、他のＢ７ファミリーリガンドと比較すると特有であるが、組織微小環境を模倣し損なう最適ではない培養条件を反映し得る。

【０６４１】

ＶＩＳＴＡ発現がインビボで、どのように制御されるかを考慮するために、ＣＤ４　ＴＣＲトランスジェニックマウスＤＯ１１．１０を、ＣＦＡ中で乳化された同族抗原トリＯＶＡで免疫した。免疫化後２４時間時点で、流入領域リンパ節由来の細胞をＶＩＳＴＡ発現について分析した（図７Ａ）。アジュバント単独ではなく抗原（ＣＦＡ／ＯＶＡ）での免疫化は、Ｆ４／８０$^{+}$マクロファージおよびＣＤ１１ｃ$^{+}$ＤＣの混合集団を含有したＣＤ１１ｂ$^{+}$ＶＩＳＴＡ$^{+}$骨髄性細胞集団を劇的に増加させた。ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２とのさらなる比較は、ＰＤ－Ｌ１が最も高い構成的発現レベルを有したが、ＶＩＳＴＡがそのような炎症性免疫応答中に最も高度に上方制御されたことを明らかにした（図７Ｂ）。集合的に、これらのデータは、骨髄性ＡＰＣでのＶＩＳＴＡの発現が、免疫系によって厳重に制御され、免疫応答を制御するその役割に寄与し得ることを強く示唆する。そのＡＰＣでの発現増加とは対照的に、ＶＩＳＴＡ発現は、免疫時のより遅い時点で（すなわち、２４時間時点ではなく４８時間時点で）活性化ＤＯ１１．１０　ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞で減少した。

【０６４２】

インビトロでのＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答へのＶＩＳＴＡシグナル伝達の機能的影響ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質（ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ）を産生して、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答におけるＶＩＳＴＡの制御的役割を試験した。ＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、ヒトＩｇＧ$_{1}$Ｆｃ領域に融合されたＶＩＳＴＡの細胞外ドメインを含有した。マイクロプレート上に固定化したとき、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、α－ＣＤ３刺激に応答してバルク精製されたＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖を抑制したが、対照－Ｉｇは抑制しなかった（図９Ａおよび９Ｂ）。ＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、ＥＬＩＳＡによって判定すると、プラスチックウェルへの抗ＣＤ３抗体の吸収に影響を及ぼさず、それ故に非特異的阻害効果の可能性を排除した。ＰＤ－Ｌ１－ＩｇおよびＶＩＳＴＡ－Ｉｇの阻害効果も直接比較した。滴定量のＩｇ融合タンパク質がα－ＣＤ３とともにマイクロプレートに吸収されてＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を刺激したとき、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、ＰＤ－Ｌ１－Ｉｇ融合タンパク質と同様の強力な阻害性有効性を示した。ＰＤ－１　ＫＯ　ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞も抑制され（図９Ｃ）、ＰＤ－１がＶＩＳＴＡの受容体ではないことを示す。

【０６４３】

バルク精製されたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞が様々なサブセットを含有するため、分類されたナイーブ（ＣＤ２５$^{-}$ＣＤ４４^{低}ＣＤ６２Ｌ^{高}）およびメモリー（ＣＤ２５$^{-}$ＣＤ４４^{高}ＣＤ６２Ｌ^{低}）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サブセットへのＶＩＳＴＡ－Ｉｇの影響を評価した。メモリー細胞上での有効性ははるかに低いが、ＶＩＳＴＡは、両方のサブセットの増殖を抑制した。

【０６４４】

ＶＩＳＴＡ媒介性抑制の機序をさらに理解するために、初期のＴＣＲ活性化マーカーの発現およびアポトーシスをＴ細胞活性化後に測定した。細胞増殖への負の効果と一致して、初期の活性化マーカーＣＤ６９、ＣＤ４４、およびＣＤ６２Ｌの発現における包括的な抑制が存在した（図１２Ａ）。対照的に、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、アポトーシスを誘導しなかった。ＴＣＲ活性化の初期（２４時間）および後期（４８時間）の両方で、対照－Ｉｇよりも少ないアポトーシス（アネキシンＶ$^{+}$７ＡＡＤ$^{-}$細胞の割合によって判定される）

がＶＩＳＴＡ－Ｉｇの存在下で見られた（図１２Ｂ）。例えば、２４時間時点で、全体の非ゲート化集団において、約２７％の細胞がＶＩＳＴＡ－Ｉｇの存在下でアポトーシスであったが、約３９％の細胞が対照－Ｉｇの存在下でアポトーシスであった。同様に、生細胞Ｒ１ゲート内の細胞のうち、約７２．６％の細胞が対照－Ｉｇの存在下でアポトーシスになった一方で、約４３．５％のみの細胞がＶＩＳＴＡ－Ｉｇの存在下でアポトーシスになった。同様の結果が４８時間時点でも見られた。したがって、ＶＩＳＴＡが初期ＴＣＲ活性化および停止細胞分裂を抑制することによってＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答を負に制御するが、アポトーシスに最小限の直接影響しか及ぼさないようである。この抑制機序は、Ｂ７－Ｈ４のものに類似している（Ｓｉｃａ，ｅｔ　ａｌ．２００３）。

【０６４５】

２段階アッセイを開発して、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇが活性化前のＣＤ４　Ｔ細胞を抑制することができるか、およびその抑制効果がどの程度持続するかを判定した。ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の抑制効果は、活性化後２４時間時点でそれを除去した後に持続した（図９Ｄ、ｉｉ）。加えて、ナイーブと活性化前のＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の両方ともに、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇによって抑制された（図９Ｄ、ｉ、ｉｉｉ、およびｉｖ）。

【０６４６】

次に、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サイトカイン産生へのＶＩＳＴＡ－Ｉｇの効果を分析した。ＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、バルク精製されたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞培養からのＴｈ１サイトカインＩＬ－２およびＩＦＮ－γの産生を抑制した（図１３Ａおよび１３Ｂ）。別個のナイーブ（ＣＤ２５$^{-}$ＣＤ４４^{低}ＣＤ６２Ｌ高）およびメモリー（ＣＤ２５$^{-}$ＣＤ４４^{高}ＣＤ６２Ｌ^{低}）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団へのＶＩＳＴＡの影響をさらに試験した。メモリーＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞コンパートメント内のサイトカイン産生の主な供給源であり、ＶＩＳＴＡは、この産生を抑制した（図１３Ｃおよび１３Ｄ）。ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞からのＩＦＮ－γ産生もＶＩＳＴＡ－Ｉｇによって阻害された（図１３Ｅ）。ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞によるサイトカイン産生へのＶＩＳＴＡのこの阻害効果は、ＶＩＳＴＡがＴ細胞媒介性免疫応答を下方制御する阻害性リガンドであるという仮説と一致する。

【０６４７】

ＶＩＳＴＡの阻害効果を克服することができる因子を判定するさらなる実験を設計した。ＶＩＳＴＡがＩＬ－２産生を抑制し、ＩＬ－２がＴ細胞生存および増殖に不可欠であることを前提に、ＩＬ－２がＶＩＳＴＡの阻害活性を回避し得ると仮定した。図１４Ａに示されるように、外因性ＩＬ－２は、細胞増殖へのＶＩＳＴＡ－Ｉｇの抑制効果を部分的に逆転させたが、ＩＬ－１５、ＩＬ－７、またはＩＬ－２３は逆転させなかった。高レベルのＩＬ－２による不完全な救出は、ＶＩＳＴＡシグナル伝達が単にＩＬ－２産生よりも広範のＴ細胞活性化経路を標的とすることを示す。対照的に、α－ＣＤ２８アゴニスト性抗体によって提供された強力な共刺激シグナルが、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ媒介性抑制を完全に逆転させた（図１４Ｂ）のに対して、中程度のレベルの共刺激は、ＶＩＳＴＡシグナル伝達によって引き続き抑制された（図１４Ｃ）。この点において、ＶＩＳＴＡは、この特徴をＰＤ－Ｌ１およびＢ７－Ｈ４等の他の抑制性Ｂ７ファミリーリガンドと共有する（Ｃａｒｔｅｒ，ｅｔ　ａｌ．２００２、Ｓｉｃａ，ｅｔ　ａｌ．２００３）。

【０６４８】

ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質に加えて、ＡＰＣで発現されたＶＩＳＴＡが、ＡＰＣとＴ細胞との間の同族相互作用中に、抗原特異的Ｔ細胞活性化を抑制することができることを確認することが必要であった。２つの独立した細胞株を用いて、この問題に対処した。最初に、ＶＩＳＴＡ－ＲＦＰまたはＲＦＰ対照タンパク質を、Ｂ細胞株Ａ２０においてレトロウイルス形質導入によって過剰発現させた。ＶＩＳＴＡ－ＲＦＰ融合タンパク質の正しい細胞表面局在化を蛍光顕微鏡検査法で確認した。Ｔ細胞応答を刺激するために、Ａ２０－ＶＩＳＴＡまたはＡ２０－ＲＦＰ細胞を、抗原ＯＶＡペプチドの存在下でＤＯ１１．１０　ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞とともにインキュベートした。図１５ＡおよびＣに示されるように、Ａ２０－ＶＩＳＴＡは、Ａ２０－ＲＦＰ細胞の増殖よりも低いＤＯ１１．１０細胞の増殖を誘導した。この抑制効果は、より低いペプチド濃度でより顕著であり、より強力な

刺激性シグナルがＶＩＳＴＡの抑制効果を克服するといった概念と一致する。

【０６４９】

次に、天然ＡＰＣへの全長ＶＩＳＴＡの阻害効果を確認した。インビトロで培養したＢＭ由来ＤＣ（ＢＭＤＣ）は、高レベルのＶＩＳＴＡを発現しなかった（図１６）。ＶＩＳＴＡ－ＲＦＰまたはＲＦＰを、１０日間の培養期間中にレトロウイルス形質導入によってＢＭＤＣで発現させた。形質導入された細胞を、ＲＦＰ発現に基づいて同種に分類した。形質導入されたＤＣでのＶＩＳＴＡの発現レベルを、α－ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体での染色によって推定し、新たに単離された腹腔マクロファージでの発現レベルに類似しており、それ故に生理学的発現範囲内であることが見出された（図１６）。その後、分類されたＢＭＤＣを用いて、ＯＶＡペプチドの存在下でＯＶＡ特異的トランスジェニックＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（ＯＴ－ＩＩ）を刺激した。ＢＭＤＣでのＶＩＳＴＡの発現は、同族ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞増殖を抑制した（図１５Ｄ）。この結果は、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質またはＶＩＳＴＡ発現Ａ２０細胞を用いたデータ（図５）と一致し、ＡＰＣで発現されたＶＩＳＴＡがＴ細胞媒介性免疫応答を抑制することができることを示唆する。

【０６５０】

インビボでのＶＩＳＴＡ発現の影響を確証するために、腫瘍細胞でのＶＩＳＴＡ過剰発現が抗腫瘍免疫応答を損なうかを試験した。ＭＣＡ１０５（メチルコラントレン１０５）線維肉腫は、ＶＩＳＴＡを発現しない。２つのＭＣＡ１０５腫瘍株を、レトロウイルス形質導入によってＶＩＳＴＡ－ＲＦＰまたはＲＦＰ対照ウイルスのいずれかで確立した。ＭＣＡ１０５腫瘍が免疫原性であり、照射ＭＣＡ１０５細胞で予め免疫付与した宿主で容易に制御することができるため（Ｍａｃｋｅｙ，ｅｔ　ａｌ．１９９７）、そのような防御免疫への腫瘍ＶＩＳＴＡ発現の効果を試験した。図２６Ａに示されるように、ＶＩＳＴＡ発現ＭＣＡ１０５がワクチン接種した宿主で精力的に成長した一方で、対照腫瘍は成長することができなかった。Ｔ細胞媒介性抗腫瘍免疫の不在下で腫瘍成長速度に本質的な違いがないことを確認するために、モノクローナル抗体を用いて、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞とＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の両方が枯渇したワクチン接種した動物に腫瘍を接種した。図２６Ｂに示されるように、Ｔ細胞枯渇時に、ＭＣＡ１０５ＲＦＰとＭＣＡ１０５ＶＩＳＴＡ腫瘍の両方が同等の速度で成長し、非Ｔ細胞枯渇宿主よりもはるかにより急速に成長した。まとめると、これらのデータは、腫瘍細胞でのＶＩＳＴＡ発現がその宿主における防御抗腫瘍免疫を妨害することができることを示す。

【０６５１】

特定のモノクローナル抗体によるＶＩＳＴＡ封鎖は、インビトロおよびインビボでのＴ細胞応答を高めた。

Ａ２０－ＤＯ１１．１０アッセイシステムにおいてＶＩＳＴＡ媒介性抑制を中和するＶＩＳＴＡ特異的モノクローナル抗体（１３Ｆ３）を特定した（図２５Ａ）。Ｔ細胞応答への１３Ｆ３の影響をさらに確認するために、ＣＤ１１ｂ^{高}骨髄性ＡＰＣをナイーブマウスから精製して、１３Ｆ３の存在下または不在下でＯＴ－ＩＩトランスジェニックＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を刺激した（図２５Ｂ）。その中和作用と一致して、１３Ｆ３は、ＣＤ１１ｂ^{高}骨髄性細胞によって刺激されたＴ細胞増殖を高め、高レベルのＶＩＳＴＡを発現することを示した（図３）。１３Ｆ３の同様の効果が、ＣＤ１１ｂ^{高}ＣＤ１１ｃ$^{+}$骨髄性ＤＣとＣＤ１１ｂ^{高}ＣＤ１１ｃ$^{-}$単球の両方で見ることができた（図２５Ｃ～Ｄ）。

【０６５２】

次に、モノクローナル抗体によるＶＩＳＴＡ封鎖の影響を、ヒト多発性硬化症のマウス自己免疫炎症性疾患モデル（Ｓｔｒｏｍｎｅｓ　ａｎｄ　Ｇｏｖｅｒｍａｎ，２００６）であるＥＡＥの受動伝達モデルにおいて試験した。脳炎誘発性ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を、ドナーマウスにおいて能動免疫によってプロテオリピドタンパク質（ＰＬＰ）ペプチドで刺激して、ナイーブマウスに養子導入した。疾患を悪化させるα－ＶＩＳＴＡの能力を慎重に評価するために、滴定数の活性化脳炎誘発性Ｔ細胞をα－ＶＩＳＴＡまたは対照－Ｉｇで処理したナイーブ宿主に受動伝達し、ＥＡＥの発症を監視した。１３Ｆ３は、疾患発症を著しく加速させ、準最適なＴ細胞移入投薬量で疾患の重症度を悪化させることが見出された

。１３Ｆ３処理群が１４日目までに疾患発生率１００％に達した一方で、対照抗体で処理したマウスは、実験期間中に疾患発生率１００％に達しなかった。平均疾患スコアは、疾患経過を通して対照群よりも１３Ｆ３処理群において著しく高かった。より高い疾患スコアと一致して、疾患経過終了時の中枢神経系の分析は、１３Ｆ３処理群において著しく高いＩＬ－１７Ａ産生ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞浸潤を確認した。

考察

【０６５３】

ＶＩＳＴＡは、インビトロとインビボの両方でＴ細胞に免疫抑制活性を与えるＩｇスーパーファミリーネットワークの新規のメンバーであり、自己免疫の発達および癌への免疫応答の制御における重要な調節因子である。提示されるデータは、（ａ）ＶＩＳＴＡが、ＰＤ－Ｌ１との遠位配列類似性を有するＩｇ－Ｖドメインを含有するＩｇスーパーファミリーの新しいメンバーであり、（ｂ）Ｉｇ融合タンパク質として産生されるか、または人工ＡＰＣで過剰発現されるとき、これは、ＣＤ４およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞増殖とサイトカイン産生の両方を阻害し、（ｃ）骨髄性ＡＰＣでのＶＩＳＴＡ発現が、インビトロでＴ細胞応答に対して阻害性であり、（ｄ）腫瘍細胞での過剰発現が、ワクチン接種したマウスにおける防御的抗腫瘍免疫を低下させ、（ｅ）抗体媒介性ＶＩＳＴＡ封鎖が、Ｔ細胞媒介性自己免疫疾患であるＥＡＥの発症を悪化させることを示唆する。

【０６５４】

ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ－Ｖドメインの生物情報学分析は、Ｂ７－ブチロフィリンファミリーメンバーであるＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、およびＭＯＧ、ならびに非Ｂ７ファミリーであるＣＡＲおよびＶＣＢＰ３が、ＶＩＳＴＡの進化的に最も近い類縁体であることを示唆する（図２３）。しかしながら、一次配列シグネチャの厳重な試験は、すべてのＶＩＳＴＡオルソログが特有の保存された配列モチーフを共有し、かつＶＩＳＴＡが、恐らくＩｇスーパーファミリーの構造的および機能的に新規のメンバーの代表であることを示唆する。具体的には、ＶＩＳＴＡ細胞外ドメインに特有の４つの不変システイン（３つはＩｇ－Ｖドメインに存在し、１つはストークに存在する）の存在は、その機能に影響を与える新規の構造的特徴に寄与し得る。それらの厳密な不変性を前提に、４つすべてのＶＩＳＴＡ特異的システインがジスルフィド結合に関与することがもっともらしい。この観察は、これら４つのシステインが、（ａ）２つの分子内ジスルフィド結合を形成し、（ｂ）二量体界面で４つの分子間ジスルフィド結合を形成し、（ｃ）１つの分子内ジスルフィド結合および２つの分子間ジスルフィド結合を形成することを含む、いくつかの可能性を示唆する。これらのシナリオのうちのいずれかは、新規のジスルフィド結合パターンを表し、典型的なＩｇスーパーファミリーメンバーに対する特有の三次および／または四次構造をもたらすであろう。加えて、包括的配列比較は、ＶＩＳＴＡがＩｇスーパーファミリー内の任意の既知の機能群のメンバーではないことを示唆する。

【０６５５】

ＶＩＳＴＡの発現パターンは、ＶＩＳＴＡと他のＢ７ファミリーリガンドをさらに区別する。これら２つのリガンドとＶＩＳＴＡとの間のより高い配列相同性およびＴ細胞活性化時のそれらの同様の阻害性機能のため、このデータは、大部分は、ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２と対比している。ＶＩＳＴＡの定常状態発現は、造血細胞で選択的に発現され、ＡＰＣ（マクロファージおよび骨髄性ＤＣ）とＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球の両方で最も高度に発現される。この文脈において、ＰＤ－Ｌ１が造血細胞と非造血細胞の両方で広範に発現する一方で、ＰＤ－Ｌ２は、ＤＣおよびマクロファージに制限される（Ｋｅｉｒ，ｅｔ ａｌ．２００６，２００８）。ＰＤ－Ｌ１とＰＤ－Ｌ２の両方がインビトロ培養時および活性化時にＡＰＣで上方制御されるが（Ｙａｍａｚａｋｉ，ｅｔ ａｌ．２００２、Ｌｉａｎｇ，ｅｔ ａｌ．２００３、Ｋｅｉｒ，ｅｔ ａｌ．２００８）、骨髄性細胞およびＴ細胞でのＶＩＳＴＡ発現は、刺激が存在するかにかかわらず、短期間のインビトロ培養後に失われる（図６）。そのような喪失は、インビボでのＶＩＳＴＡ発現を維持または制御するリンパ組織微小環境の必要な役割を反映し得る。この仮説と一致して、定常状態であっても、ＶＩＳＴＡは、異なる組織部位で差次的に発現される（すなわち、末梢リンパ組

織よりも腸間膜リンパ節で高く、血液で最も低い）。そのような異なる発現レベルが、特定の組織部位でのＶＩＳＴＡの差次的抑制機能を反映し得ると推測する。

【０６５６】

インビボでのＶＩＳＴＡ発現は、能動免疫応答中に高度に制御される。ＴＣＲトランスジェニックマウスにおけるアジュバントと抗原（ＯＶＡ／ＣＦＡ）での免疫化が、流入領域リンパ節内のＶＩＳＴＡ^{高}骨髄性ＡＰＣ集団を誘導したが、アジュバント単独（ＣＦＡ）は誘導しなかった（図７）。抗原の必要性は、ＡＰＣでのＶＩＳＴＡ上方制御がＴ細胞活性化の結果であり得ることを示唆する。ＶＩＳＴＡと比較して、ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２も免疫化に応答して骨髄性ＡＰＣで上方制御されたが、はるかに低い程度であった。ＶＩＳＴＡ$^{+}$骨髄性ＡＰＣの誘導が自己制御機構を構成して、継続的な免疫応答を抑制すると推測する。この仮説と一致して、中和ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体は、ＶＩＳＴＡ発現骨髄性ＡＰＣで刺激したときにインビトロでのＴ細胞増殖応答を高めた（図２５）。

【０６５７】

骨髄性細胞での発現パターンと対照的に、ＶＩＳＴＡ発現は、インビボ活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞で減退する。この結果は、インビボにおけるＣＤ４Ｔ細胞でのＶＩＳＴＡ発現を、能動免疫応答中に、その活性化状態およびサイトカイン微小環境によって制御することができることを示唆する。そのような下方制御は特有であり、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、およびＢ７－Ｈ４等の他の阻害性Ｂ７ファミリーリガンドでは見られない。ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞でのＶＩＳＴＡ発現の機能的有意性が未だ知られていないが、Ｔ細胞からＡＰＣへのこれらの同族相互作用中の逆シグナル伝達の可能性が今後の研究で調査される。

【０６５８】

ＶＩＳＴＡの阻害性リガンド機能を、インビトロとインビボの両方で、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＩＳＴＡを発現するＡＰＣ、およびＶＩＳＴＡを過剰発現する腫瘍、ならびに中和モノクローナル抗体を用いて描写した。ＶＩＳＴＡ過剰発現腫瘍は、ワクチン接種した宿主において強力な防御的免疫を克服することができた。ＥＡＥモデルにおけるＶＩＳＴＡモノクローナル抗体の強力な増強効果は、ＶＩＳＴＡがインビボにおいて阻害性リガンドであるという仮説をさらに確証する。同様のアプローチを用いて、他のＢ７ファミリーリガンドの機能が特徴付けられている（Ｓｉｃａ，ｅｔ　ａｌ．２００３、Ｋｅｉｒ，ｅｔ　ａｌ．２００８）。ＶＩＳＴＡがＰＤ－１とは異なる受容体に結合することによってその抑制機能を発揮することに留意することが重要である（図９）。ＶＩＳＴＡ経路の封鎖がＥＡＥを悪化させるという事実は、その機能がＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２とは重複しないことを確認する。それとは逆に、ＶＩＳＴＡが、その特有の構造的特徴、発現パターン、および動態が反映される様式で免疫応答を制御すると推測する。その未知の受容体の特定は、ＶＩＳＴＡ媒介性抑制の機序をさらに明らかにする。

【０６５９】

要約すると、ＶＩＳＴＡを、新規の免疫抑制性リガンドと特定した。ＡＰＣでのＶＩＳＴＡの発現は、Ｔ細胞とＡＰＣとの間の同族相互作用中に、Ｔ細胞上のそのまだ特定されていないカウンター受容体に結合することによってＴ細胞応答を抑制する。ＶＩＳＴＡ封鎖は、自己免疫疾患モデルにおいてＴ細胞媒介性免疫を高め、ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２等の他の阻害性Ｂ７ファミリーリガンドと比較した自己免疫を制御するその特有の重複しない役割を示唆する。免疫活性化の初期のその高度に制御された発現パターンは、Ｔ細胞免疫を下方制御し、炎症性応答を弱めるためのフィードバック制御経路も示し得る。この点において、ＶＩＳＴＡ阻害経路の治療的介入は、Ｔ細胞媒介性免疫を調節してウイルス感染および癌等の疾患を治療するための新規のアプローチの代表である。

【０６６０】

実施例２１

自己免疫における免疫介入の標的としてのＶＩＳＴＡ経路

これらの研究の目的は、可溶性ＶＩＳＴＡ－Ｉｇタンパク質がインビボで免疫応答を抑制することができるかを判定することである。インビボでマウスＶＩＳＴＡ－ｍＩＧｇ２

ａを用いた研究は、遅くとも１４日目の治療的処理がＥＡＥにおける臨床疾患スコアに有益な効果をもたらしたことを示した。我々が自己免疫疾患介入において新たな軸を特定したかもしれないため、これらの進行中の実験は、まさに胸を躍らせるような実験に見える（図２６）。この成功に基づいて、我々は、マウスＩｇＧ１またはＩｇＧ２ａ骨格上のマウスＶＩＳＴＡを用いて、それらの細胞親和性を活用する研究を拡大している。ＩｇＧ１Ｆｃ（野生型ＩｇＧ１および現存する非ＦｃＲ結合ＩｇＧ１の両方）とインフレームのＶＩＳＴＡのＦｃ融合構築物を産生している。これらの可溶性ＶＩＳＴＡ分子のそれぞれを試験して、それらがＥＡＥを抑制することができるかを判定し、ＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ１およびＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ２ａの両方がＥＡＥの発症および進行を抑制することが示される（図２７）。これらの初期結果は、二量体細胞親和性ＶＩＳＴＡがインビボで活性を有することを示唆するが、我々は、部位特異的ビオチン化を用いた四量体化および多量体化のためのアビジンとの複合化にも備えている。提案された研究は、インビトロで、具体的には、ＥＡＥの文脈でＴ細胞機能を調節するための一組の多価試薬の系統的生成および分析についての専門的知識を活用する。最後に、我々は、この提案で説明される取り組みが新たな治療戦略の開発にかなりの可能性を秘めており、一般に自己免疫およびＴ細胞機能に関心を持つ全地域社会にかなり有用であると確信している。

【０６６１】

実施例２２

ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ複合体がＥＡＥ進行を軽減する。

実験的自己免疫脳脊髄炎（ＥＡＥ）は、多発性硬化症のモデルである。マウスを１７５μｇのＭＯＧ／ＣＦＡおよび３００ｎｇの百日咳毒素（ＰＴ）で免疫して（０日目、２日目）、ＥＡＥを誘導した。１４、１７、および２０日目に、１５０μｇのＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ　２ａ（ｎ＝８）または１５０μｇの対照ＩｇＧ２ａ（ｎ＝８）を投与した。データが平均±標準誤差で図２６に示される。別の実験において、６日目に、マウスを、１５０μｇの対照ＩｇＧ１（ｎ＝３）、１５０μｇの対照ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）、１５０μｇのｍＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ１（ｎ＝３）、または１５０μｇのｍＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）を週に３回（合計２週間）投与して処置した。データが平均±標準誤差で図２７に示される。別の実験において、１４日目に、マウスを、ＰＢＳ（ｎ＝６）、１００μｇの対照ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）、３００μｇの対照ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）、１００μｇのＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）、または３００μｇのｍＶＩＳＴＡ－ＩｇＧ２ａ（ｎ＝６）を週に３回（合計２週間）投与して処理した。データが平均±標準誤差で図２８に示される。したがって、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質は、炎症性状態、例えば、多発性硬化症に治療効果を有する。

【０６６２】

実施例２３

ヒト細胞におけるＶＩＳＴＡ発現およびＶＩＳＴＡ－Ｉｇによる抑制の分析

ＶＩＳＴＡの発現パターンおよびＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の投与によるその抑制をヒト細胞試料で試験した。

【０６６３】

材料および方法

ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質の産生：ヒトＶＩＳＴＡの細胞外ＩｇＶドメイン由来のアミノ酸１６～１９４およびＦｃ受容体の低結合のために突然変異させたヒトＩｇＧ１の一形態からなる融合タンパク質を作成した。ＶＩＳＴＡ配列をベクターＣＤＭ７ＢのＳｐｅＩ－ＢａｍＨＩ部位にクローニングした。製造業者の取扱説明書に従ってＦｒｅｅｓｔｙｌｅトランスフェクション試薬およびタンパク質を含まないＦｒｅｅｓｔｙｌｅ発現培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、Ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ　ＣＨＯ細胞の一過性トランスフェクションによってタンパク質を産生した。上清を増殖の５日後に収集し、タンパク質Ｇ親和性カラムによって精製した。１０Ｋ　ＭＷＣＯスピンカラム（Ａｍｉｃｏｎ）を用いてタンパク質を濃縮した。

【０６６４】

細胞調製：ヒトアフェレーシス試料を未特定の健常なヒトドナーから得た。培養実験のために、血液をＬｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（ＰＡＡ）上に積層し、密度勾配遠心分離によって単離した。界面細胞をＰＢＳで２回洗浄し、その後、ＭＡＣＳ緩衝液で１回洗浄した後に、製造業者の取扱説明書に従って、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＣＤ４陰性選択キットＩＩ、ＣＤ８陰性選択キット、またはＣＤ４メモリーＴ細胞選択ンキットを用いて電磁ビーズ選択を行った。その後、エフェクター細胞単離のために、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＣＤ２７陽性選択ビーズを用いてＣＤ４　Ｔ細胞のＣＤ２７$^{+}$細胞型を枯渇させた。

【０６６５】

培養：Ｔ細胞を、抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３、ＢｉｏＸＣｅｌｌ）およびＶＩＳＴＡ－Ｉｇまたは対照－Ｉｇ（ＺＺ、Ｒ＆Ｄ　ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）のいずれかでコーティングした９６ウェル平底プレート中に２×１０^{5}細胞／ウェルで播いた。別途示されない限り、ＰＢＳ中で１０μｇ／ｍＬ（１：４の比率）のＶＩＳＴＡ－Ｉｇまたは対照－Ｉｇタンパク質と一緒に４℃で一晩混合した抗ＣＤ３を２．５μｇ／ｍＬでコーティングした。ウェルを完全培地で２回洗浄した後に、細胞を添加した。指示される場合、滴定量の抗ＣＤ２８（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）をコーティング混合物に含めたか、または５０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、またはＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を培養培地に添加した。培養物を、２日目に初期活性化マーカーについて分析し、５日目に後期活性化マーカーまたはＣＦＳＥプロファイルについて分析した。

【０６６６】

フローサイトメトリー：培養後の染色のために、細胞を収集し、Ｖ底９６ウェルプレートに移した。細胞を洗浄し、抗体（ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ６９、ＣＤ４５ＲＡ；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）および近赤外固定性生／死染料（ｎｅａｒ－ｉｎｆｒａｒｅｄ　ｆｉｘａｂｌｅ　ｌｉｖｅ－ｄｅａｄ　ｄｙｅ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含有するＨＢＳＳ／５％ＢＣＳ染色緩衝液中で染色した。細胞を洗浄し、ＢＤ固定緩衝液で固定した後、分析した。

【０６６７】

ＶＩＳＴＡ発現のための染色について、全血を洗浄し、細胞外マーカー用の抗体を含有するＰＢＡ緩衝液（ＰＢＳ／０．１％ＢＳＡ／０．１％アジ化ナトリウム）で染色した。ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ５６、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１２３、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１４、およびＣＤ１６に対する抗体をＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入し、抗ＶＩＳＴＡを本明細書に記載されるように産生した。ＦｏｘＰ３を細胞内で染色するために、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓのＦｏｘｐ３　Ｆｉｘａｔｉｏｎ／Ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ　ａｎｄ　Ｄｉｌｕｅｎｔキットおよびｂｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓの抗ＦｏｘＰ３抗体を用いた。図３３Ｄを参照されたい。

【０６６８】

試料を、ＦＡＣＳＤｉｖａソフトウェアｖ６．１．２（Ｂｅｃｔｏｎ＆Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）を用いてＬＳＲＩＩ　Ｆｏｒｔｅｓｓａ（Ｂｅｃｔｏｎ＆Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ，ＵＳＡ）上で得て、ＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ，Ｉｎｃ．）を用いて分析した。Ｐｒｉｓｍ　５（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．）を用いてグラフにしたものを用いてグラフを作成した。

【０６６９】

結果

ヒトＶＩＳＴＡタンパク質：ヒトゲノムに対するマウスＶＩＳＴＡ配列のＢＬＡＳＴは、８ｅ－１６５のｅ値および７７％の同一性を有する染色体１０オープンリーディングフレーム５４（Ｃ１０ｏｒｆ５４または血小板受容体Ｇｉ２４前駆体、遺伝子ＩＤ：６４１１５）を特定する。マウスＶＩＳＴＡと共通して、このタンパク質は、単一の細胞外ＩｇＶドメインを有するＩ型膜貫通タンパク質をコードすると予測される。ヒトＶＩＳＴＡは、３１１アミノ酸（ａａ）長であり、３２アミノ酸シグナルペプチド、１３０アミノ酸細胞外ＩｇＶドメイン、３３アミノ酸ストーク領域、２０アミノ酸膜貫通ドメイン、および

長い９６アミノ酸細胞質尾部からなる。配列番号１６のアミノ酸配列を参照されたい。

【０６７０】

ＶＩＳＴＡ発現分析：ＶＩＳＴＡ健常ヒト組織の発現を、ｃＤＮＡ組織パネル（Ｏｒｉｇｅｎｅ）のリアルタイムＰＣＲ分析によって試験した（図２９Ａ）。マウス組織と同様に、ＶＩＳＴＡは、造血組織またはかなりの数の造血組織を含有する組織で主に発現した。これは、免疫関連機能におけるＶＩＳＴＡの重要性と一致する。興味深いことに、ＶＩＳＴＡの発現は、特にヒト胎盤で高く、これは、妊娠同種環境への耐性の維持におけるＶＩＳＴＡの機能的役割を示し得る。この発現パターンがＶＩＳＴＡの最も近い相同体ＰＤ－Ｌ１と同様の傾向に従うことが見出された（図２９Ｂ）。

【０６７１】

次に、造血コンパートメント内でのＶＩＳＴＡタンパク質発現をフローサイトメトリーによって試験した。ＰＢＭＣを末梢血から単離し、抗ＶＩＳＴＡモノクローナル抗体ＧＡ１で染色した。ＶＩＳＴＡは、単球の大半、樹状細胞、ならびにＣＤ４およびＣＤ８Ｔ細胞の約２０％によって高度に発現された（図３０）。ＶＩＳＴＡ発現は、血中単球の「巡回性」（ＣＤ１４^{dim}ＣＤ１６$^{+}$）サブセットおよび「炎症性」（ＣＤ１４$^{+}$ＣＤ１６$^{+/-}$）サブセットの両方において、ならびに樹状細胞のリンパ球サブセットおよび骨髄サブセットの両方において観察された。

【０６７２】

Ｔ細胞機能へのＶＩＳＴＡの機能的効果：ＶＩＳＴＡがマウスＴ細胞免疫応答に負の影響を与えることが以前に実証されている（Ｗａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．ｐａｇｅｓ　１－１６）。ＶＩＳＴＡがヒト細胞媒介性免疫応答において同一の役割を有するかを試験した。ＶＩＳＴＡの細胞外ドメインおよびＦｃ受容体結合の低下のために突然変異を含むヒトＩｇＧのＦｃ領域からなるＩｇ融合タンパク質を作成した。１０μｇ／ｍｌのＶＩＳＴＡ－Ｉｇまたは対照Ｉｇを、２．５μｇ／ｍｌの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）とともにプレートに固定し、次いで、増殖を、ＣＦＳＥ希釈によって測定した。ＶＩＳＴＡがバルク精製されたＣＤ４（図３１Ａ）およびＣＤ８（図３１Ｂ）Ｔ細胞のＣＦＳＥ希釈を抑制することが見出された。ＶＩＳＴＡによる抑制は、ＰＤ－Ｌ１－Ｉｇ（Ｒ＆Ｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）によって誘導された抑制と同等である。さらに、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、メモリーサブセット（ＣＤ４５ＲＯ$^{+}$、図３１Ｃ）およびエフェクターサブセット（ＣＤ２７$^{-}$、図３１Ｄ）の抑制時に有効であった。ヒトＣＤ４　Ｔ細胞上でのマウスＶＩＳＴＡとヒトＶＩＳＴＡの比較は、ＶＩＳＴＡが種にわたって交差反応性であることを実証した。異なる濃度にわたるＯＫＴ３でのヒトＶＩＳＴＡ－ＩｇおよびヒトＶＩＳＴＡ－Ｉｇの滴定は、より高い濃度のＯＫＴ３がより高い濃度のＶＩＳＴＡに圧倒され得ることを示した（図３２Ａおよび３２Ｂ）。

【０６７３】

抑制機序に対する洞察を得るために、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇの存在下または不在下での活性化後に細胞状態を試験した。２日間の培養中に、抗ＣＤ３による初期活性化マーカーＣＤ２５およびＣＤ６９の上方制御が、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇによって遮断された（図３３Ａおよび３３Ｂ）。同様に、５日間の培養後、抗原経験を示すＣＤ４５ＲＡの発現からＣＤ４５ＲＯへの偏移が防止された（図３３Ｃ）。ＶＩＳＴＡは、細胞生存に影響を有さなかった。増殖の遮断と一致して、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇで処理した細胞は、ＯＫＴ３単独で見られる芽細胞ではなく、刺激されていない細胞と同様の前方および側方散乱プロファイルを有した。ＶＩＳＴＡによって誘導された抑制が安定しているかを判定するために、細胞を抗ＣＤ３およびＶＩＳＴＡ－Ｉｇで２日間培養し、その後、抗ＣＤ３単独に移して３日間培養した。図３４Ａおよび３４Ｂに示されるように、このさらなる刺激は、抑制の救出を不可能にした。

【０６７４】

次に、サイトカイン産生へのＶＩＳＴＡ－Ｉｇの効果を試験した。細胞を、増加量のＶＩＳＴＡ－Ｉｇの存在下で、プレート結合されたＯＫＴ３で５日間刺激し、その後、培養上清中の様々なサイトカインの濃度をサイトメトリービーズアレイによって測定した。わ

ずかなレベルのＩＬ－２、ＩＬ－４、またはＩＬ－６のみが検出され（５ｐｇ／ｍＬ未満）、差異は観察されなかった。しかしながら、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇは、ＣＤ４（図３５Ａ）およびＣＤ８（図３５Ｂ）Ｔ細胞によるＩＬ－１０、ＴＮＦα、およびＩＦＮγの産生を有意に低減させ、ＩＬ－１７の産生における軽度の減少傾向があった。

【０６７５】

Ｔ細胞のＶＩＳＴＡ誘導抑制を克服することができた因子も試験した。抗ＣＤ２８アゴニスト性抗体は、Ｔ細胞に強力な共刺激を提供するため、ＶＩＳＴＡ抑制にチャレンジするために培養物中に滴定した（図３６Ａ～Ｃ）。より少ない量の抗ＣＤ２８ではＶＩＳＴＡを克服することができなかったが、抗ＣＤ２８を１μｇ／ｍＬのコーティング濃度で包含したとき、ＶＩＳＴＡは、増殖を遮断することができなかった。同様に、ＩＬ－２、ＩＬ－７、およびＩＬ－１５等のサイトカインを添加することにより低濃度のＶＩＳＴＡを克服することができたが、より高い濃度のＶＩＳＴＡは、５０ｎｇ／ｍＬの生理学的に高い濃度のサイトカインでも依然として抑制性であった。

【０６７６】

したがって、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質が、ＣＤ４およびＣＤ８Ｔ細胞によって、ＩＬ－１０、ＴＮＦα、およびＩＦＮγの産生を著しく減少させ得るため、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇ融合タンパク質を、炎症の負の制御因子として用いることができる。これは、次いで、免疫応答の治療的下方制御につながり、自己免疫または炎症性障害の緩和を提供し得る。

【０６７７】

実施例２４

ヒト結腸直腸癌における腫瘍浸潤白血球（ＴＩＬ）でのＶＩＳＴＡ発現ならびに病期および予後との関係

我々は、マウスＴＩＬが非常に高いレベルのＶＩＳＴＡを発現し、ＶＩＳＴＡに対する抗体を遮断することにより腫瘍成長を減少させることを先に実証した（２）。我々は、ヒトにおける末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）と正常な結腸固有層単核細胞（ＬＰＭＣ）との両方でのＶＩＳＴＡ発現も実証し、ＶＩＳＴＡがヒト結腸直腸癌腫（ＣＲＣ）における腫瘍浸潤白血球で発現されると仮定する。本実施例は、免疫蛍光顕微鏡検査法およびフローサイトメトリーによって、「健全な」粘膜およびペア末梢血に隣接したＣＲＣにおけるＶＩＳＴＡ発現の特徴付けを説明する。組織切片は、ＴＭＥ内のＶＩＳＴＡ発現の構造についての有益な情報を提供する。フローサイトメトリーは、骨髄系由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）、腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）、樹状細胞（ＤＣ）、および制御Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）等のＴＩＬの頻度および活性化状態を含む、ＶＩＳＴＡ発現および非発現細胞のより広範な特徴付けを可能にする。ＣＲＣにおけるＶＩＳＴＡ発現は、臨床的および病理学的データにも関連しており、ＶＩＳＴＡ発現と予後マーカー、例えば、腫瘍の病期との関連性を実証する。

【０６７８】

抗体媒介性ＶＩＳＴＡ封鎖は、腫瘍成長を阻害する：

研究室内での以前の研究は、ＶＩＳＴＡが、ＰＤ－１（１）とは無関係にＴ細胞上の未知の受容体に結合する強力な免疫抑制性リガンドであることを確証している。ＶＩＳＴＡは、ＡＰＣで発現されると、Ｔ細胞増殖およびサイトカイン産生を抑制する。腫瘍細胞でのＶＩＳＴＡの過剰発現は、ワクチン接種した宿主における防御的抗腫瘍免疫を低下させた。抗ＶＩＳＴＡクローン１３Ｆ３は、インビトロでのＶＩＳＴＡの抑制活性を機能的に遮断し、実験的自己免疫脳脊髄炎（ＥＡＥ）の疾患進行を悪化させた（７５）。なおもさらに、１３Ｆ３投与は、膀胱腫瘍ＭＢ４９、メチルコラントレン（ＭＣＡ）－１０５線維肉腫、胸腺腫ＥＧ７、卵巣腫瘍ＩＤ８（図３７）、およびＢ１６Ｆ１０黒色腫を含む複数の可移植性腫瘍系における腫瘍成長を著しく減少させた。加えて、我々は、ＭＢ４９腫瘍流入領域リンパ節（ＬＮ）リンパ球由来のＩＦＮｇのＥＬＩＳＰＯＴで測定したとき、ＶＩＳＴＡ媒介性腫瘍拒絶が、強化された局所的抗腫瘍Ｔ細胞応答と相関していることを確認している。

【０６７９】
上述のマウスデータとヒトにおける癌の原因との直接翻訳関連性を実証するために、我々のグループは、炎症性腸疾患およびＣＲＣにおける粘膜免疫学の欠陥を調査する他施設でのＮＩＨＲの資金援助を受けたＣＬＲＮに登録済みの観察的研究（ＲＥＣ　１０／Ｈ０８０４／６５、ＮＩＨＲ　ＣＲＮ　９９２９）を開始している。次に、我々は、多色フローサイトメトリーおよび機能的アッセイに用いるために腸切除検体からのＬＰＭＣの抽出を遂行した。その後、抗ＶＩＳＴＡクローンＧＡ１およびＨＣ１（ＡＰＳ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｌｔｄ）を用いて、ヒト末梢血および固有層単球およびＬｉｎ－ＨＬＡ－ＤＲ＋ＤＣおよび単球におけるＶＩＳＴＡ発現を特定し、これは、以前に記載されていない（図３８）。その結果として、正常なＬＰＭＣにおける発現に加えて、我々は、ＶＩＳＴＡが隣接したＣＲＣにおけるＴＩＬで発現すると仮定する。

【０６８０】
８～１０個の色蛍光支援細胞分類（ＦＡＣＳ）抗体パネルを最適化して、サイトカインおよび転写因子発現に加えて、免疫細胞の頻度および活性化状態を判定し、これらのパネルをＰＢＭＣおよびＬＰＭＣに適用した。その後、ＦＡＣＳを用いて、集団特異的表面マーカーに基づいて結腸腫瘍試料中のＴＩＬの集団を区別する。例えば、ヒトＭＤＳＣは、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ３３＋、ＨＬＡ－ＤＲ－であることが見出され、さらにＣＤ１４＋およびＣＤ１４－サブセットに分類される。これらのＶＩＳＴＡ陽性および陰性下位集団を、我々の研究室がこの分子のために以前に開発した２つの抗体クローン（図４１、ＧＡ１およびＨＣ１）を用いて区別する。Ｔ細胞、ＣＤ６４、ＣＤ６２Ｌ、腫瘍関連マクロファージ等のＣＤ６９等の活性化マーカーを、これらのＶＩＳＴＡ陽性下位集団とＶＩＳＴＡ陰性下位集団の間で比較する。その後、これらを、実施例２９に見られるように、インビトロ条件下でさらに研究することができる。

【０６８１】
腫瘍試料の区分をＯＣＴ中で凍結させ、その後、ＶＩＳＴＡ発現について分析する。これらをヘマトキシリン対比染色で免疫蛍光または免疫組織化学によって染色する。免疫蛍光染色は、ＴＭＥにおける他の細胞（例えば、上皮細胞、ＭＤＳＣ、寛容原性ＤＣ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、および他の免疫細胞）に対して特異的な抗体に加えて、抗ＶＩＳＴＡ抗体を用いる。これは、ＶＩＳＴＡ発現細胞の微小解剖学的局在性およびＴＭＥにおける他の細胞とのそれらの空間的相互作用を実証する。ヘマトキシリン対比染色での免疫組織化学は、腫瘍病理および形態、ならびにＶＩＳＴＡが異なる病理（例えば、炎症化した領域または壊死領域）にどの程度関連しているかを明らかにする。

【０６８２】
さらに、ＶＩＳＴＡ発現を、デューク病期、病理学的ＴＮＭ病期分類、ならびに神経侵襲および分化の程度等の組織学的特徴等の臨床的および病理学的データと比較して、ＶＩＳＴＡ発現が臨床転帰の代用にどの程度関連しているかを判定する。ＣＲＣにおけるＣＯＸ－２発現（デュークＡ：６６％対デュークＤ：１００％における「高」ＣＯＸ－２発現）のパラダイムを用いて、試料サイズ８０（各デューク病期分類群においてｎ＝２０）は、８４％の力（α＝０．０５）を有し、任意の２つの群の間の３３％の差を検出する（７６）。

【０６８３】
世界的および臨床的に許容される様式で試料を分類することによって、この研究は、臨床的に関連性のあるデータを提供する。患者試料中のＴＩＬの特徴付けは、どの細胞がヒトにおいてＶＩＳＴＡを発現するか、および各サブセット内の発現が癌発症の各病期でどの程度変化し、転帰にどの程度関連しているかを概説する。例えば、ヒト卵巣癌において、ＦｏｘＰ３＋Ｔｒｅｇの広範囲の浸潤が、予後不良に関連していることが見出されている。この目的は、実施例２９に見られるようなインビトロ研究もさらに後押しする。

【０６８４】
実施例２５
腫瘍浸潤白血球（ＴＩＬ）でのＶＩＳＴＡ発現の機能的役割

我々のマウスデータは、ＶＩＳＴＡ陽性Ｔｒｅｇ がＶＩＳＴＡ陰性Ｔｒｅｇよりも抑制性であることを示唆する。したがって、我々は、エフェクター免疫応答においてＶＩＳＴＡ発現ＴＩＬがＶＩＳＴＡ陰性ＴＩＬよりも抑制性であると仮定した。２つの補足法を用いてこの仮説を試験した。最初に、結腸癌および正常な対照試料由来のＴＡＭ、ＭＤＳＣ、ＤＣ、およびＴｒｅｇを、ＶＩＳＴＡ陽性サブセットとＶＩＳＴＡ陰性サブセットに分類する。Ｔ細胞に対するこれらの細胞の抑制性または刺激性の性質をインビトロで判定し、その後、さらに機構的実験を行う。次に、ＶＩＳＴＡ発現をレトロウイルスＲＮＡｉでノックダウンさせ、これがインビトロで異なるＴＩＬ細胞型の抑制性質にどの程度影響を及ぼすかを判定する。このアプローチは、可能性のある治療法がＴＭＥにどの程度影響を与え得るかのさらなる理解に役立つ。

【０６８５】

我々は、ＶＩＳＴＡがＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答を大いに抑制することを実証した（図３９）。具体的には、図３９は、ａＣＤ３増殖アッセイにおいてプレート結合されたＶＩＳＴＡ－Ｉｇを用いたインビトロアッセイにおける増殖抑制を示す。本実施例は、ＶＩＳＴＡがＴＭＥ内の異なる細胞型の機能にどの程度影響を及ぼすかをさらに試験する。結腸癌におけるＶＩＳＴＡの機能的役割を理解することにより、抗ＶＩＳＴＡ抗体を用いることにより可能になる抗癌治療の基盤がさらに提供される。

【０６８６】

蛍光支援細胞分類を用いて、細胞特異的マーカーおよび活性化マーカーに基づいて、腫瘍試料由来の骨髄またはリンパ由来ＴＩＬ（腫瘍関連マクロファージ、骨髄由来サプレッサー細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、およびＤＣ）の個々の集団を得る。その後、これらを、ｉＲＮＡを発現するレンチウイルスまたは高レベルのＶＩＳＴＡ、ＰＤ－Ｌ１、もしくは「空」を発現するレトロウイルスでトランスフェクトして、ＶＩＳＴＡまたはＰＤ－Ｌ１発現をノックダウンする。ＰＤ－Ｌ１を陽性対照として用いて、Ｂ７－ＣＤ２８ファミリー内のデータコンテキストを得る。レトロウイルスベクターにおけるｈＶＩＳＴＡの４つの特有の２９ｍｅｒ　ｓｈＲＮＡ構築物および対照の非機能性２９ｍｅｒスクランブルｓｈＲＮＡ構築物は、市販されている（Ｏｒｉｇｅｎｅ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）。これらは、７０％を超えるノックダウンの達成を保証する。トランスフェクション後、ＴＩＬを、ＣＦＳＥ標識化レスポンダーＴ細胞との標準の混合リンパ球反応（ＭＬＲ）培養物において抑制／刺激能力について試験する。サイトカイン産生も測定して、ＶＩＳＴＡが分化にどの程度影響を与えるかを判定する。

【０６８７】

実施例２６

抗ＶＩＳＴＡ抗体のパネルのスクリーニングおよび既存の抗ＰＤ－Ｌ１　ｍＡｂとの活性比較および抗体を遮断するＶＩＳＴＡの特定

我々の研究室で先に産生した抗ＶＩＳＴＡ抗体が、マウスにおける腫瘍成長の軽減に有効であり、ＶＩＳＴＡに最も近い相同体であることが証明されており、ＰＤ－Ｌ１は、黒色腫の治療のための臨床試験において既にうまく機能している。本実施例は、抗ＰＤ－Ｌ１単独またはＶＩＳＴＡとＰＤ－Ｌ１封鎖の組み合わせのいずれかの有効性と比較した、インビトロでのＴ細胞増殖を強化する有効性についての抗ＶＩＳＴＡ抗体のパネルの試験を説明する。

【０６８８】

ＰＤ－Ｌ１／ＰＤ－１およびＣＴＬＡ－４等の免疫チェックポイント経路の役割、ならびに末期黒色腫に対する任意の有効性を有する第一の免疫学的治療であるＣＴＬＡ－４封鎖（Ｉｐｉｌｕｍｉｍａｂ）は、ヒト患者において十分に裏付けされている（７７）。別の免疫学的チェックポイントタンパク質の封鎖と組み合わせて抗ＶＩＳＴＡ治療を用いることにより、抗腫瘍応答をなおさらに強化することができる。我々の研究室は、Ｃ５７ＢＬ／６マウスの細胞株Ｂ１６Ｆ１０を用いてこの理論を試験した。その免疫原性の低さのため、Ｂ１６Ｆ１０は、癌に対する免疫介入に非常に困難なマウス腫瘍系も表す。ＶＩＳＴＡでの予防的処理（－２日目）がＢ１６Ｆ１０腫瘍進行を大いに中断させた一方で、別

の免疫チェックポイントタンパク質ＰＤ－Ｌ１の封鎖は、何の影響力も持たなかった（図４０）。ＶＩＳＴＡを治療的に投与したとき（＋４日目）、単一の試薬としての有効性は検出されなかった。しかしながら、。ＶＩＳＴＡ封鎖をＰＤ－Ｌ１封鎖と組み合わせたときに、腫瘍成長への追加の影響が見られた（図４０）。ＶＩＳＴＡ－ＩｇおよびＰＤ－Ｌ１－Ｉｇを一緒に用いてＴ細胞活性化を抑制したときに、より高い相乗効果がインビトロで観察された。

【０６８９】

これらの結果は、ＶＩＳＴＡがＰＤ－Ｌ１と相乗作用してＴ細胞応答を最大限に抑制するという確信をもたらした。本実施例において、我々は、インビトロでＴ細胞増殖を強化する有効性について抗ＶＩＳＴＡ抗体のパネルを試験し、これを抗ＰＤ－Ｌ１単独またはＶＩＳＴＡとＰＤ－Ｌ１封鎖の組み合わせと対比する。

【０６９０】

我々は、抗ＶＩＳＴＡのクローン、ＧＡ１およびＨＣ１を以前に生成している。ＧＡ１ｍＡｂでの染色が図４１に示される。ＧＡ１を、ＥＬＩＳＡにおいて、ｈＶＩＳＴＡ－Ｉｇに結合するが、Ｉｇには結合しないその能力によって選択し、その後、対照形質導入細胞ではなくＧＦＰ－ＶＩＳＴＡ形質導入細胞の特異的染色によって選択した。示されるように（図４１）ｍＡｂ上清を用いて、ＧＡ１は、末梢血中の５０％を超える単球およびわずかな割合のリンパ球に結合し、これらのすべてがＶＩＳＴＡ－Ｉｇによって遮断される。抗ヒトＶＩＳＴＡ抗体のより広範なパネルを生成し、ＶＩＳＴＡ経路を遮断する有効性について試験した。さらなる抗体を生成するために、我々は、マウスをＶＩＳＴＡ発現ＥＬ４細胞株で照射し、その後、ＶＩＳＴＡ－Ｉｇで月に１回追加免疫する。力価を、Ｆｃ領域に対する応答を制御するヒトＩｇＧに対するＶＩＳＴＡ－Ｉｇを用いてＥＬＩＳＡによって確認する。その後、脾臓を用いて骨髄腫を生成する。その後、ヒトＰＢＭＣを用いて上清を結合因子についてスクリーニングし、ＶＩＳＴＡ発現細胞株についてもスクリーニングする。陽性クローンをサブクローニングし、凍結保存した。各融合の初期データに基づいて、我々は、５～１０の候補結合因子を予想し、その結果、まず最初に１０匹のマウスを免疫する。

【０６９１】

抗体を、ＶＩＳＴＡ発現ＡＰＣによって誘導されるＴ細胞応答を遮断する有効性について試験する。ヒトアフェレーシス白血球濃縮錐体（ｈｕｍａｎ　ａｐｈｅｒｅｓｉｓ　ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ－ｅｎｒｉｃｈｅｄ　ｃｏｎｅ）（例えば、Ｋｉｎｇ’ｓ　Ｃｏｌｌｅｇｅ　Ｈｏｓｐｉｔａｌから入手可能）。各試料から、我々は、典型的には、約10^9個のＰＢＭＣを得ることができる。多数のＣＤ４　Ｔ細胞とミスマッチドナー由来のＣＤ１４＋単球の両方をＭｉｌｔｅｎｙｉビーズ選択によって単離し、凍結保存する。これにより、混合リンパ球反応において抗体をスクリーニングするための比較的一貫性のある細胞集団が得られる。ヒト血中単球は、高レベルのＶＩＳＴＡを発現し（図４１）、それ故に使用に好適な刺激集団である。Ｔ細胞の増殖応答を、対照Ｉｇに対して抗ＶＩＳＴＡ抗体の存在下でＣＦＳＥ希釈によって測定する。さらに、抗ＰＤ－Ｌ１抗体が、陽性対照として有用であり、比較に有用である、十分に特徴付けられた薬剤であるため、この抗ＰＤ－Ｌ１抗体も用いる。我々は、相乗作用のためにこれら両方の試薬を一緒に用いる効果も試験し、治療薬としてこれら２つの試薬を一緒に用いることを想定する。

【０６９２】

同様の方法を用いて、抗ＶＩＳＴＡ抗体を、Ｋ－５６２等のＶＩＳＴＡ発現ＡＰＣ細胞株によって誘導されるＴ細胞応答を遮断する有効性について試験する。

【０６９３】

さらに、抗ＶＩＳＴＡ抗体を、抗ＣＤ３刺激のＶＩＳＴＡ－Ｉｇ抑制を遮断する能力について試験する。上の実施例３で説明されるように、ＶＩＳＴＡ（ＰＤ－Ｌ３）－Ｉｇは、停止細胞分裂によって判定すると、プレート結合された抗ＣＤ３刺激に応答して、バルク精製されたＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖を抑制した（図９Ａ～Ｂを参照されたい）。

【０６９４】

これらのアッセイで特定されたＶＩＳＴＡ阻害性抗体を、例えば、先の実施例でさらに説明されるような癌を有する動物モデルにおける抗腫瘍応答の促進についてインビボでさらに試験する。さらに、有効性を示す抗体をヒト化して、潜在的な治療的使用のためにさらに開発することができる。

【０６９５】

すべての出版物、特許、および特許出願は、各個々の出版物、特許、および特許出願が、参照によりその全体が組み込まれると具体的および個別に示される場合と同程度に、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０６９６】

当業者であれば、日常的な実験のみを用いて、本発明の特定の実施形態との多くの等価物が本明細書に記載されることを認識するか、または確認することができる。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるよう意図されている。

【０６９７】

参考文献：

【表４】

1. Wang, L., et al., VISTA, a novel Ig-superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. J. Exp. Med., 2011. 208(3): p. 577-92.

2. Wang, L., et al., Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(27): p. 9331-6.

3. Hodi, F.S., Overcoming immunological tolerance to melanoma: Targeting CTLA-4. Asia Pac J Clin Oncol, 2010. 6 Suppl 1: p. S16-23.

4. Tarhini, A., E. Lo, and D.R. Minor, Releasing the brake on the immune system: ipilimumab in melanoma and other tumors. Cancer Biother Radiopharm, 2010. 25(6): p. 601-13.

5. Kaehler, K.C., et al., Update on immunologic therapy with anti-CTLA-4 antibodies in melanoma: identification of clinical and biological response patterns, immune-related adverse events, and their management. Semin Oncol, 2010. 37(5): p. 485-98.

6. Wing, K., et al., CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. Science, 2008. 322(5899): p. 271-5.

7. Chambers, C.A., T.J. Sullivan, and J.P. Allison, Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. Immunity, 1997. 7(6): p. 885-95.

【表５】

8. Waterhouse, P., et al., Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science, 1995. 270(5238): p. 985-8.
9. Tivol, E.A., et al., 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(5): p. 541-7.
10. Zheng, S.G., et al., TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. J Immunol, 2006. 176(6): p. 3321-9.
11. van Elsas, A., A.A. Hurwitz, and J.P. Allison, Combination immunotherapy of B16 melanoma using anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. J Exp Med, 1999. 190(3): p. 355-66.
12. Hoos, A., et al., Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. Semin Oncol, 2010. 37(5): p. 533-46.
13. Calabro, L., et al., Clinical studies with anti-CTLA-4 antibodies in non-melanoma indications. Semin Oncol, 2010. 37(5): p. 460-7.
14. Attia, P., et al., Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. J Clin Oncol, 2005. 23(25): p. 6043-53.
15. Freeman, G.J., et al., Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med, 2000. 192(7): p. 1027-34.
16. Butte, M.J., et al., Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the b7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. Immunity, 2007. 27(1): p. 111-22.
17. Nishimura, H., et al., Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity, 1999. 11(2): p. 141-51.
18. Nishimura, H., et al., Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science, 2001. 291(5502): p. 319-22.
19. Keir, M.E., et al., PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol, 2008. 26: p. 677-704.

【表６】

20. Gao, Q., et al., Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res, 2009. 15(3): p. 971-9.

21. Dong, H. and L. Chen, B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity. J Mol Med, 2003. 81(5): p. 281-7.

22. Zou, W. and L. Chen, Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol, 2008. 8(6): p. 467-77.

23. Dong, H., et al., Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med, 2002. 8(8): p. 793-800.

24. Blank, C., et al., PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. Cancer Res, 2004. 64(3): p. 1140-5.

25. Blank, C., T.F. Gajewski, and A. Mackensen, Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumorspecific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. Cancer Immunol Immunother, 2005. 54(4): p. 307-14.

26. Iwai, Y., et al., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(19): p. 12293-7.

27. Geng, H., et al., HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma. Int J Cancer, 2006. 118(11): p. 2657-64.

28. Hirano, F., et al., Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. Cancer Res, 2005. 65(3): p. 1089-96.

29. Curiel, T.J., et al., Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. Nat Med, 2003. 9(5): p. 562-7.

30. Brahmer, J.R., et al., Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. J Clin Oncol, 2010. 28(19): p. 3167-75.

31. Sica, G.L., et al., B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. Immunity, 2003. 18(6): p. 849-61.

32. Prasad, D.V., et al., B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. Immunity, 2003. 18(6): p. 863-73.

【表７】

33. Yi, K.H. and L. Chen, Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. Immunol Rev, 2009. 229(1): p. 145-51.
34. Kryczek, I., et al., B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. J Exp Med, 2006. 203(4): p. 871-81.
35. Kryczek, I., et al., Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. J Immunol, 2006. 177(1): p. 40-4.
36. Shevach, E.M., CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol, 2002. 2(6): p. 389-400.
37. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, Regulatory T cells in tumor immunity. Int J Cancer, 2010. 127(4): p. 759- 67.
38. Yamaguchi, T. and S. Sakaguchi, Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. Semin Cancer Biol, 2006. 16(2): p. 115-23.
39. Curiel, T.J., et al., Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med, 2004. 10(9): p. 942-9.
40. Zou, W., Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol, 2006. 6(4): p. 295- 307.
41. Sharma, M.D., et al., Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. J Clin Invest, 2007. 117(9): p. 2570-82.
42. Tacke, F. and G.J. Randolph, Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology, 2006. 211(6-8): p. 609-18.
43. Shortman, K. and S.H. Naik, Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. Nat Rev Immunol, 2007. 7(1): p. 19-30.
44. Leon, B. and C. Ardavin, Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. Immunol Cell Biol, 2008. 86(4): p. 320-4.
45. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 669-92.
46. Geissmann, F., et al., Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science, 2010. 327(5966): p. 656-61.
47. Qu, C., et al., Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. J Exp Med. 2004. 200(10): p. 1231-41.

【表８】

48. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity, 2003. 19(1): p. 71-82.
49. Sunderkotter, C., et al., Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. J Immunol, 2004. 172(7): p. 4410-7.
50. Randolph, G.J., et al., Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. Immunity, 1999. 11(6): p. 753-61.
51. Robben, P.M., et al., Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. J Exp Med, 2005. 201(11): p. 1761-9.
52. Serbina, N.V., et al., TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. Immunity, 2003. 19(1): p. 59-70.
53. Copin, R., et al., MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during Brucella melitensis infection. J Immunol, 2007. 178(8): p. 5182-91.
54. Geissmann, F., et al., Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. Immunol Cell Biol, 2008. 86(5): p. 398-408.
55. Krutzik, S.R., et al., TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. Nat Med, 2005. 11(6): p. 653-60.
56. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. Immunity, 2007. 26(4): p. 519- 31.
57. Le Borgne, M., et al., Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. Immunity, 2006. 24(2): p. 191-201.
58. Nakano, H., et al., Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. Nat Immunol, 2009. 10(4): p. 394-402.
59. Rabinovich, G.A., D. Gabrilovich, and E.M. Sotomayor, Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. Annu Rev Immunol, 2007. 25: p. 267-96.
60. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol, 2009. 9(3): p. 162-74.
61. Wilcox, R.A., Cancer-associated myeloproliferation: old association, new therapeutic target. Mayo Clin Proc, 2010. 85(7): p. 656-63.
62. Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha, Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. J Immunol, 2009. 182(8): p. 4499-506.

【表９】

63. Marigo, I., et al., Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. Immunol Rev, 2008. 222: p. 162-79.
64. Corzo, C.A., et al., HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. J Exp Med, 2010. 207(11): p. 2439-53.
65. Gabrilovich, D., Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. Nat Rev Immunol, 2004. 4(12): p. 941-52.
66. Melief, C.J., Cancer immunotherapy by dendritic cells. Immunity, 2008. 29(3): p. 372-83.
67. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 685-711.
68. Ghiringhelli, F., et al., Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. J Exp Med, 2005. 202(7): p. 919-29.
69. Conejo-Garcia, J.R., et al., Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. Nat Med, 2004. 10(9): p. 950-8.
70. Huarte, E., et al., Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity. Cancer Res, 2008. 68(18): p. 7684-91.
71. Cubillos-Ruiz, J.R., et al., Polyethylenimine-based siRNA nanocomplexes reprogram tumor-associated dendritic cells via TLR5 to elicit therapeutic antitumor immunity. J Clin Invest, 2009. 119(8): p. 2231-44.
72. Bak, S.P., et al., Murine ovarian cancer vascular leukocytes require arginase-1 activity for T cell suppression. Mol Immunol, 2008. 46(2): p. 258-68.
73. Scarlett, U.K., et al., In situ stimulation of CD40 and Toll-like receptor 3 transforms ovarian cancerinfiltrating dendritic cells from immunosuppressive to immunostimulatory cells. Cancer Res, 2009. 69(18): p. 7329-37.
74. Nesbeth, Y.C., et al., CD4+ T cells elicit host immune responses to MHC class II-negative ovarian cancer through CCL5 secretion and CD40-mediated licensing of dendritic cells. J Immunol, 2010. 184(10): p. 5654-62.
75. Wang, L., et al., VISTA, a novel mouse Ig-superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. J Exp Med, 2010.
76. Sheehan, K., K. Sheehan, and D. O'Donoghue, The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. JAMA, 1999. 282: p. 1254-7.
77. Weber, J., Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. Semin Oncol, 2010. 37(5): p. 430-9.

【図１－１】

図１Ａ

図１Ｂ

【図１－２】

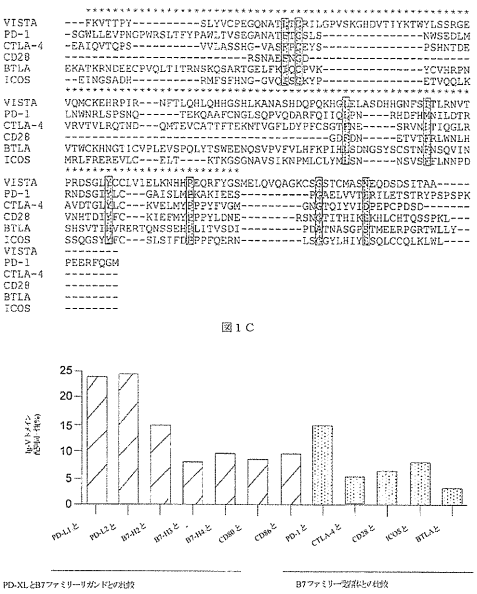


図１Ｃ

図１Ｄ

【図１－３】

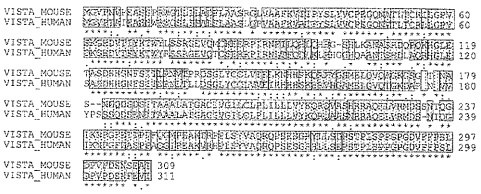
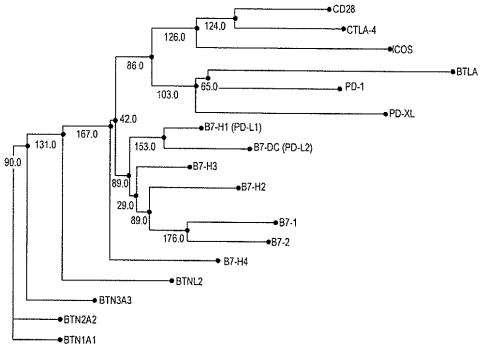
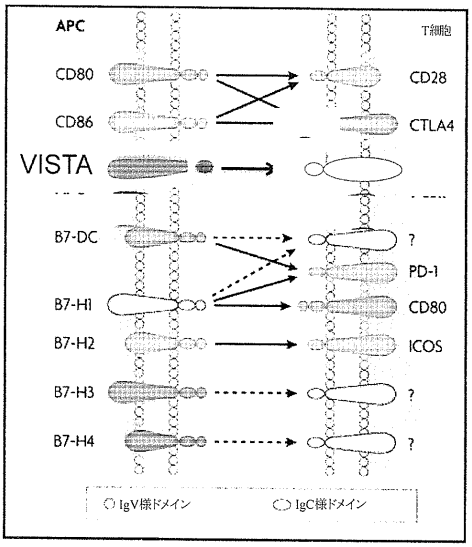


図１Ｅ

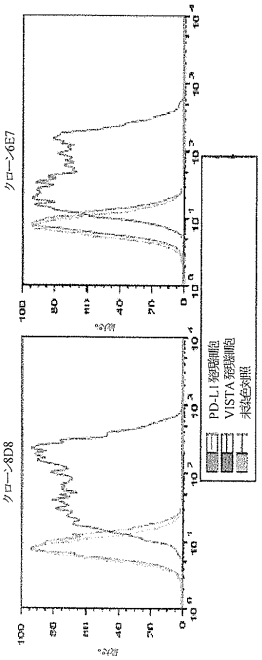
【図２】



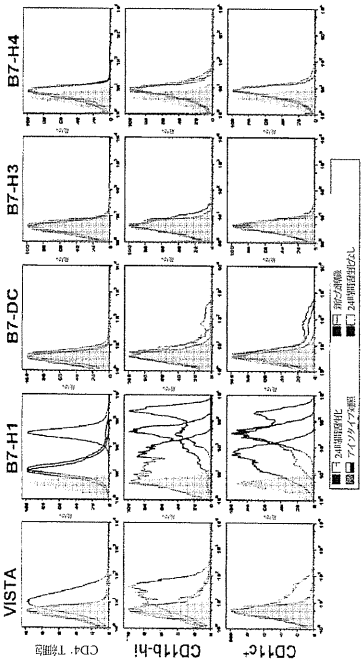
【図４】



【図５】



【図６】



【図９－１】

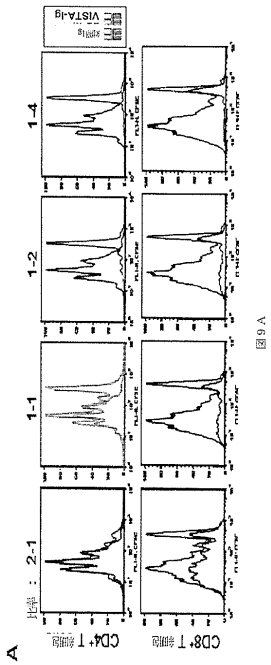


図９Ａ

【図１１】

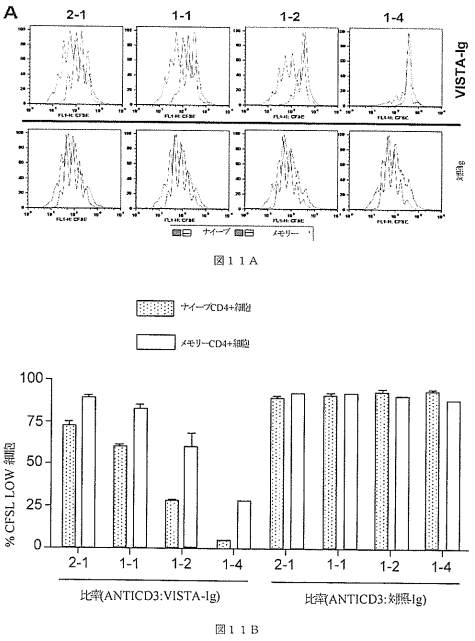


図１１Ａ

図１１Ｂ

【図１３－１】

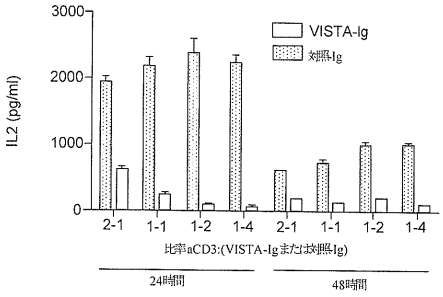


図１３Ａ

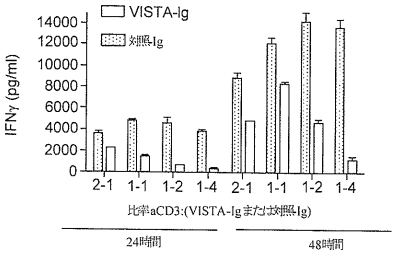


図１３Ｂ

【図１３－２】

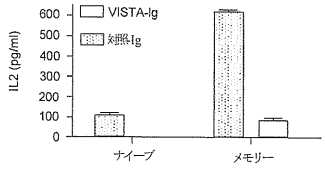


図１３Ｃ

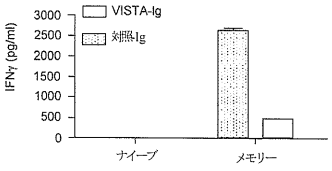


図１３Ｄ

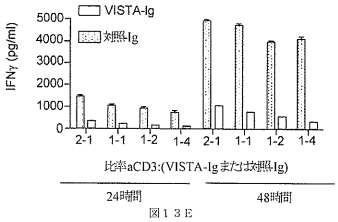


図１３Ｅ

【図１４－１】

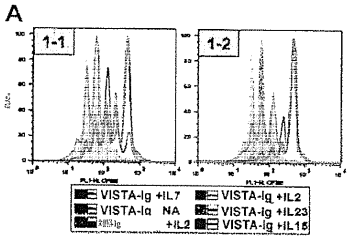


図１４Ａ

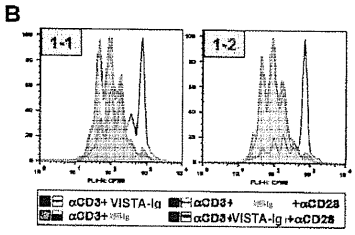


図１４Ｂ

【図１４－２】

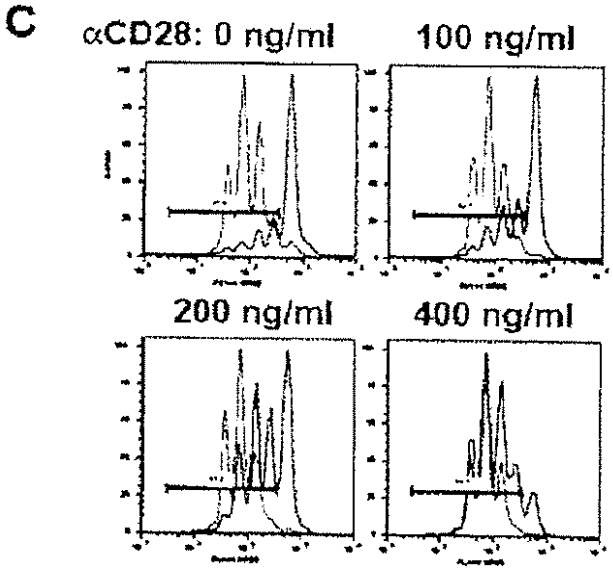


図１４Ｃ

【図１４－３】

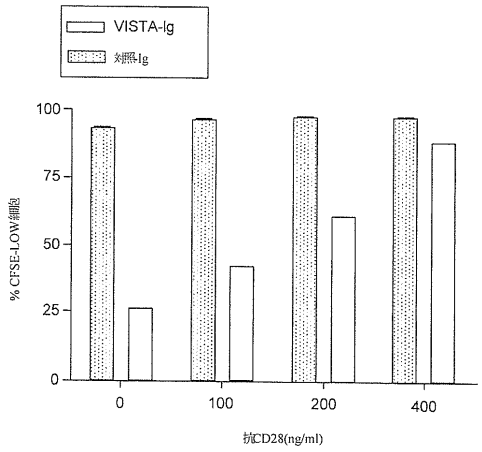


図１４Ｄ

【図１５－１】

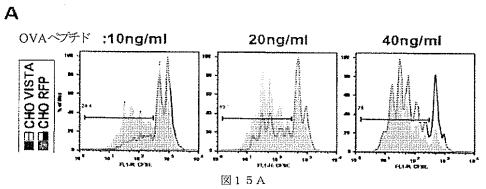


図１５Ａ

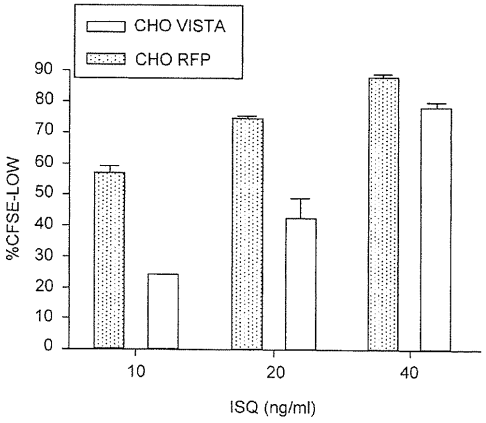


図１５Ｂ

【図１５－２】

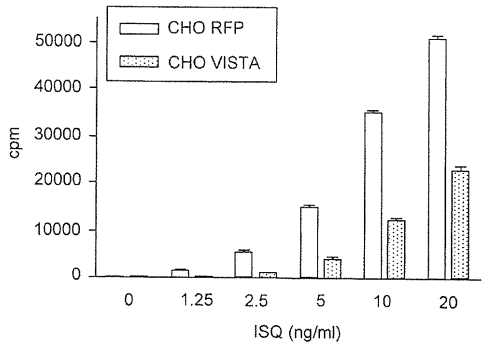


図１５Ｃ

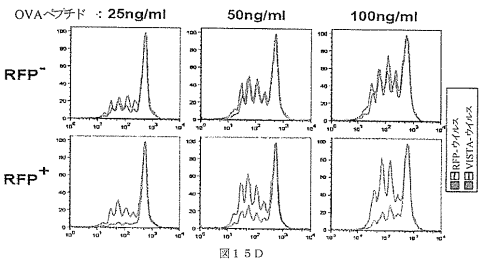
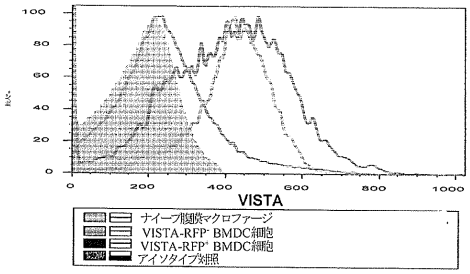
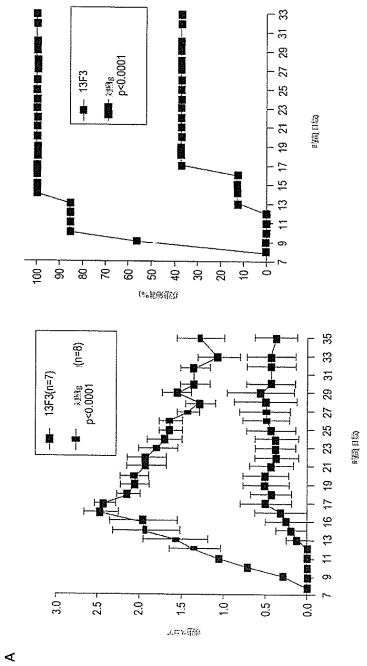


図１５Ｄ

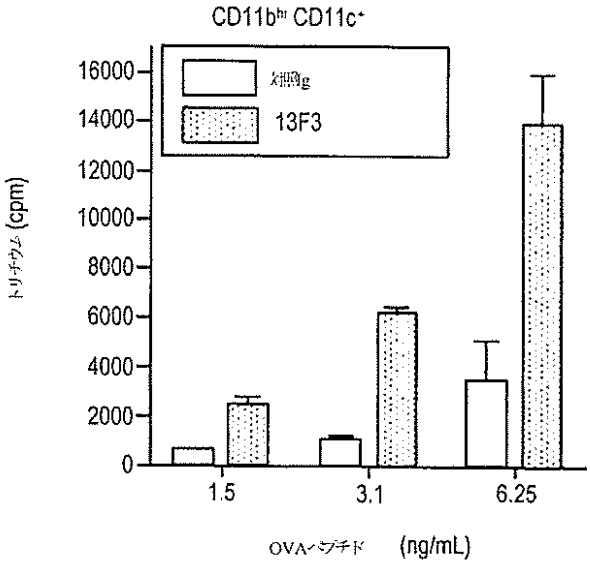
【図１６】



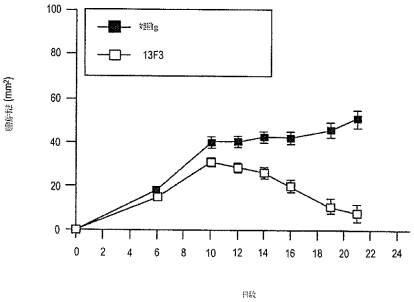
【図１７】



【図１８】



【図１９】



【図２０－１】

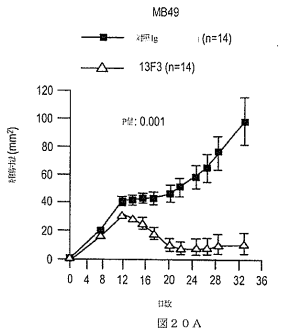


図２０Ａ

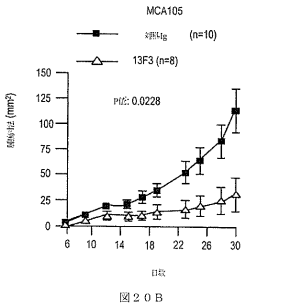


図２０Ｂ

【図２０－２】

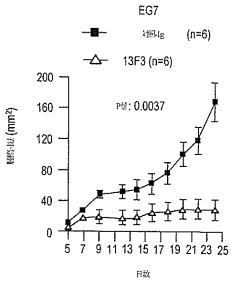


図２０Ｃ

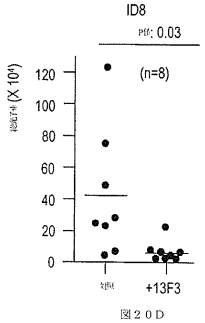


図２０Ｄ

【図２０－３】

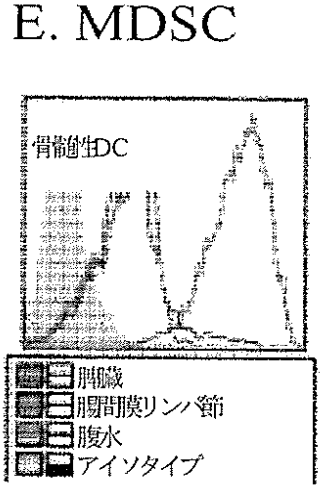
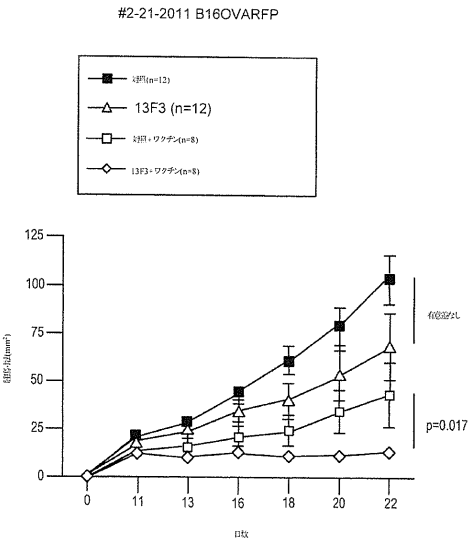
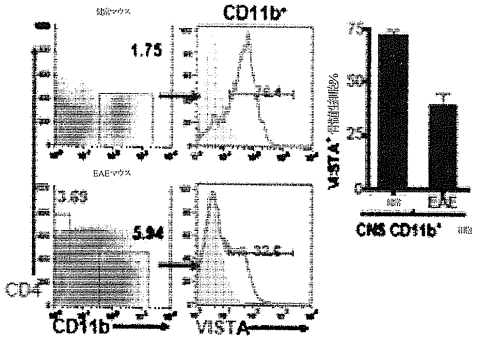


図２０Ｅ

【図２１】



【図２２】



【図２３－１】

MGVPAVPEASSPRWGTLLLAIFLAASRGLVAAFKVTTPYSLYVCPEGQNATLTC
RILGPVSKGHDVTIYKTWYLSSRGEVQMCKEHRPIRNFTLQHLCHHGSHLKAN
ASHDQPQKHGLELASDHHGNFSITLRNVTPRDSGLYCCLVIELKNHHPEQRFYG
SMELQVQAGKGSGSTCMASNEQDSDSITAAALATGACIVGILCLPLILLLVYKQRQ
VASHRRAQELVRMDSSNTQGIENPGFETTPPFQGMPEAKTRPPLSYVAQRQPS
ESGRYLLSDPSTPLSPPGPGDVFFPSLDPVPDSPNSEAI

(膜貫通領域)

図２３Ａ

図２３Ｂ

【図２３－２】

図２３Ｃ

【図２４】

図２４

【図２４】

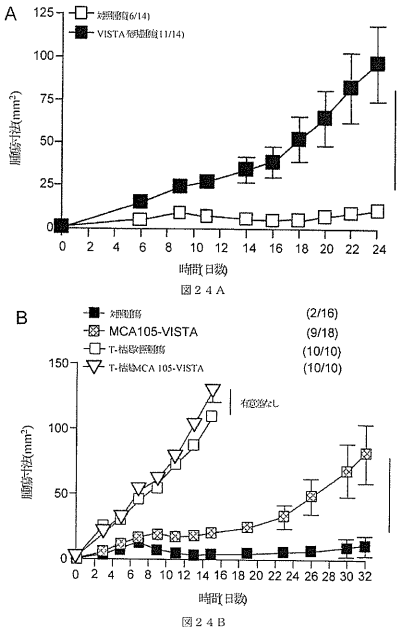


図２４Ａ

図２４Ｂ

【図２５－１】

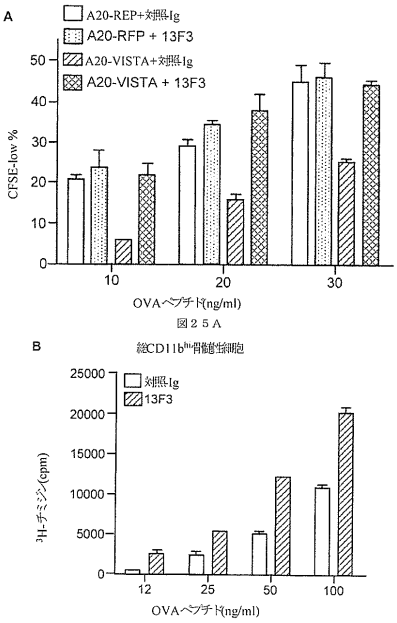
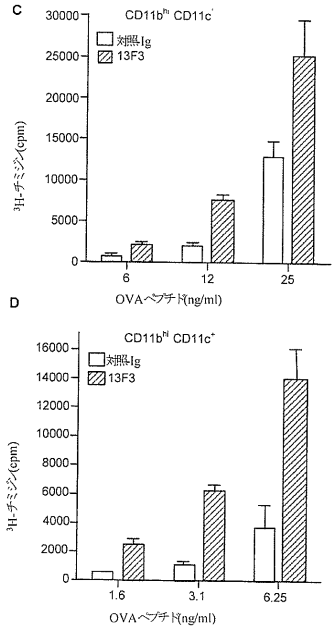


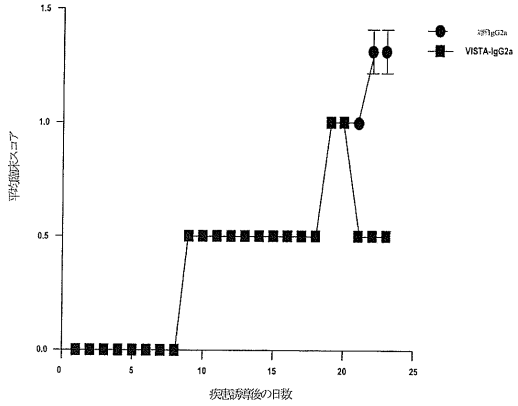
図２５Ａ

図２５Ｂ

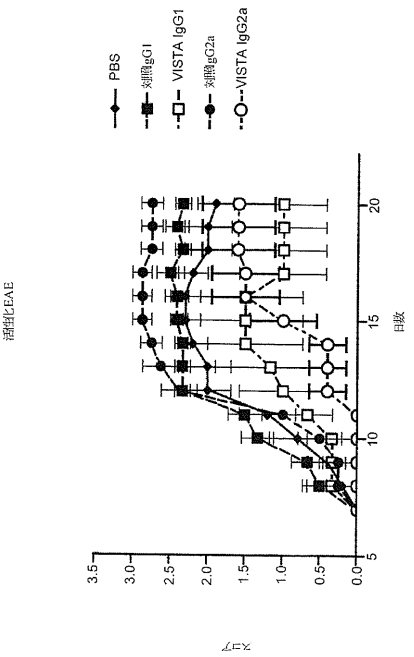
【図２５－２】



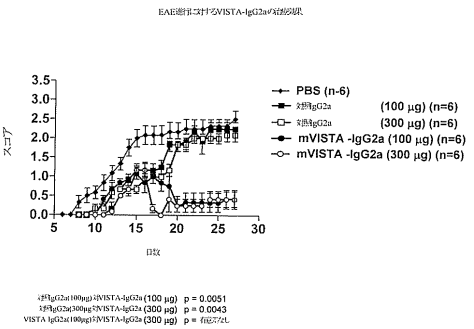
【図２６】



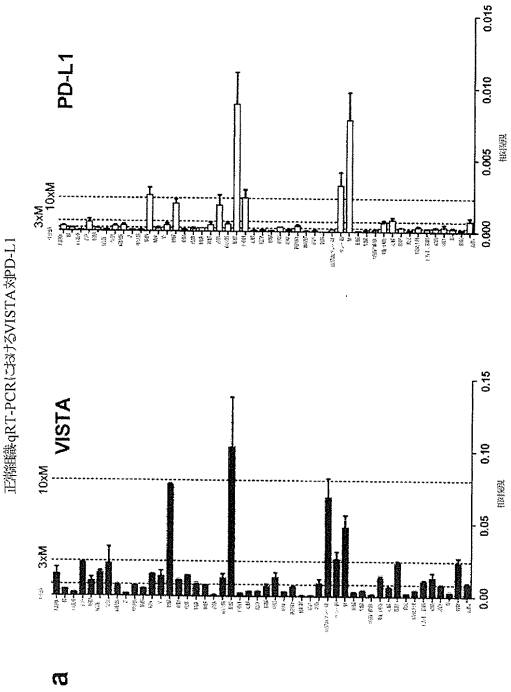
【図２７】



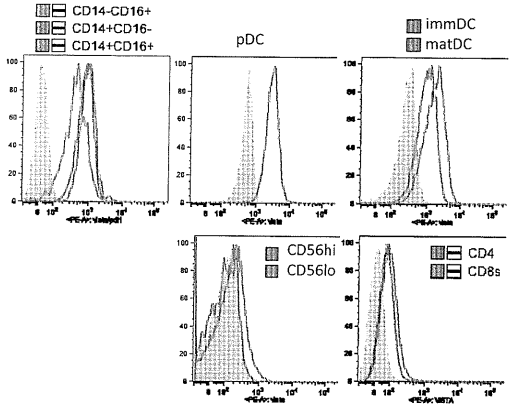
【図２８】



【図２９】

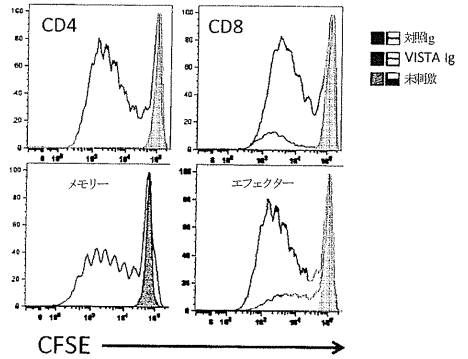


【図３０】



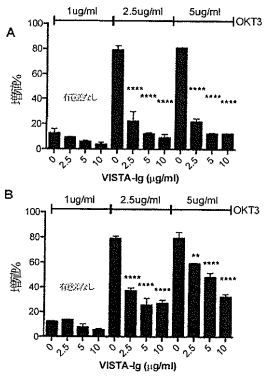
【図３１】

VISTAは、T細胞抑制性である



【図３２】

ヒトCD4におけるヒト対マウスの滴定



【図３３－１】

ＶＩＳＴＡで処理された細胞は活性化マーカーを発現しない

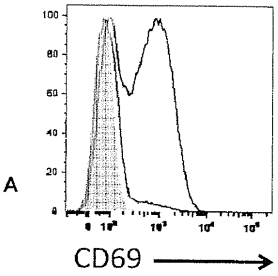


図３３Ａ

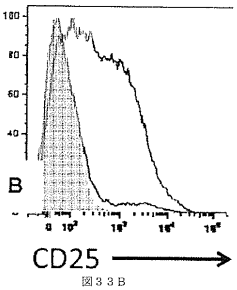


図３３Ｂ

【図３３－２】

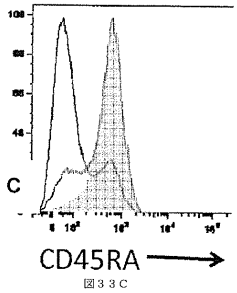


図３３Ｃ

VISTA-IgはFoxP3保存を増加させる

aCD28: 250 ng/ml
IL-2: 10 ng/ml
TGFb添加なし

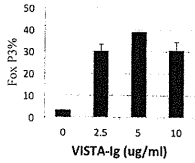
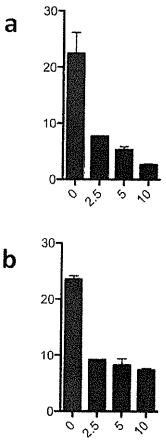


図３３Ｄ

【図３４】



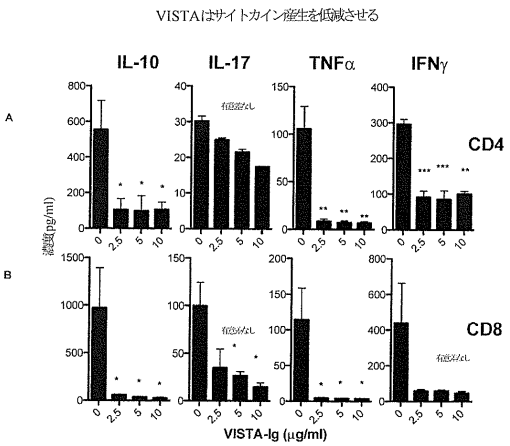
VISTA効果は安定している

細胞を抗CD3/VISTA-Ig上で培養し、次いでCD3単独に移した

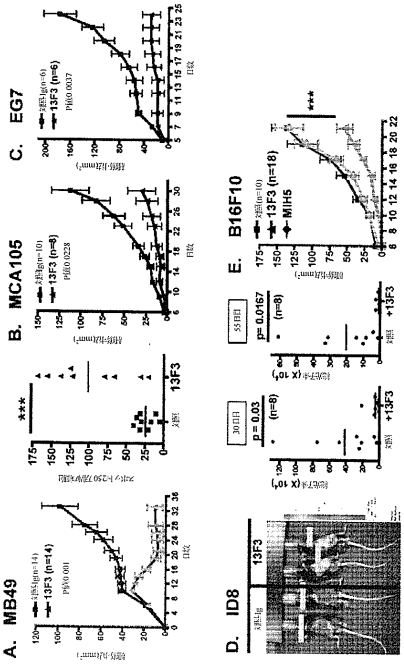
A)3日間のCD3/VISTAの後、2日間のCD3

B)2日間のCD3/VISTAの後、3日間のCD3

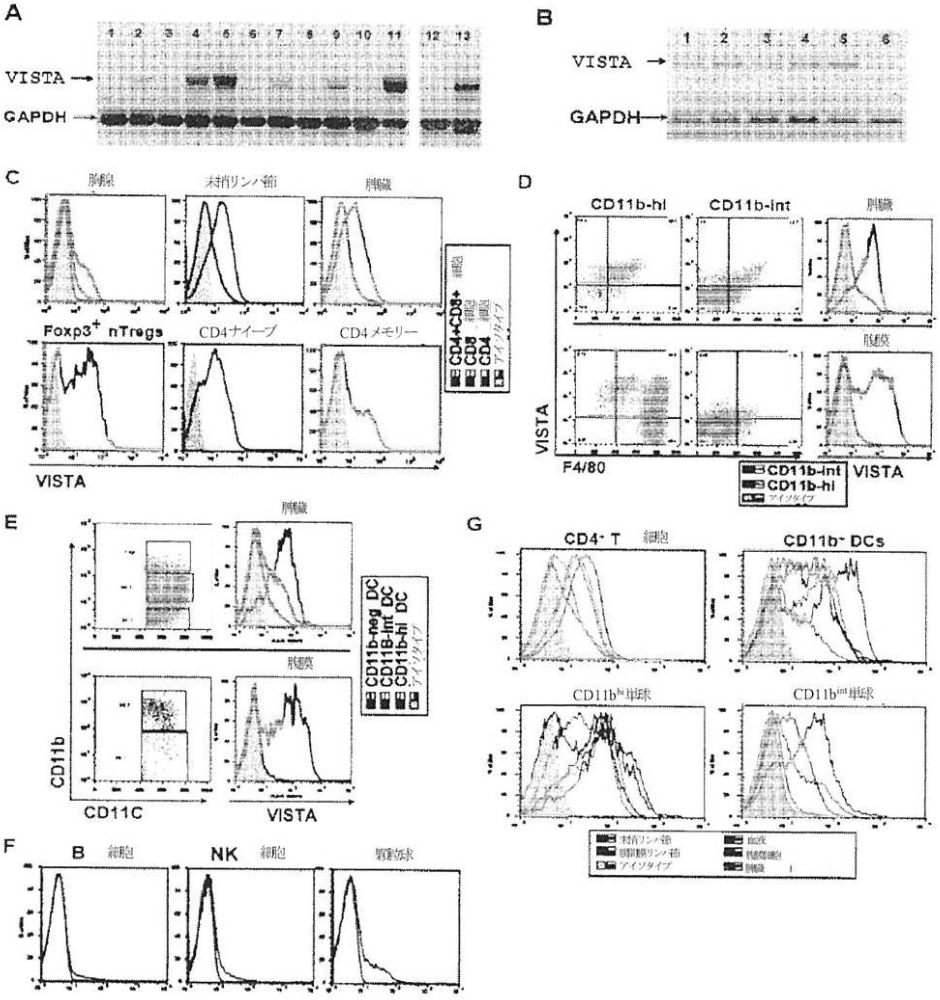
【図３５】


VISTAはサイトカイン産生を低減させる
IL-10
IL-17
TNFα
IFNγ
A
B
CD4
CD8
濃度(pg/ml)
有意差なし
VISTA-Ig (μg/ml)

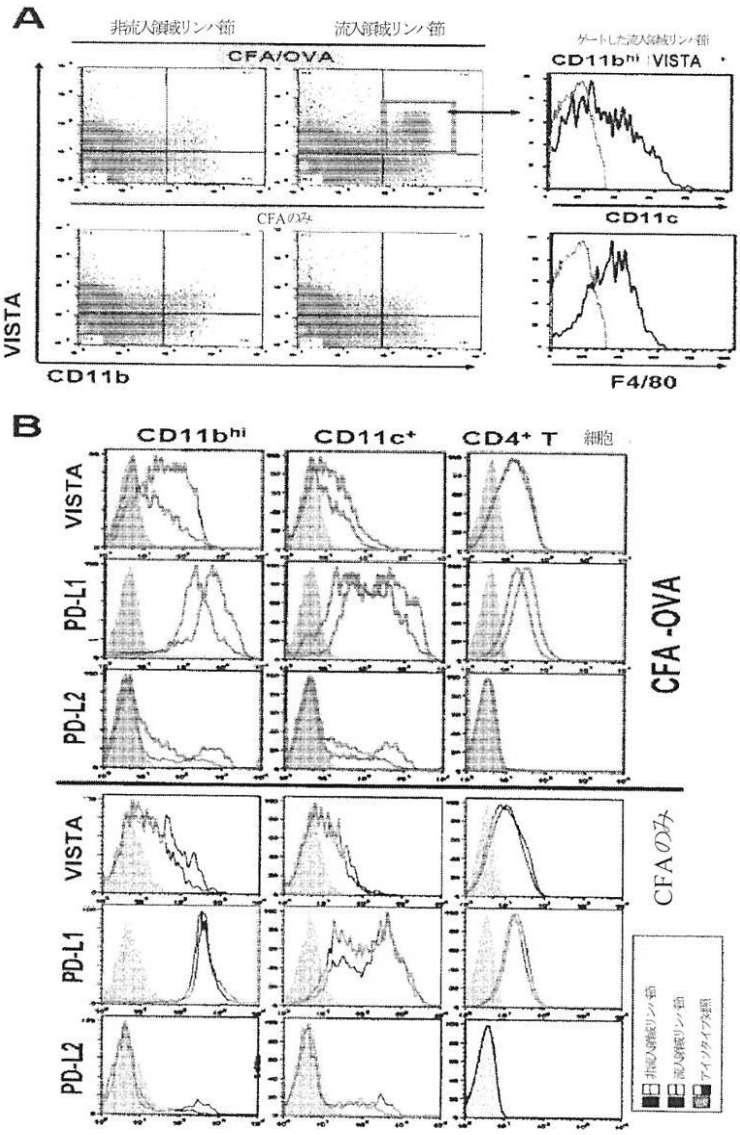
【図３７】


A. MB49
B. MCA105
C. EG7
D. ID8
E. B16F10
13F3
MIH5
腫瘍体積(mm³)
日数
生存率
p= 0.03
p= 0.0167
(n=8)

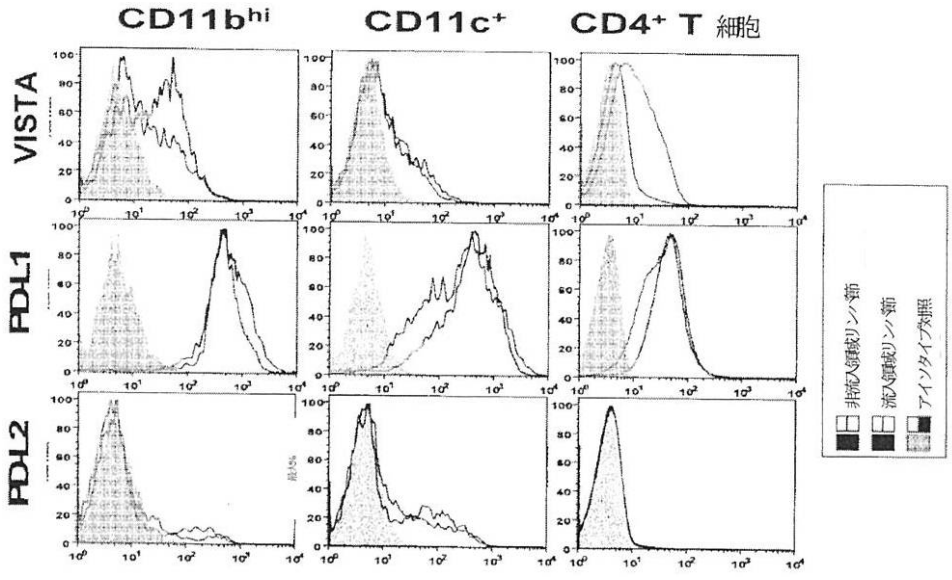
【図３】


A
VISTA
GAPDH
B
VISTA
GAPDH
C
胸腺
末梢リンパ節
脾臓
Foxp3+ nTregs
CD4ナイーブ
CD4メモリー
VISTA
D
CD11b-hi
CD11b-int
脾臓
VISTA
F4/80
CD11b-int
CD11b-hi
VISTA
E
脾臓
CD11b
CD11C
VISTA
CD11b-neg DC
CD11B-int DC
CD11b-hi DC
G
CD4+ T 細胞
CD11b+ DCs
CD11bhi単球
CD11bint単球
F
B 細胞
NK 細胞

【図７】


A
非流入領域リンパ節
流入領域リンパ節
CFA/OVA
CFAのみ
VISTA
CD11b
ゲートした流入領域リンパ節
CD11b^hi VISTA +
CD11c
F4/80
B
CD11b^hi
CD11c+
CD4+ T 細胞
VISTA
PD-L1
PD-L2
CFA -OVA
CFAのみ
非流入領域リンパ節
流入領域リンパ節
アイソタイプ対照

【図８】


CD11b^hi
CD11c+
CD4+ T 細胞
VISTA
PDL1
PDL2
非流入領域リンパ節
流入領域リンパ節
アイソタイプ対照

【図９－２】

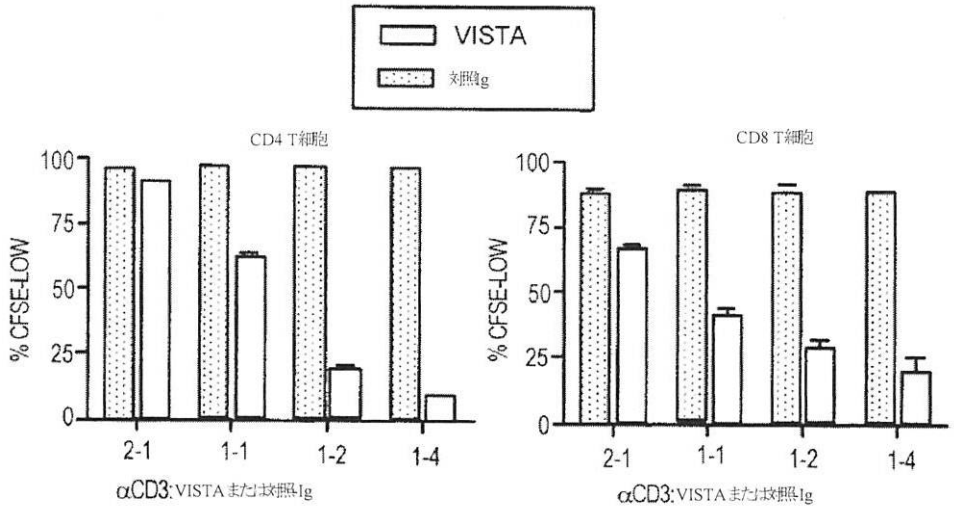


図９Ｂ

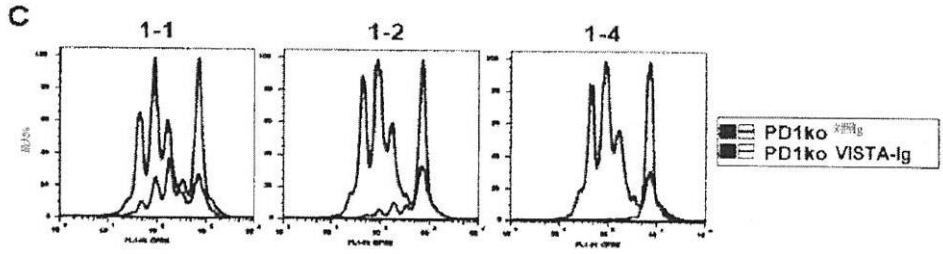


図９Ｃ

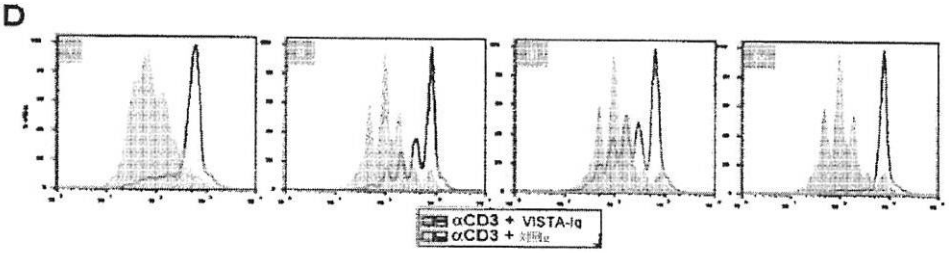
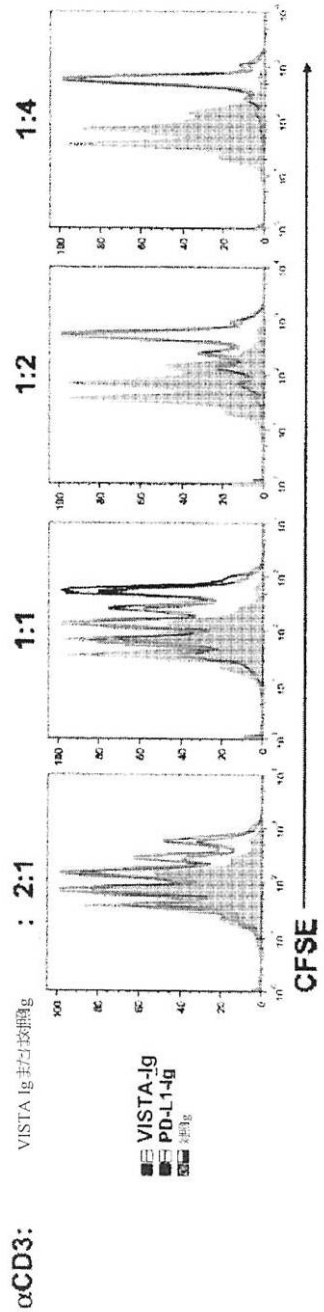
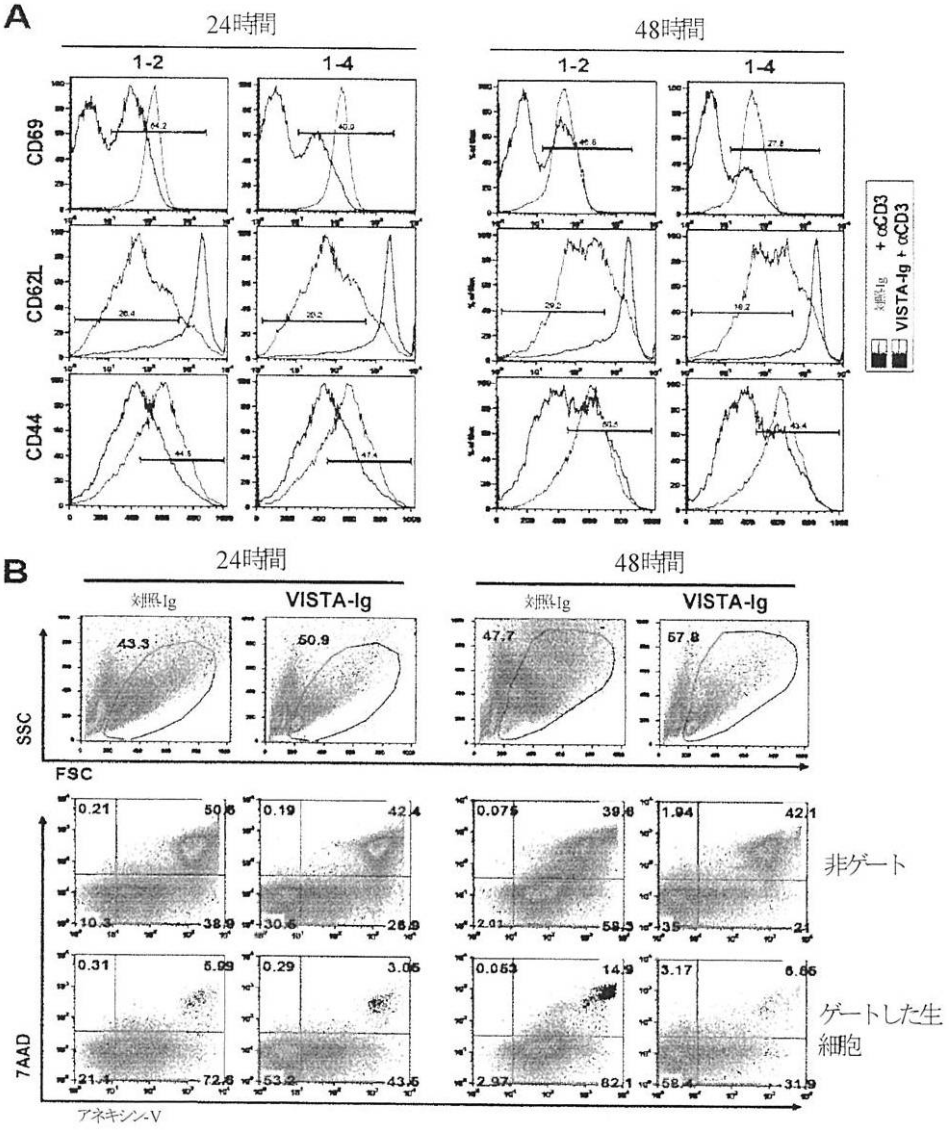


図９Ｄ

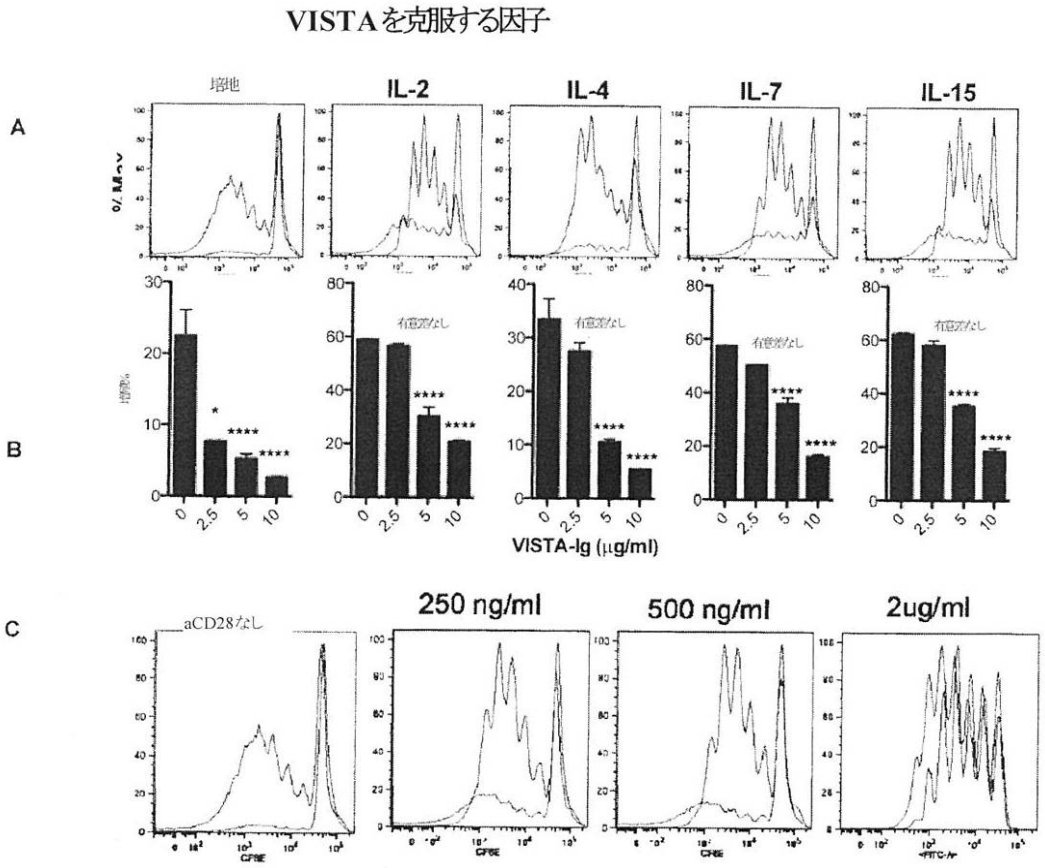
【図１０】



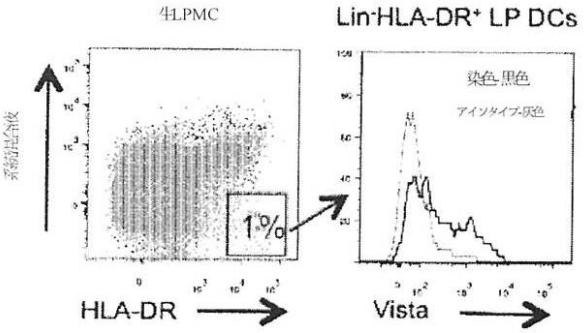
【図１２】


A
24時間
48時間
1-2
1-4
CD69
CD62L
CD44
対照Ig + αCD3
VISTA-Ig + αCD3
B
24時間
48時間
対照Ig
VISTA-Ig
SSC
FSC
非ゲート
ゲートした生細胞
7AAD
アネキシン-V

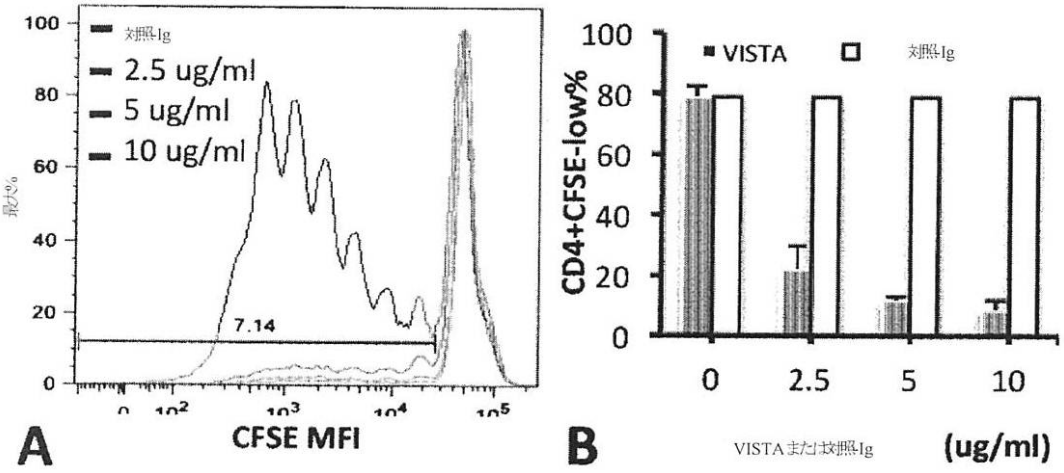
【図３６】


VISTAを克服する因子
A
B
C
培地
IL-2
IL-4
IL-7
IL-15
% Max
増殖%
有意差なし
VISTA-Ig (μg/ml)
aCD28なし
250 ng/ml
500 ng/ml
2ug/ml
CFSE

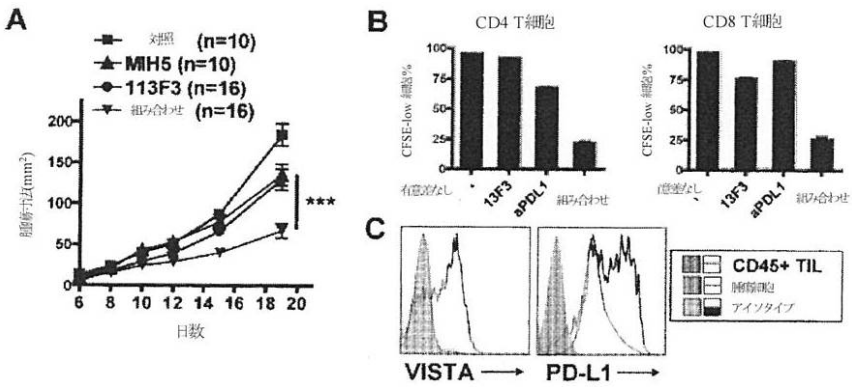
【図３８】


生LPMC
Lin-HLA-DR+ LP DCs
染色-黒色
アイソタイプ-灰色
1%
HLA-DR
Vista

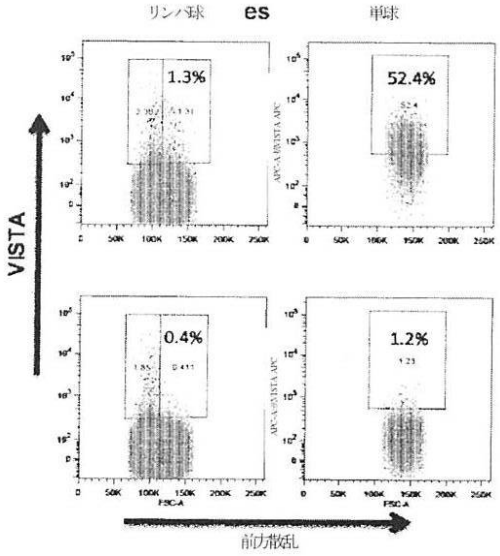
【図３９】


対照Ig
2.5 ug/ml
5 ug/ml
10 ug/ml
7.14
CFSE MFI
A
VISTA
対照Ig
CD4+CFSE-low%
VISTAまたは対照Ig
(ug/ml)
B

【図４０】



【図４１】



【配列表】

2015533796000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/058785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K 39/395; C07K 16/28; A61K 48/00; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: VISTA antagonist, immune response, cancer, vaccine, vector

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG, L. et al., `VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses`, The Journal of Experimental Medicine, 2011, Vol. 208, No. 3, pages 577-592. See abstract and pages 586-588.	62,66,92
A		63,64,67,70-75,83-85,93
X	NORDE, W. J. et al., `Coinhibitory molecules in hematologic malignancies: targets for therapeutic intervention`, Blood, July 2012, Vol. 120, No. 4, pages 728-736. See abstract and page 733.	62,66,92
A	SHARMA, P. et al., `Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps`, Nature Reviews Cancer, 2011, Vol. 11, pages 805-812. See the whole document.	62-64,66,67,70-75,83-85,92,93
A	BOLHASSANI, A. et al., `Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy`, Molecular Cancer, 2011, Vol. 10, No. 1, Article Number 3. See abstract.	62-64,66,67,70-75,83-85,92,93

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 December 2013 (20.12.2013)	**23 December 2013 (23.12.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea	CHOI, Sung Hee
Facsimile No. +82-42-472-7140	Telephone No. +82-42-481-8740

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/058785

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	US 2013-0177557 A1 (NOELLE, R. J. et al.) 11 July 2013 See paragraphs [0026], [0050], [0059], [0216]-[0219], [0288]-[0292], [0306]-[0308] and claims 53-81.	62-64,66,67,70-75,83-85,92,93

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/058785

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-61, 121-126
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-61 and 121-126 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: (see the extra sheet)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(see the extra sheet)

3. ☒ Claims Nos.: (see the extra sheet)
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/058785

(Continuation of Box No. II)

2. Claims Nos.: 12, 14, 16, 24, 37-40, 42, 43, 46, 52-61, 65, 68, 69, 77, 79, 81, 87-89, 91, 102-105, 107, 108, 118, 123, 124, 126, and 128
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 12, 14, 16, 24, 77, 79, 81, 102-105, 107, 108, 118, 123, 124, 126, and 128 are unclear, since they refer one of claims which are not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a) (PCT Article 6).

Claims 37, 42, 46, 52, 53, 56-61, 65, and 68 are not clear because they respectively direct themselves as the claim to which they refer (PCT Article 6). Since claims 38-40, 43, 54, 55, 69, 88, 89, and 91 ultimately refer to any of claims 37, 42, 53, 65, and 68, claims 38-40, 43, 54, 55, 69, 88, 89, and 91 are also unclear (PCT Article 6).

Claim 87 is worded in reference to condition of claim 62. However, said condition has not been worded in claim 62. Therefore, claim 87 is unclear (PCT Article 6).

3. Claims Nos.: 10, 11, 13, 15, 17, 21, 23, 29-36, 41, 44-52, 57, 58, 60, 61, 76, 78, 80, 82, 86, 90, 94-101, 106, 109-117, 119-122, 125, 127, 129, 130
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2013/058785

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013-0177557 A1	11/07/2013	AU 2011-230537 A1	29/11/2012
		CA 2794483 A1	29/09/2011
		CN 103119054 A	22/05/2013
		EP 2552947 A2	06/02/2013
		JP 2013-527144 A	27/06/2013
		KR 10-2013-0010906 A	29/01/2013
		MX 2012011089 A	28/06/2013
		US 2008-0287358 A1	20/11/2008
		US 2011-0027278 A1	03/02/2011
		US 8097249 B2	17/01/2012
		US 8231872 B2	31/07/2012
		US 8236304 B2	07/08/2012
		WO 2006-116181 A2	02/11/2006
		WO 2006-116181 A3	18/01/2007
		WO 2011-120013 A2	29/09/2011
		WO 2011-120013 A3	03/05/2012

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI				テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02			４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00			４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00			
Ａ６１Ｋ	*31/7088*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088			
Ａ６１Ｐ	*31/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04			
Ａ６１Ｐ	*31/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/10			
Ａ６１Ｐ	*33/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/00			
Ａ６１Ｐ	*33/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/02			
Ａ６１Ｋ	*38/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02			
Ａ６１Ｋ	*31/7105*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105			
Ａ６１Ｋ	*31/713*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713			
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02			
Ａ６１Ｐ	*1/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/00			
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00			
Ａ６１Ｐ	*31/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12			
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395		Ｄ	
Ａ６１Ｋ	*45/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395		Ｎ	
Ａ６１Ｐ	*37/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395		Ｅ	
Ａ６１Ｋ	*39/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395		Ｔ	
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	45/06			
Ａ６１Ｋ	*35/13*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１		
Ａ６１Ｐ	*31/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04			
Ａ６１Ｐ	*31/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00		Ｈ	
Ａ６１Ｐ	*31/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76			
Ａ６１Ｐ	*31/20*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/13			
Ａ６１Ｐ	*31/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/16			
Ａ６１Ｐ	*33/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14			
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/18			
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/20			
Ｇ０１Ｎ	*33/574*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/06			
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/06			
			Ａ６１Ｐ	1/16			
			Ｇ０１Ｎ	33/53		Ｍ	
			Ｇ０１Ｎ	33/574		Ａ	
			Ｃ１２Ｐ	21/08			

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

(74)代理人 100101373
弁理士 竹内 茂雄

(74)代理人 100118902
弁理士 山本 修
(74)代理人 100135415
弁理士 中濱 明子
(72)発明者 ノエル，ランドルフ・ジェイ
アメリカ合衆国ニューハンプシャー州０３７８１，プレインフィールド，フリーマン・ロード ３０１

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA13 CA11 DA03 GA11 HA17
4B064 AG27 DA01 DA14 DA15
4B065 AA93X AA94X AA94Y AB01 AC12 AC20 BA01 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 AA19 AA20 BA44 CA53 CA62 MA13
MA16 MA28 MA31 MA41 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59
MA60 MA63 MA66 NA05 NA10 NA14 ZA661 ZA662 ZA751 ZA752
ZA891 ZA892 ZB071 ZB072 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372 ZB381 ZB382 ZC201 ZC202
ZC551 ZC552 ZC751 ZC752
4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 BB23 BB31 CC01 CC22 CC23 EE01
EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA07 NA05 NA10 NA14
ZA66 ZA75 ZA89 ZB07 ZB09 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35 ZB37
ZB38 ZC20 ZC55 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 MA02 MA67 NA05 NA10 NA14 ZA66
ZA75 ZA89 ZB07 ZB09 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35 ZB37 ZB38
ZC20 ZC55 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 EA29 FA71

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015533796A5	公开(公告)日	2016-10-27
申请号	JP2015531291	申请日	2013-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	达特茅斯学院 伦敦国王学院		
申请(专利权)人(译)	受托人达特茅斯学院 伦敦大学国王学院		
[标]发明人	ノエルランドルフジェイ		
发明人	ノエル,ランドルフ·ジェイ		
IPC分类号	A61K45/00 C12N5/0783 C12N5/09 C12N15/113 C07K16/18 A61P43/00 A61P37/02 A61P35/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61P31/04 A61P31/10 A61P33/00 A61P33/02 A61K38/00 A61K31/7105 A61K31/713 A61P35/02 A61P1/00 A61P17/00 A61P31/12 A61K39/395 A61K45/06 A61P37/04 A61K39/00 A61K35/76 A61K35/13 A61P31/16 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/06 A61P33/06 A61P1/16 G01N33/53 G01N33/574 C12P21/08		
CPC分类号	A61K35/17 A61K39/0011 A61K39/39 A61K39/3955 A61K2039/505 A61K2039/507 A61K2039/5152 A61K2039/55516 A61P1/00 A61P1/16 A61P17/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P33/00 A61P33/02 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 A61K47/6851 C07K16/2827 C07K16/2878 C07K2317/74 C07K2317/75 C07K2317/76 C07K2319/30 C07K2319/32 Y02A50/386 Y02A50/41 Y02A50/412 Y02A50/489 A61K31/00 A61K39/39566 A61K45/06 A61K2039/5256 C12N15/113 C12N15/1138 C12N2310/14 C12N2710/10034 C12N2710/10043		
FI分类号	A61K45/00.ZNA C12N5/00.202.L C12N5/00.202.U C12N15/00.G C07K16/18 A61P43/00.111 A61P37/02 A61P35/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61P31/04 A61P31/10 A61P33/00 A61P33/02 A61K37/02 A61K31/7105 A61K31/713 A61P35/02 A61P1/00 A61P17/00 A61P31/12 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/06 A61P43/00.121 A61P37/04 A61K39/00.H A61K35/76 A61K35/13 A61P31/16 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/06 A61P33/06 A61P1/16 G01N33/53.M G01N33/574.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA13 4B024/CA11 4B024/DA03 4B024/GA11 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/DA01 4B064/DA14 4B064/DA15 4B065/AA93X 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC12 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/AA20 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/CA62 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA41 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA10 4C084/NA14 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA751 4C084/ZA752 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C084/ZB371 4C084/ZB372 4C084/ZB381 4C084/ZB382 4C084/ZC201 4C084/ZC202 4C084/ZC551 4C084/ZC552 4C084/ZC751 4C084/ZC752 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB23 4C085/BB31 4C085/CC01 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA07 4C086/NA05 4C086/NA10 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZA75 4C086/ZA89 4C086/ZB07 4C086/ZB09 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZB37 4C086/ZB38 4C086/ZC20 4C086/ZC55 4C086/ZC75 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/MA02 4C087/MA67 4C087/NA05 4C087/NA10 4C087/NA14 4C087/ZA66 4C087/ZA75 4C087/ZA89 4C087/ZB07 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB33 4C087/ZB35 4C087/ZB37 4C087/ZB38 4C087/ZC20 4C087/ZC55 4C087/ZC75 4H045/AA11		

	4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/FA71
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 中滨 明子
优先权	61/698003 2012-09-07 US PCT/US2013/047009 2013-06-21 WO
其他公开文献	JP6368308B2 JP2015533796A

摘要(译)

本公开涉及用于在有此需要的患者中激活免疫应答的组合物和治疗方法。在一个优选的实施方案中，本发明的方法和组合物能够拮抗VISTA的活性，VISTA是一种天然存在的“检查点”蛋白，其有助于免疫耐受，任选地与第二检查点途径的拮抗剂如PD-1组合。例如，此类方法和组合物可适用于预防和治疗结肠癌或其他癌症。本文证明示例性VISTA拮抗剂，特别是抗VISTA抗体在体外和体内激活针对癌细胞的免疫应答，从而赋予降低肿瘤负荷的保护性抗肿瘤免疫力。另外，当VISTA拮抗剂与第二检查点蛋白拮抗剂，特别是针对PD-1配体（PD-L1）的抗体组合使用时，观察到附加益处。