República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012024565-1 B1

(22) Data do Depósito: 25/03/2011

(45) Data de Concessão: 08/02/2022

(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO VISTA IMUNOSSUPRESSORA MULTIMÉRICA ISOLADA OU RECOMBINANTE E COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: C07K 14/47; C07K 19/00; C07K 16/18; A61K 38/17; A61K 39/395; (...).

(30) Prioridade Unionista: 06/10/2010 US 61/390,434; 07/03/2011 US 61/449,882; 26/01/2011 US 61/436,379; 26/03/2010 US 12/732,371.

(73) Titular(es): TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE.

(72) Inventor(es): RANDOLPH J. NOELLE; LILI WANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2011030087 de 25/03/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/120013 de 29/09/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/09/2012

(57) Resumo: PROTEÍNA VISTA IMUNOSSUPRESSORA E ANTICORPO, BEM COMO SEUS USOS COMO MODULADORES TERAPÊUTICOS. A presente invenção refere-se a uma nova proteína de célula T reguladora. Esta proteína, designada PD-L3 ou VISTA, rearranja membros da família PD-L1, identificada uma nova e estruturalmente distinta, ligante inibidor da superfamília Ig, que o domínio celular apresente homologia ao ligante PD-L1 da família B7. Esta molécula é designada como PD-L3 ou VISTA ou domínio V supressor de imunoglobulina da ativação de célula T. Expressão de VISTA é primariamente dentro do compartimento hematopoético a é altamente regulado em células T e APCs mieloide. Intervenção terapêutica da vis inibitória VISTA representa uma nova abordagem para modular imunidade mediada por célula T para o tratamento de uma ampla variedade de cânceres, por exemplo, ovário, mama e melanomas. Também, proteínas VISTA, especialmente proteínas VISTA multimérica e anticorpos podem ser usados para suprimir imunidade de célula T em doença autoimune, alergia, infecção e condições inflamatórias por exemplo esclerose múltipla e condições de artrose tal como RA.

Relatório Descritivo da Patente de Inveção para **"PROTEÍNA DE FUSÃO VISTA IMUNOSSUPRESSORA MULTIMÉRICA ISOLADA OU RECOMBINANTE E COMPOSIÇÃO".**

Introdução

[001] Este pedido reivindica prioridade de US 12/732.371 depositado em 26 de Março de 2010, US provisório 61/390.434 depositado em 6 de outubro de 2010; US provisório 61/436.379 depositado em 26 de janeiro de 2011 e US provisório 61/449.882 depositado em 7 de março de 2011. Todos estes pedidos estão aqui incorporados como referência em suas totalidades.

[002] Este pedido se refere a esta constatação, caracterizada e funcionalmente definida como um novo ligante inibitório da superfamília Ig hematopoieticamente restrita, estruturalmente distinta designada como **S**upressor de **A**tivação da célula **T** contendo **I**munoglobulina de região **V** (VISTA) ou PD-L3. O domínio extracelular tem homologia com o ligante PD-L1 da família B7, e como PD-L1, VISTA tem um profundo impacto sobre a imunidade. No entanto, ao contrário de PD-L1, a expressão de VISTA é exclusivamente dentro do compartimento hematopoiético. A expressão é mais proeminente em células mieloides apresentadoras de antígeno (APCs), embora a expressão em células T CD4+CD4+ e em um subconjunto de células T reguladoras Foxp3 + (Treg) também é de grande interesse. Uma proteína de fusão solúvel VISTA-Ig ou expressão de VISTA em APC inibe potentemente a proliferação de células T *in vitro*, a produção de citocinas e induz a expressão de Foxp3 em células T. Por outro lado, um anticorpo monoclonal anti-VISTA recém-desenvolvido interferiu com a imunossupressão induzida por VISTA de respostas de células T por VISTA+ APCs *in vitro*. Além disso, anti-VISTA *in vivo* intensificou o desenvolvimento da doença encefalomielite alérgica experimental autoimune (EAE) mediada por células T, e facilitou o desenvolvimento

de uma resposta imune protetora específica do tumor com a remissão do tumor subsequente. Os estudos iniciais da camundongos VISTA-/- estão revelando os primeiros indícios de doença inflamatória espontânea, e seu destino final será determinado patologicamente. Ao contrário de todas as outras moléculas relacionadas aos ligantes PD (por exemplo, B7-H3, H4, H6), a restrição hematopoiética de VISTA juntamente com suas profundas atividades supressoras e características estruturais únicas, ilustra que VISTA é um novo, funcionalmente não redundante, regulador central negativo da imunidade, cuja expressão é principalmente restrita a mieloide.

Antecedentes da invenção

[003] A indução de uma resposta imune requer expansão de células T, diferenciação, contração e estabelecimento de células T de memória. As células T devem encontrar células apresentadoras de antígenos (APC) e se comunicar via interações com receptor de células T (TCR)/complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em APC. Uma vez que a interação de TCR-MHC é estabelecida, outros conjuntos de contatos ligante-receptor entre a célula T e a APC são necessários, ou seja, a coestimulação via CD154/CD40 e CD28/B7.1-B7.2. A sinergia entre estes contatos sugere-se que resulta, *in vivo*, em uma resposta imune produtiva capaz de compensar patógenos e tumores e em alguns casos capazes de induzir a autoimunidade.

[004] Outro nível de controle foi identificado, chamado de células T reguladoras (Treg). Este subconjunto específico das células T é gerado no timo, distribuído para a periferia e é capaz de controlar respostas de células T constantes e induzíveis *in vitro* e *in vivo* ((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). Treg são representadas por um fenótipo CD4+CD4+ CD25+ e também expressam altos níveis de linfócitos T citotóxicos associados a

antígeno-4 (CTLA-4), OX-40, 4-IBB e o glicocorticoide induzível pela proteína associada ao receptor TNF (GITR) (McHugh, *et al*. (2002) Immunity 16(2):311-23; Shimizu, *et al*. (2002) Nat. Immun. 3(2): 135-42). A eliminação de células Treg por timectomia neonatal no dia 5 ou depleção de anticorpos usando anti-CD25, resulta na indução de patologia autoimune e exacerbação de respostas de células T para antígenos próprios e não próprios, incluindo respostas anti-tumorais aumentadas (Sakaguchi, *et al*. (1985) J. Exp. Med161 (I) :72-87; Sakaguchi *et al*. (1995) J. Immunol. 155 (3): 1151 -64; Jones, *et al*. (2002) Immun Câncer. 2: 1). Além disso, Treg também foram envolvidas na indução e manutenção da tolerância ao transplante (Hara, *et al* (2001) J. Immunol 166 (6) :3789-3796, Wood e Sakaguchi (2003) Nat Rev. Immunol. 3: 199-210), uma vez que a depleção de Treg com anticorpos monoclonais anti-CD25 resulta na ablação da tolerância de transplante e a rejeição rápida do enxerto (Jarvinen, *et al* (2003.) Transplantation 76: 1375-9). Entre os receptores expressos por Treg, GITR parece ser um componente importante, uma vez que a ligação de GITR na superfície de Treg *in vitro* ou *in vivo* com um anticorpo monoclonal agonístico resulta na terminação rápida da atividade de Treg (McHugh, et ai. (2002) supra,. Shimizu, *et al* (2002) supra), resultando ainda em patologia autoimune (Shimizu, *et al*. (2002.) supra) e na ablação da tolerância ao transplante.

[005] Ligantes e receptores coestimulatórios e de coinibitórios não só fornecem um "2º sinal" para ativação das células T, mas também uma rede equilibrada de sinal positivo e negativo para maximizar a resposta imune contra infecção, enquanto limita a autoimunidade. Os melhores ligantes coestimulatórios caracterizados são B7.1 e B7.2 que são expressos por APCs profissionais, e cujos receptores são CD28 e CTLA-4 (Greenwald, R.J., Freeman, G.J., e Sharpe, A.H. (2005). Annu Rev Immunol 23, 515-548; Sharpe, A.H., e Freeman, G.J. (2002) Nat

Rev Immunol 2, 1 16 - 126). CD28 é expressa por células T naive e ativadas e é crítico para a ativação ideal das células T. Em contraste, o CTLA-4 é induzido após ativação de células T e inibe a ativação das células T através da ligação a B7.1/B7.2, prejudicando assim a coestimulação mediada por CD28. CTLA-4 também transduz sinalização negativa através do seu motivo citoplasmático ITIM (Teft, W.A., Kirchhof, M.G., e Madrenas, J. (2006) Annu Rev Immunol 24, 65-97; Teft, W.A., Kirchhof, M.G., e Madrenas, J. (2006). Annu Rev Immunol 24, 65-97. KO mice B7.1/B7.2 are impaired in adaptative immune response Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E. M., Freeman, G.J., e Sharpe, A.H. (1997)) Immunity 6, 303-313; Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Hathcock, K.S., Laszlo, G., McKnight, A.J., Kim, J., Du, L., Lombard, D.B., e *et al*. (1993). Science 262, 907-909), enquanto camundongos CTLA-4 KO não podem controlar adequadamente a inflamação e desenvolver doenças sistêmicas autoimunes (Chambers, C.A., Sullivan, T.J., e Allison, J.P. (1997) Immunity 7, 885-895; Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., e Sharpe, A.H. Immunity (1995) 3, 541 -547; Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Science 270, 985-988.

[006] A família de ligantes B7 se exandiu de modo a incluir os coestimulatórios B7-H2 (ligante ICOS) e B7-H3, bem como os coinibitórios B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H4 (B7S 1 ou B7x), e B7-H6. Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E. C, Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., *et al*. (2009) J. Exp. Med. 206, 1495-1503; Greenwald, R.J., Freeman, G.J., e Sharpe, A.H. (2005) Annu Rev Immunol 23, 515-548.

[007] A molécula coestimulatória induzível (ICOS) é expressa em células T ativadas e se liga a B7-H2 Yoshinaga, S. K "Whoriskey, J.S.,

Khare, S.D., Sarmiento, U. Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T*et al*. (1999). Nature 402, 827-832. ICOS é importante para a ativação, diferenciação e função de célula T, bem como essencial para a ativação de células T helper induzida pela ativação de células B. Troca de classe de Ig e formação do centro germinativo (GC) Dong, C, Juedes, A.E., Temann, U.A., Shresta, S., Allison, J.P., Ruddle, N.H., e Flavell, R.A. (2001) Nature 409, 97-101; Tafuri, A., Shahinian, A., Bladt, F., Yoshinaga, S.K., Jordana, M., Wakeham, A., Boucher, L.M.,-Bouchard, D., Chan, V.S., Duncan, G., *et al*. (2001) Nature 409, 105-109; Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., *et al*. (1999) Nature 402, 827-832. . A morte programada 1 (PD-1), por outro lado, regula negativamente as respostas das células T. Camundongos KO para PD-1 desenvolvem uma doença autoimune tipo lúpus, ou cardiomiopatia dilatada autoimune, dependendo do patrimônio genético Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., e Honjo, T. (1999) 11, 141-151. Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., e Honjo, T. (2001) Science 291, 319-322. A autoimunidade resulta mais provavelmente da perda de sinalização por ambos os ligantes PD-L1 e PD-L2. Recentemente, CD80 foi identificado como sendo um segundo receptor de PD-L1 que transduz sinais inibidores nas células T Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., e Freeman, G.J. (2007) Immunity 27, 1 1 1 - 122. O receptor para B7-H3 e B7-H4 ainda permanece desconhecido.

[008] Os ligantes coestimulatórios mais bem caracterizados são B7.1 e B7.2 e pertencem à superfamília de Ig, que é constituída por muitos reguladores imunológicos críticos, como os ligantes da família B7 e receptores. Os membros da superfamília de Ig são expressos em células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), e os seus

receptores são CD28 e CTLA-4. CD28 é expresso por células T naive e ativadas e é essencial para a ativação ideal das células T. Em contraste, o CTLA-4 é induzido após ativação de células T e inibe a ativação das células T através da ligação a B7.1/B7.2, prejudicando a coestimulação mediada por CD28. Camundongos knockout B7.1 e B7.2 (KO) são prejudicados na resposta imune adaptativa, enquanto que camundongos KO CTLA-4 não podem controlar adequadamente inflamação e desenvolvem doenças sistêmicas autoimunes. Ao longo do tempo os ligantes da família B7 se expandiram para incluir ligantes coestimulatórios como B7-H2 (Ligantes ICOS) e B7-H3, e ligantes coinibitórios como B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H4 (B7S1 ou B7x), e B7-H6. Por conseguinte, receptores adicionais da família CD28 foram identificados. ICOS é expresso em células T ativadas e se liga a B7-H2. ICOS é um co-regulador positivo, importante para a ativação, diferenciação e função de células T. Por outro lado, a morte programada 1 (PD-1) regula negativamente as respostas das células T. Camundongos KO PD-1 desenvolveram doença autoimune tipo lúpus, ou cardiomiopatia dilatada. Em contraste com VISTA (a molécula imunossupressora que é o foco da presente invenção), os dois ligantes inibitórios da família B7, PD-L1 e PD L2, têm padrões de expressão diferentes. PD-L2 é expresso de forma induzível em DCs e macrófagos, enquanto PD-L1 é amplamente expresso em ambos os tipos de células hematopoiéticas ou não hematopoiéticas. Consistente com um papel imunossupressor do receptor PD-1, estudos utilizando camundongos PD-L1 -/- e PD-L2 -/- demonstraram que ambos os ligantes têm sobreposiçãode papéis na inibição de proliferação de células T e produção de citocinas. A deficiência de PD-L1 aumenta a progressão da doença tanto em modelo de diabéticos não obesos (NOD) de diabetes autoimune quanto no modelo murino de Esclerose Múltipla (encefalomielite autoimune experimental; EAE). As células T PD-L1-/ - produzem níveis

elevados de citocinas próinflamatórias em ambos os modelos de doenças. Além disso, estudos em camundongos NOD demonstraram que a expressão tecidual de PD-L1 (ou seja, dentro de pâncreas) singularmente contribui para a sua capacidade de controlar a inflamação regionalmente. PD-L1 também é altamente expressa em sinciciotrofoblastos placentários, que criticamente controlam as respostas imunes maternas para o feto alogênico.

[009] Levando-se em conta o forte impacto desta família de moléculas na regulação de imunidade, os esforços substanciais em modelos murinos de câncer têm mostrado que a imunidade protetora antitumoral pode ser induzida focando esta família de moléculas. Estudos envolvendo anti-CTLA-4 documentaram o benefício terapêutico melhorado em modelos murinos e estudos clínicos de melanoma. Camundongos vacinados com B 16-GM-CSF (Gvax) promovem a rejeição dos melanomas B16, quando combinados com o bloqueio de anticorpos anti CTLA-4. Anticorpos anti PD-1, bem como PD-L1 também documentaram a imunidade antitumoral melhorada e a sobrevivência do hospedeiro em uma grande variedade de modelos murinos de tumores. Finalmente, apesar de CTLA-4 e DP-1 pertencerem à mesma família de moléculas coinibitórias, a evidência sugere que eles usam mecanismos distintos não redundantes para inibir a ativação de células T, e há sinergia na capacidade do anti-CTLA-4 e anti-PD-1/L1 em aumentar a sobrevivência do hospedeiro com melanoma murino, quando usados em combinação.

[0010] Com base no exposto, a elucidação de mais um novo membro da família tipo B7 e ligantes e moduladores do mesmo seria útil dado o importante papel destes membros da família na regulação da imunidade, especialmente da imunidade de células T.

Sumário da Invenção

[0011] A presente invenção se refere a métodos terapêuticos que

modulam a atividade e/ou, que se ligam especificamente ou bloqueiam a ligação de uma proteína regulatória de célula T específica ao seu contrarreceptor. Esta proteína, denominada PD-L3 OR VISTA, é um novo e estruturalmente distinto, ligante inibitório da superfamília Ig, cujo dominio extracelular tem homologia com o ligante PD-L1 da família B7. Esta molécula é referida alternadamente aqui como PD-L3 ou VISTA ou como domínio V de imunoglobulina supressora de ativação de células T (VISTA). VISTA é expressa principalmente no interior do compartimento hematopoiético e é altamente regulada em APC mieloides e células T. A intervenção terapêutica da via inibitória de VISTA representa uma nova abordagem para modular a imunidade mediada por células T para o tratamento de uma grande variedade de cânceres.

[0012] A presente invenção se refere em particular à utilização de anticorpos específicos anti-VISTA ou PD-L3 para o tratamento de cânceres específicos incluindocâncer de bexiga, câncer ovariano, e melanoma.

[0013] Além disso, a presente invenção se refere em particular à utilização de proteínas PD-L3 ou VISTA, especialmente as proteínas multiméricas VISTA e vetores virais (por exemplo, adenoviral) que expressam o mesmo para tratar condições onde a imunossupressão é terapeuticamente desejada como condições alérgicas, autoimunidade, e inflamatórias.

[0014] Conforme como revelado abaixo, a expressão de VISTA parece ser exclusiva para o compartimento hematopoiético e esta proteína é altamente expressa em células mieloides maduras ($CD11b^{bright}$), com níveis mais baixos de expressão em células T CD4+, Tregs e CD8+. As proteínas solúveis VISTA, por exemplo, proteína de fusão solúvel VISTA-Ig, ou expressão de VISTA nas APCs, suprimem a proliferação de células T CD4+CD4+ e CD8+CD8+ *in vitro* e produção de citocinas. Observa-se também que os anticorpos anti-

VISTA, por exemplo, um anticorpo monoclonal (mAb) anti-VISTA (13F3) bloqueou a supressão de respostas de células T induzida por VISTA por VISTA$^+$ APCs *in vitro*. Além disso, verificou-se que um mAb anti-VISTA exacerbava EAE e aumentava a frequência de Th17s encefalitogênicas *in vivo*. Ainda adicionalmente, como revelado em detalhes abaixo, verificou-se que um mab anti-VISTA induz remissão do tumor em vários (4) modelos de tumores murinos. A expressão de VISTA em células supressoras mieloides derivadas (MDSC) nesses modelos é extremamente elevada, sugerindo que VISTA$^+$ MDSC suprime a imunidade específica do tumor. Como mostrado aqui, VISTA exerce atividades imunossupressoras em células T tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em camundongo e em humanos (apenas *in vitro*) e é um importante mediador no controle do desenvolvimento de autoimunidade e as respostas imunes ao câncer. Especificamente, os dados mostram que:

(1) VISTA é um novo membro da superfamília Ig e contém um domínio V de Ig com homologia distante para PD-L1. Revelamos aqui que, quando produzido como uma proteína Ig de fusão, ou quando super expressa em APCs artificiais VISTA inibe a proliferação de células T CD4+ e CD8+ tanto murinas quanto humanas e produção de citocinas.

(2) A expressão de VISTA nas APCs mieloides é inibitória para respostas de células T *in vitro*.

[0015] A expressão de VISTA em MDSC no microambiente tumoral é extremamente elevada. A análise fenotípica e funcional de muitas moléculas de superfície das células previamente sugeridas como envolvidas na supressão de células T mediadas por MDSC: CD115, CD124, CD80, PD-L1, e PD-L2 foram expressas por MDSC, mas não há diferenças nos níveis de sua expressão ou proporção de células positivas foram encontradas entre MDSC e as células de camundon-

gos livres de tumor que não possuem atividade de supressão imune. Portanto, podemos prever que VISTA será o regulador B7 primário negativo sobre MDSCs.

(4) O bloqueio de VISTA mediado por anticorpos induz uma imunidade protetora a um tumor autólogo.

[0016] Com base no mesmo, VISTA parece ser uma molécula imunorreguladora negativa dominante, sobre MDSCs que interfere com o desenvolvimento da imunidade antitumoral protetora. Assim, bloqueando a atividade dessa molécula com anticorpos anti-VISTA permitirá o desenvolvimento da imunidade antitumoral protetora no homem e em outros mamíferos.

[0017] Portanto, a invenção se refere a métodos de utilização de proteínas solúveis VISTA, por exemplo, proteínas de fusão e de proteínas multiméricas VISTA compreendendo várias cópias do domínio extracelular VISTA ou um fragmento do mesmo, e agentes de ligação VISTA, por exemplo, pequenas moléculas e anticorpos ou fragmentos dos mesmos, que se ligam ou modulam (agonizam ou antagonizam) a atividade de VISTA como moduladores imunes e para o tratamento de diferentes cânceres, por exemplo, ovário, bexiga e linfoma, doença autoimune, alergia, infecção e condições inflamatórias, por exemplo, esclerose múltipla e artrite.

[0018] Como descrito em detalhes abaixo, esta proteína é um novo ligante de inibição, o qual o domínio Ig-V extracelular tem homologia com os dois ligantes conhecidos da família de ligante B7 de morte programada 1 e 2 (PD-L1 e PD-L2) e apresenta características e padrões de expressão de sequências distintas, *in vitro* e *in vivo* sobre os subconjuntos de células T e APC, (que distingue PD-L3 ou VISTA dos ligantes da família B7). Esta proteína tem demonstrado ter um efeito funcional em proliferação de células T e diferenciação de células T CD4+ eCD8+ (suprime a proliferação de células T CD4+ e CD8+, bem

como a produção de citocinas). Com base em seu padrão de expressão e impacto inibitório sobre as células T, PD-L3 ou VISTA aparentemente funcionam como um ligante regulador que regula negativamente respostas de células T durante as interações cognatas entre as células T e APC derivadas de mieloides.

[0019] Embora PD-L3 ou VISTA pareçam ser um membro da família de ligantes B7, ao contrário de outros ligantes da família B7, esta molécula contém um único domínio Ig-V sem um domínio Ig-C, e é mais próxima filogeneticamente ao receptor de morte programada -1 ((PD-1) da família B7. Baseado nisto, PD-L3 ou VISTA, e agonistas ou antagonistas específicos dos mesmos podem ser usados para regular a ativação e diferenciação das células T, e, mais amplamente para modular a rede reguladora que controla as respostas imunes. Em particular proteínas PD-L3 ou VISTA e agonistas ou antagonistas PD-L3 ou VISTA, de preferência anticorpos específicos anti-PD-L3 ou VISTA são úteis na modulação das respostas imunes, em autoimunidade, respostas e doenças inflamatórias, alergia, câncer, doenças infecciosas e transplantes.

[0020] Por conseguinte, a presente invenção se refere, em parte, a composições, por exemplo, para o uso terapêutico de diagnóstico ou de imunomodulatória contendo uma proteína solúvel isolada PD-L3 ou VISTA ou proteína de fusão, por exemplo, uma proteína solúvel de fusão VISTA-Ig ou uma proteína VISTA multimérica, que compreende uma sequência de aminoácidos que é, preferencialmente, pelo menos, 70-90% idêntica ao polipeptídeo PD-L3 ou VISTA humano ou murino estabelecido em SEQ ED NO: 2, 4 ou 5 ou um ortólogo, ou fragmento do mesmo codificado por um gene que hibridiza especificamente com a SEQ ID NO: l ou 3, que modula VISTA *in vivo* e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a proteína solúvel ou multimérica VISTA pode ser direta ou indiretamente ligada a uma

proteína heteróloga (não VISTA) ou pode ser expressa por um vetor viral ou uma célula que contenha, por exemplo, uma célula imune transfectada como uma célula T.

[0021] A presente invenção fornece também vetores de expressão compreendendo um ácido nucleico isolado que codifica uma proteína VISTA que é, pelo menos, 70-90% idêntica à sequência de aminoácidos VISTA humana ou murina estabelecida na SEQ ID NO: 2, 4 ou 5 ou um fragmento ou ortólogo do mesmo, que é opcionalmente fundido a uma sequência que codifica para uma outra proteína Como um polipeptídeo de Ig, por exemplo, uma região Fc ou uma molécula repórter, e células hospedeiras contendo os ditos vetores.

[0022] A presente invenção também se refere especificamente a um agente de ligação isolado, preferencialmente, um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente a uma proteína de PD-L3 ou VISTA que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 2, 4 ou 5 ou uma variante, fragmento ou ortólogo do mesmo. Em uma modalidade preferencial, o agente de ligação modula (agoniza ou antagoniza) atividade *in vitro* ou *in vivo* de VISTA. Na maioria das modalidades preferenciais, o agente de ligação é um anticorpo agonista ou antagonista.

[0023] A presente invenção também fornece métodos para modular a resposta imunecelular por contato de uma célula imune *in vitro* ou *in vivo* com uma proteína VISTA, ou respectivo agente de ligação específico, na presença de um sinal primário, de modo que a resposta imune da célula é modulada. (Interação de VISTA ou um modulador do mesmo transmite um sinal para as células do sistema imune, regulando as respostas imunes. A proteína PD-L3 ou VISTA é expressa em níveis elevados em células mieloides apresentadoras de antígeno, incluindo células mieloides dendríticas (DCs) e macrófagos, e com menores densidades em células T CD4+ e CD8+. Mediante a ativação

imune, a expressão PD-L3 ou VISTA é aumentada em APCs mieloides, mas diminuída em células T CD4+). Portanto, os ácidos nucleicos e polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA da presente invenção, e os agonistas ou antagonistas do mesmo são úteis, por exemplo, na modulação da resposta imune.

[0024] Em outro aspecto, esta invenção fornece moléculas de ácidos nucleicos isoladas que codificam polipeptídeos VISTA, preferencialmente que codificam as proteínas de fusão solúveis e proteínas multiméricas VISTA, bem como fragmentos de ácidos nucleicos adequados como iniciadores ou sondas de hibridização para a detecção de ácidos nucleicos codificadores de PD-L3 ou VISTA. Em uma modalidade, uma molécula de ácido nucleico de PD-L3 ou VISTA da presente invenção é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de nucleotídeos (por exemplo, para todo o comprimento da sequência de nucleotídeos) de codificação de PD-L3 ou VISTA em SEQ ID NO: 1 ou 3 aqui mostrado ou um complemento do mesmo.

[0025] Em outra modalidade, uma molécula de ácido nucleico PD-L3 ou VISTA compreende uma sequência de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo contendo uma sequência de aminoácidos com um percentual de identidade com a sequência específica de aminoácidos da SEQ ED NO: 2, 4 ou 5. Em uma modalidade preferencial, uma molécula de ácido nucleico de PD-L3 ou VISTA compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo contendo uma sequência de aminoácidos pelo menos cerca de 71%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à totalidade do comprimento da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4 ou 5, ou ao domínio do extracelular do mesmo.

[0026] Em outra modalidade preferencial, uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a sequência de aminoácidos de VISTA

humana ou murina ou uma região conservada ou domínio funcional. Em ainda outra modalidade preferencial, a molécula de ácido nucleico inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo contendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4 ou 5. Em ainda outra modalidade preferencial, a molécula de ácido nucleico é de pelo menos cerca de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 ou mais nucleotídeos de comprimento. Em ainda outra modalidade preferencial, a molécula de ácido nucleico é de pelo menos cerca de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 ou mais nucleotídeos de comprimento e codifica um polipeptídeo contendo uma atividade PD-L3 ou VISTA ou modulando a função PD-L3 ou VISTA (como aqui descrito).

[0027] Outra modalidade da invenção é caracterizada por moléculas de ácidos nucleicos, preferencialmente moléculas de ácidos nucleicos PD-L3 ou VISTA que detectam especificamente moléculas de ácidos nucleicos PD-L3 ou VISTA relativas a moléculas de ácido nucleico que codificam polipeptídeos não-PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, em uma modalidade, dita molécula de ácido nucleico é de pelo menos cerca de 880, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 ou mais nucleotídeos de comprimento e hibridiza sob condições rigorosas com uma molécula de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mostrado em SEQ ID NO: 2, 4 ou 5, ou um complemento do mesmo. Em outra modalidade, dita molécula de ácido nucleico é de pelo menos 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300 ou mais nucleotídeos de comprimento e hibridiza sob condições rigorosas com uma molécula de ácido nucleico que codifica um fragmento de PD-L3 ou VISTA, por exemplo, compreendendo n de pelo menos, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ou mais nucleo-

tídeos de comprimento, inclui, pelo menos, 15 (ou seja, 15 contíguos) nucleotídeos da sequência de ácido nucleico revelada na SEQ ID NO: 1 e 3, que codifica os polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA em SEQ ID NO: 2, 4 ou 5, ou complemento do mesmo, e hibridiza sob condições rigorosas com uma molécula de ácido nucleico compreendendo a sequência de nucleotídeos apresentada em SEQ ID NO: 1 ou 3 ou um complemento do mesmo.

[0028] Ainda em outras modalidades preferenciais, a molécula de ácido nucleico que codifica uma variante alélica de ocorrência natural de um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou 4 ou 5, onde a molécula de ácido nucleico que hibridiza com o complemento de uma molécula de ácido nucleico que compreende a SEQ ID NO: 1 ou 3, ou um complemento do mesmo, sob condições rigorosas.

[0029] Outra modalidade da invenção fornece uma molécula de ácido nucleico isolado, que é antissenso a uma molécula de ácido nucleico PD-L3 ou VISTA, por exemplo, é antissenso para a cadeia codificante de uma molécula de ácido nucleico PD-L3 ou VISTA como mostrada na SEQ ID NO: 1 ou 3.

[0030] Outro aspecto da presente invenção fornece um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico PD-L3 ou VISTA. Em certas modalidades, o vetor é um vetor de expressão recombinante.

[0031] Em outra modalidade, a invenção fornece uma célula hospedeira contendo um vetor da presente invenção. Ainda em outra modalidade, a invenção fornece uma célula hospedeira contendo uma molécula de ácido nucleico da presente invenção. A invenção também fornece um método para a produção de um polipeptídeo, preferencialmente um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, fazendo o cultivo em um meio apropriado, uma célula hospedeira, por exemplo, uma célula hospedeira de mamífero como uma célula de mamífero não humano,

da presente invenção, contendo um vetor de expressão recombinante, de modo que o polipeptídeo seja produzido.

[0032] Outro aspecto desta invenção apresenta polipeptídeos isolados ou recombinantes PD-L3 ou VISTA (por exemplo, proteínas, polipeptídeos, peptídeos, ou fragmentos ou porções dos mesmos). Em uma modalidade, um polipeptídeo isolado PD-L3 ou VISTA ou proteína de fusão PD-L3 ou VISTA incluem pelo menos um ou mais dos seguintes domínios: um domínio de peptídeo sinal, um domínio IgV, um domínio extracelular, um domínio transmembrana, e um domínio citoplasmático.

[0033] Em uma modalidade preferencial, um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA inclui pelo menos um ou mais dos seguintes domínios: um domínio de peptídeo sinal, um domínio IgV, um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático, e uma sequência de aminoácidos pelo menos cerca de 71%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou 4 ou 5. Em outra modalidade preferencial, um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA inclui pelo menos um ou mais dos seguintes domínios: um domínio de peptídeo sinal, um domínio IgV, um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático, e tem uma atividade de VISTA ou PD-L3 (como aqui descrito).

[0034] Ainda em outra modalidade preferencial, um polipeptídeo PD-L3 compreende pelo menos um ou mais dos seguintes domínios: um domínio de peptídeo sinal, um domínio IgV, um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático, e é codificado por uma molécula de ácido nucleico com uma sequência nucleotídica que hibridiza sob condições rigorosas de hibridização com o complemento de uma molécula de ácido nucleico compreendendo a sequência nucleotídica de SEQ ID NO: 1 ou 3.

[0035] Em outra modalidade, a invenção apresenta fragmentos ou porções do polipeptídeo contendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou 4 ou 5, em que o fragmento compreende pelo menos 15 aminoácidos (ou seja, aminoácidos contíguos) da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou 4. Em outra modalidade, um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA compreende ou consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 4 ou 5. Em outra modalidade, a presente invenção apresenta um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA que é codificada por uma molécula de ácido nucleico que consiste em uma sequência de nucleotídeos pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idênticos à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1 ou 3, ou um complemento do mesmo. Esta invenção também inclui um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA que é codificado por uma molécula de ácido nucleico que consiste em uma sequência nucleotídica que hibridiza sob condições rigorosas de hibridização com o complemento de uma molécula de ácido nucleico compreendendo a sequência nucleotídica de SEQ ID NO: 1 ou 3 .

[0036] Os polipeptídeos da presente invenção, ou porções dos mesmos, por exemplo, porções biologicamente ativas dos mesmos, podem ser ligados operacionalmente a um polipeptídeo não-PD-L3 ou VISTA (por exemplo, sequências de aminoácidos heterólogas) para formar polipeptídeos de fusão. A invenção ainda inclui anticorpos, como anticorpos monoclonais ou policlonais, que se ligam especificamente a polipeptídeos da invenção, preferencialmente polipeptídeos humanos PD-L3 ou VISTA.

[0037] A invenção também se refere a métodos de seleção de anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA contendo propriedades funcionais desejadas a partir de painéis de anticorpos monoclonais produzidos contra esta proteína ou uma proteína de fusão Ig PD-L3 ou VISTA com base

em propriedades funcionais desejadas, por exemplo, modulando os efeitos específicos de PD-L3 ou VISTA na imunidade como o efeito supressivo da proteína sobre a ativação de TCR, o efeito supressivo da proteína sobre as respostas proliferativas dos células T CD4de ao anti-CD3, supressão de respostas proliferativas específicas ao antígeno de cognatas células T CD4, os efeitos supressivos de PD-L3 ou VISTA sobre a expressão de citocinas específicas como IL-2 e interferon gama, *et al*. Em uma modalidade particularmente preferencial, ou anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA para utilização como agentes terapêuticos serão selecionados *in vitro*, na presença de proteínas solúveis PD- L3 ou VISTA, por exemplo, proteína de fusão Ig PD-L3 ou VISTA aumentam os efeitos de supressão de Ig PD-L3 ou VISTA em funções imunes PD-L3 ou VISTA relacionadas. Isto é preferencial como inesperadamente (mostrado abaixo) estes anticorpos *in vivo* comportam-se ao contrário do que seria esperado a partir de seu efeito *in vitro* sobre a imunidade, ou seja, estes anticorpos monoclonais anti-VISTA são imunossupressores.

[0038] Além disso, os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA (ou partes biologicamente ativas dos mesmos) ou moduladores das moléculas PD-L3 ou VISTA, ou seja, anticorpos como selecionados utilizando os métodos anteriores podem ser incorporados em composições farmacêuticas, as quais, opcionalmente, incluem veículos farmaceuticamente aceitáveis.

[0039] Em outra modalidade, a proteína PD-L3 ou VISTA é utilizada como um sinal inibitório para inibir ou reduzir a ativação das células imunes. Nesta modalidade, o sinal inibitório se liga a um receptor inibitório (por exemplo, CTLA-4 ou PD-1) em uma célula imune, assim, antagonizando o sinal primário que se liga a um receptor de ativação (por exemplo, via um TCR, CD3, BCR, ou polipeptídeo Fc). A inibição inclui, por exemplo, a inibição da geração do segundo mensageiro, uma

inibição da proliferação; uma inibição da função efetora da célula imune, por exemplo, a fagocitose reduzida, a produção de anticorpos reduzida, citotoxicidade celular reduzida, falha da célula imune em produzir mediadores, (como citocinas (por exemplo, IL-2) e/ou mediadores de respostas alérgicas), ou o desenvolvimento de anergia.

[0040] Em modalidades particulares, o sinal primário é um ligante (por exemplo, CD3 ou anti-CD3), que se liga a TCR e inicia um sinal de estimulação primária. Ditos ligantes de TCR estão prontamente disponíveis de fontes comerciais e exemplos específicos incluem anticorpo anti-CD3 OKT3, preparado a partir de células de hibridoma obtidas a partir da American Type Culture Collection, e anticorpo monoclonal anti-CD3 G19-4. Em uma modalidade alternativa, um sinal primário é liberado a uma célula T através de outros mecanismos incluindo um ativador de proteína C quinase, como um éster de forbol (por exemplo, acetato de miristato de forbol), e de um ionóforo de cálcio (por exemplo, ionomicina, o que aumenta as concentrações de cálcio citoplasmático), ou semelhantes. O uso de ditos agentes desvia do complexo TCR/CD3, mas fornece um sinal estimulatório às células T. Outros agentes que atuam como sinais primários podem incluir ligantes naturais e sintéticos. Um ligante natural pode incluir MHC com ou sem um peptídeo apresentado. Outros ligantes podem incluir, entre outros, um peptídeo, polipeptídeo, fator de crescimento, citocinas, quimiocinas, glicopeptídeo, receptor solúvel, esteroide, hormônio, mitógeno, como PHA, ou outros superantígenos, peptídeos tetrâmeros MHC (Altman, *et al* . (1996) Science 274 (5284) :94-6) e solúveis em dímeros de MHC (Dal Porto, *et al* (1993) Proc Natl Acad Sci EUA 90:6671-5).

[0041] As células imunes ativadas de acordo com o método da presente invenção podem ser subsequentemente expandidas *ex vivo* e utilizado no tratamento e prevenção de uma variedade de doenças, por exemplo, células T humanas, que foram clonadas e expandidas *in*

vitro mantêm a sua atividade reguladora (Groux, *et al*. (1997) Nature 389 (6652) :737-42). Antes da expansão, uma fonte de células T é obtida de um sujeito (por exemplo, um mamífero como um humano, cão, gato, camundongo, rato, ou espécies transgênicas dos mesmos); Células T podem ser obtidas a partir de um número de fontes, incluindo células mononucleares de sangue periférico, medula óssea, tecido de nódulo linfático, sangue de cordão, tecido do timo, tecido a partir de um local da infecção, tecido do baço, tumores ou linhagens de células T. As células T podem ser obtidas a partir de uma unidade de sangue coletada de um sujeito utilizando qualquer número de técnicas conhecidas, para o especialista na técnica, como separação por ficol™.

[0042] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para detectar a presença de uma molécula de ácido nucleico, proteína, ou um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA em uma amostra biológica através de contato da amostra biológica com um agente capaz de detectar uma molécula de ácido nucleico, proteína, ou um polipeptídeo, PD-L3 ou VISTA de modo que a presença de molécula de ácido nucleico, proteína, ou um polipeptídeo, de PD-L3 ou VISTA é detectada na amostra biológica. Esta expressão de PD-L3 ou VISTA pode ser usada para detectar sítios patológicos como sítios inflamatórios.

[0043] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para detectar a presença de atividade de PD-L3 ou VISTA em uma amostra biológica através de contato da amostra biológica com um agente capaz de detectar um indicador de atividade de PD-L3 ou VISTA que a presença de atividade de PD-L3 ou VISTA é detectada na amostra biológica.

[0044] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para modular a atividade de PD-L3 ou VISTA, compreendendo o contato de uma célula capaz de expressar PD-L3 ou VISTA com um agente que modula a atividade PD-L3 ou VISTA, preferencialmente um anti-

corpo anti-PD-L3 ou VISTA, de modo que a atividade PD-L3 ou VISTA na célula é modulada. Em uma modalidade, o agente inibe a atividade PD-L3 ou VISTA. Em outra modalidade, o agente estimula a atividade PD-L3 ou VISTA. Ainda em outra modalidade, o agente interfere com o aumenta a interação entre um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação natural. Em uma modalidade, o agente é um anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Em outra modalidade, o agente é um peptídeo, peptideomimético, ou outra pequena molécula que se liga a um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA.

[0045] Ainda em outra modalidade, o agente modula a expressão de PD-L3 ou VISTA modulando a transcrição de um gene de PD-L3 ou VISTA, tradução de PD-L3 ou VISTA, ou modificação pós-traducional de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Em outra modalidade, o agente é uma molécula de ácido nucleico com uma sequência nucleotídica que é antissenso para a cadeia codificante de um mRNA de PD-L3 ou VISTA ou um gene PD-L3 ou VISTA.

[0046] Em uma modalidade, os métodos da presente invenção são utilizados para tratar um sujeito com um distúrbio ou condição caracterizada por atividade ou expressão anormal, insuficiente, ou indesejada do polipeptídeo ou ácido nucleico PD-L3 ou VISTA através da administração de um agente que é um modulador de PD-L3 ou VISTA ao sujeito. Em uma modalidade preferencial, o modulador de PD-L3 ou VISTA é um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, preferencialmente uma proteína de fusão solúvel ou proteína multimérica VISTA ou anticorpo anti-VISTA como descrito abaixo. Em outra modalidade, o modulador de PD-L3 ou VISTA é uma molécula de ácido nucleico PD-L3 ou VISTA, por exemplo, em um vetor adenoviral. Em outra modalidade, a invenção fornece ainda o tratamento do sujeito com um agente adicional, que modula uma resposta imune.

[0047] Ainda em outra modalidade, a invenção fornece uma vacina compreendendo um antígeno e um agente que modula (inibe ou aumenta) a atividade de PD-L3 ou VISTA. Em uma modalidade preferencial, a vacina inibe a interação entre PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação natural.

[0048] A presente invenção também fornece ensaios diagnósticos para identificação da presença ou ausência de uma alteração genética caracterizada por pelo menos um de (i) modificação ou mutação anormal de um gene que codifica um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, (ii) desregulação do gene, e (iii) modificação pós-traducional anormal de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, onde uma forma tipo selvagem do gene codifica um polipeptídeo com atividade de PD-L3 ou VISTA.

[0049] Em outro aspecto, a invenção fornece métodos para a identificação de um composto que se liga a ou modula a atividade de um polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA, fornecendo uma composição de indicador que compreende um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA com atividade de PD-L3 ou VISTA, o contato da composição de indicador com um composto teste, e determinando o efeito do composto teste na atividade PD-L3 ou VISTA na composição de indicador para identificar um composto que modula a atividade de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA.

[0050] Em um aspecto, a invenção fornece um método para modular a interação de PD-L3 ou VISTA com o seu parceiro de ligação natural em uma célula imune compreendendo o contato de uma célula apresentadora de antígeno que expressa PD-L3 ou VISTA com um agente selecionado a partir do grupo consistindo de: uma forma de PD-L3 ou VISTA, ou um agente que modula a interação de PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação natural de modo que a interação entre PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural em uma célula imune é modulada. Em uma modalidade preferencial, um agente que

modula a interação de PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação natural é um anticorpo que se liga especificamente a PD-L3 ou VISTA. Em uma modalidade, a interação de PD-L3 ou VISTA com o seu parceiro de ligação natural é regulada geneticamente. Em outra modalidade, a interação de PD-L3 ou VISTA com seus parceiros de ligação natural é regulada negativamente. Em uma modalidade, o método compreende ainda o contato da célula imune ou a célula apresentadora de antígeno com um agente adicional, que modula uma resposta imune.

[0051] Em uma modalidade, a etapa de contato é realizada *in vitro*. Em outra modalidade, a etapa de contato é realizada *in vivo*. Em uma modalidade, a célula imune é selecionada a partir do grupo que consiste em: uma célula T, um monócito, um macrófago, uma célula dendrítica, uma célula B, e uma célula mieloide.

[0052] Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para a inibição ou aumento da ativação em uma célula imune compreendendo aumento ou inibição da atividade ou da expressão de PD-L3 ou VISTA em uma célula de modo que a ativação da célula imune é inibida ou aumentada.

[0053] Ainda em outro aspecto, a invenção se refere a uma vacina compreendendo um antígeno e um agente que promove a interação entre PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação natural.

[0054] Ainda em outro aspecto, a invenção se refere a uma vacina compreendendo um antígeno e um agente que promove a interação entre PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação natural.

[0055] Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para tratamento de um sujeito que tem uma condição que possa se beneficiar da regulação genética de uma resposta imune compreendendo a administração de um agente que inibe a interação entre PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação natural em células do sistema imune do sujeito de modo que uma condição que possa se beneficiar da re-

gulação genética de uma resposta imune é tratada. Em uma modalidade preferencial, o agente compreende um anticorpo de bloqueio ou uma pequena molécula que se liga a PD-L3 ou VISTA e inibe a interação entre PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação natural. Em outra modalidade, o método compreende ainda a administração de um segundo agente que regula geneticamente uma resposta imune em um sujeito. Em outro aspecto, a invenção se refere a um método para o tratamento de um sujeito que tem uma condição que se beneficiaria de regulação de uma resposta imune compreendendo a administração de um agente que estimula a interação entre PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação natural nas células do sujeito de modo que uma condição que se beneficiaria de regulação de uma resposta imune é tratada.

[0056] Por exemplo, a doença tratada com a proteína ou agentes de ligação PD-L3 ou VISTA é selecionado a partir do grupo consistindo em: um tumor, uma infecção patogênica, uma resposta inflamatória imune ou condição, preferencialmente condições inflamatórias menos pronunciadas, ou uma doença imunossupressora. Exemplos específicos incluem esclerose múltipla, tiroidite, artrite reumatoide, diabetes tipo II e tipo I e cânceres, ambas formas avançadas e precoces, incluindo cânceres metastático como câncer de bexiga, câncer ovariano, melanoma, câncer de pulmão e outros cânceres onde VISTA suprime uma resposta antitumoral efetiva. Em alguns casos, o indivíduo pode ser administrado com células ou um vetor viral que expressa um ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-VISTA ou proteína de fusão VISTA.

[0057] Em uma modalidade o agente compreende um anticorpo ou uma pequena molécula que estimula a interação entre PD-L3 ou VISTA e do seu parceiro de ligação natural. Em outra modalidade, o método compreende ainda a administração de um segundo agente

que regula negativamente uma resposta imune para o sujeito como proteínas de fusão PD-L1, PD-L2 ou CTLA-4 ou anticorpo específico respectivo.

[0058] Exemplos de condições que podem ser tratadas utilizando proteínas, agentes de ligação PD-L3 ou VISTA ou antagonistas ou agonistas PD-L3 ou VISTA de acordo com a invenção incluem, a título de exemplo, transplante, alergia, doenças infecciosas, câncer, doenças inflamatórias ou autoimunes, por exemplo, uma doença inflamatória imune. Exemplos específicos de precedentes incluem diabetes tipo 1, esclerose múltipla, artrite reumatoide, artrite psoriática, lúpus eritematoso sistêmico, doenças reumáticas, distúrbios alérgicos, asma, rinite alérgica, distúrbios de pele, doenças gastrointestinais como Doença de Crohn e colite ulcerativa, rejeição de transplante, insuficiência renal autoimmune e pós-estreptocócica, choque séptico, síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), síndrome de distresse respiratório do adulto (ARDS) e envenenamento; doenças autoinflamatórias como doenças ósseas degenerativa e doenças articulares incluindo osteoartrite, artrite cristal e capsulite e outras artropatias. Além disso, os métodos e as composições podem ser utilizados para o tratamento da tendinite, ligamentite e lesão traumática de articulação.

[0059] Em outro aspecto, a invenção se refere a um ensaio de base celular para a triagem de compostos que modulam a atividade da PD-L3 ou VISTA compreendendo contato de uma célula que expressa uma molécula alvo PD-L3 ou VISTA com um composto do teste e determinar a capacidade do composto teste para modular a atividade da molécula alvo PD-L3 ou VISTA.

[0060] Ainda em outro aspecto, a invenção se refere a um ensaio sem células para a triagem de compostos que modulam a ligação de PD-L3 ou VISTA a uma molécula alvo compreendendo o contato de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou porção biologicamente ativa do

mesmo com um composto do teste e determinar a capacidade do composto teste para se ligar ao polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou porção biologicamente ativa do mesmo.

[0061] Em outra modalidade, a invenção se refere a um método de identificação de um composto, por exemplo, um anticorpo anti-PD-L3 ou VISTA que modula o efeito de PD-L3 ou VISTA na ativação das células T ou na produção de citocinas, a uma primeira e segunda concentrações de antígeno compreendendo o contato de uma célula T que expressa uma molécula alvo PD-L3 ou VISTA com um composto do teste a uma primeira concentração de antígeno, determinando a capacidade do composto do teste em modular a proliferação de células T ou a produção de citocinas, na primeira concentração de antígeno, contatar uma célula T que expressa uma molécula alvo PD-L3 ou VISTA com o composto do teste a uma segunda concentração de antígeno, e determinar a capacidade do composto do teste em modular a proliferação de células T ou a produção de citocinas, na segunda concentração de antígeno, identificando assim um composto que modula a ativação das células T ou a produção de citocinas, a uma primeira e segunda concentrações de antígeno.

[0062] Em outras modalidades específicas painéis de anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA e proteínas PD-L3 ou VISTA são triados para selecionar aqueles que inibem ou promovem os efeitos de PD-L3 ou VISTA na diferenciação, proliferação de células T CD4+ e CD8+ e produção de citocinas *in vitro* ou *in vivo*.

[0063] Em modalidades preferenciais, as proteínas, ácidos núcleicos PD-L3 ou VISTA, e ligantes específicos a PD-L3 ou VISTA, preferencialmente, anticorpos que têm efeitos desejados sobre as funções de PD-L3 ou VISTA são utilizados para tratar doenças como o câncer, doenças autoimunes, alergia, doenças inflamatórias ou infecção e distúrbios do sistema imune, mais especificamente como

imunodeficiência combinada severa, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes mellitus tipo I, síndrome linfoproliferativa, doença inflamatória do intestino, alergias, asma, doença enxerto versus hospedeiro, rejeição de transplante; respostas imunes a patógenos infecciosos como bactérias e vírus, e cânceres do sistema imune como linfomas e leucemias.

Descrição Detalhada dos Desenhos

[0064] Figura 1. Análise da sequência. A. Sequência murina de aminoácidos de comprimento total PD-L3 ou VISTA. B. Alinhamento da sequência de aminoácidos dos domínios extracelulares de Ig murina entre PD-L3 ou VISTA e ligantes selecionados da família B7, incluindo B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H3, e B7- H4. C Alinhamento do domínio Ig de PD-L3 ou VISTA com os receptores da família B7, incluindo PD-1, CTLA-4, CD28, BTLA, e ICOS. Domínio Ig-v; domínio Ig-c. O alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo de MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation). D. A identidade de sequência (%) dos domínios de Ig-V entre PD-L3 ou VISTA e outros ligantes da família B7 e receptores é calculada usando o programa Clustal W2. E. Homologia de sequência entre PD-L3 ou VISTA humana e murina. Resíduos idênticos são sombreados em preto. Resíduos altamente conservados e semiconservados são sombreados em tom cinza escuro e claro, respectivamente.

[0065] Figura 2. Análise filogenética de PD-L3 ou VISTA murina com outros membros de superfamília de imunoglobulinas (Ig). Sequência de comprimento total de PD-L3 ou VISTA de camundongo e outros membros da superfamília Ig, incluindo 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 e BTN1Al, foram analisados usando L algoritmo PhyML (Phylogenetic Maximum Likelihood). Distâncias filiais foram mostradas nos nós dos galhos da árvore.

[0066] Figura 3. Expressão tecidual e os padrões de expressão de células hematopoiéticas de PD-L3 ou VISTA A. RT-PCR de comprimento completo de PD-L3 ou VISTA a partir de tecidos de camundongo. Lanes: (l) músculo (2) coração (3) olho (4) timo (5) baço (6) intestino delgado, (7) rim (8) fígado (9) cérebro (10) glândula mamária (11) pulmão (12) ovário (13) medula óssea. B. RT-PCR de comprimento completo de PD-L3 ou VISTA a partir de tipos de células hematopoiéticas purificadas. Lanes (1) macrófagos peritoneais (2) CD11b + monócitos esplênicos (3) CD11c + DCs esplênicos (4) células T CD4+CD4+ esplênicas (5) células T CD8+CD8+ esplênicas (6) células B do baço. C-E. A análise de citometria de fluxo da expressão de PD-L3 ou VISTA em células esplênicas CD4+CD4+ e CD8+CD8+ do timo e do baço (C), em CD11b + monócitos (D), e em CD11c + DC subconjuntos do baço e cavidade peritoneal (E). F. Células B de baço, células NK e granulócitos são também analisados. G. A expressão diferencial de PD-L3 ou VISTA em células hematopoiéticas de locais de tecidos diferentes, incluindo LN mesentérico, LN periférico, baço, sangue e cavidade peritoneal. Os dados representativos de pelo menos três experimentos independentes são apresentados.

[0067] Figura 4. Dados de arranjo gênico de PD-L3 ou VISTA a partir do banco de dados matriz GNF (Genomics Institute of Novartis Research Foundation), bem como do banco de dados GEO NCBI.

[0068] Figura 5. Especificidade de anticorpos monoclonais de hamster anti PD-L3 ou VISTA. Linhagens de células de camundongo EL4 super expressando ou PD-L1 ou PD-L3 ou VISTA fundido a RFP foram corados utilizando-se os sobrenadantes de culturas de hibridomas e analisados por citometria de fluxo. Dois clones positivos representativos são mostrados.

[0069] Figura 6. Comparação da expressão de PD-L3 ou VISTA com outros ligantes da família B7 em células esplênicas cultivadas *in*

vitro. Expressão de PD-L3 ou VISTA e outros ligantes da família B7 (ou seja, PD-L1, PD-L2, B7-H3, e B7-H4) em tipos de células hematopoiéticas, incluindo células T CD4+, monócitos CD11bhi e CD11c + DC foram comparados. As células foram recém-isoladas ou cultivadas durante 24 horas *in vitro*, com e sem ativação. Células T CD4+ foram ativadas com ϒCD3 ligado a placa (5ug/mL), monócitos CD11bhi e CD11c+ DCs foram ativadas com IFN alfa (20 ng/mL) e LPS (200 ng/mL). Os resultados representativos de três experimentos independentes são apresentados.

[0070] Figura 7. Comparação de padrões de expressão *in vivo* de PD-L3 ou VISTA e outros ligantes da família B7 durante a imunização. Camundongos transgênicos DO11,10 TCR foram imunizados com ovalbumina de galinha (OVA), emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA) no flanco. Células de linfonodos de drenagem e não drenagem foram coletadas 24 horas após a imunização, e analisadas por citometria de fluxo para a expressão de PD-L3 ou VISTA, PD-L1 e PD-L2. São mostrados resultados representativos de, pelo menos, quatro experimentos independentes. A. Uma população de células CD11b + que expressam um alto nível de PD-L3 ou VISTA foi induzida 24hs pós-imunização com CFA/ OVA, mas não com CFA sozinho dentro do linfonodo de drenagem. Estas células são de fenótipo misto de macrófagos F4/80+ e células dendríticas CD11C+. B. A expressão de PD-L3 ou VISTA, PD-L1 e PD-L2 em monócitos CD11bhi, células T CD11c+ DCs e CD4+ foram analisadas 24h pós- imunização.

[0071] Figura 8. Perda de expressão de PD-L3 ou VISTA em células T CD4+CD4+ ativadas em resposta à imunização. Camundongos DO11.10 foram imunizados com ovalbumina de galinha (OVA), emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA) no flanco. Células de linfonodos de drenagem e não drenagem foram coletadas 48hs após a imunização, e analisadas para a expressão de PD-L3 ou VISTA por

citometria de fluxo. São mostrados os resultados representativos de dois experimentos independentes.

[0072] Figura 9. Proteína de fusão imobilizada PD-L3 ou VISTA-Ig inibiu a proliferação de células T CD4+ e CD8+. A. Células T CD4+ e CD8+ marcadas com CFSE foram estimuladas por □CD3 ligado a placa com ou sem PD-L3 ou VISTA-Ig coabsorvidas. O percentual de células com pouco CFSE foi quantificado e mostrado em B. C. Células T CD4+ de camundongos PD-1 ko foram suprimidas por PD-L3 ou VISTA-Ig. D. Supressão mediada por PD-L3 ou VISTA-Ig é persistente e pode atuar tardiamente. Células T CD4+CD4+ foram ativadas na presença de PD-L3 ou VISTA-Ig ou de Ig controle por 72h (i), ou por 24 horas (ii, iii e iv). Células pré-ativadas por 24h foram coletadas e estimuladas novamente, em condições especificadas por outras 48hs. A proliferação celular foi analisada no final de 72hs de cultura, (ii) Pré-ativação com PD-L3 ou VISTA-Ig e nova estimulação com antiCD3, (iii) Pré-ativação com antiCD3 e nova estimulação com PD-L3 ou VISTA-Ig. (Iv) Pré-ativação com PD-L3 ou VISTA-Ig e nova estimulação com PD-L3 ou VISTA-Ig. Poços duplicados foram analisados para todas as condições. São mostrados resultados representativos de, pelo menos, quatro experimentos.

[0073] Figura 10. Efeito inibitório semelhante de PD-L1-Ig e proteínas de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig em proliferação celular de células T CD4+. Bulk de células T CD4+ purificadas foram marcadas com CFSE e estimuladas com ϒCD3 ligado à placa juntamente com uma quantidade titulada de PD-L1-Ig ou PD-L3 ou proteínas de fusão de Ig-VISTA. A diluição de CFSE foi analisada em 72 horas e o percentual de células com pouco CFSE foi quantificada. Poços duplicados foram analisados para todas as condições. São mostrados os resultados representativos de dois experimentos independentes.

[0074] Figura 11. Impacto supressor de PD-L3-Ig ou VISTA sobre

a proliferação de células T CD4+CD4+ naive e de memória. A. Subconjuntos de células T CD4+CD4+ naive (CD25-CD441owCD62Lhi) e de memória (CD25-CD44hiCD62Llow) foram classificados, marcados com CFSE, e estimulados com anti-CD3 ligado à placa (2,5 ug/mL), juntamente com PD-L3 ou VISTA-Ig ou Ig controle em proporções indicadas. A proliferação celular foi analisada em 72 horas avaliando o perfil de divisão de CFSE. O percentual de células que proliferaram, como determinado pelo percentual de células baixas em CFSE, é calculado e mostrado em B. Poços duplicados foram analisados para todas as condições. São mostrados resultados representativos de dois experimentos independentes.

[0075] Figura 12. Proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig suprimiu a ativação precoce de TCR e a proliferação celular, mas não induziu diretamente a apoptose. Bulk de células T CD4+ purificadas foram estimuladas com anti-CD3 ligado à placa, juntamente com PD-L3 ou VISTA-Ig ou Ig controle na proporção 1: 2 (2,5 ug/mL e 5 ug/mL, respectivamente). As células foram analisadas em 24 horas e 48 horas para a expressão de CD69, CD62L, e CD44 por citometria de fluxo. As células foram também coradas para o marcador de apoptose precoce anexina-V, e um marcador da morte celular 7-Aminoactinomicina D (7-AAD). São mostrados resultados representativos de dois experimentos independentes.

[0076] Figura 13. PD-L3 ou VISTA-Ig inibiram a produção de citocinas pelas células T CD4+ e CD8+. A-B. Bulk purificado de células T CD4+ foram estimuladas com anti-CD3 ligado à placa, e PD-L3 ou VISTA-Ig ou Ig controle nas proporções indicadas. Sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas e 48 horas. Os níveis de IL-2 e IFNLI foram analisados por ELISA. C-D. Células T CD4+ foram separadas em populações de células naive (CD25-CD441owCD62Lhi) e de memória (CD25-CD44hiCD62Llow). As células foram estimuladas com

□CD3 ligado à placa e PD-L3 ou VISTA-Ig ou Ig controle, na proporção de 1:2. Sobrenadantes de cultura foram coletados às 48 horas e analisados para o nível de IL-2 e IFN□ por ELISA. E. Bulk purificado de células T CD8+ foram estimuladas com □CD3 ligado à placa, e PD-L3 ou VISTA-Ig ou Ig controle em proporções indicadas. IFN□ no sobrenadante da cultura foi analisado por ELISA. Para todas as condições, o sobrenadante de seis poços duplicados foram agrupados para análise por ELISA. São mostrados resultados representativos de pelo menos três experimentos.

[0077] Figura 14. Supressão mediada por PD-L3 ou VISTA Ig poderia superar um nível moderado de coestimulação fornecida pelo CD28, mas foi completamente revertido por um nível elevado de coestimulação, assim como parcialmente resgatados por IL-2 exógena. A-B. Células T CD4+ foram ativadas por □CD3 ligado à placa juntamente com PD-L3 ou VISTA-Ig ou Ig controle nas proporções 1:1 e um 1:2. Para o resgate de citocinas, mIL-2 solúvel, mEL7, mIL15 e mIL-23 (todos a 40ng/mL) foram adicionados à cultura de células (A). Para avaliar os efeitos da coestimulação, □CD28 (1ug/mL) foi imobilizada em conjunto com as proteínas Ig e CD3 em proporções indicadas (B). A proliferação celular foi analisada em 72hs avaliando perfis de divisão de FSE. C-D. Para avaliar a atividade supressora de PD-L3 ou VISTA na presença de níveis baixos de coestimulação, as quantidades tituladas de CD28 foram revestidas com anti-CD3 (2,5ug/mL) e proteínas de fusão PD-L3 ou VISTA Ig ou controle Ig (10 ug/mL) para estimular a proliferação de células T CD4+. A proliferação celular foi analisada em 72hs. O percentual de células proliferadas baixas em CFSE foi quantificado e mostrado em D. Poços duplicados foram analisados para todas as condições. Perfis de CFSE representativos de três experimentos independentes são apresentados.

[0078] Figura 15. PD-L3 ou VISTA expresso em células apresen-

tadoras de antígenos suprimiu a proliferação de células T CD4. A-C A linhagem de células CHO que expressa de forma estável molécula MHCII I-Ad e molécula de coestimulação B7-2 foi utilizada como linhagem de células-mãe. As células foram transduzidas com retrovírus que expressou tanto o PD-L3 ou VISTA-RFP ou moléculas de controle RFP. Células transduzidas foram ordenadas para atingir o nível homogêneo de expressão. Para testar a sua capacidade como células apresentadoras de antígeno, células CHO-PD-L3 ou VISTA ou CHO-RFP foram tratadas com mitomicina C e misturadas com células T CD4+ transgênicas OVA-específicas DO11.10, na presença de uma quantidade titulada de peptídeo OVA. Proliferação de células de DO11 foi analisada em 72 horas, ou por perfis de divisão de CFSE (AB), ou por incorporação de trítio (C). D. Células dendríticas derivadas de medula óssea foram transduzidas com retrovírus RFP ou B7B-H5-RFP durante período de 10 dias de cultura. CD11c + RFP+ DCs e CD11c+ RFP- DCs não transduzidas foram ordenadas e utilizadas para estimular células T CD4+ transgênicas OVA-específicas OTÍI na presença de uma quantidade titulada de peptídeo OVA. A proliferação celular foi analisada no dia 3 examinando a divisão CFSE. Para todos os experimentos, os poços duplicados foram analisados para todas as condições, e os resultados representativos de três experimentos independentes são apresentados.

[0079] Figura 16. Nível da expressão de superfície de PD-L3 ou VISTA em DCs derivadas de medula óssea retroviralmente transduzidas. DCs derivadas de medula óssea (BMDC), foram cultivadas na presença de GM-CSF (20ng mmL) e transduzidas com um RFP ou PD-L3 ou VISTA-RFP retrovírus, como descrito em Métodos. No dia 10, o nível de expressão de superfície de PD-L3 ou VISTA foi analisado em BMDCs cultivadas, e comparadas com macrófagos peritoneais recém-isoladas.

[0080] A Figura 17 mostra que o mAb anti-PDL3 demonstrou eficácia em um modelo passivo de transferência de EAE. Neste modelo de transferência adotiva de EAE, os camundongos da linhagem doadora SJL foram imunizados com CFA e peptídeo PLP. No dia 10, a partir de linfócitos totais de nódulos linfáticos foram isolados e cultivados *in vitro* com peptídeo PLP, IL-23 (20 ng/mL) e anti-DFNg (10 g/mL) por 4 dias. Células T CD4 expandidas foram então purificadas e transferidas adotivamente para camundongos recipientes naive. A progressão da doença foi monitorada e pontuada com: 0, nenhuma doença, 0,5 perda de tônus da cauda; 1: cauda flácida, 2: cauda flácida + paresia dos membros posteriores; 2,5: paralisia de 1 membro posterior; 3: paralisia de ambos os membros posteriores; 3,5: fraqueza de membros anteriores; 4: paralisia dos membros posteriores + paralisia de membros anteriores unilateral. Os camundongos foram sacrificados quando a pontuação da doença atingiu 4.*, camundongos foram sacrificados.

[0081] A Figura 18 mostra que anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA apresentam eficácia (reduzem os sintomas de artrite), em um modelo animal com artrite induzida pelo colágeno.

[0082] A Figura 19 mostra que VISTA expressa em células apresentadoras de antígenos suprimiu a proliferação de células T CD4+.

[0083] A Figura 20 mostra que um anticorpo anti-VISTA inibiu o crescimento de tumor em camundongos transplantados com células tumorais MB49.

[0084] A Figura 21 mostra o efeito antitumoral de mab anti-VISTA em quatro modelos antitumorais diferentes de camundongos.

[0085] A Figura 22 mostra o efeito potencializador de um anticorpo monoclonal anti-VISTA na eficácia de uma vacina agonista CD40/TLR.

[0086] A Figura 23 mostra expressão de VISTA em células do SNC.

[0087] A Figura 24 mostra o impacto de VISTA sobre o destino e função de células T em um modelo de EAE.

Descrição Detalhada da Invenção

Definições

[0088] Antes de se descrever a invenção em mais detalhes as seguintes definições são fornecidas.

[0089] Conforme usado aqui, "célula imune" compreende células que são de origem hematopoiética e que desempenham um papel na resposta imune. Células imunes incluem linfócitos, como as células B e as células T, células natural killers, e células mieloides, como monócitos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, basófilos, e granulócitos.

[0090] Conforme usado aqui, o termo "célula T" inclui células T CD4+ e T CD8+. O termo célula T também inclui ambas as células T auxiliares do tipo 1 e auxiliares do tipo 2.

[0091] O termo "célula apresentadora de antígenos" inclui as células apresentadoras de antígenos profissionais (por exemplo, linfócitos B, monócitos, células dendríticas e células de Langerhans) assim como células apresentadoras de outros antígenos (por exemplo, queratinócitos, células endoteliais, astrócitos, fibroblastos e oligodendrócitos).

[0092] O termo “antígeno" aqui se refere ao antígeno, onde a modulação da resposta imune aos mesmos pode ser terapeuticamente desejada. No caso de uma resposta imune intensificada desejada para antígenos específicos de interesse, ditos antígenos incluem, entre outros, antígenos de doenças infecciosas para o qual uma resposta imune protetora pode ser induzida são exemplares. Por exemplo, os antígenos de HIV considerados são a proteínas gag, env, pol, tat, rev, nef, transcriptase reversa, e outros componentes do HIV. As proteínas E6 e E7 do vírus papiloma humano também são consideradas. Além disso, o antígeno de EBNA1 do vírus herpes simplex é também considerado. Outros antígenos virais considerados são os antígenos virais de

hepatite como o S, M, L e as proteínas do vírus da hepatite B, o pré-antígeno S do vírus da hepatite B, e outras hepatites, por exemplo, hepatite A, B, e C, componentes virais como RNA viral de hepatite C; antígenos virais de influenza como hemaglutinina, neuraminidase, nucleoproteína, M2 e outros componentes virais de influenza, antígenos virais de sarampo como proteínas de fusão de sarampo e outros componentes virais do sarampo, antígenos virais de rubéola como proteínas El e E2 e outros componentes virais da rubéola; antígenos rotavirais como VF7sc e outros componentes de rotavirus; antígenos de citomegalovírus como glicoproteína B do envelope e outros componentes dos antígenos virais do citomegalovírus; antígenos do vírus sincicial respiratório como a proteína de fusão RSV, a proteína M2 e componentes de antígenos virais de vírus sinciciais respiratórios; antígenos virais de herpes simplex como proteínas precoces imediatas, glicoproteína D, e outros componentes dos antígenos do vírus herpes simplex; antígenos virais de varicela zoster como gpI, gpII, e outros componentes dos antígenos virais de varicela zoster; antígenos virais de encefalite japonesa como as proteínas E, ME, ME-NS1, NS 1, NS 1-NS2A, 80% E, e outros componentes de antígenos virais da encefalite japonesa; antígenos virais da raiva como glicoproteína rábica, nucleoproteína rábica e outros componentes de antígenos virais da raiva; vírus do Nilo Ocidental, prM e proteínas E; proteína do envelope de Ebola. Vide Fundamental Virology, Second Edition, eds. Knipe, D. M. and, Howley P. M. (Lippincott Williams & Wilkins, New & Wilkins, New York, 2001) para exemplos adicionais de antígenos virais. Além disso, antígenos bacterianos são também revelados. Antígenos bacterianos que podem ser utilizados nas composições e métodos da presente invenção incluem, entre outros, antígenos da bactéria pertussis como, toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina, FI 2, FIM3, adenilato ciclase e outros componentes de antígenos bacterianos da pertussis; antíge-

nos bacterianos da difteria como toxina da difteria ou toxoide difteria e outros componentes de antígenos bacterianos da difteria ; antígenos bacterianos do tétano como toxina tetânica ou toxoide e outros componentes de antígenos bacterianos do tétano; antígenos bacterianos estreptocócicos como as proteínas M e outros componentes de antígenos bacterianos de estreptocócos ; antígenos bacterianos estafilocócicos como IsdA, IsdDB SdrD, e SdrE; antígenos bacterianos de bacilos gram-negativos como lipopolissacarídeos, flagelina, e outros componentes de antígenos de bactérias gram-negativas; antígenos bacterianos de *Mycobacterium tuberculosis* como ácido micólico, proteína de choque térmico 65 (HSP65), a proteína secretada principal de 30 kDa; antígeno 85A, ESAT-6, e outros componentes do antígeno micobacteriano; componentes do antígeno bacteriano de *Helicobacter pylori*; antígenos bacterianos pneumocócicos como pneumolisina, polissacarídeo capsular de pneumococos e outros componentes do antígeno bacteriano pneumocócico; antígenos bacterianos de haemophilus influenza como polissacarídeos capsulares e outras componentes de antígenos bacterianos de *Haemophilus influenza*; antígenos bacterianos de antraz como antígeno protetor de antraz, fator letal antraz, e outros componentes de antígenos bacterianos de antraz, as proteínas Fl e V de *Yersinia pestis*; antígenos bacterianos de riquétsias como *romps* e outros componentes de antígenos bacterianos de riquétsias. Também incluídos com os antígenos bacterianos descritos aqui estão quaisquer outros antígenos bacterianos, micobacterianos, de micoplasmas, de riquétsias, ou de clamídia. Exemplos de protozoários e outros antígenos parasitários incluem, entre outros, antígenos de *Plasmodium falciparum* como antígenos de superfície, antígenos de superfície merozoítos, antígenos de superfície esporozoitos, antígenos de superfície circunsporozoito, antígenos de superfície gameta/ gametócito, antígeno da superfície de eritrócitos de 155 RESA e outros

componentes de antígeno plasmodiais; antígenos de toxoplasma como SAG-1, p30 e outros componentes de antígenos de toxoplasma; antígenos esquistossomóticos como glutationa-S-transferase, paramiosina, e outros componentes de antígeno esquistossomótico; antígenos principais de Leishmania, e outros antígenos como gp63, lipofosfoglicano e sua proteína associada e outros componentes do antígeno de Leishmania, e antígenos de *Trypanosoma cruzi* como o antígeno de 75-77 kDa, o antígeno de 56 kDa e outros componentes do antígeno tripanossômico. Exemplos de antígenos fúngicos incluem entre outros antígenos de espécies de Cândida, da espécie Aspergillus, da espécie Blastomyces, da espécie Histoplasma, da espécie Coccidiodomycosis, Malassezia furfur e outras espécies, Exophiala werneckii e outras espécies, Piedraia hortai e outras espécies, Trichosporum beigelii e outras espécies, espécies de Microsporum, espécies de Trichophyton, espécies Epidermophyton, Sporothrix schenckii e outras espécies, Fonsecaea pedrosoi e outras espécies, Wangiella dermatitidis e outras espécies, Pseudallescheria boydii e outras espécies, Madurella grisea e outras espécies, as espécies de Rhizopus, espécies Absidia, e espécies Mucor. Exemplos de antígenos de doenças por príons incluem PrP, beta-amiloide, e outras proteínas associadas a príons.

[0093] Além dos agentes infecciosos e parasitários mencionados acima, outra área para a imunogenicidade melhorada desejável para um agente anti-infeccioso é na área das doenças disproliferativas, incluindo entre outras: câncer, em que as células que expressam os antígenos de câncer são desejavelmente eliminadas pelo corpo. Antígenos tumorais que podem ser utilizados nas composições e métodos da presente invenção incluem, mas entre outros, antígeno específico da próstata (PSA), mama, bexiga, ovário, testículo, melanoma, telomerase; proteínas de multirresistência a drogas como glicoproteína P; MAGE-1, alfa fetoproteína, antígeno carcinoembrionário, mutante p53,

antígenos de papilomavírus, gangliosídeos ou outros carboiidratos contendo os componentes do melanoma ou outras células tumorais. É contemplado pela invenção que antígenos de qualquer tipo de célula tumoral podem ser utilizados nas composições e métodos aqui descritos. O antígeno pode ser uma célula cancerígena, ou materiais imunogênicos isolados a partir de uma célula cancerígena, como as proteínas da membrana. Estão incluídos antígenos survivina e telomerase universal e da família MAGE de antígenos de câncer de testículo. Antígenos que foram demonstrados estarem envolvidos na autoimunidade e podem ser utilizados nos métodos da presente invenção para induzir tolerância incluem, entre outros, proteína básica de mielina, glicoproteína oligodendrócitica da mielina e proteína proteolipídica da esclerose múltipla e proteína de colágeno CI1 da artrite reumatoide.

[0094] O antígeno pode ser uma porção de um agente infeccioso como HZV-1, EBV, HBV, vírus influenza, vírus da SARS, poxvírus, malária, ou HSV, a título de exemplos não limitantes, para os quais as vacinas que mobilizam forte imunidade mediada por células T (através de células dendríticas) são necessárias.

[0095] O termo "tumor" denota, pelo menos, uma célula ou um grupo de células na forma de uma neoformação de tecidos, em particular sob a forma de um crescimento espontâneo, autônomo e irreversível em excesso, que é mais ou menos desinibido, de tecido endógeno, cujo crescimento é em regra associado com a perda mais ou menos pronunciada das funções específicas das células e dos tecidos. Este grupo de células ou célula não é efetivamente inibida, no que se refere ao seu crescimento, por si só ou por mecanismos de regulação do organismo hospedeiro, por exemplo, melanoma ou carcinoma. Antígenos tumorais não só incluem antígenos presentes no interior ou sobre as células malignas em si, mas também incluem antígenos presentes no tecido do estroma de suporte de células de tumores incluin-

do células endoteliais e outros componentes dos vasos sanguíneos.

[0096] Conforme usado aqui, o termo "resposta imune" inclue respostas imunes mediadas por células T e/ou B, que são influenciadas pela modulação de coestimulação de células T. Exemplos de respostas imunes incluem respostas de células B (por exemplo, a produção de anticorpos) as respostas de células T (por exemplo, produção de citocinas e citotoxicidade celular) e ativação de células que respondem a citocinas, por exemplo, macrófagos. Conforme usado aqui o termo "modulação para baixo" com referência a resposta imune inclui uma diminuição em qualquer uma ou mais respostas imunes, ao passo que o termo "modulação para cima" com referência a resposta imune inclui um aumento em uma ou mais respostas imunológicas. Deve entender-se que modulação para cima de um tipo de resposta imune pode levar a uma modulação para baixo correspondente em outro tipo de resposta imune. Por exemplo, modulação para cima da produção de certas citocinas (por exemplo, IL-10) pode conduzir a modulação para baixo de respostas imunes celulares.

[0097] Conforme usado aqui, o "receptor coestimulatório" inclui receptores que transmitem um sinal coestimulatório a uma célula imune, por exemplo, CD28 ou ICOS. Conforme usado aqui, o termo "receptores inibitotórios" inclui receptores que transmitem um sinal negativo a uma célula imune.

[0098] Conforme usado aqui, o termo "coestimular", com referência às células imunes ativadas, inclui a capacidade de uma molécula coestimulatória para fornecer um segundo sinal mediado por receptor não ativador (um "sinal coestimulatório"), que induz a proliferação ou função efetora. Por exemplo, um sinal coestimulatório pode resultar na secreção de citocina, por exemplo, em uma célula T que tenha recebido um sinal mediado pelo receptor de célula T. Células do sistema imune que tenham recebido um sinal celular mediado por receptor, por

exemplo, através de um receptor de ativação, são aqui referenciadas como "células imunes ativadas".

[0099] Um sinal inibitório como transduzido por um receptor inibitório pode ocorrer mesmo se o receptor coestimulatório (como CD28 ou ICOS) não estiver presente na célula imune e, assim, não é uma simples função de competição entre receptores inibitórios e receptores para ligação de moléculas coestimulatórias (Fallarino *et al*. (1998) J. Exp. Med. 188:205). A transmissão de um sinal inibitório a uma célula imune pode resultar em falta de resposta, anergia ou morte celular programada em células imunes. Preferencialmente, a transmissão de um sinal inibitório opera através de um mecanismo que não envolve a apoptose.

[00100] Conforme usado aqui, o termo "apoptose" inclui morte celular programada, que pode ser caracterizada utilizando técnicas conhecidas. Morte celular apoptótica pode ser caracterizada, por exemplo, por encolhimento da célula, prolongamentos da membrana, e a condensação da cromatina culminando na fragmentação celular. As células em apoptose também apresentam um padrão característico de clivagem internucleossômica de DNA.

[00101] O termo "autoimunidade" ou "doença ou condição autoimune" aqui. Uma "doença autoimune" aqui é uma doença ou distúrbio decorrente de e direcionado contra os próprios tecidos do indivíduo ou uma co-segregação ou manifestação dos mesmos ou condição desta resultante. Exemplos de doenças ou distúrbios autoimunes incluem, entre outros a artrite (artrite reumatoide como artrite aguda, artrite reumatoide crônica, artrite gotosa, artrite gotosa aguda, artrite inflamatória crônica, artrite degenerativa, artrite infecciosa, Artrite de Lyme, artrite proliferativa, artrite psoriática, artrite vertebral, e artrite reumatoide juvenil, osteoartrite, artrite progressiva crônica, artrite deformante, poliartrite primária crônica, artrite reativa e espondilite anquilo-

sante), doenças inflamatórias hiperproliferativas da pele, psoríase como psoríase de placa, psoríase gutata, psoríase pustular, e psoríase das unhas, dermatite incluindo dermatite de contato, dermatite de contato crônica, dermatite alérgica, dermatite alérgica de contato, dermatite herpetiforme, dermatite atópica e, síndrome de hiper IgM ligado ao X, urticária como urticária alérgica e urticária idiopática crônica, incluindo urticária autoimune crônica, polimiosite/dermatomiosite, dermatomiosite juvenil, necrólise epidérmica tóxica, escleroderma (incluindo escleroderma sistêmico), esclerose como esclerose sistêmica, esclerose múltipla (MS) como MS espinho ótica, MS progressiva primária (PPMS), e MS recorrente remitente (RRMS), esclerose sistêmica progressiva, aterosclerose, arterioesclerose, esclerose disseminata, e esclerose atáxica, doença inflamatória intestinal (IBD) (por exemplo, Doença de Crohn, autoimune mediadas por doenças gastrointestinais, colite como colite ulcerativa, colite ulcerosa, colite microscópica, colite colagenosa, colite poliposa, enterocolite necrosante, e colite transmural e doença intestinal inflamatória autoimune), pioderma gangrenosa, eritema nodoso, colangite esclerosante primária, episclerite), síndrome de distresse respiratório, incluindo síndrome de distresse respiratório aguda ou do adulto (ARDS), meningite, inflamação de todas ou parte da úvea, irite, coroidite, uma distúrbio autoimune hematológica, espondilite reumatoide, perda de pelos súbita, Doenças mediadas por IgE como anafilaxia e rinite alérgica e atópica, encefalite como Encefalite de Rasmussen e encefalite límbica e ou de tronco cerebral, uveíte, como uveíte anterior, uveíte anterior aguda, uveíte granulomatosa, uveíte não granulomatosa, uveíte facoantigênica, uveíte posterior, ou uveíte autoimune, glomerulonefrite (GN) com e sem síndrome nefrótica como glomerulonefrite aguda ou crônica como GN primária, GN imuno-mediada, GN membranosa (nefropatia membranosa), GN idiopática membranosa ou nefropatia idiopática membranosa, GN membrano ou

membranosa proliferativa (MPGN), incluindo Tipo I e Tipo II, e GN rapidamente progressiva, condições alérgicas, reação alérgica, eczema incluindo eczema alérgico ou atópico, asma como asma asma brônquica, e asma autoimune, condições envolvendo infiltração de células T e respostas inflamatórias crônicas, doença pulmonar inflamatória crônica, miocardite autoimune, deficiência de adesão de leucócito, lúpus eritematoso sistêmico (SLE) ou lúpus eritematoso sistêmico como SLE cutâneo, lúpus eritematoso cutâneo subagudo, Síndrome de lúpus neonatal (NLE), lúpus eritematoso disseminado, lúpus (incluindo nefrite, cerebrite, pediátrico, não renal, extra-renal, discoide, alopecia), diabetes mellitus juvenil (tipo I), incluindo diabetes mellitus pediátrico dependente de Insulina (IDDM), diabetes mellitus de inicio tardio (diabetes tipo II), diabetes autoimune, diabetes insipidus idiopática, respostas imunes associadas com hiperssensibilidade aguda e retardada mediada por citocinas e linfócitos T, tuberculose, sarcoidose, granulomatose incluindo granulomatose linfomatoide, granulomatose de Wegener, agranulocitose, vasculitides, incluindo vasculite (incluindo vasculite de grandes vasos (incluindo polimialgia reumática e arterite de célula gigante (de Takayasu)), vasculite de médios vasos (incluindo Doença de Kawasaki e poliarterite nodosa , poliarterite microscópica, vasculite do SNC, necrosante, cutâneo, ou vasculite de hipersensibilidade, vasculite necrosante sistêmica, e Vasculite Associada a ANCA, como vasculite de Churg-Strauss ou síndrome (CSS)), arterite temporal, anemia aplástica, anemia aplástica autoimune, Anemia positiva de Coombs, Anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica ou anemia hemolítica imune incluindo anemia hemolítica autoimune (AIHA), anemia perniciosa (anemia perniciosa), Doença de Addison, anemia pura de célula vermelha ou aplasia (PRCA), Deficiência de Fator VIII, hemofilia A, neutropenia autoimune, pancitopenia, leucopenia, doenças envolvendo diapedese de leucócito, Distúrbios inflamatórios de SNC,

síndrome de lesão de múltiplos órgãos Como aqueles secundárias a uma septicemia, trauma ou hemorragia, doenças mediadas por complexo antígeno-anticorpo, doença de membrana de base anti-glomerular, Síndrome de anticorpo anti-fosfolipídeo, neurite alérgica, Doença de Bechet ou Behçet, Síndrome de Castleman, Síndrome de Goodpasture, Síndrome de Reynaud, Síndrome de Sjogren, Síndrome de Stevens Johnson, penfogoide como pênfigo bolhoso e pele penfigoide, pênfigo (incluindo pênfigo vulgar, pênfigo folháceo, pênfigo penfigoide muco-membrana, e pênfigo eritematoso), poliendocrinopatias autoimunes, Doença ou Síndrome de Reiter, nefrite de complexo imune, nefrite mediada por anticorpo, neuromielite óptica, polineuropatias, neuropatia crônica como IgM polineuropatias ou neuropatia mediada por IgM, trombocitopenia (desenvolvida por pacientes com enfarte do miocárdio, por exemplo), incluindo púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) e trombocitopenia autoimune ou imuno-mediadas, como púrpura trombocitopênica idiopática (ITP), incluindo ITP crônica ou aguda, doença autoimune do testículo e ovário incluindo orquite autoimune e ooforite, hipotireoidismo primário, hipoparatiroidismo, doenças endócrinas autoimunes incluindo tiroidite como tiroidite autoimune, Doença de Hashimoto, tiroidite crônica (Tiroidite de Hashimoto), ou tiroidite subaguda, Doença autoimune da tiroide, hipotiroidismo idiopático, Doença de Grave, síndrome poliglandular como síndrome poliglandular autoimune (ou síndrome endocrinopatia poliglandular), síndromes paraneoplásticas, incluindo síndromes neurológicas paraneoplásticas como Síndrome miastênica de Lambert-Eaton ou Síndrome de Eaton-Lambert, rigidez muscular espasmódica, encefalomielite como encefalomielite alérgica ou encefalomielite alérgica e encefalomielite alérgica experimental (EAE), miastenia gravis como miastenia gravis associada com timoma, degeneração cerebelar, neuromiotonia, síndrome de opsoclonia ou opsoclonia-mioclonia (OMS), e neuropatia sensorial, neu-

ropatia multifocal motora, Síndrome de Sheehan, hepatite autoimune, hepatite crônica, hepatite lupoide, hepatite de célula gigante, hepatite ativa crônica ou hepatite ativa crônica autoimune, pneumonite intersticial linfoide, bronquiolite obliterante (não transplante) vs NSIP, Síndrome de Guillain-Barré, doença de Berger (Nefropatía de IgA), Nefropatía de IgA idiopática, dermatose linear por IgA, cirrose biliar primária, pneumonocirrose, síndrome enteropatia autoimune, Doença celíaca, Doença celíaca (enteropatia de glúten), psilose refratária, psilose idiopática, crioglobulinemia, esclerose lateral amiotrófica (ALS; Doença de Lou Gehrig), doença arterial coronariana, doença auricular autoimune como doença auricular interna autoimune (AGED), perda de audição autoimune, Síndrome de opsoclonia mioclonia (OMS), policondrite como policondrite refratária ou recaída, proteinose alveolar pulmonar, amiloidose, esclerite, uma linfocitose não cancerígena, uma linfocitose primária, que inclui linfocitose monoclonal de célula B (por exemplo, gamopatia monoclonal benigna e gamopatia monoclonal de significância não determinada, MGUS), neuropatia periférica, síndrome paraneoplásica, canaleopatias como epilepsia, enxaqueca, arritmia, distúrbios musculares, surdez, cegueira, paralisia periódica, e canaleopatias do SNC, autismo, miopatia inflamatória, glomeruloesclerose segmentar e focal (FSGS), ofalmopatia endócrina, uveoretinite, corioretinite, distúrbio hepático autoimune, fibromialgia, falha endócrina multipla, Síndrome de Schmidt, adrenalite, atrofia gástrica, demência pré-senil, doenças desmielinizantes como doenças desmielinizantes autoimunes, nefropatía diabética, síndrome de Dressler, alopecia greata, Síndrome CREST (calcinose, fenômeno de Raynaud, desmotilidade esofágica, esclerodactil), e telangiectasia), Infertilidade autoimune masculina ou feminina, doença de tecido conectivo misto, Doença de Chagas, febre reumática, aborto recorrente, pulmão do fazendeiro, eritema multiforme, síndrome pós-cardiotomia, Síndrome de Cushing de, pulmão de

criadores de aves, angiite granulomatosa alérgica, angiite linfocítica benigna, Síndrome de Alport, alveolite como alveolite alérgica e alveolite fibrosante, doença pulmonar intersticial, reação de transfusão, leprosia, malária, leishmaniose, cipanosomiase, esquistosomiase, ascariase, aspergilose, síndrome Sampter, a Síndrome de Caplan, dengue, endocardite, fibrose endomiocardíaca, fibrose pulmonar intersticial difusa, fibrose pulmonar intersticial, fibrose pulmonar idiopática, fibrose cística, endoftalmite, eritema elevatum et diutinum, eritroblastose fetal, faciite eosinofílica, Síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariase, ciclite como ciclite crônica, heterociclite crônica, iridociclite, ou Ciclite de Fuch, Púrpura de Henoch-Schönlein, vírus da imunodeficiência humana (HIV), Infecção por ecovírus, cardiomiopatia, Doença de Alzheimer, Infecção por parvovírus, infecção por Vírus da rubéola, síndromes pós vacinação, infecção de rubéola congênita, Infecção por vírus de Epstein-Barr, caxumba, Síndrome de Evan, falência gonadal autoimune, Coreia de Sydenham, nefrite pós-estreptococócica, tromboangite ubiterans, tirotoxicose, tabes dorsal, corioidite, polimialgia de célula gigante, oftalmopatia endócrina, pneumonite de hipersensibilidade crônica, ceratoconjuntivite seca, ceratoconjuntivite epidêmica, síndrome nefrítica idiopática, nefropatía de troca mínima, lesão de reperfusão isquêmica e benigna familiar, autoimunidade de retina, inflamação de articulação, bronquite, doença das vias aéreas obstrutivas crônicas, silicose, afta, estomatite aftosa, distúrbios aterioescleróticos, aspermiogenese, hemólise autoimune, Doença de Boeck, crioglobulinemia, contratura de Dupuytren, endoftalmia facoanafilática, enterite alérgica, eritema nodoso leprosante, paralisia facial idiopática, síndrome de fadiga crônica, febre reumática, Doença de Hamman-Rich, perda auditiva sensoneural, hemoglobinúria paroxismatica, hipogonadismo, ileíte regional, leucopenia, mononucleose infecciosa, mielite transversa, mixedema idiopática primária, nefrose, oftalmia simpática, orqui-

te granulomatosa, pancreatite, poliradiculite aguda, pioderma gangrenosa, Tireoidite de Quervain, atrofia esplênica adquirida, Infertilidade devido a anticorpos antiespermatozoários, timoma não maligno, vitiligo, doenças associadas a vírus SC1D e Epstein-Barr, Síndrome de imunodeficiência adquirida (ADDS), Doenças parasíticas como Lesihmania, síndrome de choque tóxico, intoxicação Alimentar, condições envolvendo infiltração de células T, deficiência de adesão de leucócitos, respostas imunes associadas com hipersensibilidade aguda e retardada mediadas por citocinas e linfócitos T, doenças envolvendo diapedese de leucócito, síndrome de lesão de múltiplos órgãos, doenças mediadas por complexo antígeno-anticorpo, doença de membrana de Base antiglomerular, neurite alérgica, poliendocrinopatias autoimunes, ooforite, mixedema primário, gastrite atrófica autoimune, oftalmia simpatética, doenças reumáticas, doença de tecido conectivo misto, Síndrome nefrótica, insulite, falência poliendócrina, neuropatia periférica, síndrome poliglandular autoimune Tipo I, hipoparatiroidismo idiopático adulto (AOIH), alopecia totalis, cardiomiopatia dilatada, epidermolise bolhosa adquirida (EBA), hemocromatose, miocardite, Síndrome nefrótica, colangite esclerosante primária, sinutese purulenta ou não purulenta, sinutese aguda ou crônica, sinusite etmoide, frontal, maxilar, ou esfenoide, um distúrbio relacionado a eosinófilo como eosinofilia, eosinofilia de infiltração pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Loffler, pneumonia eosinofílica crônica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilose broncopneumônica, aspergiloma, ou granulomas contendo eosinófilos, anafilaxia, espondiloartrite soronegativa, doença autoimune poliendócrina, colangite esclerosante, esclera, epiesclera, candidíase mucocutânea crônica, Síndrome de Bruton, hipogamaglobulinemia transitoria de infância, Síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia, distúrbios associados com doença de colágeno, reumatismo, doença neurológica, distúrbio de reperfusão isquêmica, redução

na resposta de pressão arterial, disfunção vascular, angiectasia, lesão de tecido, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia cerebral, e doença que acompanha vascularização, distúrbios de hiperssensibilidade alérgica, glomerulonefritides, lesão de reperfusão, lesão de reperfusão de tecido miocárdico e outros, dermatoses com componentes inflamatórios agudos, meningite purulenta aguda ou outros distúrbios inflamatórios do sistema nervoso central, distúrbios inflamatórios oculares e orbitais, síndromes associadas a transfusão de granulócito, toxicidade induzida por citocinas, inflamação séria aguda, inflamação intratável crônica, pielite, pneumonocirrose, retinopatia diabética, distúrbio diabetico de grandes artérias, hiperplasia endarterial, úlcera péptica, valvulite e endometriose.

[00102] Os termos "câncer" e "cancerígeno" referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, entre outros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares de ditos cânceres incluem câncer de células escamosas, câncer do pulmão (incluindo o câncer do pulmão de pequenas células, não pequenas do câncer do pulmão de células, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão), cânceres do câncer hepatocelular peritoneu, gástrico ou do estômago (incluindo câncer gastrointestinal), o câncer de pâncreas, glioblastoma, câncer de colo uterino, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de cólon, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma de glândula salivar, câncer renal, câncer do fígado, câncer da próstata, câncer vulvar, câncer da tiroide, carcinoma hepático e vários tipos de câncer da cabeça e pescoço, bem como de células B linfoma (incluindo baixo grau/folicular não Hodgkin linfoma (NHL); linfocítico pequeno (SL) NHL, intermediário grau/folicular NHL, intermediário grau difusa NHL; alto grau imuno-

blástico NHL; alto grau linfoblástica NHL; alto grau NHL de células pequenas não clivadas; NHL doença volumosa; células do manto linfoma; relacionada com a SIDA linfoma, e Macroglobulinemia Waldenstrom), leucemia linfocítica crônica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crônica, mieloma múltiplo e pós-transplante doença linfoproliferativa (PTLD).

[00103] A frase "doença alérgica", se refere a uma doença envolvendo reações alérgicas. Mais especificamente, uma "doença alérgica" é definida como uma doença para a qual um alergenoalergeno é identificado, em que existe uma forte correlação entre a exposição a esse alergenoalergeno e o aparecimento de alterações patológicas e onde essa alteração patológica demonstrou ter um mecanismo imunológico. Um mecanismo imunológico significa que os leucócitos mostram uma resposta imune para estimulação do alergeno. Exemplos de alergenos incluem antígenos de ácaros e de antígenos de pólen. Doenças alérgicas representativas incluem asma brônquica, rinite alérgica, dermatite atópica e alergias ao pólen e insetos. Diátese alérgica é um fator genético que pode ser herdado pelos filhos de pais alérgicos. Doenças alérgicas familiares são também chamadas de doenças atópicas, e o fator, causador transmitido geneticamente é diátese atópica. "Dermatite atópica" é um termo geral para uma doença atópica, em particular doenças acompanhadas por sintomas de dermatite. Os exemplos preferenciais incluem condição alérgica é selecionado a partir do grupo que consiste de eczema, rinite alérgica, febre dos fenos, urticária, e alergias alimentares. Condições alérgicas incluem eczema, rinite alérgica ou coriza, febre do feno, asma brônquica, urticária e alergias alimentares, e outras condições atópicas.

[00104] "Asma" - se refere a uma doença do sistema respiratório caracterizada por inflamação, estreitamento das vias respiratórias e aumento da reatividade das vias aéreas a agentes inalatórios. Asma é

frequentemente, embora não exclusivamente, associada com sintomas atópicos ou alérgica.

[00105] A frase "condições inflamatórias ou doenças inflamatórias" aqui inclui crônicas ou agudas de doenças inflamatórias, incluindo uma doença ou condição seleccionada a partir do grupo que compreende: Doenças reumáticas (incluindo entre outras, artrite reumatoide, osteoartrite, artrite psoriática) spondyloartropatias (incluindo mas não se limitando a espondilite anquilosante, artrite reativa, síndrome de Reiter), artropatias cristal (incluindo, entre outras, pseudogota, doença de deposição de pirofosfato de cálcio), doença de Lyme, polimialgia reumática, doenças do tecido conjuntivo (incluindo mas não se limitando a lúpus eritematoso sistémico, Esclerose Sistêmica, polimiosite, dermatomiosite, Síndrome de Sjogren); vasculitides (incluindo, entre outras a, poliarterite nodosa, Granulomatose de Wegener, síndrome de Churg-Strauss); condições inflamatórias incluindo consequências de trauma ou isquemia, sarcoidose; doenças vasculares incluindo doença vascular aterosclerótica, aterosclerose, e doença oclusiva vascular (incluindo, entre outras, a aterosclerose, doença cardíaca isquêmica, infatro do miocárdio, infarto, doença vascular periférica), e restenose de stent vascular; doenças oculares incluindo uveíte, doença da córnea, irite, iridociclite, e cataratas;

[00106] O termo câncer passível de tratamento pela presente invenção inclui, entre outros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia ou malignidades linfoides. Exemplos mais particulares de tais cânceers incluem bexiga, ovário, melanoma, câncer de células escamosas, câncer do pulmão (incluindo o câncer do pulmão de pequenas células, câncer do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão), cânceres de peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou de estômago (incluindo câncer gastrointestinal), o câncer de pâncreas, glioblastoma, câncer de

colo uterino, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de cólon, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterina, salivar carcinoma da glândula, rim ou renal, câncer do fígado, câncer da próstata, câncer vulvar, câncer da tiroide, carcinoma hepático e vários tipos de câncer da cabeça e pescoço, bem como linfomas de células B (incluindo baixo grau/linfoma folicular não Hodgkin (NHL); linfocítico pequeno (SL) NHL, de grau intermediário/folicular NHL, grau intermediário difuso NHL; alto grau imunoblástico NHL; alto grau linfoblástico NHL; alto grau imunoblástico NHL, alto grau NHL de células pequenas não clivadas; doença volumosa NHL; linfoma de células do manto; linfoma relacionado com a AIDS, e Macroglobulinemia Waldenstrom), leucemia linfocítica crônica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas, leucemia mieloblástica crônica, mieloma múltiplo e doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), bem como a proliferação vascular anormal associada com facomatose, edema (como o associado com tumores cerebrais) e síndrome de Meigs. Preferencialmente, o câncer é selecionado a partir do grupo consistindo de câncer da mama, câncer colorretal, câncer retal, câncer do pulmão de células não pequenas, linfoma não-Hodgkin (NHL), o câncer das células renais, câncer de próstata, câncer do fígado, câncer pancreático, sarcoma de tecidos moles, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer ovariano, mesotelioma, e mieloma múltiplo. Em uma modalidade exemplar (ver exemplos de trabalho), o câncer é um de bexiga, ovário ou melanoma de início avançado (incluindo metastático). Em outra modalidade, o câncer é câncer colo-retal. As doenças cancerígenas passíveis de tratamento pela presente invenção incluem cânceres metastáticos, onde a expressão de VISTA por células mieloides supressoras derivadas suprimem respostas imunes antitumorais e anti-invasivas. O método da presente invenção é particularmente

apropriado para o tratamento de tumores vascularizados.

[00107] A invenção é também apropriada para o tratamento de cânceres, em combinação com a quimioterapia ou a radioterapia ou outros produtos biológicos e para aumentar a atividade dos mesmos, ou seja, em indivíduos onde a expressão de VISTA por células supressoras derivadas de mieloides suprimem respostas antitumorais e a eficácia da quimioterapia ou radioterapia, ou eficácia biológica. Qualquer agente quimioterápico que apresenta atividade anticancerígena pode ser usado de acordo com a presente invenção. Preferencialmente, o agente quimioterápico é selecionado a partir do grupo que consiste de agentes alquilantes, antimetabólitos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inibidores relacionados, alcaloides de vinca, epipodopilotoxinas, antibióticos, L-asparaginase, inibidor de topoisomerase, interferons, complexos de coordenação de platina, ureia antracenodiona substituída, derivados de metilhidrazinas, supressores adrenocorticais, adrenocorticosteroides, progesterona, estrógenos, antiestrogenos, andrógenos, antiandrogênico e análogo de hormônio liberador de gonadotrofinas. Mais preferencialmente, o agente quimioterápico é selecionado a partir do grupo consistindo de 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin (LV), irenotecan, oxaliplatina, capecitabina, paclitaxel e doxetaxel. Dois ou mais agentes quimioterápicos podem ser utilizados em um coquetel a ser administrado em combinação com a administração do anticorpo anti-VEGF. Uma combinação preferencial é a quimioterapia baseada em fluorouracil, que compreende 5-FU e de um ou mais agente quimioterápico. Regimes de dosagem apropriados de quimioterapias combinadas são conhecidos na técnica e descritos em, por exemplo, Saltz *et al*. (1999) Proc ASCO 18:233a e Douillard *et al*. (2000) Lancet 355: 1041-7. O biológico pode ser outro potencializador imune como anticorpos anti PD-L1, PD-L2, CTLA-4 e DP-L1, PD-L2, as proteínas de fusão CTLA-4, bem como as

citocinas, os antagonistas e agonistas do fator de crescimento, hormônios e anticorpos anti-citocinas.

[00108] Dependendo da forma da molécula de PD-L3 ou VISTA que se liga a um receptor, um sinal pode ser transmitido ou (por exemplo, por uma forma multivalente de uma molécula de PD-L3 ou VISTA que resulte em reticulação do receptor ou por uma forma solúvel de PD-L3 ou VISTA que se liga a receptores Fc em células apresentadoras de antígenos) ou inibido (por exemplo, por uma forma solúvel monovalente de uma molécula de PD-L3 ou VISTA ou uma forma solúvel de PD-L3 ou VISTA que é alterada através de métodos conhecidos na técnica de modo que não se liga a receptores Fc em células apresentadoras de antígenos), por exemplo, através da competição com formas ativadas de moléculas de PD-L3 ou VISTA para se ligarem ao receptor. No entanto, há casos em que uma molécula solúvel pode ser estimulatória. Os efeitos dos vários agentes moduladores podem ser facilmente demonstrados utilizando ensaios de triagem de rotina como aqui descritos.

[00109] Conforme usado, o termo "receptor ativador" inclui receptores das células do sistema imune que se ligam antígenos, antígenos complexados (por exemplo, no contexto de moléculas do MHC), ou anticorpos. Receptores de ativação incluem receptores de células T (TCR), receptores de células B (BCR), receptores de citocina, receptores de LPS, receptores do complemento, e receptores Fc.

[00110] Por exemplo, os receptores das células T estão presentes em células T e estão associados com moléculas de CD3. Receptores de células T são estimulados por antígenos no contexto das moléculas MHC (assim como por reagentes ativadores policlonais de células T). A ativação das células T através dos resultados de TCR resulta em numerosas alterações, por exemplo, fosforilação da proteína, alterações lipídicas da membrana, fluxos de íons, alterações de nucleotí-

deos cíclicos, mudanças de transcrição de RNA, alteração da síntese de proteínas, e alterações de volume da célula.

[00111] O termo "receptor de célula B" (BCR), conforme usado aqui, inclui o complexo entre a Ig de membrana (mIg) e outros polipeptídeos transmembrana (por exemplo, Ig alfa e Ig beta) foram encontrados em células B. A função de transdução de sinal de mIg é desencadeada por ligação cruzada de moléculas de receptor por antígenos oligoméricos ou multiméricos. As células B também podem ser ativadas por anticorpos anti-imunoglobulina. Após a ativação de BCR, numerosas mudanças ocorrem em células B, incluindo a fosforilação da tirosina.

[00112] O termo "receptor de Fc" (FcRs) incluem receptores de superfície celular para a porção Fc de moléculas de imunoglobulina (Ig). Receptores de Fc são encontrados em muitas células que participam na resposta imune. Entre os FcRs humanos que foram identificados até agora estão aqueles que reconhecem IgG (designada Fc gama. R), IgE (Fc epsilon R1), IgA (Fc alfa R), e IgM/A polimerizada (Fc.mu.. alfa. R). FcRs são encontrados nos seguintes tipos celulares: Fc epsilon RI (mastócitos), Fc epsilon. RII (muitos leucócitos), Fc alfa. R (neutrófilos) e Fc mu alfa. R (epitélio glandular, hepatócitos) (Hogg, N. (1988) Immunol Today 9: 185-86). Os Fc-gama Rs amplamente estudados são centrais em defesas imunes celulares e são responsáveis pela estimulação da liberação de mediadores da inflamação e enzimas hidrolíticas envolvidas na patogênese da doença autoimune (Unkeless, J. C (1988) Annu. Rev. Immunol. 6: 251 -87). Os Fc gama Rs fornecem uma ligação crucial entre células efetoras e os linfócitos que secretam Ig, uma vez que o macrófago/monócito, leucócito polimorfonuclear e células natural killer (NK) Fc gama Rs conferem um elemento de reconhecimento específico mediado por IgG. Leucócitos humanos possuem pelo menos três diferentes receptores para IgG:h Fc-gama.

RI (encontrada em monócitos/macrófagos), hFc gama RII (em monócitos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, possivelmente células B e a linhagem de células K562) e Fc.gama. III (em células NK, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos).

[00113] Com relação a células T, a transmissão de um sinal coestimulatório a uma célula T envolve uma via de sinalização que não é inibida pela ciclosporina A. Além disso, um sinal coestimulatório pode induzir a secreção de citocina (por exemplo, IL-2, e/ou IL -10) em uma célula T e/ou pode impedir a indução da falta de responsividade ao antígeno, a indução de anergia, ou a indução de morte celular nas células T.

[00114] Conforme usado aqui, o "sinal inibitório" diz respeito a um sinal transmitido via molécula de receptor inibitório em uma célula imune. Dito sinal antagoniza um sinal via um receptor de ativação (por exemplo, via um TCR, CD3, BCR, ou molécula de Fc) e pode resultar, por exemplo, na inibição de: geração de um segundo mensageiro, a proliferação, ou a função efetora na célula imune, por exemplo, fagocitose reduzida, produção de anticorpos, ou citotoxicidade celular, ou a falha das células imunes em produzir mediadores (como citocinas (por exemplo, IL-2) e/ou mediadores de respostas alérgicas), ou o desenvolvimento de anergia.

[00115] Conforme usado aqui, a "falta de responsividade" inclui refratividade à estimulação por parte das células do sistema imune, por exemplo, a estimulação através de um receptor de ativação ou uma citocina. Falta de responsividade pode ocorrer, por exemplo, devido à exposição a agentes imunossupressores ou elevadas doses de antígeno.

[00116] Conforme usado aqui, o termo "anergia" ou "tolerância" inclui refratividade à ativação mediada pela estimulação de receptores. Dita refratividade é geralmente antígeno específica e persiste após a

cessão da exposição ao antígeno gerador de tolerância. Por exemplo, a anergia em células T (ao contrário da falta de responsividade) é caracterizada pela falta de produção de citocina, por exemplo, DL-2. Anergia de células T ocorre quando as células T são expostas ao antígeno e recebem um primeiro sinal (um receptor de células T ou sinal mediado por CD-3), na ausência de um segundo sinal (um sinal coestimulatório). Sob estas condições, a nova exposição das células ao mesmo antígeno (mesmo se a nova exposição ocorre na presença de uma molécula coestimulatória) resulta na falha de produzir citocinas e, deste modo, a falha ao proliferar. As células T anérgicas podem, no entanto, montar respostas a antígenos não relacionados e podem proliferar se cultivadas com citocinas (por exemplo, IL-2). Por exemplo, a anergia de células T pode também ser observada com a falta de produção de IL-2 pelos linfócitos T, conforme medido por ELISA ou por um ensaio de proliferação utilizando uma linhagem celular indicadora. Alternativamente, uma construção de gene repórter pode ser usada. Por exemplo, as células T anérgicas falham em iniciar a transcrição do gene IL-2 induzido por um promotor heterólogo sob o controle da região 5' do gene IL-2 potenciador ou por um multímero da sequência de API que pode ser encontrada dentro do potencializador (Kang *et al* . (1992) Science 257:1 134).

[00117] A modulação de um sinal coestimulatório resulta em modulação da função efetora de uma célula imune. Assim, o termo "atividade de PD-L3 ou VISTA" inclui a capacidade de um polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA se ligar ao seu parceiro de ligação natural, a capacidade para modular os sinais coestimulatórios ou inibitórios de células imunes, e a capacidade para modular a resposta imune.

[00118] A modulação de um sinal inibitório em uma célula imune resulta em modulação da proliferação e/ou secreção de citocinas por uma célula imune.

[00119] Conforme usado aqui, uma molécula de ácido nucleico de "ocorrência natural" se refere a uma molécula de RNA ou DNA contendo uma sequência nucleotídica que ocorre na natureza (por exemplo, codifica uma proteína natural).

[00120] Conforme usado aqui, uma molécula de ácido nucleico "antissenso" compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar a um ácido nucleico "senso" de que codifica uma proteína, por exemplo, complementar da cadeia codificante de uma molécula de cDNA de cadeia dupla, complementar a uma sequência de mRNA ou complementar à cadeia codificadora de um gene. Por conseguinte, uma molécula de ácido nucleico antissenso pode ligar hidrogênio a uma molécula de ácido nucleico senso.

[00121] Conforme usado aqui, a "região codificadora" se refere a regiões de uma sequência nucleotídica compreendendo códons que são traduzidos em resíduos de aminoácidos, enquanto que a "região não codificadora" se refere a regiões de uma sequência nucleotídica que não são traduzidas em aminoácidos (por exemplo, regiões 5' e 3' não traduzidas).

[00122] Conforme usado aqui, o termo “vetor” se refere a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outra molécula de ácido nucleico a qual foi ligada. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma alça de DNA de cadeia dupla circular na qual os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, onde segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Determinados vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem de replicação bacteriana e vetores epissômicos de mamíferos). Outros vetores (por exemplo, vetores não epissômicos de mamíferos) são integrados no genoma de uma célula hospedeira quando da introdução na célula hospedeira, e assim

são replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Além disso, determinados vetores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais estão ligados operacionalmente. Estes vetores são aqui referidos como "vetores de expressão recombinantes" ou simplesmente "vetores de expressão". Em geral, os vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante são muitas vezes na forma de plasmídeos. Na presente especificação, "plasmídeo" e “vetor” podem ser utilizados de modo intercambiável como o plasmídeo é a forma mais comumente utilizada de vetor. No entanto, a invenção destina-se a incluir outras formas de vetores de expressão, como vetores virais (por exemplo, os retrovírus de replicação defeituosa, adenovírus e vírus adeno-associados), que desempenham funções equivalentes.

[00123] Conforme usado aqui, o termo "célula hospedeira" pretende referir-se a uma célula na qual uma molécula de ácido nucleico da presente invenção, como um vetor de expressão recombinante da invenção, foi introduzido. Os termos "célula hospedeira" e "célula hospedeira recombinante" são aqui utilizados alternadamente. Deve ser entendido que tais termos se referem não só à célula sujeito particular, mas à descendênca ou potencial descendência de dita célula. Porque certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas, devido tanto à mutação quanto a influências ambientais, dita descendência pode não ser, de fato, idêntica à célula parental, mas ainda está incluída no escopo do termo conforme usado aqui.

[00124] Conforme usado aqui, um "animal transgênico" se refere a um animal não humano, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um camundongo, no qual uma ou mais das células do animal incluem um "transgene". O termo "transgene" se refere a DNA exógeno que é integrado no genoma de uma célula a partir da qual se desenvolve um animal transgênico e que permanece no genoma do animal maduro, por exemplo, direcionando a expressão de um produto

de gene codificado em um ou mais tipos de células ou tecidos do animal transgênico.

[00125] Conforme usado aqui, um "animal recombinante homólogo" se refere a um tipo de animal transgênico não humano, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um camundongo, no qual um gene endógeno foi alterado por recombinação homóloga entre o gene endógeno e uma molécula de DNA exógeno introduzida em uma célula do animal, por exemplo, uma célula embrionária do animal, antes do desenvolvimento do animal.

[00126] Conforme usado aqui, uma "proteína isolada" se refere a uma proteína que está substancialmente livre de outras proteínas, material celular e meio de cultura quando isolada a partir de células ou produzida por técnicas de DNA recombinante, ou precursores químicos ou outros produtos químicos quando sintetizado quimicamente.

[00127] Uma proteína "isolada" ou "purificada" ou uma fração biologicamente ativa da mesma é substancialmente livre de material celular ou de outras proteínas contaminantes das células ou fonte de tecido a partir do qual a proteína PD-L3 ou VISTA é derivada, ou substancialmente livre de produtos químicos precursores ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizados. A linguagem "substancialmente livre de material celular" inclui preparações de proteína PD-L3 ou VISTA onde a proteína é separada dos componentes celulares das células das quais é isolada ou produzida de forma recombinante. Em uma modalidade, a linguagem "substancialmente livre de material celular" inclui preparações de proteína PD-L3 ou VISTA com menos de cerca de 30% (em peso seco) de proteínas não-PD-L3 ou VISTA (aqui referida também como uma "proteína contaminante"), mais preferencialmente menos do que cerca de 20% de proteínas não PD-L3 ou VISTA, ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 10% de proteínas não PD-L3 ou VISTA, e mais preferencialmente menos do que

cerca de 5% de proteínas não PD-L3 ou VISTA. Quando a proteína PD-L3 ou Vista ou fração biologicamente ativa da mesma é produzida por via recombinante, é também preferencialmente substancialmente isenta de meio de cultura, ou seja, o meio de cultura representa menos do que cerca de 20%, mais preferencialmente menos do que cerca de 10%, e mais preferencialmente menos do que cerca de 5% do volume da preparação da proteína.

[00128] A linguagem "substancialmente livre de percursores químicos ou outros produtos químicos" inclui preparações de proteínas PD-L3 ou VISTA onde a proteína é separada a partir de precursores químicos ou outros produtos químicos que estão envolvidos na síntese da proteína. Em uma modalidade, a linguagem "substancialmente livre de percursores químicos ou outros produtos químicos" inclui preparações de proteínas PD-L3 ou VISTA com menos de cerca de 30% (em peso seco) de precursores químicos ou de PD-L3 ou VISTA sem produtos químicos, mais preferencialmente menos do que cerca de 20% de precursores químicos ou de PD-L3 ou VISTA sem produtos químicos, ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 10% de precursores químicos ou de PD-L3 ou VISTA sem produtos químicos, e mais preferencialmente menos do que cerca de 5% de precursores químicos ou de PD-L3 ou VISTA sem produtos químicos.

[00129] O termo "anticorpo", como utilizado aqui, inclui uma "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo"), bem como as moléculas de anticorpo total. O termo "porção de ligação ao antígeno", tal conforme usado aqui, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno (por exemplo, PD-L3 ou VISTA). Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser executada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação englobados dentro do termo

"porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste dos domínios VL, VH, CL e os CHI, (ii) um fragmento F(ab') 2, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça, (iii) um fragmento Fd que consiste dos domínios VH e CH1, (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al*, (1989) Nature 341: 544-546) que consiste de um domínio VH e (vi) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR). Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que sejam feitos como uma cadeia de proteína única, onde as regiões VL e VH pareiam para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv), ver por exemplo, Bird *et al* (1988) Science 242:423-426, e Huston *et al* (1988) Proc Natl Acad Sci. USA 85:5879-5883, e Osbourn *et al* 1998 Nat Biotechnol 16:778). TaisDitos anticorpos de cadeia simples também se destinam estar incluídos no termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo. Quaisquer sequências de VH e VL de scFv específico podem ser ligados ao cDNA da região constante de imunoglobulinas humanas ou sequências genômicas, de modo a gerar vetores de expressão que codificam as moléculas de IgG completas ou outros isotipos. VH e VL também podem ser usados na geração de fragmentos Fab, Fv ou outros fragmentos de imunoglobulinas utilizando tanto química de proteínas quanto tecnologia de DNA recombinante. Outras formas de anticorpos de cadeia simples, como *diabodies* estão também englobados. Os *diabodies* são anticorpos bivalentes, biespecíficos, onde os domínios VH e VL são expressos em uma única cadeia polipeptídica, mas utilizando um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os

dois domínios na mesma cadeia, forçando assim os domínios a emparelharem com domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação ao antígeno (ver, por exemplo, Holliger, P. *et al* (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448, Poljak, RJ *et al* (1994) Structure 2:1121-1123).

[00130] Ainda adicionalmente, um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, pode ser parte de umas moléculas de imunoadesão maiores, formadas por associação covalente ou não covalente do anticorpo ou porção de anticorpo, com uma ou mais proteínas ou peptídeos. Exemplos de ditas moléculas de imunoadesão incluem a utilização da região de núcleo de estreptavidina para fazer uma molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, SM *et al*. (1995) Hum. Antibodies Hybridomas 6:93-101) e a utilização de um resíduo de cisteína, um peptídeo marcador e um tag C-terminal de poli-histidina para fazer moléculas scFv bivalentes e biotiniladas (Kipriyanov, S.M. *et al* (1994) Mol Immunol 31:1047-1058). Porções de anticorpo, como Fab e fragmentos F(ab')2 podem ser preparados a partir de anticorpos inteiros, utilizando técnicas convencionais, como digestão com papaína ou pepsina, respectivamente, dos anticorpos inteiros. Além disso, os anticorpos, porções de anticorpos e moléculas de imunoadesão podem ser obtidos utilizando técnicas padrão de DNA recombinante, conforme aqui descrito.

[00131] Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais; xenogeneico, alogeneico ou singeneico, ou formas modificadas do mesmo, por exemplo, humanizado, quimérico, etc, preferencialmente, os anticorpos da invenção ligam-se especificamente ou substancialmente especificamente a moléculas de PD-L3 ou VISTA. Os termos "anticorpos monoclonais" e "composição de anticorpo monoclonal", tal conforme usado aqui, referem-se a uma população de moléculas de anticorpo que contém apenas uma espécie de um sítio de ligação ao antígeno

capaz de imunorreagir com um epítopo particular de um antígeno, enquanto que o termo "anticorpos policlonais" e "composição de anticorpo policlonal" referem-se a uma população de moléculas de anticorpo que contêm múltiplas espécies de sítios de ligação ao antígeno capazes de interagir com um antígeno particular. Uma composição de anticorpo monoclonal, tipicamente exibe uma afinidade de ligação única para um antígeno particular com o qual imunorreage.

[00132] O termo "anticorpo humanizado", conforme usado aqui, pretende incluir anticorpos produzidos por uma célula não humana com regiões variáveis e constantes que foram alteradas para serem mais semelhantes aos anticorpos que seriam produzidos por uma célula humana. Por exemplo, ao alterar a sequência de aminoácidos do anticorpo não humano para incorporar os aminoácidos encontrados em sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanizados da presente invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados pelas sequências de imunoglobulinas da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese ao acaso, ou mutagênese sítio específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nas CDRs. O termo "anticorpo humanizado", conforme usado aqui, inclui também os anticorpos onde as sequências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie de mamíferos, como um camundongo, foram enxertadas em sequências nas sequências estruturais humanas.

[00133] Um "anticorpo isolado", tal conforme usado aqui, pretende referir-se a um anticorpo que é substancialmente isento de outros anticorpos que possuem especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-L3 ou VISTA é substancialmente isento de anticorpos que se ligam especificamente a outros antígenos diferentes de PD-L3 ou VISTA). Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente isento de outros

materiais celulares, e/ou de produtos químicos.

[00134] Um "domínio de oligomerização" aqui se refere a um domínio que, quando ligado a um dominio extracelular VISTA ou fragmento do mesmo, facilita a oligomerização. Ditos domínios de oligomerização compreendem auto-associação. alfa-hélices, por exemplo, ziper de leucina, que podem ser ainda estabilizados por ligações dissulfeto adicionais. Os domínios são projetados para ser compatíveis com o enovelamento vetorial através de uma membrana, um processo pensado para facilitar o enovelamento do polipeptídeo *in vivo* em uma proteína de ligação funcional. Exemplos dos mesmos são conhecidos na técnica e incluem a título de exemplo GCN4, e COMP enovelados.

[00135] O rolo enovelado alfa-helice é provavelmente o motivo de oligomerização de subunidade mais generalizado encontrado em proteínas. Assim, os rolos enovelados completam uma variedade de funções diferentes. Em várias famílias de ativadores de transcrição, por exemplo, zíperes curtos de leucina desempenham um papel importante no posicionamento das regiões de ligação ao DNA no DNA (Ellenberger *et al*., 1992, Cell 71:1223-1237). Rolos enovelados também são usados para formar oligômeros de proteínas dos filamentos intermediários. Proteínas enoveladas em rolos parecem desempenhar um papel importante tanto na vesícula como na fusão da membrana viral (Skehel e Wiley, 1998, Cell 95:871-874). Em ambos os casos, as sequências hidrofóbicas, incorporados nas membranas a serem fundidas, estão localizadas no mesmo lado do complexo de forma cilíndrica constituída por um feixe de longas alfas-hélices. Acredita-se que este arranjo molecular cause aposição à membrana próxima quando os complexos são montados para a fusão da membrana. O rolo enovelado é frequentemente usado para controlar a oligomerização. É encontrado em muitos tipos de proteínas, incluindo fatores de transcrição, como, entre outros a GCN4, peptídeos de fusão virais, complexos

SNARE e sintetases tRNA, entre outros. Super-hélices muito longas são encontradas em proteínas como tropomiosina, filamentos intermediários e componentes do fuso mitótico. Rolos enovelados envolvem uma série de alfa-hélices que são superenoveladas em torno de si de uma forma altamente organizada que se associam em paralelo ou uma orientação antiparalela. Embora os dímeros e trímeros são os mais comuns. As hélices podem ser da mesma ou de diferentes proteínas. O rolo enovelado é formado por hélices de componentes que se juntam para enterrar suas costuras hidrofóbicas. Como as costuras hidrofóbicas torcem em torno de cada hélice, de modo que os hélices também torcem o rolo em torno de si, enterrando as costuras hidrofóbicas e formando um super rolo. É a característica de interdigitação das cadeias laterais entre as hélices vizinhas, conhecida como pacotes *knobs-into-holes*, que define a estrutura como um rolo enovelado. As hélices não têm que correr na mesma direção para que este tipo de interação ocorra, embora a conformação paralela seja mais comum. A conformação antiparalela é muito rara em trímeros e desconhecida em pentâmeros, mas mais comum em dímeros intramoleculares, onde as duas hélices estão muitas vezes ligadas por um laço curto. No espaço extracelular, a laminina proteína heterotrimérica enovelada desempenha um papel importante na formação de membranas basais. Outros exemplos são os tromboespondinas e cartilagem oligomérica da proteína de matriz (COMP) na qual três (trombospondinas 1 e 2) ou cinco (trombospondinas 3, 4 e COMP) cadeias estão ligadas. As moléculas têm uma aparência semelhante a ramalhete de flores, e a razão da sua estrutura oligomérica é provavelmente a interação multivalente dos domínios C-terminais com receptores celulares. A levedura GCN4 ativadora transcricional é uma das 30 proteínas eucarióticas mais identificadas que contêm a região de base de zíper de leucina (bZIP) motivo deligação ao DNA (Ellenberger *et al*, 1992, Cell 71: 1223-1237). O

dímero bZIP é um par de hélices alfa contínuas que forma uma espiral enovelada paralela sobre suas carboxi-terminal de 34 resíduos e, gradualmente divergem para com os seus terminais amino para passar através da ranhura principal do sítio de ligação do DNA. A interface de dimerização em rolo enovelado é orientada quase perpendicular ao eixo de DNA, dando o complexo a aparência da letra T. bZIP contém uma repetição 4-3 hepta de resíduos hidrofóbicos e não polares, que encaixam em paralelo uma alfa-hélice em rolo enovelado (Ellenberger *et al*, 1992, Cell 71:. 1223-1237). A estabilidade dos resultados de dímero da embalagem lado-a-lado de leucinas e resíduos não polares nas posições a e d da repetição heptad, bem como um número limitado de pontes de sal intra- e interhelical, mostrados em uma estrutura de cristal de zíper de leucinas GCN4 peptídeo (Ellenberger *et al*, 1992, Cell 71:1223-1237). Outro exemplo é o CMP (matrilin-1) isolada a partir de cartilagem bovina traqueal como um homotrímero de subunidades de Mr 52000 (Paulsson e Heinegard, 1981, Biochem J. 197:367-375), em que cada subunidade é composta por um módulo de vWFA1, um único domínio EGF, um módulo vWFA2 e um domínio que abrange cinco rolos enovelados heptadas (Kiss *et al*, 1989, J. Biol Chem 264:8126-8134, Hauser e Paulsson, 1994, J. Biol Chem 269:25747 - 25753). A microscopia eletrônica de CMP purificada mostrou uma estrutura tipo bouquet trímero em que cada subunidade forma um elipsoide emergindo a partir de um ponto comum correspondente à bobina enrolada (Hauser e Paulsson, 1994, J. Biol. Chem. 269:25747-25753). O domínio de serpentina enovelada em matrilin-1 tem sido extensivamente estudado. A estrutura trimérica é mantida após completa redução das ligações dissulfureto intercadeias sob condições não desnaturantes (Hauser e Paulsson, 1994, J. Biol. Chem. 269:25747-25753). Ainda outro exemplo é a cartilagem oligomérica de proteína de matriz (COMP). A glicoproteína não colagenosas, COMP, foi pela primeira

vez identificada em cartilagem (Hedbom *et al*., 1992, J. Biol. Chem. 267:6132-6136). A proteína é uma kDa 524 homopentamérica de cinco subunidades que consiste de uma região de repetição septeto N-terminal (cc) seguido por quatro fatores de crescimento epidérmico (EGF) como domínios (EF), sete domínios de ligação do cálcio (T3) e uma C -terminal globular de domínio (TC). De acordo com esta organização de domínio, COMP pertence à família de trombospondinas. Repetições de septeto (abcdefg).sub.n com resíduos preferencialmente hidrofóbicos nas posições a e d formam domínios helicoidais em rolo enovelado (Cohen e Parry, 1994, Science 263:488-489). Recentemente, o recombinante de cinco cadeias de domínio em espiral espiralada de COMP (COMPcc) foi cristalizado e sua estrutura foi resolvida a 0,2 nm resolução (Malashkevich *et al*., 1996, Science 274:761-765).

[00136] O termo "família" quando se refere a moléculas de ácido nucleico e de polipeptídeo da presente invenção pretende significar duas ou mais moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo contendo um domínio ou motivo estrutural comum e contendo suficiente homologia da sequência de aminoácidos ou nucleotídeos como definido aqui. Os membros da família podem ser de ocorrência natural ou não e podem ser tanto de uma mesma espécie como de espécies diferentes. Por exemplo, uma família pode conter um primeiro polipeptídeo de origem humana, bem como outros polipeptídeos distintos, de origem humana ou alternativamente, pode conter homólogos de origem não humana, como por exemplo, polipeptídeos de macaco. Os membros de uma família podem ter também características funcionais comuns.

[00137] Por exemplo, a família de polipeptídeos PD-L3 ou VISTA da presente invenção compreende, preferencialmente, pelo menos um "domínio de peptídeo sinal". Como usado aqui, uma "sequência de sinal" ou "peptídeo de sinal" inclui um peptídeo contendo cerca de 15 ou mais aminoácidos, que ocorre na extremidade N-terminal dos polipep-

tídeos secretórios ligados à membrana e que contém um grande número de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Por exemplo, uma sequência de sinal contém pelo menos cerca de 10-30 resíduos de aminoácidos, preferencialmente cerca de 15 a 25 resíduos de aminoácidos, de maior preferência cerca de 18-20 resíduos de aminoácidos, e ainda mais preferencialmente cerca de 19 resíduos de aminoácidos e tem pelo menos cerca de 35-65%, preferencialmente cerca de 38-50%, e mais preferencialmente cerca de 40-45% resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (por exemplo, valina, leucina, isoleucina ou fenilalanina). Tal "sequência de sinal", também referido na técnica como um "peptídeo sinal", serve para direcionar um polipeptídeo que contém dita sequência a uma bicamada lipídica, e é clivado na membrana e secretado nos polipeptídeos ligados. Como descrito abaixo uma sequência de sinal foi identificada na sequência de aminoácidos de PD-L3 ou VISTA humana nativa e foi também identificada na sequência de aminoácidos de PD-L3 ou VISTA de camundongo nativo.

[00138] Em outra modalidade da invenção, um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA da presente invenção é identificado com base na presença de um "domínio transmembrana". Como usado aqui, o "domínio transmembrana" compreende uma sequência de aminoácidos com cerca de 15 resíduos de aminoácidos de comprimento, que se estende à membrana plasmática. Mais preferencialmente, um domínio transmembrana inclui, pelo menos, cerca de 20, 25, 30, 35, 40, ou 45 resíduos de aminoácidos e vãos na membrana plasmática. Domínios transmembrana são ricos em resíduos hidrofóbicos, e tipicamente têm uma estrutura de alfa hélice. Em uma modalidade preferencial, pelo menos, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais dos aminoácidos de um domínio transmembrana são hidrofóbicas, por exemplo, leucinas, isoleucinas, tirosinas, ou triptofano. Domínios transmembrana estão descritos em, por exemplo, Zagotta, WN *et al*. (1996) Annu. Rev. Neu-

rosci. 19:235-263, cujo conteúdo está aqui incorporado como referência. A região de domínio transmembrana de PDL3 é aqui identificada (ver, por exemplo, Figura 1).

[00139] Em outra modalidade, uma molécula de PD-L3 ou VISTA da presente invenção é identificada com base na ausência de um "domínio de IgC" e a presença de um "domínio IgV" na molécula de polipeptídeo ou de ácido nucleico correspondente. Conforme usado aqui os domínios IgV e IgC são reconhecidos na técnica como domínios de membro da superfamília de Ig. Estes domínios correspondem a unidades estruturais que possuem diferentes padrões de dobra chamadas dobras Ig. Dobras Ig são constituídas por um sanduíche de duas folhas beta, cada uma consistindo de cadeias antiparalelas beta de 5-10 aminoácidos com uma ponte dissulfeto conservada entre as duas folhas na maioria, mas não em todos, os domínios. Domínios IgC de Ig, TCR, e moléculas de MHC partilham os mesmos tipos de padrões de sequência e são chamados de conjunto CI dentro da superfamília Ig. Outros domínios IgC são abrangidos dentro de outros conjuntos. Domínios IgV também partilham os mesmos tipos de padrões de sequência e são chamados conjuntos de domínios V. Domínios IgV são mais longos do que os domínios C e formam um par adicional de cadeias beta. Os resíduos de aminoácidos do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA nativo humano e murino constituindo o domínio IgV pode ser visto na Figura 1. A presença de um domínio IgV é provavelmente necessária para a ligação de PD-L3 ou VISTA ao seu parceiro de ligação natural.

[00140] Em outra modalidade, uma molécula de PD-L3 ou VISTA da presente invenção é identificada com base na presença de um "domínio extracelular" na molécula de polipeptídeo ou de ácido nucleico correspondente. Como usado aqui, o termo "domínio extracelular" representa os aminoácidos N-terminais que se estendem como uma

cauda a partir da superfície de uma célula. Um domínio extracelular da presente invenção inclui um domínio IgV e pode incluir um domínio de peptídeo de sinal. (Ver Figura 1).

[00141] Ainda em outra modalidade, uma molécula de PD-L3 ou VISTA da presente invenção é identificada com base na presença de um "domínio citoplasmático" da molécula de polipeptídeo ou ácido nucleico correspondente. Como usado aqui, o termo "domínio citoplasmático" representa os aminoácidos C-terminal, que se estendem como uma cauda para dentro do citoplasma de uma célula, previsto para compreender domínios citoplasmáticos.

[00142] Em uma modalidade preferencial, as moléculas de PD-L3 ou VISTA da invenção incluem pelo menos um ou mais dos seguintes domínios: um domínio de peptídeo de sinal, um domínio IgV, um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático .

[00143] Os polipeptídeos isolados da presente invenção, preferencialmente, polipeptídeos PD-L3 ou VISTA, têm uma sequência de aminoácidos suficientemente idêntica à da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou 4, ou 5, ou é codificado por uma sequência de nucleotídeos suficientemente idêntica a SEQ ID NO: 1 ou 3 ou um fragmento ou complemento do mesmo. Conforme usado aqui, o termo "suficientemente idêntico" se refere a um primeiro aminoácido ou uma sequência de nucleotídeos que contenha um número suficiente ou mínimo de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos idênticos ou equivalentes (por exemplo, um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral semelhante) para uma segunda sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos de modo que a primeira e a segunda sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos compartilham domínios estruturais ou motivos e/ou uma atividade funcional comum. Por exemplo, sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos que compartilham domínios

estruturais comuns têm, pelo menos, 30%, 40%, ou 50% de homologia, preferencialmente uma homologia de 60%, mais preferencialmente 70% -80%, e ainda mais preferencialmente 90-95% de homologia ao longo das sequências de aminoácidos dos domínios e que contêm pelo menos um e preferencialmente dois domínios estruturais ou motivos, são aqui definidas como suficientemente idênticas. Além disso, sequências de aminoácido ou de nucleotídeos que compartilham pelo menos 30%, 40%, ou 50%, preferencialmente 60%, mais preferencialmente 70-80% ou 90-95% de homologia e partilham uma atividade funcional comum são aqui definidas como suficientemente idênticas.

[00144] Como usado aqui de modo intercambiável, "atividade PD-L3 ou VISTA", "atividade biológica de PD-L3 ou VISTA" ou "atividade funcional de PD-L3 ou VISTA", se refere a uma atividade exercida por uma proteína, molécula de polipeptídeo ou ácido nucleico PD-L3 ou VISTA em uma célula ou tecido responsivo a PD-L3 ou VISTA, ou em um polipeptídeo parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA, como determinado *in vivo* ou *in vitro*, de acordo com técnicas padrão. Estas atividades incluem a modulação de proliferação de células T CD4+ e CD8+ a e produção de citocinas. Em outra modalidade, uma atividade de PD-L3 ou VISTA é uma atividade direta, como uma associação com um parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA. Como utilizado aqui, uma "molécula alvo" ou "parceiro de ligação" é uma molécula com a qual o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA se liga ou interage na natureza, ou seja, expressa em células T, de modo que a função mediada por PD-L3 ou VISTA seja alcançada. Alternativamente, uma atividade de PD-L3 ou VISTA é uma atividade indireta, como uma atividade de sinalização celular mediada pelo polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. As atividades biológicas de PD-L3 ou VISTA são aqui descritas. Por exemplo, o polipeptídeo agonista ou antagonista PD-L3 ou VISTA da presente invenção podem ter uma ou mais das seguintes atividades: (1) suprime ou

promove a proliferação de células T CD4+ e CD8+, (2) suprime ou promove a produção de citocina (3) funciona como um ligante regulador que regula negativamente as respostas de células T durante as interações cognatas entre as células T e APCs derivadas de mieloides (4) regula negativamente respostas de células T CD4+ suprimindo a ativação TCR precoce e retendo a divisão celular, mas com mínimo impacto direto na apoptose, (5) suprime ou promove a ativação específica de antígeno de células T durante as interações cognatas entre as APCs e as células T e/ou (6) suprime ou promove respostas imunes mediadas por células T, (7) modula a ativação de células imunes, por exemplo, linfócitos T, e (8) modula a resposta imune, por exemplo, a resposta inflamatória imune de um organismo, por exemplo, um organismo humano ou de camundongo.

[00145] Assim, outra modalidade da invenção caracteriza proteínas e polipeptídeos isolados PD-L3 ou VISTA que modulam uma ou mais atividades PD-L3 ou VISTA. Estes polipeptídeos incluirão polipeptídeos PD-L3 ou VISTA contendo um ou mais dos seguintes domínios: um domínio de peptídeo sinal, um domínio IgV, um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático, e, preferencialmente, uma atividade PD-L3 ou VISTA.

[00146] Polipeptídeos adicionais preferenciais PD-L3 ou VISTA podem ter pelo menos um domínio extracelular, e um ou mais domínios de peptídeo sinal, um domínio IgV, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático, e são, preferencialmente, codificados por um molécula de ácido nucleico com uma sequência nucleotídica que hibridiza sob condições de hibridizar sob condicos rígidas com uma molécula de ácido nucleico compreendendo o complemento da sequência nucleotídica de SEQ ID NO: 1 ou 3 aqui. As sequências de nucleotídeo e a sequência de aminoácidos do exemplificado isolado humano e murino cDNA de PD-L3 ou VISTA e a sequência prevista de aminoácidos

do polipeptídeo humano de PD-L3 ou VISTA estão contidas na listagem de sequências aqui.

[00147] VISTA humana ou PD-L3 ou VISTA humana foi identificada como uma molécula regulada positivamente em uma triagem de perfil de células T de transcrição. A nossa caracterização de um produto de gene idêntico de 930 pb recuperado de uma biblioteca de cDNA de células T CD4+ murinas confirmou o tamanho e sequência. Silico-sequência e análise estrutural predizem uma proteína transmembrana de tipo I de 309 aminoácidos após a maturação. Seu domínio extracelular contém um único domínio Ig-V extracelular de 136 aminoácidos, que está ligado a uma região de base de 23 aminoácidos, um segmento transmembrana de 21 resíduos, e de um domínio citoplasmático de 97 aminoácidos. A cauda citoplasmática de VISTA não contém qualquer domínio de sinalização. Uma busca de sequência BLAST com o domínio VISTA Ig-V identificou PD-L1 da família B7 como a proteína evolutivamente mais próxima relacionada com uma pontuação limite de e-valor significativo. Um alinhamento de sequências de estrutura baseada em VISTA com os membros da família B7 :PD-L1, PD-L2, B7-H3, e B7-H4 realça vários aminoácidos que são sistematicamente conservados em todas as proteínas do domínio Ig-V.

[00148] Vários aspectos da invenção são descritos em maior detalhe nas seguintes subseções:

I. Moléculas de ácido nucleicos isoladas de PD-L3 ou VISTA

[00149] Um aspecto da invenção se refere às moléculas de ácidos nucleicos isoladas que codificam os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA ou porções biologicamente ativas dos mesmos, bem como fragmentos de ácidos nucleicos suficientes para usar como sondas de hibridização para identificar moléculas de ácidos nucleicos que codificam o PD-L3 ou VISTA (por exemplo, o mRNA de PD-L3 ou VISTA) e fragmentos para usar como iniciadores de PCR para a amplificação ou mutação

de moléculas de ácidos nucleicos de PD-L3 ou VISTA. Conforme usado aqui, o termo "molécula de ácidos nucleicos" pretende incluir moléculas de DNA (por exemplo, cDNA ou DNA genômico) e moléculas de RNA (por exemplo, mRNA) e análogos de DNA ou de RNA gerados usando análogos de nucleotídeos. A molécula de ácido nucleico pode ser fita simples ou fita dupla, mas de preferência é DNA fita dupla.

[00150] O termo "molécula de ácido nucleico isolada" inclui as moléculas de ácido nucleico que são separadas de outras moléculas de ácidos nucleicos que estão presentes na fonte natural dos ácidos nucleicos. Por exemplo, em relação ao DNA genômico, o termo "isolada" inclui moléculas de ácidos nucleicos que são separadas do cromossoma com o qual o DNA genômico está naturalmente associado. Preferencialmente, uma molécula de ácido nucleico "isolada" é livre de sequências que naturalmente flanqueiam o ácido nucleico (ou seja, sequências localizadas nas extremidades 5' e 3' da molécula de ácido nucleico) no DNA genômico do organismo do qual o ácido nucleico é derivado. Por exemplo, em várias modalidades, a molécula de ácido nucleico isolada de PD-L3 ou VISTA pode conter aproximadamente menos de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ou 0,1 kb das sequências de nucleotídeos que flanqueiam naturalmente a molécula de ácido nucleico no DNA genômico da célula da qual a molécula do ácido nucleico é derivada. Além disso, uma molécula de ácido nucleico "isolada" , como uma molécula de cDNA, pode ser substancialmente isenta de outro material celular ou meio de cultura, quando produzida por técnicas de recombinação, ou substancialmente isenta de precursores químicos ou outros produtos químicos quando sintetizada quimicamente.

[00151] Uma molécula de ácido nucleico da presente invenção, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico contendo a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1, 3, ou uma porção da mesma, pode ser isolada usando técnicas padrões de biologia molecular e a informação

da sequência fornecida aqui. Usando toda ou porção da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 1 ou 3 como uma sonda de hibridização, as moléculas de ácidos nucleicos de PD-L3 ou VISTA podem ser isoladas usando técnicas padrões de hibridização e clonagem (por exemplo, conforme descrito em Sambrook, J. *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

[00152] Além disso, uma molécula de ácido nucleico incluindo toda ou uma porção da SEQ ID NO: 1, 3, ou um ortólogo ou variante pode ser isolada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores de oligonucleotídeos sintéticos projetados com base na sequência da SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 ou 5.

[00153] Uma molécula de ácido nucleico da invenção pode ser amplificada usando cDNA, mRNA ou, alternativamente, DNA genômico como molde e iniciadores oligonucleotídeos apropriados de acordo as técnicas padrões de amplificação da PCR. A molécula de ácido nucleico assim amplificada pode ser clonada em um vetor apropriado e caracterizada pela análise de sequências de DNA. Além disso, os oligonucleotídeos correspondentes às sequências de nucleotídeos de PD-L3 podem ser preparados por técnicas padrões de síntese, por exemplo, usando um sintetizador de DNA automatizado.

[00154] Em uma modalidade preferencial, uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica o PD-L3 ou VISTA da invenção compreende a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 1, ou 3, ou um fragmento destas . Em outr modalidade a molécula de ácido nucleico da invenção compreende uma molécula de ácido nucleico que é um complemento da sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 1, ou 3 ou porção de qualquer uma dessas sequências de nucleotídeos. Uma molécula de ácido nucleico complementar à sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 1 ou 3, é aquela que

é suficientemente complementar à sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 1 ou 3, de modo que pode hibridizar à sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 1 ou 3, respectivamente, assim, formando um duplex estável.

[00155] Ainda em outra modalidade preferencial, uma molécula de ácido nucleico isolada da presente invenção compreende uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao comprimento completo da sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 1, ou 3 ou porção de qualquer uma dessas sequências de nucleotídeos.

[00156] Além disso, a molécula de ácido nucleico da invenção pode incluir apenas uma porção da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 1 ou 3, por exemplo, um fragmento que pode ser usado como uma sonda ou iniciador ou um fragmento que codifica uma porção do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, por exemplo, uma porção biologicamente ativa do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. As sequências de nucleotídeos determinadas a partir da clonagem do gene humano PD-L2 permitem a geração de sondas e iniciadores projetados para uso na identificação e/ou clonagem de outros membros da família PD-L2, bem como homólogos de PD-L3 ou VISTA de outras espécies. A sonda/iniciador normalmente compreende oligonucleotídeo substancialmente purificado. O oligonucleotídeo normalmente compreende uma região da sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições rigorosas em pelo menos cerca de 12 ou 15, preferencialmente cerca de 20 ou 25, mais preferencialmente cerca de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, ou 75 nucleotídeos consecutivos de uma sequência senso da SEQ ID NO: 1, ou 3; de uma sequência antisenso da SEQ ID NO: 1, 3, ou uma variante alélica ou mutante, que ocorre naturalmente, da SEQ ID NO: 1, ou 3.

[00157] Em uma modalidade, uma molécula de ácido nucleico da presente invenção compreende uma sequência de nucleotídeos que é maior do que cerca de 50-100, 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 ou mais nucleotídeos de comprimento e que hibridizam sob condições rigorosas de hibridização a uma molécula de ácido nucleico da SEQ ID NO: 1, ou 3 ou o complementar da mesma. Em outra modalidade, uma molécula de ácido nucleico da presente invenção compreende uma sequência de nucleotídeos que é maior do que cerca de 880-900, 900-950, 950-1000, 1000-1050, 1050-1100, 1100-1150 ou mais nucleotídeos de comprimento e que hibridiza sob condições rigorosas de hibridização a uma molécula de ácido nucleico da SEQ ID NO: 1, ou 3 ou o complementar da mesma. Ainda em outra modalidade, uma molécula de ácido nucleico da presente invenção compreende uma sequência de nucleotídeos que é maior do que cerca de 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300 ou mais nucleotídeos de comprimento e que hibridiza sob condições rigorosas de hibridização a uma molécula de ácido nucleico da SEQ ID NO: 1, ou 3 ou o complementar da mesma. Ainda em outra modalidade, uma molécula de ácido nucleico da presente invenção compreende uma sequência de nucleotídeos que é maior do que cerca de 50-100, 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 ou mais nucleotídeos de comprimento, incluindo pelo menos cerca de 15 (ou seja, 15 contíguos) nucleotídeos de uma sequência que comprende a região codificante da SEQ ID NO: 1 ou 3 ou complementar desta, e hibridiza sob condições rigorosas a uma molécula de ácido nucleico que compreende a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 1, ou 3 ou o complementar da mesma.

[00158] Sondas baseadas nas sequências de nucleotídeos de PD-L3 ou VISTA podem ser usadas para detectar transcritos ou sequências genômicas que codificam para os mesmos polipeptídeos ou homólogos. Em modalidades preferenciais, a sonda ainda compreende um grupo marcado ligado à mesma, por exemplo, o grupo marcado pode ser um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima, ou um co-fator de enzima. Tais sondas podem ser usadas como parte de um kit de teste diagnóstico para a identificação de células ou tecidos que mal expressam um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, medindo um nível de um ácido nucleico que codifica o PD-L3 ou VISTA em uma amostra de células de um sujeito, por exemplo, detectando os níveis de RNAm de PD-L3 ou VISTA ou determinando se um gene de PD-L3 ou VISTA genômico foi mutado ou suprimido.

[00159] Um fragmento de ácido nucleico que codifica uma "porção biologicamente ativa de um polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA" pode ser preparado por isolamento de uma porção da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 ou 3, que codifica um polipeptídeo com uma atividade biológica PD-L3 ou VISTA (por exemplo, a capacidade de ligar a seu parceiro natural de ligação e/ou de modular a atividade das células imunes), expressando a porção codificante do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA (por exemplo, pela expressão recombinante *in vitro*) e avaliar a atividade da porção codificante do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA.

[00160] A invenção ainda compreende moléculas de ácidos nucleicos que diferem na sequência de nucleotídeos mostradas na SEQ ID NO: 1 ou 3 devido à degeneração do código genético e, portanto, codificando os mesmos polipeptídeos PD-L3 ou VISTA como aqueles codificados por sequências de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 1 ou 3. Em outra modalidade, uma molécula de ácido nucleico isolada da invenção tem uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipep-

tídeo comtendo uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2, 4 ou 5.

[00161] Além das sequências de nucleotídeos de PD-L3 ou VISTA mostradas na SEQ ID NO: 1 e 3, serão apreciadas por aqueles especialistas na técnica que os polimorfismos da sequência de DNA que levam à alterações nas sequências de aminoácidos dos polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA podem existir dentro de uma população (por exemplo, a população humana). Dito polimorfismo genético nos genes de PD-L3 ou VISTA pode existir entre os indivíduos dentro de uma população devido à variação alélica natural. Conforme usado aqui, os termos "gene" e "gene recombinante" referem-se a moléculas de ácidos nucleicos que incluem uma região aberta de leitura que codifica um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, preferencialmente um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA de mamíferos, e ainda podem incluir sequências reguladoras não codificantes e íntrons.

[00162] Variantes alélicas humanas ou murinas de PD-L3 ou VISTA incluem polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA funcionais e não funcionais. As variantes alélicas funcionais são variantes de sequência de aminoácidos de polipeptídeos humanos ou murinos de PD-L3 ou VISTA que ocorrem naturalmente que mantêm a capacidade de se ligar ao parceiro natural de ligação de PD-L3 ou VISTA e/ou de modular a proliferação de células T CD4+ e CD8+ e a produção de citocinas e a ativação celular de linfócitos. As variantes alélicas funcionais normalmente conterão apenas substituição conservadora de um ou mais aminoácidos da SEQ ID NO: 2, 4 ou 5, ou substituição, supressão ou inserção de resíduos não críticos em regiões não críticas do polipeptídeo.

[00163] Variantes alélicas não funcionais são variantes de sequência de aminoácidos dos polipeptídeos humanos ou murinos de PD-L3 ou VISTA que ocorrem naturalmente que não têm a capacidade de se ligar ao parceiro natural de ligação PD-L3 ou VISTA, e/ou modulam

quaisquer atividades da PD-L3 ou VISTA aqui descritas. As variantes alélicas não funcionais normalmente conterão uma substituição não conservadora, supressão, ou inserção ou truncamento prematuro da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, 4 ou 5, ou substituição, inserção ou supressão de resíduos críticos ou regiões críticas do polipeptídeo, por exemplo, em um domínio IgV.

[00164] A presente invenção ainda fornece ortólogos não humanos, não murinos do polipeptídeo humano ou murino de PD-L3 ou VISTA. Os ortólogos do polipeptídeo humano ou murino de PD-L3 ou VISTA são polipeptídeos que são isolados de organismos não humanos, não murinos e possuem a mesma atividade de ligação e/ou atividade de modulação-ativação de linfócitos e a capacidade de modular a proliferação de células T CD4+ e CD8+ e a produção de citocinas como os polipeptídeos humanos e murinos de PD-L3 ou VISTA reveladas aqui. Os ortólogos do polipeptídeo humano ou murino de PD-L3 facilmente podem ser identificados como compreendendo uma sequência de aminoácidos que é substancialmente idêntica à SEQ ID NO: 2, 4 ou 5.

[00165] Além disso, as moléculas de ácidos nucleicos que codificam outros membros da família PD-L3 ou VISTA, e assim, que têm uma sequência de nucleotídeos que difere das sequências de PD-L3 ou VISTA da SEQ ID NO: 1 ou 3 destinam-se a estar dentro do escopo da invenção. Por exemplo, outro cDNA de PD-L3 ou VISTA pode ser identificado com base na sequência de nucleotídeos murina ou humana de PD-L3 ou VISTA. Além disso, as moléculas de ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA de espécies diferentes, e que têm assim uma sequência de nucleotídeos que difere das sequências de PD-L3 ou VISTA da SEQ ID NO: 1 ou 3 pretendem estar dentro do escopo da invenção. Por exemplo, um cDNA de PD-L3 ou VISTA de macaco pode ser identificado com base na sequência de nucleotídeos murina ou humana de PD-L3 ou VISTA.

[00166] Moléculas de ácidos nucleicos correspondentes às variantes alélicas naturais e homólogas dos cDNAs de PD-L3 ou VISTA da invenção podem ser isoladas com base na sua homologia aos ácidos nucleicos de PD-L2 revelados aqui usando os cDNAs revelados aqui, ou uma porção deles, como uma sonda de hibridização de acordo com as técnicas de hibridização padrões sob condições rigorosas de hibridização. As moléculas de ácidos nucleicos correspondentes às variantes alélicas naturais e homólogas dos cDNAs de PD-L3 ou VISTA da invenção ainda podem ser isoladas por mapeamento do mesmo cromossoma ou locus do gene PD-L3 ou VISTA.

[00167] Assim, em outra modalidade, uma molécula de ácido nucleico isolada da invenção é pelo menos 15, 20, 25, 30 ou mais nucleotídeos em comprimento e hibridiza sob condições rigurosas à molécula de ácido nucleico compreendendo a região codificante da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 ou 3. Em outra modalidade, o ácido nucleico é pelo menos 700, 750, 800, 850, 880-900, 900-950, 950-1000, 1000-1050, 1050-1100, 1100-1150 ou mais nucleotídeos em comprimento.

[00168] Conforme usado aqui, o termo "hibridizar sob condições rigorosas" pretende descrever condições para a hibridização e a lavagem sob as quais as sequências de nucleotídeos que são significativamente idênticas ou homólogas entre si permanecem hibridizadas a cada outra. Preferencialmente, as condições são tais que sequências de pelo menos cerca de 70%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 80%, ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 85% ou 90% idênticas a cada outra permanecem hibridizadas a cada outra. Ditas condições rigorosas são conhecidas por especialistas na técnica e podem ser encontradas em Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al*., eds., John Wiley & Sons, Inc (1995), seções 2, 4 e 6. Condições rigorosas adicionais podem ser encontradas em Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al*., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), capítulos 7, 9 e 11. Um exemplo preferencialmente, não limitante de condições rigorosas de hibridização inclui a hibridização em cloreto de sódio/citrato de sódico (SSC) 4 vezes ou 6 vezes a cerca de 65-70ºC (ou hibridização em SSC 4 vezes mais 50% de formamida a 42-50ºC.) seguido por uma ou mais lavagens em SSC 1X, a cerca de 65-70ºC. Um outro exemplo preferencialmente, não limitante de condições rigorosas de hibridização inclui hibridização no SSC 6 vezes a 45ºC, seguido de uma ou mais lavagens em SSC 0,2 vezes, 0,1% SDS a 65ºC. Um exemplo preferencialmente, não limitante das condições altamente rigorosas de hibridização inclui hibridização no CCD 1 vezes, a cerca de 65-70ºC (ou hibridização em SSC 1 vez mais 50% formamide a cerca de 42-50ºC.) seguido por uma ou mais lavagens em SSC 0,3 vezes, a cerca de 65-70ºC. Outro exemplo preferencialmente, não limitante de condições menos rigorosas de hibridização inclui hibridização no SSC 4 vezes ou 6 vezes, a cerca de 50-60ºC (ou alternativamente hibridização em SSC 6 vezes mais 50% de formamida a cerca de 40-45ºC.) seguido de uma ou mais lavagens em SSC 2 vezes, a cerca de 50-60ºC. As faixas intermediárias aos valores acima relatados, por exemplo, a 65-70ºC ou a 42-50ºC também pretendem ser incluídas pela presente invenção. SSPE (SSPE 1 vez é 0,15 M de NaCl, 10 mM de NaH2P04 e 1,25 mM de EDTA, pH 7,4) pode ser substituído por SSC (SSC 1 vez é 0,15 M de NaCl e 15 mM de citrato de sódio) nos tampões de hibridização e lavagem; as lavagens são realizadas por 15 minutos após a conclusão da hibridização. A temperatura de hibridização para híbridos previstos de serem menores de 50 pares de bases de comprimento deve ser de 5-10ºC inferior à temperatura de fusão (Tm) do híbrido, onde Tm é determinada de acordo com as seguintes equações. Para híbridos com menos de 18 pares de bases de comprimento, Tm (graus C.)-2 (# de

bases A+T) + 4 (# de bases G+C). Para os híbridos entre 18 e 49 pares de base de comprimento, Tm (graus C.) = 81,5+16,6(log10[Na+])+0,41(%G+C)-(600/N), onde N é o número de bases no híbrido e [Na+1] é a concentração de íons de sódio no tampão de hibridização ([Na.+] para SSC 1 vez = 0,165 M). Será também reconhecido especialista que reagentes adicionais podem ser adicionados aos tampões de lavagem e/ou hibridização para diminuir a hibridização não específica de moléculas de ácidos nucleicos a membranas, por exemplo, membranas de nitrocelulose ou náilon, incluindo, entre outros, agentes de bloqueio (por exemplo, BSA ou esperma de salmão ou arenque carregador de DNA), detergentes (por exemplo, SDS), agentes quelantes (por exemplo, EDTA), Ficoll, PVP semelhantes. Quando se usa membranas náilon, em particular, um exemplo adicional preferencial não limitante de condições rigorosas de hibridização, é a hibridização em 0,25-0,5M de NaH2P04, 7% de SDS a cerca de 65ºC, seguido de uma ou mais lavagens em 0,02 M de NaH2P04, 1% de SDS a 65ºC, por exemplo, ver Church and Gilbert (1984) Nad. Acad. Sci. USA 81: 1991-1995 (ou alternativamente SSC 0,2 vezes, 1% de SDS).

[00169] Preferencialmente, uma molécula de ácido nucleico isolada da invenção que hibridiza sob condições rigorosas à sequência da SEQ ID NO: 1, ou 3 ou corresponde a uma molécula de ácido nucleico de ocorrência natural. Conforme usado aqui, uma molécula de ácido nucleico de "ocorrência natural" se refere a uma molécula de RNA ou DNA, contendo uma sequência de nucleotídeos que ocorre na natureza (ou seja, codifica um polipeptídeo natural).

[00170] Além das variantes alélicas de ocorrência natural das sequências de PD-L3 ou VISTA que podem existir na população, o especialista na técnica ainda apreciará que mudanças podem ser introduzidas por mutação nas sequências de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 ou

3, desse modo conduzindo às mudanças na sequência de aminoácidos que codificam os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA, sem alterar a capacidade funcional dos polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, substituições de nucleotídeos que levam a substituições de aminoácidos em resíduos de aminoácidos "não essenciais" podem ser feitas na sequência da SEQ ID NO: 1 ou 3. Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado a partir da sequência de tipo selvagem de PD-L3 ou VISTA (por exemplo, a sequência da SEQ ID NO: 2, 4 ou 5) sem alterar a atividade biológica, considerando um resíduo de aminoácido "essencial" é necessário para a atividade biológica. Por exemplo, resíduos de aminoácidos que são conservados entre os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA da presente invenção, por exemplo, aqueles presentes em um domínio extracelular, estão previstos para serem particularmente não passíveis de alteração. Além disso, os resíduos de aminoácidos adicionais que são conservados entre os polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA da presente invenção e outros membros da família de PD-L3 ou VISTA não são susceptíveis de serem passíveis de alteração.

[00171] Assim, outro aspecto da invenção pertence às moléculas de ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA que contêm mudanças nos resíduos de aminoácidos que não são essenciais para a atividade. Esses polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA diferem na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, 4 ou 5, ainda conservam a atividade biológica. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico isolada compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo, onde o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos em pelo menos cerca de 71%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à SEQ ID NO: 2, 4 ou 5.

[00172] Uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica um

polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA idêntico ao polipeptídeo SEQ ID NO: 2, 4 ou 5 pode ser criada através da introdução de uma ou mais substituições de nucleotídeos, adições ou exclusões na sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1 ou 3 de modo que uma ou mais substituições de aminoácidos, adições ou exclusões são introduzidas no polipeptídeo codificado. Mutações podem ser introduzidas na SEQ ID NO: 1 ou 3 por técnicas padrões, como mutagênese sítio-direcionada e mutagênese mediada por PCR. Preferencialmente, substituições de aminoácidos conservados são feitas em um ou mais dos resíduos de aminoácidos previstos não essenciais. "Substituição de aminoácido conservados" é aquela em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral semelhante. Famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares sem carga (por exemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais apolares (por exemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um resíduo de aminoácidos previsto não essencial de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA preferencialmente é substituído por um outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Alternativamente, em outra modalidade, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente em toda ou porção de uma sequência que codifica PD-L3 ou VISTA, por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser selecionados pela atividade biológica de PD-L3 ou VISTA para identificar mutantes que mantêm a atividade. Seguido da mutagênese da

SEQ ID NO: 1 ou 3, o polipeptídeo codificante pode ser expresso recombinantemente e a atividade do polipeptídeo pode ser determinada.

[00173] Em uma modalidade preferencial, um polipeptídeo mutante de PD-L3 ou VISTA pode ser analisado para a capacidade de se ligar e/ou modular a atividade de um parceiro natural de ligação PD-L3 ou VISTA, para modular a sinalização intra- ou intercelular, modular a ativação dos linfócitos T e ou modular a resposta imune do organismo.

[00174] Ainda outro aspecto da invenção se refere a moléculas isoladas de ácidos nucleicos que codificam proteínas de fusão PD-L3 ou VISTA PD-L3 ou VISTA ou VISTA. Ditas moléculas de ácidos nucleicos que compreendem pelo menos uma primeira sequência de nucleotídeos que codificam uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo PD-L3 ou VISTA PD-L3 ou VISTA ou VISTA, operativamente ligado a uma segunda sequência que codifica uma proteína, polipeptídeo ou peptídeo que não é PD-L3 ou VISTA, podem ser preparadas por técnicas padrões de DNA recombinante.

[00175] Além de moléculas de ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA acima descritas, outro aspecto da invenção se refere às moléculas isoladas de ácido nucleico que são antissenso a eles. Um ácido nucleico "antissenso" compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a um ácido nucleico "senso" que codifica um polipeptídeo, por exemplo, complementar a uma fita codificante de uma molécula de cDNA fita dupla ou complementar a uma sequência de mRNA. Nesse sentido, um ácido nucleico antissenso pode se ligar pelo hidrogênio a um ácido nucleico senso. O ácido nucleico antissenso pode ser complementar inteiramente à fita codificante de PD-L3 ou VISTA, ou apenas a porção da mesma. Em uma modalidade, uma molécula de ácido nucleico antissenso é antissenso a uma "região codificante" da fita cofidicante de uma sequência nucleotídea que codifica uma PD-L3 ou VISTA. O termo "região codificante" se refe-

re à região da sequência de nucleotídeos que compreende os códons que são traduzidos em resíduos de aminoácidos. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico antissenso é antissenso a uma "região não-codificante" da fita codificante de uma sequência de nucleotídeos que codificam PD-L. O termo "região não-codificante" se refere a sequências 5' e 3' que flanqueiam a região codificante que não são traduzidas em aminoácidos (também conhecidas como regiões 5' e 3' não traduzíveis). Dadas as sequências da fita codificante que codificam a PD-L3 ou VISTAPD-L3 ou VISTA ou VISTA humana ou murina reveladas aqui, os ácidos nucleicos antissenso da invenção podem ser projetados de acordo com as regras de emparelhamento de bases de Watson e Crick. A molécula de ácido nucleico antissenso pode ser complementar a toda a região codificante do mRNA de PD-L3 ou VISTA, mas é preferencialmente um oligonucleotídeo que é antissenso para apenas uma porção da região codificante ou não-codificante do mRNA de PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, o oligonucleotídeo antissenso pode ser complementar à região circundante do sítio de início da tradução do mRNA de PD-L3 ou VISTA ou VISTA. Um oligonucleotídeo antissenso pode ser, por exemplo, cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 nucleotídeos de comprimento. Uma molécula de ácido nucleico antissenso da invenção pode ser construída usando a síntese química e reações enzimáticas de ligação usando procedimentos conhecidos na técnica. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico antissenso (por exemplo, um oligonucleotídeo antissenso) pode ser sintetizada quimicamente usando nucleotídeos naturais ou nucleotídeos variadamente modificados projetados para aumentar a estabilidade biológica das moléculas, ou para aumentar a estabilidade física do duplex formado entre os ácidos nucleicos antissenso e senso, por exemplo, nucleotídeos derivados de fosforotioatos e substitutos de acridina podem ser usados. Os exemplos de nucleotídeos modificados que podem ser usados para

gerar o ácido nucleico antissenso incluem 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-clorouracil, 5-iodouracil, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracil, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridin- e, 5-carboximetilaminometiluracil, dihidrouracil, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracila, 5-metoxiaminometil-2-tiouracila, beta D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracila, 5-metoxiuracila, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracila, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracila, 2-tiouracila, 4-tiouracila, 5-metiluracila, uracila-5-ácido oxiacético metiléster, ácido uracila-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracila, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracila, (acp3)w, e 2,6-diaminopurina. Como alternativa, os ácidos nucleicos antissenso podem ser produzidos biologicamente usando um vetor de expressão no qual um ácido nucleico tem sido subclonado em uma orientação antissenso (ou seja, RNA transcrito do ácido nucleico inserido será de uma orientação antissenso para um ácido nucleico alvo de interesse, descrito na seguinte subsecção).

[00176] As moléculas de ácidos nucleicos antissenso da invenção são normalmente administradas a um sujeito ou geradas *in situ*, de modo que hibridizam ou se ligam ao mRNA celular e/ou DNA genômico que codifica um polipeptídeo PD-L3 ou VISTAPD-L3 ou VISTA ou VISTA para, assim, inibir a expressão do polipeptídeo, por exemplo, inibindo a transcrição e a tradução. A hibridização pode ser pela complementaridade de nucleotídeos convencionais para formar um duplex estável, ou, por exemplo, no caso de uma molécula de ácido nucleico antissenso que se ligar aos duplexes de DNA, através de interações específicas no sulco maior da dupla hélice. Um exemplo de uma via de administração de moléculas de ácidos nucleicos antissenso da inven-

ção inclui a injeção direta em um local do tecido. Como alternativa, as moléculas de ácidos nucleicos antissenso podem ser modificadas para atingir células selecionadas e então administradas sistemicamente. Por exemplo, para a administração sistêmica, moléculas antissenso podem ser modificadas, de modo que se ligam especificamente aos receptores ou antígenos expressos em uma superfície celular selecionada, por exemplo, mediante ligação das moléculas de ácidos nucleicos antissenso a peptídeos ou anticorpos que se ligam a receptores ou antígenos da superfície de células. As moléculas de ácidos nucleicos antissenso também podem ser administradas às células usando os vetores descritos aqui. Para atingir concentrações intracelulares suficientes das moléculas antissenso, construções de vetor em que a molécula de ácido nucleico antissenso é colocada sob o controle de um promotor forte pol II ou pol III são preferenciais.

[00177] Ainda em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico antissenso da invenção é uma molécula de ácido nucleico alfa anomérica . Uma molécula de ácido nucleico alfa anomérica forma híbridos de fita dupla específicos com RNA complementar em que, contrariamente às unidades .beta usuais, as fitas correm paralelas entre si (Gaultier *et al*. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625 - 6641). A molécula de ácido nucleico antissenso também pode incluir um 2'-o- metilribonucleotídeo (Inoue *et al*. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) ou um análogo de RNA-DNA quimérico (Inoue *et al*. (1987) FEBS Lett. 215:327 - 330).

[00178] Ainda em outra modalidade, um ácido nucleico antissenso da invenção é um ribossoma. Os ribossomas são moléculas de RNA catalíticas com atividade da ribonuclease que são capazes de clivar um ácido nucleico fita simples, como um mRNA, para o qual eles têm uma região complementar. Assim, os ribossomas (por exemplo, ribossomas cabeça de martelo (descrito em Haseloff e Gerlach (1988) Na-

ture 334:585-591)) podem ser usados para clivar cataliticamente os transcritos de mRNA PD-L3 ou VISTA para, assim, inibir a tradução do mRNA de PD-L3 ou VISTA ou VISTA. Um ribossoma contendo especificidade para um ácido nucleico que codifica PD-L3 ou VISTA pode ser projetado com base na sequência de nucleotídeos de um cDNA de PD-L3 ou VISTA revelado aqui (ou seja, SEQ ID NO: 1 ou 3). Por exemplo, um derivado de um RNA de Tetrahimena L-19 IVS pode ser construído onde a sequência de nucleotídeos do sítio ativo é complementar à sequência de nucleotídeos para ser clivada em um mRNA que codifica PD-L3 ou VISTAPD-L3 ou VISTA ou VISTA. Ver, por exemplo, Cech *et al*., Pat. US. No. 4.987.071 e Cech *et al*., Pat. U.S. No 5.116.742. Como alternativa, o mRNA PD-L3 ou VISTA pode ser usado para selecionar um RNA catalítico, tendo uma atividade ribonuclease específica a partir de um grupo de moléculas de RNA. Ver, por exemplo, Bartel, D. e Szostak, J. W. (1993) Science 261: 1411 -1418.

[00179] Alternativamente, a expressão gênica de PD-L3 ou VISTA pode ser inibida por direcionamento de sequências de nucleotídeos complementares à região reguladora do PD-L3 ou VISTA (por exemplo, o promotor e/ou intensificadores de PD-L3 ou VISTA; para formar estruturas helicoidais triplas que impedem a transcrição do gene PD-L3 em células alvo. Ver geralmente, Helene, C (1991) Anticancer Drug Des. 6 (6): 569-84; Helene, C *et al*. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27 - 36; e Maher, L. J. (1992) Bioessays 14 (12): 807-15.

[00180] Ainda em outra modalidade, as moléculas de ácidos nucleicos de PD-L3 ou VISTA da presente invenção podem ser modificadas na porção de base, na porção dos açúcares ou na estrutura fosfato para melhorar, por exemplo, a estabilidade, a hibridização ou a solubilidade da molécula. Por exemplo, a estrutura de fosfato desoxirribose das moléculas de ácidos nucleicos pode ser modificada para gerar ácidos nucleicos peptídicos (ver Hyrup, B. e Nielsen, P. E. (1996) Bio-

org. Med. Chem. 4 (l): 5-23). Conforme usado aqui, os termos "ácidos nucleicos peptídicos" ou "PNAs" se refere às imitações de ácido nucleico, por exemplo, imitações de DNA, em que a estrutura fosfato desoxirribose é substituída por uma estrutura pseudopeptídica e apenas as quatro nucleobases naturais são retidas. A estrutura neutra das PNAs mostrou permitir a hibridização específica ao DNA e ao RNA sob condições de baixa força iônica. A síntese de oligômeros PNA pode ser realizada usando protocolos padrões de síntese de peptídeos em fase sólida conforme descrito em Hyrup e Nielsen (1996) supra e Perry O'Keefe *et al*. (1996) Proc Natl. Acad. Sci. USA 93:14670 - 675.

[00181] As PNAs das moléculas de ácido nucleicode PD-L3 ou VISTA podem ser usadas em aplicações terapêuticas e de diagnóstico. Por exemplo, PNASs podem ser usadas como agentes antissenso ou antigene para a modulação sequência-específica da expressão gênica mediante, por exemplo, indução do transcrito ou interrupção da tradução ou inibição da replicação. As PNAs das moléculas de ácidos nucleicos de PD-L3 ou VISTA também podem ser utilizadas na análise de mutações de pares de base única em um gene (por exemplo, mediante PCR clamping direcionada por PNA); como ¨enzimas de restrição artificial" quando usado em combinação com outras enzimas (por exemplo, nucleases S I (Hyrup e Nielsen (1996) supra)); ou como sondas ou iniciadores para o sequenciamento de DNA ou hibridização (Hyrup e Nielsen (1996) supra; Perry-O'Keefe *et al*. (1996) supra).

[00182] Em outra modalidade, PNAs de PD-L3 ou VISTA podem ser modificadas (por exemplo, para realçar sua estabilidade ou absorção celular), mediante ataque lipofílico ou outros grupos auxiliares a PNA, mediante formação de quimeras de PNA-DNA, ou mediante uso dos lipossomas ou outras técnicas de distribuição de droga conhecida na técnica. Por exemplo, podem ser geradas quimeras PNA-DNA de moléculas de ácidos nucleicos de PD-L3 ou VISTA que podem combinar

as propriedades vantajosas de PNA e DNA. Tais quimeras permitem que enzimas de reconhecimento de DNA (por exemplo, RNAse H e DNA polimerases) interagem com a porção do DNA, enquanto a porção PNA forneceria afinidade de ligação de alta especificidade. As quimeras de PNA-DNA podem se ligar usando ligantes de comprimentos adequados selecionados em termos de empilhamento de base, número de ligações entre as nucleobases e orientação (Hyrup e Nielsen (1996) supra). A síntese de quimeras PNA-DNA pode ser realizada conforme descrito em Hyrup e Nielsen (1996) supra e Finn P. J. *et al*. (1996) Nucleic Acids Res. 24 (17): 3357-63. Por exemplo, uma cadeia de DNA pode ser sintetizada em um suporte sólido, usando a química padrão de acoplamento fosforamidita e análogos de nucleosídeos modificados, por exemplo, 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxitimidina fosforamidita, podem ser usados como uma ponte entre a PNA e a extremidade 5' do DNA (Mag, M. *et al*. (19879 Nucleic Acids Res. 17: 5973-88). Monômeros de PNA, em seguida, são acoplados de forma progressiva para produzir uma molécula quimérica com um segmento PNA 5' e um segmento de DNA 3' (Finn P. J. *et al*. (1996) supra). Como alternativa, as moléculas quiméricas podem ser sintetizadas com um segmento de DNA 5' e um segmento PNA 3' (Peterser, K. H. *et al*. (1975) Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-11124).

[00183] Em outras modalidades, o oligonucleotídeo pode incluir outros grupos anexados como peptídeos (por exemplo, para o direcionamento de receptores celulares do hospedeiro *in vivo*), ou agentes, facilitando o transporte através da membrana celular (ver, por exemplo, Letsinger *et al*. (1989) Proc Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre *et al*. (1987) Proc Natl. Acad. Sci. USA 84: 648 - 652; publicação PCT No. WO 88/09810) ou a barreira hematoencefálica (veja, por exemplo, publicação PCT No. WO 89/10134). Além disso, os oligonucleotídeos podem ser modificados com os agentes de clivagem

acionados por hibridização (ver, por exemplo, Krol *et al*. (1988) Biotechniques 6:958-976) ou agentes intercalantes (veja, por exemplo, Zon (1988) Pharm. Res. 5:539-549). Para este fim, o oligonucleotídeo pode ser conjugado com outra molécula (por exemplo, um peptídeo, agente de ligação cruzada acionada por hibridização, agente de transporte ou agente de clivagem acionado por hibridização).

[00184] Alternativamente, as características da expressão de um gene endógeno de PD-L3 ou VISTA dentro de uma linhagem celular ou de um micro-organismo podem ser modificadas introduzindo um elemento regulador do DNA heterólogo no genoma de uma linhagem celular estável ou de um micro-organismo clonado de modo que o elemento regulador introduzido está ligado operativamente com o gene endógeno de PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, um gene endógeno de PD-L3 ou VISTA que é normalmente "transcricionalmente silencioso", ou seja, um gene de PD-L3 ou VISTA que normalmente não é expresso, ou é expresso somente em níveis muito baixos em uma linhagem celular ou micro-organismo, pode ser ativado através da inserção de um elemento regulador que é capaz de promover a expressão de um produto de gene normalmente expresso nessa linhagem celular ou micro-organismo. Alternativamente, um gene endógeno de PD-L3 ou VISTA transcricionalmente silencioso, pode ser ativado pela inserção de um elemento regulador promíscuo que funciona através dos tipos de células.

[00185] Um elemento regulador heterólogo pode ser inserido em uma linhagem celular estável ou micro-organismo clonado, de modo que está operativamente ligado com um gene endógeno de PD-L3 ou VISTA, utilizando técnicas, como recombinação homóloga direcionada, que são bem conhecidas por especialistas na técnica e descritas, por exemplo, em Chappel, Pat. US. No 5.272.071; Publicação de PCT No. WO 91/06667, publicado em 16 de maio de 1991.

II. Polipeptídeos PD-L3 ou VISTA isolados e Anticorpos Anti-PD-L3 ou VISTA

[00186] Um aspecto da invenção se refere aos polipeptídeos isolados de PD-L3 ou VISTA, e às partes biológicamente ativas destes, bem como aos fragmentos adequados para o uso como imunógenos para incrementar os anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA. Em uma modalidade, polipeptídeos nativos de PD-L3 ou VISTA podem ser isolados de fontes de tecidos ou células mediante um esquema de purificação apropriado usando técnicas de purificação de proteínas padrões. Em outra modalidade, os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA são produzidos por técnicas de DNA recombinante. Alternativa à expressão recombinante, uma proteína ou polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA pode ser sintetizada quimicamente, usando técnicas de síntese de peptídeos padrões.

[00187] Um polipeptídeo "isolado" ou "purificado" ou uma porção biologicamente ativa do mesmo é substancialmente isento de material celular ou outras proteínas contaminantes de fontes de célula ou tecido das quais é derivado o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou substancialmente isento de precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizados. A linguagem "substancialmente livre de material celular" inclui preparações do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA no qual o polipeptídeo é separado dos componentes celulares das células das quais é isolado ou recombinantemente produzido. Em uma modalidade, a linguagem "substancialmente livre de material celular" inclui preparações de polipeptídeos PD-L3 ou VISTA contendo menos do que cerca de 30% (em peso seco) de proteínas que não são PD-L3 ou VISTA (também referida aqui como "proteínas contaminantes"), mais preferencialmente menos de cerca de 20% de proteínas que não são PD-L3 ou VISTA, ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 10% de proteínas que não são PD-L3 ou VISTA e mais preferencialmente menos do que cerca de 5% de proteínas que não

são PD-L3 ou VISTA. Quando o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou porção biologicamente ativa dele é produzido recombinantemente, é também preferencialmente substancialmente isento de meio de cultura, ou seja, meio de cultura representa menos do que cerca de 20%, mais preferencialmente menos do que 10% e mais preferencialmente menos do que 5% do volume da preparação de proteína.

[00188] A linguagem "substancialmente livre de precursores químicos ou outros produtos químicos" inclui preparações do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA no qual o polipeptídeo é separado de precursores químicos ou outros produtos químicos que estão envolvidos na síntese do polipeptídeo. Em uma modalidade, a linguagem "substancialmente livre de precursores químicos ou outros produtos químicos" inclui preparações do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA contendo menos do que cerca de 30% (em peso seco) de precursores químicos ou produtos químicos que não são PD-L3 ou VISTA, mais preferencialmente menos do que cerca de 20% de precursores químicos ou produtos químicos que não são PD-L3 ou VISTA, ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 10% de precursores químicos ou produtos químicos que não são PD-L3 ou VISTA, e mais preferencialmente menos do que cerca de 5% de precursores químicos ou produtos químicos que não são PD-L3 ou VISTA.

[00189] Conforme usado aqui, uma "parte biologicamente ativa" de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA inclui um fragmento de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA que participa em uma interação entre uma molécula de PD-L3 ou VISTA e uma molécula que não é PD-L3 ou VISTA, por exemplo, um ligante natural do PD-L3 ou VISTA. As porções biologicamente ativas de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA incluem peptídeos compostos por sequências de aminoácidos suficientemente idênticas ao, ou derivadas das sequências de aminoácidos do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, por exemplo, a sequência de aminoácidos mostrada

na SEQ ID NO: 2, 4 ou 5, que inclui menos aminoácidos de comprimento total do que os polipeptídeos de PD-L3 ou VISTA e apresentam pelo menos uma atividade de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Normalmente, as porções biologicamente ativas compreendem um domínio ou motivo com pelo menos uma atividade de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, por exemplo, modulação (supressão) da resposta proliferativa de células T CD4 ao anti-CD3, supressão da resposta proliferativa das células T CD4 cognatas em um modo específico de antígeno, efeitos na a expressão de citocinas específicas, *et al*. Uma porção biologicamente ativa de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode ser um polipeptídeo que é, por exemplo, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 ou mais aminoácidos em comprimento. As porções biologicamente ativas de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA podem ser usadas como alvos para o desenvolvimento de agentes que modulam uma atividade mediada por PD-L3 ou VISTA, por exemplo, a ativação de células imunes.

[00190] Em uma modalidade, uma porção biologicamente ativa de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA compreende pelo menos uma porção de um domínio extracelular. Deve-se entender que uma porção biologicamente ativa preferencial de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA da presente invenção pode conter pelo menos uma porção de um domínio extracelular (por exemplo, compreender uma IgV) e um ou mais dos seguintes domínios: um domínio peptídeo sinal, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. Além disso, outras porções biologicamente ativas, em que outras regiões do polipeptídeo são excluídas, podem ser preparadas por técnicas de recombinação e avaliadas para uma ou mais das atividades funcionais de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA nativo.

[00191] Em uma modalidade preferencial, o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA tem uma sequência de aminoácidos, mostrada na SEQ ID NO:

2, 4 ou 5. Em outras modalidades, o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA é substancialmente idêntico à SEQ ID NO: 2, 4 ou 5 e mantém a atividade funcional do polipeptídeo da SEQ ID NO: 2, 4 ou 5, mas difere na sequência de aminoácidos devido à variação alélica natural ou à metagênese, conforme descrito acima.

[00192] As sequências de ácidos nucleicos e polipeptídeo da presente invenção podem ainda ser usadas como uma "sequência de consulta" para realizar uma pesquisa em bancos de dados públicos para, por exemplo, identificar outros membros da família ou sequências relacionadas. Ditas pesquisas podem ser executadas usando os programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul *et al*. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. As pesquisas de nucloetídeos no BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, escore = 100, comprimento da palavra = 12 para obter sequências nucleotídicas homólogas às moléculas de ácidos nucleicos da PD-L3 ou VISTA da invenção. As pesquisas de proteínas no BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, escore = 100, comprimento da palavra = 3 para obter as sequências de aminoácidos homólogas às moléculas de polipeptídeo da PD-L3 ou VISTA da invenção. Para obter alinhamentos lacunados com fins comparativos, Gapped BLAST pode ser utilizada conforme descrito em Altschul *et al*. (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402. Ao utilizar os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros padrões dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Consulte o site de internet para o National Center for Biotechnology Information.

[00193] A invenção também fornece proteínas quiméricas ou de fusão de PD-L3 ou VISTA. Conforme usado aqui, uma "proteína quimérica" ou uma "proteína de fusão" de PD-L3 ou VISTA compreende um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA operativamente ligado a um polipeptídeo que não é PD-L3 ou VISTA. "Um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA"

se refere a um polipeptídeo contendo uma sequência de aminoácidos correspondente a uma molécula de PD-L3 ou VISTA, onde um "polipeptídeo que não é PD-L3 ou VISTA" se refere a um polipeptídeo contendo uma sequência de aminoácidos correspondentes a um polipeptídeo que não é substancialmente homólogo ao polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, por exemplo, um polipeptídeo que é diferente do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA e que é derivado do mesmo organismo ou diferente. Dentro de uma proteína de fusão de PD-L3 ou VISTA, o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode corresponder ao total ou a uma porção de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Em uma modalidade preferencial, uma proteína de fusão PD-L3 ou VISTA compreende pelo menos uma porção biologicamente ativa de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Em outra modalidade preferencial, uma proteína de fusão de PD-L3 ou VISTA compreende pelo menos dois domínios de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Dentro da proteína de fusão, o termo "operativamente ligado" destina-se a indicar que o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA e o polipeptídeo que não é PD-L3 ou VISTA estão fundidos *in-frame* a cada outro. O polipeptídeo que não é PD-L3 ou VISTA pode estar fusionado ao C-terminal ou ao N-terminal do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA e corresponde a uma porção que altera a solubilidade, a afinidade de ligação, a estabilidade ou a valência do polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA.

[00194] Por exemplo, em uma modalidade, a proteína de fusão é uma proteína de fusão GST-PD-L3 ou VISTA em que as sequências de PD-L3 ou VISTA estão fundidas ao C-terminal das sequências de GST. Ditas proteínas da fusão podem facilitar a purificação da PD-L3 ou VISTA recombinante. Em outra modalidade, a proteína de fusão é um polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA contendo uma sequência sinal heteróloga em seu N-terminal. Em certas células do hospedeiro (por exemplo, células hospedeiras de mamífero), a expressão e/ou secreção de PD-L3 ou VISTA pode estar aumentada através da utilização

de uma sequência sinal heteróloga. Em uma modalidade preferencial, a proteína de fusão é uma proteína de fusão Ig-PD-L3 ou VISTA em que as sequências de PD-L3 ou VISTA estão fundidas a uma porção de uma molécula de Ig. A porção Ig da proteína de fusão pode incluir uma região constante da imunoglobulina, por exemplo, um domínio C gammal humano ou um domínio C gamma4 (por exemplo, a dobradiça, regiões CH2 e CH3 da IgC gama 1 humana ou IgC gama4 humana (veja, por exemplo, Capon *et al*., Patente US 5.116.964; 5.580.756; 5.844.095, e semelhantes, incorporada aqui por referência). Uma proteína de fusão resultante pode ter alterado a solubilidade da PD-L3 ou VISTA, a afinidade de ligação, a estabilidade e/ou a valência (ou seja, o número de sítios de ligação por molécula) e pode aumentar a eficiência da purificação da proteína.

[00195] Particularmente proteínas de fusão preferenciais PD-L3 ou VISTA Ig incluem uma porção do domínio extracelular da PD-L3 ou VISTA acoplada a uma região constante de imunoglobulina (por exemplo, a região de Fc). A região constante da imunoglobulina pode conter modificações genéticas que reduzem ou eliminam a atividade efetora inerente à estrutura de imunoglobulina. Por exemplo, o DNA que codifica uma porção extracelular de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode ser ligado ao DNA que codifica a dobradiça, as regiões CH2, e CH3 de IgG gama1 humanas e/ou IgG gama 4 modificadas por mutagenesis sítio-direcionada, por exemplo, como ensinado em WO 97/28267. As proteínas de fusão de PD-L3 ou VISTA da invenção podem ser incorporadas em composições farmacêuticas e ser administradas a um sujeito *in vivo*. As proteínas de fusão PD-L3 ou VISTA podem ser usadas para afetar a biodisponibilidade de um parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA. A utilização de proteínas de fusão PD-L3 ou VISTA pode ser útil terapeuticamente para o tratamento de condições ou doenças que se beneficiariam da modulação da resposta imune.

Além disso, as proteínas de fusão de PD-L3 ou VISTA da invenção podem ser usadas como imunógenos para produzir anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA em um sujeito, para purificar proteínas que se ligam à PD-L3 ou VISTA e em ensaios de seleção para identificar moléculas que inibem a interação da PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural.

[00196] Preferencialmente, uma proteína de fusão ou quimérica de PD-L3 ou VISTA da invenção é produzida por técnicas padrões de DNA recombinante.

[00197] A presente invenção se refere também às variantes dos polipeptídeos PD-L3 ou VISTA que funcionam como agonistas de PD-L3 ou VISTA (miméticos) ou como antagonistas de PD-L3 ou VISTA. Variantes dos polipeptídeos PD-L3 ou VISTA podem ser geradas por mutagênese, por exemplo, mutação pontual discreta ou truncamento de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Um agonista dos polipeptídeos PD-L3 ou VISTA pode reter substancialmente o mesmo, ou um subconjunto das atividades biológicas da forma natural de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Um antagonista de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode inibir uma ou mais das atividades da forma natural do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, por exemplo, competitivamente modulando uma atividade mediada por PD-L3 ou VISTA de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Assim, efeitos biológicos específicos podem ser induzidos por tratamento com uma variante de função limitada. Em uma modalidade, o tratamento de um sujeito com uma variante com um subconjunto das atividades biológicas da forma natural do polipeptídeo tem menos efeitos colaterais em um sujeito em relação ao tratamento com a forma natural do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA.

[00198] Em uma modalidade, variantes de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA que funcionam como qualquer agonista de PD-L3 ou VISTA (miméticos) ou antagonista de PD-L3 ou VISTA podem ser identifica-

das pela triagem de bibliotecas combinatórias de mutantes, por exemplo, mutantes de truncamento, de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA para atividade agonista ou antagonista do polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA. Em uma modalidade, uma biblioteca *variegated* de variantes de PD-L3 ou VISTA é gerada por mutagênese combinatória no nível do ácido nucleico e é codificada por uma biblioteca *variegated* de genes. Uma biblioteca *variegated* de variantes de PD-L3 ou VISTA pode ser produzida, por exemplo, enzimaticamente ligando uma mistura de oligonucleotídeos sintéticos em sequências de genes, de modo que um conjunto degenerado de possíveis sequências de PD-L3 ou VISTA seja expresso como polipeptídeos individuais, ou alternativamente, como um conjunto de proteínas de fusão maiores (por exemplo, para exibir em fago) que contém o conjunto de sequências de PD-L3 ou VISTA no mesmo. Há uma variedade de métodos que podem ser usados para produzir bibliotecas de possíveis variantes de PD-L3 ou VISTA a partir de uma sequência do oligonucleotídeo degenerado. A síntese química de uma sequência genética degenerada pode ser executada em um sintetizador automático de DNA, e o gene sintético então ligado em um vetor de expressão adequado. O uso de um conjunto de genes degenerados permite a prestação, em uma mistura, de todas as sequências que codificam o conjunto desejado de possíveis sequências de PD-L3 ou VISTA. Métodos para a síntese de oligonucleotídeos degenerados são conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Narang, S. A. (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. 1 1: 477).

[00199] Além disso, bibliotecas de fragmentos de sequências que codificam um polipeptídeo PD-L3 VISTA podem ser usadas para gerar uma população *variegated* de fragmentos de PD-L3 ou VISTA para triagem e posterior seleção de variantes de um polipeptídeo PD-L3 ou

VISTA. Em uma modalidade, uma biblioteca de fragmentos de sequências codificantes pode ser gerada pelo tratamento de um fragmento de PCR dupla fita de uma sequência que codifica VISTA ou PD-L3 com uma nuclease sob condições onde ocorre corte apenas cerca de uma vez por molécula, desnaturando o DNA dupla fita, renaturando o DNA para formar o DNA dupla fita que pode incluir pares de senso/antissenso de diferentes produtos cortados, removendo partes de fita única de duplexes reformados por tratamento com nuclease SI, e ligando a biblioteca de fragmentos resultante em um vetor de expressão. Por este método, uma biblioteca de expressão pode ser derivada a qual codifica fragmentos N-terminal, C-terminal ou internos de vários tamanhos do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA.

[00200] Várias técnicas são conhecidas para triagem de produtos de genes de bibliotecas combinatórias feitas por mutações pontuais ou truncamento e para triagem de bibliotecas de cDNA para produtos de genes contendo uma propriedade selecionada. Essas técnicas são adaptáveis para triagem rápida das bibliotecas de genes geradas pela mutagênese combinatória de polipeptídeos PD-L3 ou VISTA. As técnicas mais amplamente utilizadas, que são passíveis de análise altamente detalhada, para triagem de bibliotecas grandes de genes normalmente incluem a clonagem da biblioteca de genes em vetores de expressão replicável, transformando células adequadas com a resultante biblioteca de vetores e expressando os genes combinatórios sob condições em que a deteção de uma atividade desejada facilita o isolamento do vetor que codifica o gene cujo produto foi detectada. A mutagênese de montagem recursiva (REM), uma nova técnica que aumenta a frequência de mutantes funcionais nas bibliotecas, pode ser usada em combinação com os ensaios de triagem para identificar variantes de PD-L3 ou VISTA (Arkin e Youvan (1992) Proc Natl. Acad. Sci. USA 89:781 1-7815; Delagrave *et al*. (1993) Protein Eng. 6 (3): 327-331).

[00201] Além dos polipeptídeos PD-L3 ou VISTA consistindo apenas de aminoácidos que ocorrem naturalmente, os peptidomiméticos de PD-L3 ou VISTA também são fornecidos. Análogos de peptídeo são comumente usados na indústria farmacêutica como drogas não-peptídicas com propriedades análogas àquelas do peptídeo modelo. Estes tipos de compostos não-peptídicos são denominados "miméticos de peptídeos" ou "peptidomiméticos" (Fauchere, J. (1986) Adv. Drug Res. 15:29; Veber e Freidinger (1985) TINS p.392; e Evans *et al*. (1987) J. Med. Chem 30: 1229, que são incorporados aqui por referência) e geralmente são desenvolvidos com o auxílio de modelagem molecular computadorizada. Os miméticos de peptídeo que são estruturalmente semelhantes aos peptídeos terapeuticamente úteis podem ser usados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Geralmente, os peptidomiméticos são estruturalmente semelhantes a um polipeptídeo paradigma (ou seja, um polipeptídeo que tem uma atividade biológica ou farmacológica), como PD-L3 ou VISTA humanos ou murinos, mas tem uma ou mais ligações peptídicas opcionalmente substituídas por uma ligação selecionada a partir do grupo constituído por: --CH2NH-, -CH2S-, -CH2-CH2-, --CH.dbd.CH~ (cis e trans), --COCH2-, ~ CH(OH)CH2~, e - CH2SO-, pelos métodos conhecidos na técnica e descritos nas seguintes referências: Spatola, A. F. em Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (March 1983), Vol. I, Issue 3, "Peptide Backbone Modifications"; Morley, J. S. (1980) Trends. Pharm. Sci. pp.463-468; Hudson, D. *et al*. (1979) Int. J. Pept. Prot. Res. 14: 177-185 (-CH2NH-, CH2CH2-); Spatola, A. F. *et al*. (1986) Life. Sci. 38: 1243-1249 (-CH2-S); Hann, M. M. (1982) J. Chem. SoC Perkin. Trans. I 307-314 (-CH-CH--, cis e trans); Almquist, R. G. *et al*. (1980) J. Med. Chem. 23: 1392-1398 (-COCH2-); Jennings-White, C *et al*. (1982) Tetrahedron

Lett. 23:2533 (--COCH2-); Szelke, M. *et al*., European Patent Application No. EP 45665 (1982) CA: 97:39405 (-CH(OH)CH2-); Holladay, M. W. *et al*. (1983) Tetrahedron. Lett. 24:4401-4404 (-C(OH)CH2-); e Hruby, V. J. (1982) Life Sci. 31: 189-199 (-CH2-S-); cada um dos quais é incorporado aqui para referência. Uma ligação não-peptídica particularmente preferencial é -CH2NH-. Ditos miméticos de peptídeos podem ter vantagens significativas sobre modalidades do polipeptídeo, incluindo, por exemplo: produção mais econômica, maior estabilidade química, melhores propriedades farmacológicas (meia-vida, absorção, potência, eficácia, etc.), especificidade alterada (por exemplo, um amplo espectro de atividades biológicas) antigenicidade reduzida e outras. A marcação de peptidomiméticos geralmente envolve ligação covalente de um ou mais marcadores, diretamente ou através de um espaçador (por exemplo, um grupo amida), a posições de não interferência sobre o peptidomimético que são previstas por dados quantitativos de estrutura-atividade e/ou modelagem molecular. Essas posições de não interferência, geralmente, são posições que não fazem contatos diretos com as macromoléculas às quais o peptidomimético se liga para produzir o efeito terapêutico. A derivatização (por exemplo, marcação) de peptidomiméticos não deve interferir substancialmente com a atividade biológica ou farmacológica desejada do peptidomimético.

[00202] A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma sequência de aminoácidos de PD-L3 ou VISTA com um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D-lisina no lugar do L-lisina) pode ser usada para gerar mais peptídeos estáveis. Além disso, peptídeos restritos, compreendendo uma sequência de aminoácidos de PD-L3 ou VISTA ou uma variação da sequência substancialmente idêntica podem ser gerados por métodos conhecidos na técnica (Rizo e Gierasch (1992) Annu. Rev. Biochem. 61:387, incorporado aqui para referência); por exemplo, mediante adição de resíduos internos do cisteína

capazes de formar pontes dissulfetos intramoleculares que ciclizam o peptídeo. As sequências de aminoácidos dos polipeptídeos PD-L3 ou VISTA identificadas aqui permitirá que especialistas na técnica produzirão polipeptídeos correspondentes às sequências de peptídeo PD-L3 ou VISTA e suas variantes de sequência. Esses polipeptídeos podem ser produzidos em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas pela expressão de polinucleotídeos que codificam uma sequência do peptídeo PD-L3 ou VISTA, frequentemente como porção de um polipeptídeo maior. Como alternativa, estes peptídeos podem ser sintetizados por métodos químicos. Métodos para a expressão de polipeptídeos heterólogos em hospedeiros recombinantes, síntese química de polipeptídeos e tradução *in vitro* são bem conhecidos na técnica. Certas modificações amino-terminal e/ou carboxi-terminal e/ou extensões de peptídeos ao núcleo da sequência podem fornecer propriedades físicas, químicas, bioquímicas e farmacológicas vantajosas, como: melhora na estabilidade, aumento da potência e/ou eficácia, resistência à proteasas séricas, propriedades farmacocinéticas desejáveis e outras. Os peptídeos podem ser utilizados terapeuticamente para tratar doença, por exemplo, alterando a coestimulação em um paciente.

[00203] Um polipeptídeo isolado de PD-L3 ou VISTA, ou uma porção ou fragmento do mesmo, pode ser usado como um imunogênico para gerar anticorpos que ligam a PD-L3 ou VISTA usando técnicas padrões para a preparação de anticorpos policlonais e monoclonais. Um polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA completo pode ser usado ou, alternativamente, a invenção fornece fragmentos de peptídeo antigênico de PD-L3 ou VISTA para uso como imunógenos. Em uma modalidade, um peptídeo antigênico de PD-L3 ou VISTA compreende pelo menos 8 resíduos de aminoácidos da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2, 4 ou 5 e inclui um epítopo de PD-L3 ou VISTA de modo que um anticorpo gerado contra o peptídeo forma um complexo imune

específico com o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Preferencialmente, o peptídeo antigênico compreende pelo menos 10 resíduos de aminoácidos, mais preferencialmente pelo menos 15 resíduos de aminoácidos, mesmo mais preferencialmente pelo menos 20 resíduos de aminoácidos e mais preferencialmente pelo menos 30 resíduos de aminoácidos. Epítopos preferenciais incluídos pelo peptídeo antigênico são regiões do PD-L3 ou VISTA que estão localizadas no domínio extracelular do polipeptídeo, por exemplo, regiões hidrofílicas, bem como as regiões com alta antigenicidade.

[00204] Um imunógeno de PD-L3 ou VISTA normalmente é usado para preparar os anticorpos por imunização de um sujeito apropriado (por exemplo, coelho, cabra, camundongo ou outro mamífero) com o imunógeno. Uma preparação imunogênica adequada pode conter, por exemplo, polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA recombinantemente expresso ou um polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA sintetizado quimicamente. A preparação pode incluir ainda um adjuvante, como o adjuvante completo ou incompleto de Freund ou agente imunoestimulante semelhante. A imunização de um sujeito apropriado com uma preparação de PD-L3 ou VISTA imunogênica induz uma resposta de anticorpos policlonal anti-PD-L3 ou VISTA.

[00205] Nesse sentido, outro aspecto da invenção se refere aos anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA. O termo "anticorpo" conforme usado aqui se refere a moléculas de imunoglobulinas e porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulinas, ou seja, moléculas que contêm um sítio de ligação a antígeno que se liga especificamente (imunoreage com) um antígeno, como PD-L3 ou VISTA. Exemplos de porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulinas incluem fragmentos F(ab) e F(ab')2 que podem ser gerados tratando o anticorpo com uma enzima como pepsina. A invenção fornece anticorpos policlonais e monoclonais que se ligam a moléculas de PD-L3 ou

VISTA. O termo "anticorpos monoclonais" ou "composição de anticorpo monoclonal", conforme usado aqui, se refere a uma população de moléculas de anticorpos que contêm apenas uma espécie de um sítio de ligação a antígeno capaz de imunoreagir com um epítopo particular do PD-L3 ou VISTA. Uma composição de anticorpo monoclonal assim normalmente exibe uma afinidade de ligação única para um determinado polipeptídeo PD-L3 ou VISTA com que ele imunoreage.

[00206] Os anticorpos policlonais anti-PD-L3 ou VISTA podem ser preparados conforme descrito acima por imunização de um sujeito apropriado com um imunógeno de PD-L3 ou VISTA, por exemplo, uma proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig. O título de anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA no sujeito imunizado pode ser monitorado ao longo do tempo por técnicas padrões, como com um ensaio de imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) usando PD-L3 ou VISTA imobilizado. Se desejado, as moléculas de anticorpos direcionadas contra PD-L3 ou VISTA podem ser isoladas de mamíferos (por exemplo, do sangue) e posteriormente purificadas por técnicas bem conhecidas, como a cromatografia de proteína A para obter a fração IgG. Em um tempo apropriado após a imunização, por exemplo, quando os títulos de anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA são elevados, as células produtoras de anticorpos podem ser obtidas a partir do sujeito e usadas para a preparação de anticorpos monoclonais por técnicas padrões, como a técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler e Milstein (1975) Nature 256: 495-497 (Ver também Brown *et al*. (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brown *et al*. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh *et al*. (1976) Proc Natl. Acad. Sci. USA 76:2927-31; e Yeh *et al*. (1982) Int. J. Cancer 29:269 - 75), a técnica de hibridoma de células B humanas mais recente (Kozbor *et al*. (183) Immunol. Today 4:72), a técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al*. (1985) Anticorpos Monoclonais e Terapia do Câncer, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) ou técnicas do trioma. A tecnolo-

gia para a produção de hibridomas de anticorpo monoclonal é bem conhecida (ver geralmente Kenneth, R. H. in Monoclonal Antibody: A New Dimension In Biological Assays, Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980); Lemer, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54:387-402; Gefter, M. L. *et al*. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231 - 36). Brevemente, uma linhagem celular imortal (normalmente um mieloma) é fundido a linfócitos (normalmente esplenócitos) de um mamífero imunizado com um imunógeno de PD-L3 ou VISTA conforme descrito acima e os sobrenadantes da cultura das células de hibridomas resultantes são triados para identificar um hibridoma produtor de um anticorpo monoclonal que se liga ao PD-L3 ou VISTA. Um dos muitos protocolos bem conhecidos utilizados para fundir os linfócitos e as linhagens celulares imortalizadas pode ser aplicado com a finalidade de gerar um anticorpo monoclonal anti-PD-L3 ou VISTA (ver, por exemplo, Galfre, G. *et al*. (1977) Nature 266:55052; Gefter *et al*. (1977) supra; Lerner (1981) supra; e Kenneth (1980) supra). Além disso, um especialista normalmente irá apreciar que há muitas variações de ditos métodos que também seriam úteis. Normalmente, a linhagem celular imortal (por exemplo, uma linha de célula de mieloma) é derivada da mesma espécie de mamífero que os linfócitos. Por exemplo, hibridomas murinos podem ser feitos pela fusão de linfócitos de um camundongo imunizado com uma preparação imunogênica da presente invenção com uma linhagem celular de camundongo imortalizada. Linhagens celulares imortais preferencialmente são linhagens celulares de mieloma murino que são sensíveis ao meio de cultura contendo hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"). Qualquer um de um número de linhagens celulares de mieloma pode ser usada como um parceiro de fusão de acordo com as técnicas convencionais, por exemplo, as linhagens de mieloma P3-NSl/l-Ag4-l, P3-x63-Ag8.653 ou Sp2/0-Agl4. Estas linhagens de mieloma estão disponíveis na ATCC normalmente, células de mieloma

murinas sensíveis ao HAT são fundidas a esplenócitos murinos usando polietileno glicol ("PEG"). As células de hibridomas resultantes da fusão, em seguida, são selecionadas usando meio HAT, que mata as células de mieloma não fundidas e improdutivas (esplenócitos não fundidos morrem depois de vários dias porque não são transformados). As células de hibridoma produzindo um anticorpo monoclonal da invenção são detectadas pela triagem dos sobrenadantes de cultura do hibridoma para anticorpos que se ligam a PD-L3 ou VISTA, por exemplo, usando um ensaio de ELISA padrão.

[00207] Métodos específicos para a produção de anticorpos que se ligam a PD-L3 ou VISTA podem ser feitos usando métodos conhecidos na técnica e conforme descrito nos exemplos. Alternativamente, para preparar hibridomas secretores de anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal anti-PD-L3 pode ser identificado e isolado mediante triagem de uma biblioteca de imunoglobulina combinatória recombinante (por exemplo, uma biblioteca de anticorpos apresentados em fagos) com o PD-L3 ou VISTA para assim isolar os membros da biblioteca de imunoglobulina que se ligam a PD-L3 ou VISTA. Kits para geração e triagem de bibliotecas de apresentação de fago estão comercialmente disponíveis.

[00208] Como observado estes anticorpos passam por uma triagem para identificar aqueles que se ligam a epítopos específicos de PD-L3 ou VISTA, por exemplo, no domínio IgV ou outros domínios específicos e/ou para selecionar os anticorpos que possuim alta afinidade e avidez à proteína PD-L3 ou VISTA. Além disso, estes anticorpos são selecionados para identificar aqueles que modulam funções e efeitos específicos do PD-L3 ou VISTA sobre a imunidade e células imunes *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, podem ensaios podem ser conduzidos para verificar o efeito modulatório, se houver, de um determinado anticorpo anti-PD-L3 ou VISTA em funções imunológicas reguladas nega-

tivamente pelo PD-L3 ou VISTA incluindo a produção de citoquinas pelas células T CD4+ ou CD8+, a coestimulação de CD28, a proliferação de células T CD4+ e a proliferação de células T CD4+ naive e de memória, *et al*. Em uma modalidade preferencial, os ensaios são realizados para identificar os potenciais anticorpos terapêuticos anti-PD-L3 ou VISTA que *in vitro*, quando a presença de PD-L3 ou VISTA-Ig melhora a supressão de por PD-L3 ou VISTA-Ig conforme esses anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA se comportam opostamente *in vivo*, ou seja, são imunossupressores. A invenção compreende os anticorpos anti-VISTA e uso dos mesmos que se ligam especificamente ao domínio extracelular de 136 aminoácidos, por exemplo, aos aminoácidos 1-50, 50-100, 100-136, os anticorpos que se ligam especificamente à IgV, os anticorpos que se ligam especificamente à região de haste, os anticorpos que se ligam especificamente à região transmembrana e os anticorpos que se ligam especificamente à região citoplasmática de VISTA. Estas regiões específicas são identificadas no pedido.

[00209] Adicionalmente, anticorpos recombinantes anti-PD-L3 ou VISTA, como os anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados, compostos tanto por partes humanas e não humanas, os quais podem ser feitos usando técnicas de DNA recombinante padrões, estão dentro do escopo da invenção. Ditos anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante conhecidos na técnica, por exemplo, usando métodos descritos em Robinson *et al*., Pedido Internacional No. PCT/US86/02269; Akira *et al*., Pedido de Patente Europeia 184, 187; Taniguchi, M., Pedido de Patente Europeia 171, 496; Morrison *et al*., Pedido de Patente Europeia 173, 494; Neuberger *et al*., Publicação Internacional PCT No. WO 01533/86; Cabilly *et al*. U.S. Pat. No. 4.816.567; Cabilly *et al*., Pedido de Patente Europeia 125.023; Better *et al*. (1988) Science 240: 1041-1043; Liu *et al*. (1987) Proc Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu *et*

al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun *et al*. (1987) Proc Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura *et al*. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood *et al*. (1985) Nature 314:446-449; Shaw *et al*. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229: 1202-1207; Oi *et al*. (1986) Biotechniques 4:214; Winter, U.S. Pat. No. 5.225.539; Jones *et al*. (1986) Nature 321 :552-525; Verhoeyen *et al*. (1988) Science 239:1534; e Beidler *et al*. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

[00210] Um anticorpo anti-PD-L3 ou VISTA (por exemplo, anticorpo monoclonal) pode ser usado para isolar o PD-L3 ou VISTA por técnicas padrões, como cromatografia de afinidade ou imunoprecipitação. Um anticorpo anti-PD-L3 ou VISTA pode facilitar a purificação do PD-L3 ou VISTA natural de células e do PD-L3 ou VISTA recombinantemente produzido por expressão em células de hospedeiro. Além disso, um anticorpo anti-PD-L3 ou VISTA pode ser usado para detectar o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA (por exemplo, em um lisado celular ou sobrenadante celular) para avaliar a abundância e o padrão de expressão do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA podem ser usados em diagnóstico para monitorar os níveis do polipeptídeo em tecido como porção de um procedimento de teste clínico, por exemplo, para determinar a eficácia de um determinado regime de tratamento. A deteção pode ser facilitada acoplando (ou seja, fisicamente ligando) o anticorpo a uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes e materiais radioativos. Exemplos de enzimas apropriadas incluem peroxidase de rábano picante, fosfatase alcalina, .beta, -galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupo prostético apropriados incluem estreptavidina biotina e avidina biotina; exemplos de materiais fluorescentes apropriados incluem umbeliferona, fluores-

ceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina, e exemplos de material radioativo apropriado incluem 1251, 1311, 35S ou 3 H.

III. Vetores de expressão recombinante e células hospedeiras

[00211] Outro aspecto da invenção se refere a vetores, preferencialmente vetores de expressão, contendo uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA (ou uma porção do mesmo). Conforme usado aqui, o termo "vetor" se refere a uma molécula de ácido nucleico, capaz de transportar outro ácido nucleico, ao qual ligada. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma alça de DNA fita dupla circular no qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos contendo uma origem de replicação bacteriana e vetores episssomais de mamíferos). Outros vetores (por exemplo, vetores não episssomais de mamíferos estão integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira e assim são replicados junto com o genoma hospedeiro). Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais operativamente estão ligados. Ditos vetores são aqui referidos como "vetores de expressão". Em geral, os vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante são muitas vezes sob a forma de plasmídeos. Na presente especificação, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados de modo intercambiável porque plasmídeo é a forma de vetor mais comumente utilizada. No entanto, a invenção pretende incluir essas outras formas de vetores de expressão, como vetores virais (por exemplo, retrovírus,

adenovírus e vírus adeno-associados defeituosos na replicação), que servem em funções equivalentes.

[00212] Os vetores de expressão recombinante da invenção compreendem um ácido nucleico da invenção de uma forma adequada para a expressão do ácido nucleico em uma célula hospedeira, o que significa que os vetores de expressão recombinante incluem uma ou mais sequências reguladoras, selecionadas com base em células hospedeiras para ser usadas para a expressão, que estão operativamente ligadas à sequência do ácido nucleico a ser expresso. Dentro de um vetor de expressão recombinante, "operativamente ligado" pretende significar que a sequência de nucleotídeos de interesse está ligada à sequência reguladora de forma que permite a expressão da sequência de nucleotídeos (por exemplo, em um sistema de tradução/transcrição *in vitro* ou em uma célula hospedeira quando o vetor é introduzido na célula hospedeira). O termo "sequência reguladora" pretende incluir promotores, potencializadores e outros elementos de controle da expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação). Ditas sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel (1990) Methods Enzymol. 185:3-7. As sequências reguladoras incluem aquelas que direcionam a expressão constitutiva de uma sequência de nucleotídeos em muitos tipos de células hospedeiras e aquelas que direcionam a expressão de sequência de nucleotídeos apenas em certas células hospedeiras (por exemplo, sequências reguladoras tecido-específicas). Será apreciado por especialistas na técnica que o desenho do vetor de expressão pode depender de ditos fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, e semelhantes. Os vetores de expressão da invenção podem ser introduzidos em células hospedeiras para assim produzir proteínas ou peptídeos, incluindo proteínas ou peptídeos de fusão, codificados por ácidos nucleicos conforme descritos aqui (por

exemplo, polipeptídeos PD-L3 ou VISTA, formas mutantes de polipeptídeos PD-L3 ou VISTA, proteínas da fusão e semelhantes).

[00213] Os vetores de expressão recombinante da invenção podem ser projetados para a expressão de polipeptídeos PD-L3 ou VISTA em células procarióticas ou eucarióticas. Por exemplo, os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA podem ser expressos em células bacterianas como E. coli, células de insetos (usando vetores de expressão de baculovírus), células de leveduras, ou células de mamíferos. As células de hospedeiros apropriados são discutidas ainda em Goeddel (1990) supra. Alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode ser transcrito e traduzido *in vitro*, por exemplo, usando sequências reguladoras do promotor T7 e a polimerase T7. As proteínas de fusão purificadas podem ser utilizadas em ensaios de atividade do PD-L3 ou VISTA (por exemplo, ensaios diretos ou ensaios de competição descritos em detalhes abaixo), ou para gerar anticorpos específicos para polipeptídeos PD-L3 ou VISTA, por exemplo. Em outra modalidade, o vetor de expressão PD-L3 ou VISTA é um vetor de expressão de levedura. Exemplos de vetores para a expressão em levedura S. cerevisiae incluem a pYepSecl (Baldari *et al*. (1987) EMBO J. 6:229 - 234), pMFa (Kurjan e Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al*. (1987) Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), e picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.). Como alternativa, os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA podem ser expressos em células de insetos usando vetores de expressão de baculovirus. Os vetores de Baculovirus disponíveis para a expressão de polipeptídeos em células de insetos cultivadas (por exemplo, células Sf9) incluem a série de pAc (Smith *et al*. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156 - 2165) e a série pVL (Lucklow e Summers (1989) Virology 170:31-39). Em outra modalidade, um ácido nucleico da invenção é expresso em células de mamíferos usando um vetor de expressão de mamíferos. Exemplos de vetores de

expressão de mamíferos incluem pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) e pMT2PC (Kaufman *et al*. (1987) EMBO J. 6: 187-195). Quando usado em células de mamíferos, as funções de controle do vetor de expressão são fornecidas frequentemente por elementos reguladores virais. Por exemplo, promotores comumente usados são derivados de polyoma, Adenovírus 2, citomegalovírus e Vírus símio 40. Para outros sistemas de expressão apropriados para células procarióticas e eucarióticas, ver capítulos 16 e 17 de Sambrook, J. *et al*., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

[00214] Em outra modalidade, o vetor de expressão recombinante de mamífero é capaz de direcionar a expressão do ácido nucleico preferencialmente em um tipo particular de célula (por exemplo, os elementos reguladores tecido-específicos são usados para expressar o ácido nucleico). Os elementos reguladores tecido-específicos são conhecidos na técnica. Exemplos não limitantes de promotores tecido-específicos apropriados incluem o promotor de albumina (específico do fígado; Pinkert *et al*. (1987) Genes Dev. 1:268-277), promotores linfoide-específicos (Calame e Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), promotores particulares de receptores de células T (Winoto e Baltimore (1989) EMBO J. 8:729 733) e imunoglobulinas (Banerji *et al*. (1983) Cell 33:729-740; Queen e Baltimore (1983) Cell 33:741-748), promotores neurônio-específicos (por exemplo, o promotor neurofilamentoso; Byrne e Ruddle (1989) Proc Natl. Acad. Sci. USA 86:5473 - 5477), promotores pâncreas-específicos (Edlund *et al*. (1985) Science 230:912-916), e promotores glândula mamárias-específicos (por exemplo, promotor do soro do leite; Pat. U.S. No. 4.873.316 e pedido de publicação Europeia No. 264.166). Os promotores regulados pelo desenvolvimento também são incluídos, por exemplo, pelos promoto-

res hox murinos (Kessel e Gruss (1990) Science 249:374-379) e o promotor alfa - fetoproteína (Campes e Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

[00215] A invenção ainda fornece um vetor de expressão recombinante constituído por uma molécula de DNA da invenção clonado no vetor de expressão em uma orientação antissenso. Ou seja, a molécula de DNA operativamente está ligada a uma sequência reguladora de uma forma que permite a expressão (pela transcrição da molécula de DNA) de uma molécula de RNA que é antissenso para o mRNA do PD-L3 ou VISTA. As sequências reguladoras operativamente ligadas a uma molécula de ácido nucleico clonadas na orientação antissenso podem ser selecionadas que direcionam a expressão contínua da molécula de RNA antissenso em uma variedade de tipos de células, por exemplo, promotores e/ou potencializadores, ou sequências reguladoras podem ser escolhidas que direcionam a expressão constitutiva, tecido específico ou tipo celular específica do RNA antissenso. O vetor de expressão antissenso pode estar sob a forma de um plasmídeo recombinante, fagomídeo ou vírus atenuado no qual os ácidos nucleicos antissenso são produzidos sob o controle de uma região reguladora de alta eficiência, cuja atividade pode ser determinada pelo tipo de célula em que o vetor é introduzido. Para uma discussão sobre a regulação da expressão gênica usando genes antissensos, ver Weintraub, H. *et al*., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews-Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986.

[00216] Outro aspecto da invenção se refere a células de hospedeiro no qual é introduzida uma molécula de ácido nucleico PD-L3 ou VISTA da invenção, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico de PD-L3 ou VISTA dentro de um vetor de expressão recombinante ou uma molécula de ácido nucleico de PD-L3 ou VISTA contendo sequências que permitem que recombinem homologamente em um sítio

específico do genoma da célula hospedeira. Os termos "célula hospedeira" e "célula hospedeira recombinante" são usados de modo intercambiável aqui. Deve-se entender que ditos termos referem-se não só à célula de determinado sujeito, mas à descendência ou potencial descendência de dita célula. Porque certas modificações podem ocorrer em gerações sucesivas devido a mutação ou influências ambientais, ditas descendentes não podem, de fato, ser idênticas à célula-mãe, mas ainda estão incluídas no escopo do termo conforme usado aqui. Uma célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica. O DNA do vetor pode ser introduzido em células procarióticas ou eucarióticas através de técnicas de transfecção ou transformação convencionais. Conforme usado aqui, os termos "transfecção" e "transformação" destinam-se para se referir a uma variedade de técnicas reconhecidas na técnica para a introdução de ácidos nucleicos estrangeiro (por exemplo, DNA) em uma célula hospedeira, incluindo co-precipitação com fosfato de cálcio ou cloreto de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrano, lipofecção ou eletroporação. Métodos apropriados para transformar ou transfectar células hospedeiras podem ser encontrados em Sambrook *et al*. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), e outros manuais de laboratório. A fim de identificar e selecionar estes integrantes, um gene que codifica um marcador de seleção (por exemplo, resistência a antibióticos) geralmente é introduzido nas células hospedeiras juntamente com o gene de interesse. Marcadores de seleção preferencialmente incluem aqueles que conferem resistência a drogas, como G418, higromicina e metotrexato. Uma célula hospedeira da invenção, como uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica em cultivo, pode ser usada para produzir (ou seja, expressar) um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Nesse sentido, a invenção ainda fornece méto-

dos para a produção de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA usando as células hospedeiras da invenção. Em uma modalidade, o método compreende o cultivo de células hospedeiras da invenção (na qual foi introduzido um vetor de expressão recombinante que codifica um polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA) em um meio apropriado de modo que um polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA é produzido. Em outra modalidade, o método ainda compreende o isolamento de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA a partir do meio ou da célula hospedeira.

[00217] As células hospedeiras da invenção, também podem ser usadas para produzir animais transgênicos não humanos. Por exemplo, em uma modalidade, uma célula hospedeira da invenção é um oócito fertilizado ou uma célula-tronco embrionária em que foram introduzidas sequências que codificam o PD-L3 ou VISTA. Ditas células hospedeiras podem então ser usadas para criar animais transgênicos não humanos nos quais sequências exógenas de PD-L3 ou VISTA foram introduzidas em seu genoma ou animais recombinantes homólogos em que sequências endógenas de PD-L3 ou VISTA foram alteradas. Esses animais são úteis para estudar a função e/ou atividade de uma PD-L3 ou VISTA e para identificar e/ou avaliar moduladores da atividade do PD-L3 ou VISTA. Conforme usado aqui, um "animal transgênico" é um animal não-humano, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um roedor como um rato ou camundongo, em que uma ou mais das células do animal incluem um transgene. Outros exemplos de animais transgênicos incluem primatas não humanos, ovelhas, cães, vacas, cabras, galinhas, anfíbios e semelhantes. Um transgene é DNA exógeno que é integrado no genoma de uma célula a partir da qual um animal transgênico se desenvolve e que permanece no genoma do animal maduro, direcionando assim, a expressão de um produto codificado pelo gene em um ou mais tipos celulares ou tecidos do animal transgênico. Conforme usado aqui, um

"animal recombinante homólogo" é um animal não humano, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um camundongo, em que um gene endógeno do PD-L3 ou VISTA foi alterado por recombinação homóloga entre o gene endógeno e uma molécula de DNA exógena introduzida em uma célula do animal, por exemplo, uma célula embrionária do animal, antes do desenvolvimento do animal. Um animal transgênico da invenção pode ser criado por introdução de um ácido nucleico que codifica o PD-L3 ou VISTA nos pró-núcleos masculinos de um oócito fertilizado, por exemplo, por microinjeção, infecção retroviral e permitindo que o oócito se desenvolva em um animal fêmea pseudográvida acolhida. A sequência de cDNA de PD-L3 ou VISTA da SEQ ID NO: 1 ou 4 pode ser introduzida como um transgene no genoma de um animal não humano. Como alternativa, um homólogo não humano de um gene humano de PD-L3 ou VISTA, como um gene de macaco ou de rato de PD-L3 ou VISTA, pode ser usado como um transgene. Como alternativa, um homólogo do gene de PD-L3 ou VISTA, como outro membro da família PD-L3 ou VISTA, pode ser isolado com base na hibridização nas sequências de cDNA PD-L3 ou VISTA da SEQ ID NO: 1 ou 3 (descrita também na subseção I acima) e usado como um transgene. As sequências intrônicas e sinais de poliadenilação também podem ser incluídas no transgene para aumentar a eficiência da expressão do transgene. Uma sequência reguladora tecido-específica pode ser operacionalmente ligada a um transgene PD-L3 ou VISTA para direcionar a expressão de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA para células específicas. Os métodos para a geração de animais transgênicos através da manipulação de embriões e microinjeção, especialmente animais como camundongos, tornaram-se convencionais na técnica e são descritos, por exemplo, na Patente US 4.736.866 e 4.870.009, ambos por Leder *et al*., Pat. U.S. No. 4.873.191 por Wagner *et al*. e em Hogan, B., Manipulating the Mouse Embryo (Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986). Os métodos semelhantes são usados para a produção de outros animais transgênicos. Um animal transgênico fundador pode ser identificado com base na presença de um transgene PD-L3 ou VISTA em seu genoma e/ou na sua expressão de mRNA PD-L3 ou VISTA em tecidos ou células dos animais. Um animal transgênico fundador pode então ser usado para criar animais adicionais portadores do transgene. Além disso, animais transgênicos portadores de um transgene que codifica um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ainda podem ser criados juntos a outros animais transgênicos portadores de outros transgenes.

[00218] Para criar um animal recombinante homólogo, um vetor é preparado o qual contém pelo menos uma porção de um gene de PD-L3 ou VISTA em que uma exclusão, adição ou substituição foi introduzida para assim alterar, por exemplo, interromper funcionalmente, o gene PD-L3 ou VISTA. O gene PD-L3 ou VISTA pode ser um gene humano ou murino (por exemplo, o cDNA da SEQ ID NO: 1 ou 3)

[00219] Em outra modalidade, animais não humanos transgênicos podem ser produzidos contendo sistemas selecionados que permitem a expressão regulada do transgene. Um exemplo de dito sistema é o sistema recombinase cre/loxP do bacteriófago PI. Para obter uma descrição do sistema recombinase cre/loxP ver, por exemplo, Lakso *et al*. (1992) Proc Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236. Outro exemplo de um sistema de recombinase é o sistema recombinase FLP de S. cerevisiae (O'Gorman *et al*. (1991) Science 251: 1351-1355. Se um sistema recombinase cre/loxP é usado para regular a expressão do transgene, os animais que contêm os transgenes que codificam a recombinase Cre e um polipeptídeo selecionado são necessários. Esses animais podem ser fornecidos através da construção de animais transgênicos "duplos", por exemplo, por cruzamento de dois animais transgênicos, um contendo um transgene que codifica um polipeptídeo selecionado

e o outro contendo um transgene que codifica uma recombinase.

[00220] Os clones dos animais transgênicos não humanos descritos aqui podem também ser produzidos de acordo com os métodos descritos em Wilmut, I. *et al*. (1997) Nature 385:810-813 e Publicação Internacional PCT Nos. WO 97/07668 e WO 97/07669. Em breve, uma célula, por exemplo, uma célula somática do animal transgênico pode ser isolada e induzida a sair do ciclo de crescimento e entrar fase GO. A célula quiescente pode então ser fundida, por exemplo, através do uso de pulsos elétricos, a um ovócito enucleado de um animal da mesma espécie da qual a célula quiescente é isolada. O oócito reconstruído é então cultivado de modo que se desenvolve para a fase de mórula ou blastocisto e depois transferido para animal fêmea pseudográvida acolhida. A prole deste animal fêmea acolhida será um clone do animal do qual a célula, por exemplo, a célula somática, é isolada.

IV. Composições Farmacêuticas

[00221] As moléculas de PD-L3 ou VISTA, por exemplo, as moléculas de ácidos nucleicos PD-L3 ou VISTA, fragmentos de polipeptídeos PD-L3 ou VISTA e anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA (também aqui referidos como "compostos ativos" ou "agentes moduladores") da invenção podem ser incorporados em composições farmacêuticas apropriadas para a administração. Ditas composições tipicamente compreendem a molécula de ácido nucleico, polipeptídeo, ou anticorpo e um carregador, por exemplo, um carreador farmaceuticamente aceitável. Conforme usado aqui a linguagem "carreador farmaceuticamente aceitável" pretende incluir quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes retardantes isotônicos e de absorção e semelhantes, compatíveis com a administração farmacêutica. O uso de ditos meios e agentes para substâncias ativas farmaceuticamente é bem conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional é incompatível com o com-

posto ativo, o uso destes nas composições é contemplado. Os compostos ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições.

[00222] Conforme observado ditas composições ainda podem incluir um antígeno desejado, por exemplo, um antígeno tumoral ou outro compostos imune moduladores como agonistas dos receptores tipo Toll, os interferons tipo 1 como interferons alfa e beta e agonistas CD40 como anticorpos e fragmentos de anticorpos agonistas CD40, preferencialmente anticorpos e fragmentos de anticorpos agonistas anti-CD40 humano ou outros potencializadores ou supressores imunológicos como PD-L1, PD-L2, proteínas de fusão CTLA4 e anticorpos específicos a esses.

[00223] Em algumas modalidades preferenciais, a composição ou terapia baseada no PD-L3 ou VISTA ainda pode incluir um antígeno ou outro agonista imune. Quando presentes na composição ou terapia, o antígeno pode ser administrado em uma quantidade que, em combinação com outros componentes da combinação, é efetivo para gerar uma resposta imune contra o antígeno. Por exemplo, o antígeno pode ser administrado em uma quantidade de cerca de 100 mu.g/kg a cerca de 100 mg kg. Em algumas modalidades, o antígeno pode ser administrado em uma quantidade de cerca de 10. mu.g kg a cerca de 10 mg/kg. Em algumas modalidades, o antígeno pode ser administrado em uma quantidade de cerca de 1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg. A quantidade particular de antígeno que constitui uma quantidade efetiva para gerar uma resposta imune, no entanto, depende de certa forma de certos fatores, como, por exemplo, o antígeno particular que está sendo administrado; o agonista específico que está sendo administrado e a quantidade do mesmo; o agonista específico que está sendo administrado e a quantidade do mesmo; o estado do sistema imunológico; o método e a ordem de administração do agonista

e do antígeno; a espécie na qual está sendo administrada a formulação; e o resultado terapêutico desejado. Por conseguinte, não é prático estabeler geralmente a quantidade que constitui uma quantidade efetiva do antígeno. Os especialistas na técnica, no entanto, facilmente podem determinar a quantidade apropriada, com a devida consideração de referidos fatores.

[00224] O antígeno pode ser todo o material capaz de aumentar uma resposta imune Th1, que possa incluir uma ou mais, por exemplo, resposta de células T CD8+, resposta de células T NK, resposta de células T .gama./delta ou resposta de anticorpos Th1. Antígenos apropriados incluem, entre outros, peptídeos; polipeptídeos; lipídeos; glicolipídeos; polissacarídeos; carboidratos; polinucleotídeos; príons; bactérias, vírus ou fungos vivos ou inativados; e antígenos, toxinas ou toxoides bacterianos, virais, fúngicos, protozoários, derivados de tumor ou derivados de organismos.

[00225] Além disso, certos antígenos atualmente experimentais, especialmente materiais como proteínas, glicoproteínas, e peptídeos recombinantes que não aumentam uma resposta imune forte, podem ser usados em relação com as combinações de adjuvantes da invenção. Antígenos de subunidade experimental exemplares incluem aqueles relacionados com doença viral, AIDS, catapora, citomegalovírus, dengue, leucemia felina, peste aviária, hepatite A, hepatite B, HSV-1, HSV-2, cólera suína, gripe A, gripe B, encefalite japonesa, sarampo, parainfluenza, raiva, vírus sincicial respiratório, rotavírus, verruga, e febre amarela.

[00226] Em uma modalidade, o antígeno pode ser um antígeno de câncer ou um antígeno tumoral. Os termos "antígeno de câncer" e "antígeno tumoral" são usados de forma intercambiável e referem-se a um antígeno que é diferencialmente expresso por células cancerígenas. Portanto, os antígenos de câncer podem ser explorados para direcio-

nar diferencialmente uma resposta imune contra as células cancerígenas. Os antígenos de câncer, portanto, potencialmente podem estimular respostas imunes de tumor-específicas. Certos antígenos de câncer estão codificados, embora não necessariamente expressos, por células normais. Alguns destes antígenos podem ser caracterizados como normalmente silenciosos (ou seja, não expressos) em células normais, aqueles que são expressos somente em determinadas fases de diferenciação e aqueles que são temporalmente expressos (por exemplo, antígenos embrionários e fetais). Outros antígenos de câncer podem ser codificados por genes celulares mutantes como, por exemplo, oncogenes (por exemplo, oncogene ras ativado), genes supressores (por exemplo, p53 mutante) ou proteínas de fusão resultantes de deleções internas ou translocações cromossômicas. Ainda outros antígenos de câncer podem ser codificados por genes virais como aqueles transportados por vírus de RNA e DNA tumoral.

[00227] Exemplos de antígenos do tumor incluem MAGE, MART-1 Melan-A, gp100, Dipeptidil peptidase IV (DPPUV), proteína de ligação a adenosina deaminase (ADAbp), ciclofilina b, antígeno associado colorretal (CRC)-C017-1 A/GA733, antígeno carcinoembrionário (CEA) e seus epítopos antigênicos CAP-1 e CAP-2, etv6, am11, antígeno específico da próstata (PSA) e seu epítopos antigênicos PSA-1, PSA-2 e 3-PSA, antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), receptor de célula T/CD3-cadeia.zeta. , antígenos tumorais da família MAGE (por exemplo, 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), antígenos tumorais da família GAGE (por exemplo, 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, tirosi-

nase, p53, família MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS 1, .alfa.fenoproteína, .epsilon.-caderina, .alfa.-catenina, .gamma.-catenina, p120ctn, pglo.sup.Pmell7, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína da Polipose coli adenomatosa (APC), fodrina, Conexina 37, Ig-idiotipo, p15, gp75, gangliosídeos GM2 e GD2, produtos virais como proteínas do vírus de papiloma humano, família Smad de antígenos tumorais, Imp-1, PI A, antígeno nuclear codificante de EBV (EBNA)-I, fosforilase do glicogênio do cérebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 e CT-7 e c-erbB-2.

[00228] Cânceres ou tumores e antígenos tumorais específicos associados com ditos tumores (mas não exclusivamente), incluem leucemia linfoblástica aguda (etv6, aml I, ciclofilina b), linfoma de célula B (Ig-idiotipo), glioma (E-caderina, alfa -catenina, .beta -catenina, gamma -catenina, pl20ctn), câncer de bexiga (p21ras), câncer biliar (p21ras), câncer de mama (família MUC, HER2 neu, c-erbB-2), carcinoma cervical (p53, p21ras), carcinoma de cólon (p21ras, HER2-neu, c-erbB-2, família MUC), câncer colorretal (antígeno associado ao colorreatal (CRC)-C017-1 A GA733, APC), Coriocarcinoma (CEA), câncer epitelio celular (ciclofilina b), câncer gástrico (HER2 neu, c-erbB-2, glicoproteína ga733), câncer hepatocelular (.alfa.-fetoproteína), linfoma de Hodgkin (Imp-l, EBNA-1), câncer de pulmão (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemía derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p5, gp75, antígeno oncofetal, gangliosídeos GM2 e GD2, Melan-A/MART-1, cdc27, MAGE-3, p21ras, gpl00.sup.Pmell17), mieloma (família MUC, p21ras), carcinoma de células de pulmão não-pequenas (HER2/neu, c-erbB-2), câncer nasofaringeo (Imp-1, EBNA-1), câncer ovariano (família MUC, HER2/neu, c-erbB-2), câncer de próstata (antígeno específico da próstata (PSA) e seu epítopos antigênicos PSA-1, PSA-2 e PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glicoproteína ga733), câncer renal (HER2 neu, c-erbB-2), câncer de células escamosas do

colo do útero e esôfago (produtos virais como proteínas do vírus papiloma humano), o câncer de testículo (NY-ESO-1) e leucemia de células T (epítopos de HTLV-1).

[00229] A composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com a sua pretendida via de administração. Exemplos de vias de administração incluem parenteral, por exemplo, intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (por exemplo, inalação), transdérmica (tópica), transmucosa e administração retal. As soluções ou suspensões utilizadas para aplicação parenteral, intradérmica, ou subcutâneo podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos como álcool benzílico ou metil parabeno; antioxidantes como o ácido ascórbico ou dissulfito de sódio; agentes quelantes como ácido etilenodiaminotetracético; tampões como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para a regulação da tonicidade como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser colocada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de dose múltipla feitos de vidro ou plástico.

[00230] As composições farmacêuticas apropriadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (quando são solúvel em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersão. Para administração intravenosa, carreadorescarreadores apropriados incluem soro fisiológico, água bacteriostática, Cremofor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.) ou tampão fosfato salino (PBS). Em todos os casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida na medida em que existe a fácil seringeabilidade. Deve ser estável nas condições de fabricação e de armazenamento e deve ser preservada contra a ação contaminante de micro-organismos

como bactérias e fungos. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietileneglicol líquido e semelhantes) e misturas apropriadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no exemplo da dispersão e pelo uso de surfactantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser conseguida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, é preferencial incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis como manitol, sorbitol e cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser obtida por inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo, o monoestearato de alumínio e a gelatina.

[00231] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas, incorporando o composto ativo (por exemplo, agentes moduladores como uma molécula de ácido nucleico PD-L3 ou VISTA, um fragmento de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, um anticorpo anti-PD-L3 ou VISTA ou uma combinação de um anticorpo anti-PD-L3 ou VISTA e um anticorpo anti-PD-Ll) na quantidade necessária em um solvente apropriado com uma ou mais combinação de ingredientes acima enumerados, conforme necessário, seguido de esterilização por filtração. Geralmente, dispersões são preparadas através da incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferenciais de preparação são secagem a vácuo e liofilização que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[00232] As composições orais geralmente incluem um diluente inerte ou um carregador comestível. Podem ser colocados em cápsulas de gelatina ou em comprimidos. Para fins de administração oral do terapêutico, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e usado sob a forma de comprimidos, pastilhas ou cápsulas. As composições orais podem também ser preparadas usando um carreador fluido para uso como um enxaguatório bucal, onde o composto no fluido carreador é aplicado por via oral e bochechado e expectorado ou engolido. Os agentes de ligação farmaceuticamente compatíveis e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como porção da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas e semelhantes podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes, ou compostos de natureza semelhante: um ligante como celulose microcristalina, goma tragacante ou gelatina; um excipiente como amido ou lactose, um agente de desintegração como o ácido algínico, Primogel ou amido de milho; um lubrificante como estearato de magnésio ou esterotes; um adsorvente como dióxido de silício coloidal; um agente edulcorante como sacarose ou sacarina; ou um agente saborizante como hortelã, salicilato de metila ou aromatizante de laranja.

[00233] Para a administração por inalação, os compostos são administrados sob a forma de um spray de aerossol recipiente ou dispersor pressurizado que contém propelente apropriado, por exemplo, um gás como dióxido de carbono ou um nebulizador.

[00234] A administração sistêmica também pode ser por meio transmucosa ou transdérmico. Para a administração transmucosa ou transdérmica, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são utilizados na formulação. ditos penetrantes são geralmente conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, para a administração transmucosa, detergentes, sais biliares e derivados do ácido fusídico. A administração transmucosa pode ser realizada mediante o uso de

sprays nasais ou supositórios. Para a administração transdermal, os compostos ativos são formulados em pomadas, unguentos, géis, ou cremes como são geralmente conhecidos na técnica.

[00235] Os compostos também podem ser preparados sob a forma de supositórios (por exemplo, com bases de supositório convencional como manteiga de cacau e outros glicerídeos) ou enemas de retenção para a administração retal. Em uma modalidade, os compostos ativos são preparados com carreadorescarreadores que protegerão o composto contra a eliminação rápida do corpo, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de administração microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, como etileno-vinil-acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Os métodos para a preparação de tais formulações serão aparentes aos especialistas na técnica. Os materiais também podem ser obtidos comercialmente de Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, InC. As suspensões lipossomais (incluindo lipossomas direcionados para as células infectadas com anticorpos monoclonais para antígenos virais) também podem ser usadas como carreadores farmaceuticamente aceitáveis. Estes podem ser preparados de acordo com os métodos conhecidos por especialistas na técnica, por exemplo, conforme descrito na Patente US 4.522.811.

[00236] É especialmente vantajoso formular composições orais ou parenterais na forma de unidade de dosagem para facilitar a administração e uniformizar a dosagem. Na forma de unidade de dosagem, conforme usado aqui, se refere a unidades fisicamente discretas apropriadas como doses unitárias para o sujeito a ser tratado; cada unidade contém uma quantidade predeterminada do composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacêutico necessário. A especificação para as formas de unidade de dosagem da invenção são ditadas por e dire-

tamente dependentes das características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico específico a ser alcançado e as limitações inerentes na técnica de composição de dito composto ativo para o tratamento de indivíduos.

[00237] A toxicidade e eficácia terapêutica desses compostos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrões em culturas de células ou em animais de experimentação. Os dados obtidos dos ensaios de cultura celular e estudos em animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem desses compostos encontra-se preferencialmente dentro de uma faixa de concentrações em circulação que incluem a ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro deste intervalo dependendo da forma de dosagem utilizada e da via de administração utilizada. Para qualquer composto usado no método da invenção, a dose terapêutica efetiva pode ser estimada inicialmente de ensaios de cultura de células. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para atingir uma faixa de concentrações circulantes no plasma que inclui a IC50 (ou seja, a concentração do composto testado que alcança a metade da máxima inibição dos sintomas) conforme determinado na cultura de células. Essa informação pode ser usada para determinar de forma mais precisa as doses úteis em seres humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alto desempenho.

[00238] Conforme definido aqui, uma quantidade terapeuticamente efetiva de proteína ou polipeptídeo (isto é, uma dose eficaz) varia de cerca de 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal, preferencialmente de cerca de 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, mais preferencialmente cerca de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal e ainda mais preferencialmente cerca de 1 até 10 mg/kg, 2 a 9 mg/kg, 3 a 8 mg/kg, 4 a 7 mg/kg ou 5 a 6 mg/kg de peso corporal. O especialista apreciará que certos

fatores podem influenciar a dose necessária para tratar efetivamente um sujeito, incluindo, mas não limitado à gravidade da doença ou distúrbio, tratamentos anteriores, a idade e/ou de saúde geral do sujeito e outras doenças presentes. Além disso, o tratamento de um sujeito com uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma proteína, polipeptídeo ou anticorpo pode incluir um tratamento único ou, preferencialmente, pode incluir uma série de tratamentos.

[00239] Em um exemplo preferencial, um sujeito é tratado com anticorpo, proteína, ou polipeptídeo no intervalo de entre cerca de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana por no entre cerca de 1 a 10 semanas, preferencialmente entre 2 a 8 semanas, mais preferencialmente entre cerca de 3 a 7 semanas, e mais preferencialmente por aproximadamente 4, 5, ou 6 semanas. Será também apreciado que a dosagem do anticorpo, proteína ou polipeptídeo utilizado para o tratamento efetivo pode aumentar ou diminuir ao longo de um determinado tratamento. Alterações na dosagem podem resultar e tornam-se aparentes a partir dos resultados dos ensaios de diagnósticos conforme descrito aqui.

[00240] A presente invenção compreende agentes que modulam a expressão ou atividade de PD-L3 ou VISTA. Um agente poderá, por exemplo, ser uma pequena molécula. Por exemplo, essas pequenas moléculas incluem, entre outras, peptídeos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleotídeos, análogos de polinucleotídeos, nucleotídeos, análogos de nucleotídeos, compostos orgânicos ou inorgânicos (ou seja, incluindo compostos heteroorgânicos ou organometálicos) contendo um peso molecular de menos do que cerca de 10.000 gramas por mol, compostos inorgânicos ou orgânicos, contendo um peso molecular de menos do que cerca de 5.000 gramas por mol, compostos inorgânicos ou orgânicos, contendo um peso molecular menor do que cerca de 1.000 gramas por mol, compostos inor-

gânicos ou orgânicos, contendo um peso molecular de menos do que cerca de 500 gramas por mol e sais, ésteres e outras formas farmaceuticamente aceitáveis de ditos compostos. Entende-se que as doses apropriadas de agentes moleculares pequenos dependem de uma série de fatores dentro do escopo de conhecimento de médicos, veterinário ou pesquisador com conhecimentos normais. A dose da molécula pequena irá variar, por exemplo, dependendo da identidade, o tamanho e a condição do sujeito ou da amostra que está sendo tratado, ainda mais dependendo da via pela qual a composição é administrada, se aplicável, e o efeito que o praticante deseja que a molécula pequena tenha sobre o ácido nucleico ou polipeptídeo da invenção.

[00241] Doses exemplares incluem quantidades de miligramas ou micrograma de uma molécula pequena ou quilograma do sujeito ou peso da amostra (por exemplo, cerca de 1 micrograma por quilograma a cerca de 500 miligramas por quilograma, cerca de 100 microgramas por quilograma a cerca de 5 miligramas por quilograma, ou cerca de 1 micrograma por quilograma a cerca de 50 microgramas por quilograma). Além disso, entende-se que doses apropriadas de uma pequena molécula dependem da potência da molécula pequena em relação a expressão ou atividade a ser modulada. Ditas doses apropriadas podem ser determinadas usando os ensaios descritos aqui. Quando uma ou mais destas pequenas moléculas deve ser administrada a um animal (por exemplo, um ser humano), a fim de modular a expressão de atividade de um polipeptídeo ou ácido nucleico da invenção, um médico, veterinário, ou pesquisador pode, por exemplo, prescrever uma dose relativamente baixa no início, posteriormente, aumentando a dose até se obter uma resposta apropriada. Além disso, entende-se que o nível de dose específica para qualquer sujeito animal particular dependerá de uma variedade de fatores incluindo a atividade do composto específico empregado, a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e

dieta do sujeito, o tempo de administração, a via de administração, a taxa de excreção, qualquer combinação de drogas e o grau de expressão ou atividade a ser modulado.

[00242] Além disso, um anticorpo (ou fragmento do mesmo) pode ser conjugado a uma porção terapêutica como uma citotoxina, um agente terapêutico ou um íon metálico radioativo. Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial para as células. Exemplos incluem o taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vimblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antraceno diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dihidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Os agentes terapêuticos incluem, entre outros, antimetabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracila decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucila, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamino-platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) e doxorrubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes antimitótico (por exemplo, vincristina e vinblastina).

[00243] Os conjugados da invenção podem ser usados para modificar uma determinada resposta biológica, a fração de droga não deve ser considerada como limitante aos agentes terapêuticos químicos. Por exemplo, a fração de droga pode ser uma proteína ou um polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Esses polipeptídeos podem incluir, por exemplo, uma toxina como abrin, ricina A, exotoxina pseudomonas ou toxina da difteria; uma proteína como fator de

necrose tumoral, alfa-interferon, beta-interferon, fator de crescimento do nervo, fator de crescimento derivado de plaquetas, ativador do plasminôgeno tecidual; ou modificadores de resposta biológica, como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos ("GM-CSF"), fator estimulante de colônias de granulócitos ("G-CSF") ou outros fatores de crescimento. Técnicas para conjugar dita porção terapêutica aos anticorpos são bem conhecidas.

[00244] As moléculas de ácidos nucleicos da invenção podem ser inseridas em vetores e usadas como vetores de terapia genética. Os vetores da terapia genética podem ser administrados a um sujeito por, por exemplo, injeção intravenosa, administração local (ver Patente US 5.328.470) ou por injeção estereotáxica (ver, por exemplo, Chen *et al*. (1994) Proc Natl. Acad. Sci. USA 91 :3054-3057). A preparação farmacêutica do vetor de terapia genética pode incluir o vetor de terapia genética gene em um diluente aceitável, ou pode incluir uma matriz de liberação lenta, em que o veículo do gene administrado está embutido. Alternativamente, onde o vetor completo do gene administrado pode ser produzido intacto de células recombinantes, por exemplo, vetores retrovirais, a preparação farmacêutica pode incluir uma ou mais células que produzem o sistema de administração do gene. As composições farmacêuticas podem ser incluídas em um recipiente, pacote ou dispensador juntamente com instruções para a administração.

V. Usos e Métodos da Invenção

[00245] Moléculas de PD-L3 ou VISTA, por exemplo, as moléculas de ácidos nucleicos de PD-L3 ou VISTA, polipeptídeos, polipeptídeo homólogos e anticorpos e fragmentos de anticorpo aqui descritos podem ser usados em um ou mais dos seguintes métodos: a) ensaios de triagem; b) medicina preditiva (por exemplo, ensaios de diagnósticos, ensaios prognósticos e ensaios clínicos de monitoramento); e c) méto-

dos de tratamento (por exemplo, terapêuticos e profiláticos, por exemplo, modulação para cima ou para baixo da resposta imune). Conforme descrito aqui, um polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA da invenção tem uma ou mais das seguintes atividades: 1) ligar e/ou modular a atividade do seu parceiro de ligação natural, 2) modular a sinalização intra- ou intercelular, 3) modular a ativação dos linfócitos T, 4) modular a resposta imune do organismo, por exemplo, um organismo de mamífero, como um camundongo ou humano. As moléculas de ácidos nucleicos isoladas da invenção podem ser usadas, por exemplo, para expressar o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA (por exemplo, através de um vetor de expressão recombinante em uma célula hospedeira em aplicações de terapia genética), para detectar mRNA de PD-L3 ou VISTA (por exemplo, em uma amostra biológica) ou uma alteração genética em um gene de PD-L3 ou VISTA e modular a atividade de PD-L3 ou VISTA, conforme descrito mais abaixo. Os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA podem ser usados para tratar condições ou doenças caracterizadas por produção excessiva ou insuficiente de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou produção de inibidores de PD-L3 ou VISTA. Além disso, os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA podem ser usados para triagem de parceiro de ligação natural a PD-L3 ou VISTA , triagem de drogas ou compostos que modulam a atividade PD-L3 ou VISTA, bem como para tratar condições ou doenças caracterizadas por produção excessiva ou insuficiente de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou produção de formas do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA que diminuíram a atividade anormal ou indesejada em comparação com polipeptídeo PD-L3 ou VISTA do tipo selvagem (por exemplo, distúrbios do sistema imunológico como imunodeficiência grave combinada, esclerose múltipla, lúpus sistêmico eritematoso, diabetes mellitus tipo I, síndrome linfoproliferativa, doença inflamatória intestinal, alergias, asma, doença do enxerto-versus-hospedeiro e rejeição de transplante; respostas imunes a

patógenos infecciosos como bactérias e vírus; e cânceres do sistema imunológico como linfomas e leucemias). Além disso, os anticorpos anti-PD-L3 OR VISTA da invenção podem ser usados para detectar e isolar os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA, regular a biodisponibilidade dos polipeptídeos PD-L3 ou VISTA e modular a atividade dos PD-L3 ou VISTA, por exemplo, modulando a interação entre PD-L3 ou VISTA e seu parceiro natural de ligação.

A. Ensaios de Triagem:

[00246] A invenção fornece um método (também conhecido aqui como um "ensaio de triagem") para identificar moduladores, isto é, candidato ou compostos ou agentes de teste (por exemplo, peptídeos, peptidomiméticos, pequenas moléculas ou outras drogas) que se ligam aos polipeptídeos PD-L3 ou VISTA, tem um efeito estimulante ou inibitório sobre, por exemplo, a expressão PD-L3 ou VISTA ou a atividade PD-L3 ou VISTA, ou tem um efeito estimulante ou inibitório sobre a interação entre PD-L3 ou VISTA e seu parceiro natural de ligação.

[00247] Em uma modalidade, a invenção fornece os ensaios para a triagem de candidato ou compostos de teste que se ligam à proteína ou ao polipeptídeo ou à porção biologicamente ativa de PD-L3 ou VISTA, por exemplo, modulam a capacidade do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA para interagir com seu parceiro natural de ligação. Em outra modalidade, a invenção fornece ensaios para a triagem de candidato ou compostos de teste que ligam ou modulam a atividade de um polipeptídeo ou proteína ou porção biologicamente ativa de PD-L3 ou VISTA. Em uma modalidade preferencial, a invenção fornece ensaios para a triagem de candidatos ou compostos de teste que têm um efeito estimulante ou inibitório sobre funções imunológicas reguladas negativamente pela PD-L3 ou VISTA conforme são identificadas aqui ou com base em seu efeito sobre a interação de PD-L3 ou VISTA e seu parceiro natural de ligação. Estas funções relacionadas à PD-L3 ou VISTA

incluem a título de exemplo, inibição da produção de citocinas (por exemplo, U-2, interferon gama pelas células T, supressão moderada do costimulante CD28, inibição da proliferação de células T CD4+ e CD8+, supressão da proliferação de células T CD4+ naive ou de memória e supressão da ativação de TCR sem induzir apoptose. Os compostos de teste da presente invenção podem ser obtidos usando qualquer uma das inúmeras abordagens nos métodos de biblioteca combinatorial conhecidos na técnica, incluindo: bibliotecas biológicas; bibliotecas em fase sólida paralela espacialmente direcionada ou em fase de solução; métodos de biblioteca sintética exige deconvolução; o método de biblioteca 'uma conta, um composto'; e métodos de biblioteca sintética usando seleção por cromatografia de afinidade. A abordagem biológica da biblioteca é limitada às bibliotecas de peptídeo, enquanto as outras quatro abordagens são aplicáveis ao peptídeo, oligômeros não peptídicos ou bibliotecas de pequenas moléculas de compostos (Lam, K. S. (1997) Anticancer Drug Des. 12: 145).

[00248] Em uma modalidade, um ensaio é um ensaio baseado em células no qual a célula que expressa um polipeptídeo ou fração biologicamente ativa de PD-L3 ou VISTA é contatada com um composto de teste, e a capacidade do composto de teste de modular a atividade de PD-L3 ou VISTA é determinada. Determinando a capacidade do composto de teste de modular a atividade de PD-L3 ou VISTA pode ser realizada através do monitoramento, por exemplo, da capacidade do PD-L3 ou VISTA para se ligar a seu parceiro natural de ligação e modular a atividade das células imunes. A célula imune pode ser, por exemplo, uma célula T, uma célula B ou uma célula mieloide. Determinar a capacidade do composto de teste em modular a ligação de PD-L3 ou VISTA a seu contrarreceptor (a ser determinado) pode ser realizado, por exemplo, pelo acoplamento PD-L3 ou VISTA com um marcador radioisótopo ou enzimático para monitorar a capacidade de um

composto de teste em modular a ligação PD-L3 ou VISTA a células T que expressam o contrarreceptor PD-L3 ou VISTA. Determinar a capacidade do composto de teste de ligar PD-L3 ou VISTA pode ser realizado, por exemplo, por acoplamento do composto com um marcador radioisótopo ou enzimático de modo que a ligação do composto ao PD-L3 ou VISTA pode ser determinada, detectando o composto PD-L3 ou VISTA marcado em um complexo.

[00249] Está também no escopo da presente invenção determinar a capacidade de um composto de interagir com o PD-L3 ou VISTA sem marcação de qualquer dos interagentes. Por exemplo, um microfisiômetro pode ser usado para detectar a interação de um composto com o PD-L3 ou VISTA sem a marcação dos compostos ou do PD-L3 ou VISTA (McConnell, H. M. *et al*. (1992) Science 257: 1906- 1912). Conforme usado aqui, um "microfisiômetro" (por exemplo, Citosensor) é um instrumento analítico que mede a taxa na qual uma célula acidifica seu ambiente usando um sensor potenciométrico de luz-direcionável (LAPS). Mudança nesta taxa de acidificação pode ser usada como um indicador da interação entre um composto e PD-L3 ou VISTA.

[00250] Em outra modalidade, um ensaio é um ensaio baseado em células compreendendo o contato com uma célula T expressando um parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA com um composto de teste e determinar a capacidade do composto de teste em modular (por exemplo, estimular ou inibir) a atividade do parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA. Determinar a capacidade do composto de teste em modular a atividade de um parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA pode ser feito, por exemplo, determinando a capacidade do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA de se ligar ou interagir com o parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA.

[00251] Determinar a capacidade do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, ou um fragmento biologicamente ativo deste, de se ligar ou interagir

com um parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA, pode ser realizado por um dos métodos descritos acima para a determinação de ligação direta. Em uma modalidade preferencial, determinar a capacidade do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA de se ligar ou interagir com um parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA pode ser feito determinando a atividade do parceiro de ligação. Por exemplo, a atividade do parceiro de ligação pode ser determinada através da detecção da indução de um segundo mensageiro celular (por exemplo, a atividade da tirosina quinase ou fosfatase), ou da detecção de atividade enzimática/catalítica de um substrato apropriado, da detecção da indução de um gene repórter (que inclui um elemento regulador em resposta ao alvo operativamente ligado a um ácido nucleico que codifica um marcador detectável, por exemplo, luciferase) ou da detecção de uma resposta celular regulada pelo alvo. Por exemplo, determinar a capacidade do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA de se vincular ou interagir com um parceiro natural de ligação do PD-L3 ou VISTA, pode ser realizada medindo-se a capacidade de um composto de modular a coestimulação ou inibição imune celular em um ensaio de proliferação, ou interferindo com a capacidade de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA para se ligar aos anticorpos que reconhecem uma porção do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Em uma modalidade, os compostos que modulam a ativação de célula T podem ser identificados, determinando a capacidade de um composto de modular a proliferação de células T ou a produção de citocinas. Em uma modalidade preferencial, os compostos que modulam a ativação de célula T podem ser identificados, determinando a capacidade de um composto de modular a proliferação de células T ou a produção de citocinas em mais de uma concentração do antígeno.

[00252] Ainda em uma modalidade, um ensaio da presente invenção é um ensaio livre de células no qual um polipeptídeo ou fração biologicamente ativa de PD-L3 ou VISTA é contactada com um composto

de teste, e a capacidade do composto de teste de se ligar ao polipeptídeo ou fração biologicamente ativa de PD-L3 ou VISTA é determinada. Partes biologicamente ativas dos polipeptídeos PD-L3 ou VISTA preferencialmente para ser usado em ensaios da presente invenção incluem fragmentos que participarem em interações com moléculas não-PD-L3 OR VISTA, por exemplo, pelo menos uma porção de um domínio extracelular que se liga a um parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA. A ligação do composto de teste ao polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode ser determinada direta ou indiretamente, conforme descrito acima.

[00253] Em outra modalidade, o ensaio é um ensaio livre de células no qual um polipeptídeo ou fração biologicamente ativa de PD-L3 ou VISTA é contatada com um composto de teste e a capacidade do composto de teste em modular (por exemplo, estimular ou inibir) a atividade do polipeptídeo ou fração biologicamente ativa de PD-L3 ou VISTA é determinada. Determinar a capacidade do composto de teste em modular a atividade de um ou polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode ser feito, por exemplo, determinando a capacidade do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA de se ligar ao parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA mediante um dos métodos descritos acima para determinar a ligação direta. Os ensaios livre de célula da presente invenção são passíveis ao uso de ambas as formas dos polipeptídeos solúveis e/ou ligados à membrana (por exemplo, polipeptídeos ou frações biologicamente ativas de PD-L3 ou VISTA ou parceiros de ligação aos quais o PD-L3 ou VISTA se liga). No caso de ensaios livres de células nos quais a forma do polipeptídeo ligado à membrana é usada (por exemplo, um PD-L3 ou VISTA de superfície celular), pode ser desejável para utilizar um agente solubilizante de modo que a forma do polipeptídeo ligado à membrana é mantida em solução. Exemplos de ditos agentes solubilizantes incluem detergentes não iônicos como o n-octilglucosida, n-dodecilglucosida, n-dodecilmaltosida, oc-

tanoil-N-metiglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton J TM. X-100, Triton. RTM. X-l 14, Thesit, Isotridecipoli(etileno glicol éter)n, sulfonato 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-1-propano (CHAPS), sulfonato 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO), ou sulfonato N-dodecil.dbd.N,N-dimetil-3-ammonio-1-propano.

[00254] Em mais de uma modalidade dos métodos de ensaio acima da presente invenção, pode ser desejável imobilizar o PD-L3 ou VISTA ou seu parceiro de ligação para facilitar a separação de formas complexadas de formas não complexadas de um ou ambos os polipeptídeos, bem como para acomodar a automação do ensaio. A ligação de um composto de teste de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou a interação de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA com o seu parceiro de ligação na presença e na ausência de um composto candidato, pode se feita em recipiente apropriado para conter os reagentes. Exemplos de ditos recipientes incluem placas de microtitulação, tubos de teste e microtubos de centrífuga. Em uma modalidade, uma proteína de fusão pode ser fornecida a qual adiciona um domínio que permite que um ou ambos os polipeptídeos se liguem a uma matriz. Por exemplo, proteínas da fusão glutationa-S-transferasa PD-L3 ou VISTA ou proteínas de fusão do parceiro de ligação glutationa-S-transferasa podem ser adsorvidas em grânulos de sefarosa glutationa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo) ou placas de microtitulação com glutationa derivatizada, que são então combinadas com o composto de teste ou o composto de teste e/ou o polipeptídeo parceiro de ligação não adsorvido ou o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA e a mistura incubada sob condições que contribuam para a formação do complexo (por exemplo, em condições fisiológicas de sal e pH). Após incubação, os grânulos ou poços da placa de microtitulação são lavados para remover quaisquer componentes não acoplados, a matriz é imobilizada no caso dos grânulos e a formação do complexo é determinada direta ou indiretamente, por

exemplo, como descrito acima. Como alternativa, os complexos podem ser dissociados da matriz e o nível de ligação ou a atividade do PD-L3 ou VISTA determinado usando as técnicas padrões. Outras técnicas para imobilizar polipeptídeos em matrizes também podem ser usadas em ensaios de triagem da invenção. Em uma modalidade alternativa, determinar a capacidade do composto de teste em modular a atividade de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode ser feito, determinando a capacidade do composto de teste de modular a atividade de uma molécula que funciona a jusante do PD-L3 ou VISTA, por exemplo, interagindo com o domínio citoplasmático de um parceiro de ligação de PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, os níveis de segundos mensageiros, a atividade da molécula interagindo em um alvo apropriado, ou a ligação do interator para um alvo apropriado pode-se determinar conforme descrito anteriormente.

[00255] Em outra modalidade, os moduladores de expressão PD-L3 ou VISTA são identificados em um método em que uma célula é contatada com um composto candidato e a expressão do mRNA ou do polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA na célula é determinado. O nível de expressão do mRNA ou do polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA na presença do composto candidato é comparado com o nível de expressão do mRNA ou do polipeptídeo de PD-L3 ou VISTA na ausência do composto candidato. O composto candidato, em seguida, pode ser identificado como um modulador da expressão PD-L3 ou VISTA baseada em essa comparação, se a mudança é estatisticamente significativa.

[00256] Ainda em outro aspecto da invenção, os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA podem ser usados como "proteínas isca" em um ensaio de dois-híbridos ou três-híbridos (ver, por exemplo, Patente US 5.283.317; Zervos *et al*. (1993) Cell 72:223-232; Madura *et al*. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Battel *et al*. (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi *et al*. (1993) Oncogene 8: 1693-1696; e Brent

WO94/10300), para identificar outros polipeptídeos que se ligam ou interagem com o PD-L3 ou VISTA ("proteínas de ligação ao PD-L3 ou VISTA", "parceiros de ligação de PD-L3 ou VISTA", ou "PD-L3 ou VISTA-bp") e estão envolvidos na atividade de PD-L3 ou VISTA. Tais proteínas de ligação ao PD-L3 ou VISTA também são susceptíveis de estar envolvidas na propagação de sinais por polipeptídeos PD-L3 ou VISTA ou alvos de PD-L3 ou VISTA como, por exemplo, elementos a jusante de uma via de sinalização mediada por PD-L3 ou VISTA. Alternativamente, ditos polipeptídeos ligantes a PD-L3 ou VISTA podem ser inibidores de PD-L3 ou VISTA. O sistema de dois híbridos é baseado na natureza moduladora da maioria dos fatores de transcrição, que consistem em domínios de ativação e ligação ao DNA separáveis. Resumidamente, o ensaio utiliza duas construções diferentes de DNA. Em uma construção, o gene que codifica um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA é fundido a um gene que codifica o domínio de ligação de DNA de um fator de transcrição conhecido (por exemplo, GAL-4). Em outro construto, uma sequência de DNA, de uma biblioteca de sequências de DNA que codifica um polipeptídeo não identificado ("presa" ou "amostra") é fundida a um gene que codifica o domínio de activação do factor de transcrição conhecida. Se os polipeptídeos "isca" e "presa" são capazes de interagir, *in vivo*, formando um complexo dependente de PD-L3 ou VISTA, os domínios de ligação de DNA e de ativação do fator de transcrição são colocados em íntima proximidade. Esta proximidade permite a transcrição de um gene repórter (por exemplo, LacZ) que está operacionalmente ligado a um sítio de regulação transcricional que responde ao fator de transcrição. A expressão do gene repórter pode ser detectada e colônias de células que contêm o fator de transcrição funcional podem ser isoladas e usadas para obter o gene clonado que codifica o polipeptídeo que interage com o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA.

[00257] Em outro aspecto, a invenção se refere a uma combinação de dois ou mais dos ensaios aqui descritos. Por exemplo, um agente de modulação pode ser identificado usando um ensaio baseado em células ou livre de células, e a capacidade do agente para modular a atividade de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode ser confirmada *in vivo*, por exemplo, em um animal como um modelo animal para a transformação celular e/ou tumorigênese**.**

[00258] Esta invenção ainda pertence a novos agentes identificados por ensaios de triagem acima descritos. Por conseguinte, está no escopo da presente invenção ainda usar um agente identificado conforme descrito aqui em um modelo animal apropriado. Por exemplo, um agente identificado conforme descrito aqui (por exemplo, um agente de modulação PD-L3 ou VISTA, uma molécula de ácido nucleico antissenso de PD-L3 ou VISTA, um anticorpo específico de PD-L3 ou VISTA ou um parceiro de ligação PD-L3 ou VISTA) pode ser usado em um modelo animal para determinar a eficácia, toxicidade ou efeitos colaterais do tratamento com dito agente. Como alternativa, um agente identificado conforme descrito aqui pode ser usado em um modelo animal para determinar o mecanismo de ação de dito agente. Além disso, esta invenção se refere a usos de novos agentes identificados por ensaios de triagem acima descritos para tratamentos conforme descrito aqui.

B. Ensaios de Detecção

[00259] As porções ou fragmentos das sequências de cDNA aqui identificadas (e as correspondentes sequências de genes completos) podem ser usadas de várias maneiras, como reagentes de polinucleotídeos. Por exemplo, estas sequências podem ser utilizadas para: (i) mapear os seus genes respectivos em um cromossoma e, assim, localizar regiões de genes associadas a doenças genéticas, (ii) identificar um indivíduo a partir de uma amostra biológica de minuto (tipagem de

tecido), e (iii) ajudar na identificação forense de uma amostra biológica. Estas aplicações estão descritas nas subseções a seguir.

1. Mapeamento Cromossômico

[00260] Uma vez que a sequência (ou uma porção da sequência) de um gene tiver sido isolada, esta sequência pode ser utilizada para mapear a localização do gene em um cromossoma. Este processo é denominado mapeamento cromossômico. Deste modo, porções ou fragmentos das sequências nucleotídicas PD-L3 ou VISTA, aqui descritas, podem ser utilizadas para mapear a localização de genes PD-L3 ou VISTA em um cromossoma. O mapeamento de sequências PD-L3 ou VISTA para cromossomos é um primeiro passo importante na correlação dessas sequências com genes associados com a doença. Resumidamente, genes PD-L3 ou VISTA podem ser mapeados nos cromossomas preparando iniciadores de PCR (preferencialmente 15-25 pb de comprimento) a partir das sequências de nucleotídeos PD-L3 ou VISTA de. A análise por computador de sequências PD-L3 ou VISTA pode ser utilizada para prever os iniciadores que não abrangem mais do que um éxon no DNA genômico, complicando assim o processo de amplificação. Estes iniciadores podem então ser utilizados para triagem em PCR de híbridos de células somáticas contendo cromossomas humanos individuais. Apenas os híbridos contendo o gene humano correspondente as sequências PD-L3 ou VISTA irão produzir um fragmento amplificado. Híbridos de células somáticas são preparadas por fusão de células somáticas de mamíferos diferentes (por exemplo, células humanas e de camundongo). Como híbridos de células humanas e de camundongo crescem e se dividem, perdem gradualmente cromossomos humanos em ordem aleatória, mas mantêm os cromossomos do camundongo. Ao utilizar meios em que as células de camundongo não podem crescer, devido à falta de uma enzima particular, mas as células humanas podem, a um cromossoma humano

que contém o gene que codifica a enzima necessária será retida. Utilizando diversos meios, os painéis de linhagens celulares híbridas podem ser estabelecidos. Cada linhagem de células de um painel contém um único cromossoma humano ou um pequeno número de cromossomas humanos, e um conjunto completo de cromossomas de camundongo, permitindo fácil mapeamento de genes individuais específicos de cromossomas humanos (D'Eustachio, P. *et al*. (1983) Science 220:919-924). Híbridos de células somáticas, contendo apenas fragmentos de cromossomas humanos também podem ser produzidos utilizando os cromossomas humanos com translocações e deleções.

[00261] Mapeamento de PCR de híbridos de células somáticas é um procedimento rápido para designar uma sequência particular a um cromossoma particular. Três ou mais sequências podem ser atribuídas por dia utilizando um ciclador térmico único. Utilizando as sequências de nucleotídeos de PD-L3 ou VISTA para projetar iniciadores oligonucleotídicos, a sublocalização pode ser conseguida com painéis de fragmentos de cromossomas específicos. Outras estratégias de mapeamento que podem ser de modo semelhante utilizadas para mapear uma sequência PD-L3 ou VISTA ao seu cromossoma incluem a hibridização *in situ* (descrito em Fan, Y. *et al*. (1990) Proc Natl. Acad. Sci. USA 87:6223-27), pré-triagem com cromossomas *flow-sorted* marcados, e pré-seleção por hibridização para bibliotecas de cDNA específicas por cromossoma.

[00262] A fluorescência de hibridação *in situ* (FISH) de uma sequência de DNA para a propagação da metáfase cromossomal pode ainda ser utilizada para fornecer uma localização cromossômica precisa em uma única etapa. A propagação de cromossoma pode ser feita usando células cuja divisão foi bloqueada em metáfase por um produto químico como colcemida que interrompe o fuso mitótico. Os cromossomas podem ser tratados brevemente com tripsina, e, em seguida,

coradas com Giemsa. Um padrão de bandas claras e escuras se desenvolve em cada cromossoma, para que os cromossomas possam ser identificados individualmente. A técnica FISH pode ser utilizada com uma sequência de DNA tão curta quanto 500 ou 600 bases. No entanto, clones maiores do que 1.000 bases possuem uma maior probabilidade de se ligarem a um local cromossômico único com uma intensidade de sinal suficiente para uma detecção simples. Preferencialmente, 1.000 bases, e mais preferencialmente 2.000 bases, serão suficientes para obter bons resultados em um período razoável de tempo. Para uma revisão desta técnica, ver Verma *et al*., Human Chromosomes: A Manual of basic Techniques (Pergamon Press, New York 1988). Os reagentes para o mapeamento cromossômico podem ser utilizados individualmente para marcar um único cromossoma ou um único sítio em que o cromossoma, ou painéis de reagentes podem ser usados para a marcação de locais múltiplos, e/ou múltiplos cromossomas. Os reagentes que correspondem a regiões não codificantes dos genes, na verdade, são preferenciais para fins de mapeamento. As sequências de codificação são mais susceptíveis de serem conservadas dentro de famílias de genes, aumentando assim a possibilidade de hibridação cruzada durante o mapeamento cromossômico.

[00263] Uma vez que uma sequência tenha sido mapeada para uma localização cromosômica exata, a posição física da sequência no cromossoma pode ser correlacionada com dados do mapa genético. Finalmente, o sequenciamento completo dos genes de vários indivíduos pode ser realizado para confirmar a presença de uma mutação e para distinguir mutações a partir de polimorfismos.

2. Tipagem de tecido

[00264] As sequências de DP-L3 OR VISTA da presente invenção também podem ser usadas para identificar os indivíduos a partir de amostras biológicas de minutos. Além disso, as sequências da presen-

te invenção podem ser utilizadas para fornecer uma técnica alternativa que determina a sequência de DNA real base-por-base de porções selecionadas do genoma de um indivíduo. Assim, as sequências de nucleotídeos PD-L3 ou VISTA aqui descritas podem ser utilizadas para preparar dois iniciadores de PCR da extremidade 5 'e 3' das sequências. Estes iniciadores podem então ser utilizados para amplificar o DNA de um indivíduo e posteriormente sequenciar o mesmo.

[00265] Os painéis de sequências de DNA correspondentes a partir de indivíduos, preparados desta forma, podem fornecer identificações individuais únicas, já que cada indivíduo terá um conjunto único de ditas sequências de DNA, devido a diferenças alélicas. As sequências da presente invenção podem ser utilizadas para se obter sequências de identificação de indivíduos e estes a partir de tecido. As sequências de nucleotídeos de PD-L3 ou VISTA da presente invenção representam unicamente porções do genoma humano. Variação alélica ocorre em algum grau em regiões codificantes dessas sequências e, em maior grau, nas regiões não codificantes. Estima-se que a variação alélica entre seres humanos individuais ocorra com uma frequência de cerca de uma vez por cada 500 bases. Cada uma das sequências aqui descritas pode, até certo ponto, ser utilizada como um padrão contra o qual o DNA de um indivíduo pode ser comparado para fins de identificação. Porque um número maior de polimorfismos ocorre nas regiões não codificantes, sequências menores são necessárias para diferenciar os indivíduos. As sequências não codificantes de SEQ ID NO: 1 ou 4 podem confortavelmente fornecer identificação individual positiva com um painel de talvez 10 a 1.000 iniciadores em que cada um gera uma sequência não codificante amplificada de 100 bases. Se as sequências codificantes previstas, como aquelas em SEQ ID NO: 3 ou 6, são utilizadas, um número mais apropriado de iniciadores para a identificação individual positiva seria 500-2.000.

[00266] Se um painel de reagentes de sequências de nucleotídeos PD-L3 ou VISTA aqui descrito é utilizado para gerar um banco de dados de identificação único para um indivíduo, esses mesmos reagentes podem mais tarde ser utilizados para identificar tecido desse indivíduo. Usando o banco de dados de identificação único, a identificação positiva dos indivíduos, vivos ou mortos, pode ser feita a partir de amostras de tecido extremamente pequenas.

3. A utilização de sequências PD-L3 ou VISTA em técnicas de identificação baseadas em DNA de Biologia Forense podem também ser utilizadas em biologia forense. As sequências da presente invenção podem ser usados para fornecer reagentes de polinucleotídeos, por exemplo, iniciadores de PCR, orientados para locais específicos no genoma humano, o que pode aumentar a confiança de identificações forenses à base de DNA, por exemplo, fornecendo outro "marcador identificador" (ou seja, outra sequência de DNA que é única para um indivíduo em particular). Como mencionado acima, a informação de sequência real de base pode ser utilizada para a identificação como uma alternativa com uma precisão de padrões formados por fragmentos gerados por enzima de restrição. Sequências específicas para as regiões não codificantes de SEQ ID NO: 1 ou 3 são especialmente adequadas para este fim, como um maior número de polimorfismos ocorre nas regiões não codificantes, o que torna mais fácil para diferenciar os indivíduos que utilizam esta técnica. Exemplos de reagentes de polinucleotídicas incluem as sequências de nucleotídeos PD-L3 ou VISTA, ou partes dos mesmos, por exemplo, fragmentos derivados das regiões não codificantes da SEQ ID NO: 1 ou 3 com um comprimento de pelo menos 20 bases, preferencialmente pelo menos 30 bases. As sequências de nucleotídeos PD-L3 ou VISTA aqui descritas podem ainda ser usados para fornecer reagentes de polinucleotídeos, por exemplo, sondas marcadas ou marcáveis que podem ser utilizadas

em, por exemplo, uma técnica de hibridação *in situ*, para identificar um tecido específico, por exemplo, os linfócitos. Isto pode ser muito útil nos casos em que um patologista forense é apresentado com um tecido de origem desconhecida. Painéis de ditas sondas PD-L3 ou VISTA podem ser usados para identificar o tecido, por espécie, e/ou, por tipo de órgão. De um modo semelhante, estes reagentes, por exemplo, iniciadores ou sondas PD-L3 ou VISTA podem ser utilizados para triar cultura de tecido para contaminação (ou seja, triar para a presença de uma mistura de diferentes tipos de células em uma cultura).

C Medicina Preditiva

[00267] A presente invenção também se refere ao campo da medicina preditiva na qual os ensaios de diagnóstico, testes de prognóstico e monitorização de ensaios clínicos são utilizados para fins prognósticos (preditivos) para, assim, tratar profilaticamente um indivíduo. Assim, um aspecto da presente invenção se refere a ensaios diagnósticos para a determinação de polipeptídeo e/ou expressão de ácido nucleico PD-L3 ou VISTA, bem como a atividade de PD-L3 ou VISTA, no contexto de uma amostra biológica (por exemplo, sangue, soro, células ou tecido) para, assim, determinar se um indivíduo é afligido com uma doença ou distúrbio, ou em risco de desenvolver um distúrbio, associado com expressão ou atividade anormal ou indesejada de PD-L3 ou VISTA. A invenção também fornece ensaios prognósticos (ou preditivos) para determinar se um indivíduo está em risco de desenvolver uma doença associada com a expressão do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, ácido nucleico ou atividade. Por exemplo, as mutações em um gene PD-L3 ou VISTA pode ser avaliada em uma amostra biológica. Ditos ensaios podem ser utilizados para fins de prognóstico ou preditivos para deste modo se tratar profilaticamente um indivíduo antes do aparecimento de um distúrbio caracterizado por ou associado com a expressão do polipeptídeo DP-L3 OR VISTA, ácido nucleico ou atividade.

[00268] Outro aspecto da invenção se refere à monitorização da influência de agentes (por exemplo, drogas, compostos) sobre a expressão ou a atividade da PR-L3 OR VISTA em ensaios clínicos. Estes e outros agentes são descritos em mais detalhe nas seções seguintes.

1. Ensaios Diagnósticos

[00269] Um método exemplar para detectar a presença ou ausência de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou ácido nucleico em uma amostra biológica envolve obter uma amostra biológica de um sujeito teste e contatar a amostra biológica com um composto ou um agente capaz de detectar polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou ácido nucleico (por exemplo, mRNA ou DNA genômico) que codifica polipeptídeo PD-L3 ou VISTA de modo que a presença de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou ácido nucleico é detectado na amostra biológica. Um agente preferencial para a detecção de mRNA PD-L3 ou VISTA ou DNA genômico é uma sonda de ácido nucleico marcada capaz de hibridizar com mRNA PD-L3 ou VISTA ou DNA genômico. A sonda de ácido nucleico pode ser, por exemplo, o ácido nucleico PD-L3 ou VISTA apresentado na SEQ ID NO: 1, ou 3, ou uma porção da mesma, como um oligonucleotídeo de pelo menos 15, 30, 50, 100, 250 ou 500 nucleotídeos de comprimento e suficiente para hibridizar especificamente sob condições rigorosas com mRNA PD-L3 ou VISTA ou DNA genômico. Outras sondas apropriadas para utilização nos ensaios diagnósticos da presente invenção são aqui descritas. Um agente preferencial para a detecção de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA é um anticorpo capaz de se ligar a polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, preferencialmente um anticorpo com um marcador detectável. Os anticorpos podem ser policlonais, ou mais preferencialmente, monoclonais. Um anticorpo intacto, ou um fragmento do mesmo (por exemplo, Fab ou F(ab')2) pode ser usado. O termo "marcado", com relação a sonda ou anticorpo, é pretendido para incluir marcação direta da sonda ou anticorpo por acoplamento (ou se-

ja, ligando fisicamente) uma substância detectável à sonda ou anticorpo, bem como marcação indireta da sonda ou anticorpo por reatividade com outro reagente que está diretamente marcado. Exemplos de marcação indireta incluem detecção de um anticorpo primário utilizando um anticorpo secundário marcado por fluorescência e de rotulagem de extremidade de uma sonda de DNA com biotina de modo que pode ser detectada com estreptavidina marcada com fluorescência. O termo "amostra biológica" pretende incluir tecidos, células, e fluidos biológicos isolados de um sujeito, bem como tecidos, células e fluidos presentes em um sujeito. Ou seja, o método de detecção da invenção pode ser usado para detectar polinucleotídeo mRNA PD-L3 ou VISTA, ou o DNA genômico em uma amostra biológica *in vitro*, bem como *in vivo*. Por exemplo, técnicas *in vitro* para a detecção de mRNA de PD-L2 incluem hibridizações Northern e hibridizações *in situ*. Técnicas *in vitro* para a detecção de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA incluem ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), Western blots, imunoprecipitações e imunofluorescência. Técnicas *in vitro* para detecção de DNA genômico PD-L3 ou VISTA incluem hibridizações Southern. Além disso, técnicas *in vivo* para a detecção de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA incluem a introdução em um sujeito de um anticorpo marcado anti-PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com um marcador radioativo cuja presença e localização em um sujeito pode ser detectada por técnicas padrões de imageamento. Em uma modalidade, a amostra biológica contém moléculas de polipeptídeo a partir do sujeito teste. Alternativamente, a amostra biológica pode conter moléculas de mRNA do sujeito teste ou moléculas de DNA genômico a partir do sujeito teste. Uma amostra biológica preferencial é uma amostra de soro isolada por meios convencionais a partir de um sujeito. Em outra modalidade, os métodos ainda envolvem obter uma amostra biológica de controle a partir de um sujeito controle, contatar a

amostra controle com um composto ou agente capaz de detectar polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, mRNA, ou DNA genômico, de modo que a presença de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, mRNA ou DNA genômico é detectada na amostra biológica, e comparar a presença de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, mRNA ou DNA genômico na amostra controle com a presença de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, mRNA ou DNA genômico na amostra teste.

[00270] A invenção também inclui kits para a detecção da presença de PD-L3 ou VISTA em uma amostra biológica. Por exemplo, o kit pode compreender um composto marcado ou agente capaz de detectar polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou mRNA em uma amostra biológica; meios para determinar a quantidade de PD-L3 ou VISTA na amostra, e meios para comparar a quantidade de PD-L3 ou VISTA na amostra com um padrão. O composto ou agente pode ser embalado em um recipiente adequado. O kit pode ainda compreender instruções para a utilização do kit para detectar polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou ácido nucleico.

2. Ensaios prognósticos

[00271] Os métodos diagnósticos aqui descritos podem, além disso, ser utilizados para identificar sujeitos com ou em risco de desenvolver uma doença ou distúrbio associado com expressão ou atividade anormal ou indesejada de PD-L3 ou VISTA. Conforme usado aqui, o termo "anormal" inclui uma expressão ou atividade de PD-L3 ou VISTA que desvia da expressão ou atividade de PD-L3 ou VISTA tipo selvagem. A expressão ou atividade anormal inclui a expressão aumentada ou diminuída ou atividade, bem como a expressão ou atividade que não segue o padrão de desenvolvimento do tipo selvagem de expressão ou o padrão de expressão subcelular. Por exemplo, a expressão ou atividade anormal de PD-L3 ou VISTA pretende incluir os casos em que a mutação no gene PD-L3 ou VISTA faz com que o gene PD-L3

ou VISTA seja subexpresso ou super expresso e situações em que ditas mutações resultem em um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA não funcional ou um polipeptídeo que não funciona de modo tipo selvagem, por exemplo, um polipeptídeo que não interage com um padrão de ligação PD-L3 ou VISTA, ou um que interage com um padrão de ligação não PD-L3 ou VISTA. Conforme usado aqui, o termo "indesejado" inclui um fenômeno indesejado envolvido em uma resposta biológica como ativação de célula imune. Por exemplo, o termo indesejado inclui uma expressão ou atividade PD-L3 ou VISTA que é indesejável em um sujeito.

[00272] Os ensaios aqui descritos, como os ensaios anteriores de diagnóstico ou os ensaios seguintes, podem ser utilizados para identificar um sujeito com ou em risco de desenvolver uma doença associada com uma desregulação de atividade de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou expressão de ácido nucleico, como um distúrbio autoimune, um distúrbio de imunodeficiência, um distúrbio do sistema imune como autoimunidade, um distúrbio alérgico ou inflamatória ou câncer. Assim, a presente invenção fornece um método para identificar uma doença ou distúrbio associado com expressão ou atividade anormal ou indesejada de PD-L3 ou VISTA em que uma amostra teste é obtida a partir de um sujeito e polipeptídeo ou ácido nucleico PD-L3 ou VISTA (por exemplo, mRNA ou DNA genômico) é detectado, em que a presença de polipeptídeo ou ácido nucleico PD-L3 ou VISTA é diagnóstico para um sujeito contendo ou em risco de desenvolver uma doença ou distúrbio com expressão ou atividade anormal ou indesejada de PD-L3 ou VISTA. Conforme usado aqui, uma "amostra teste" se refere a uma amostra biológica de um sujeito de interesse. Por exemplo, uma amostra teste pode ser um fluido biológico (por exemplo, fluido cérebro-espinhal ou no soro), amostra celular, ou tecido.

[00273] Além disso, os ensaios de prognóstico aqui descritos po-

dem ser usados para determinar se um sujeito pode receber com um agente (por exemplo, um agonista, antagonista, peptidomimético, polipeptídeo, peptídeo, ácido nucleico, molécula pequena, ou outras drogas candidatas) para tratar uma doença ou distúrbio associado com expressão ou atividade anormal ou indesejada PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, ditos métodos podem ser utilizados para determinar se um sujeito pode ser efetivamente tratado com um agente para um distúrbio autoimune, distúrbio de imunodeficiência, câncer do sistema imune, ou distúrbio alérgico ou inflamatório. Assim, a presente invenção fornece métodos para determinar se um sujeito pode ser efetivamente tratado com um agente para um distúrbio associado com atividade ou expressão anormal ou indesejada de PD-L3 ou VISTA em que uma amostra teste é obtida e expressão ou atividade de polipeptídeo ou ácido nucleico PD-L3 ou VISTA é detectada (por exemplo, em que a abundância de expressão ou atividade de polipeptídeo ou ácido nucleico PD-L3 ou VISTA é diagnóstico para um sujeito que pode receber o agente para tratar um distúrbio associado com atividade ou expressão anormal ou indesejada de PD-L3 ou VISTA). Os métodos da presente invenção também podem ser utilizados para detectar alterações genéticas em um gene PD-L3 ou VISTA, determinando assim se um sujeito com o gene alterado está em risco de uma doença caracterizada pela desregulação na atividade de polipeptídeo PR-L3 ou VISTA ou expressão de ácido nucleico, como um distúrbio autoimune, um distúrbio da imunodeficiência, um câncer do sistema imune, um distúrbio alérgico, ou um distúrbio inflamatório. Os métodos aqui descritos podem ser realizados, por exemplo, através da utilização de kits pré-embalados, de diagnóstico contendo pelo menos uma sonda de ácido nucleico ou reagente anticorpo aqui descritos, que podem ser convenientemente utilizados, por exemplo, em situações clínicas para diagnosticar pacientes que apresentam sintomas ou histórico familiar de

uma doença ou enfermidade envolvendo um gene PD-L3 ou VISTA. Além disso, qualquer tipo de célula ou tecido no qual PD-L3 ou VISTA é expresso pode ser utilizado nos ensaios prognósticos aqui descritos.

3. O monitoramento dos efeitos durante os ensaios clínicos de monitoramento da influência de agentes (por exemplo, drogas) sobre a expressão ou atividade de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA (por exemplo, a modulação de células de proliferação e/ou migração) pode ser aplicado não só em triagem de drogas básicas, mas também em ensaios clínicos. Por exemplo, a eficácia de um agente determinado por um ensaio de triagem como aqui descrito para aumentar a expressão de gene PD-L3 ou VISTA, os níveis de polipeptídeo, ou regular para cima a atividade de PD-L3 ou VISTA, pode ser monitorada em ensaios clínicos de sujeitos que apresentam expressão reduzida de gene PD- L3 ou VISTA, níveis de polipeptídicas, ou atividade regulada para baixo de PD-L3 ou VISTA. Alternativamente, a eficácia de um agente determinado por um ensaio de triagem para diminuir a expressão de gene PD-L3 ou VISTA, níveis de polipeptídeo, ou regular para baixo a atividade de PD-L3 ou VISTA, pode ser monitorada em ensaios clínicos de pacientes apresentando uma expressão de gene aumentada de PD-L3 ou VISTA, níveis de polipeptídeo, ou atividade de PD-L3 ou VISTA. Como notado PD-L3 ou VISTA é expresso em muitos tipos de células hematopoiéticas incluindo APCs (macrófagos e células dendríticas mieloides), e células T CD4+, e mais especificamente é expresso em células T $CD11c^+$ DCs, $CD4^+$ (incluindo ambas células T efetora $Foxp3^{'}$ e $Foxp3^+$ nTregs), células T $CD8^+$, e granulocitos Grl^*, e expressos em baixos níveis em células B e células NK. Em ditos ensaios clínicos, a expressão ou atividade de gene PD-L3 ou VISTA, e preferencialmente, outros genes que estão envolvidos em, por exemplo, um distúrbio associado a PD-L3 ou VISTA pode ser usado como "*read out*" ou marcador do fenótipo de uma célula particular.

[00274] Por exemplo, e não como forma de limitação, os genes, incluindo PD-L3 ou VISTA, que são modulados em células por meio de tratamento com um agente (por exemplo, droga, composto ou molécula pequena) que modulam a atividade de PD-L3 ou VISTA (por exemplo, identificados em um ensaio de triagem como aqui descrito) podem ser identificados. Assim, para estudar o efeito de agentes em distúrbios associados a PD-L3 ou VISTA, por exemplo, em um ensaio clínico, as células podem ser isoladas e o RNA preparado e analisado para os níveis de expressão de PD-L3 ou VISTA e outros genes envolvidos no distúrbio associados a PD-L3 ou VISTA, respectivamente. Os níveis de expressão de genes (por exemplo, um padrão de expressão do gene) podem ser quantificados por análise de Northern blot ou RT-PCR, como aqui descrito, ou alternativamente medindo a quantidade de polipeptídeo produzido, por um dos métodos descritos neste documento, ou através da medição dos níveis de atividade da PD-L3 ou VISTA ou outros genes. Deste modo, o padrão de expressão de genes pode servir como um marcador, indicativo da resposta fisiológica das células ao agente. Deste modo, este estado de resposta pode ser determinado antes, e em vários pontos durante o tratamento do indivíduo com o agente. Em uma modalidade preferencial, a presente invenção fornece um método para monitorar a efetividade do tratamento de um sujeito com um agente (por exemplo, um agonista, antagonista, peptidomimético, polipeptídeo, peptídeo, ácido nucleico, molécula pequena ou outras drogas candidatas identificadas por ensaios de triagem descritos aqui) incluindo as etapas de (i) obter uma amostra pré-administração de um sujeito antes da administração do agente; (ii) detectar o nível de expressão de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, mRNA, ou DNA genômico na amostra de pré-administração; (iii) obter uma ou mais amostras pós-administração do sujeito; (iv) detectar o nível de expressão ou atividade de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, mRNA, ou DNA ge-

nômico nas amostras pós-administração; (v) comparar o nível de expressão ou atividade de polipeptídeo PD-L3, OR VISTA, mRNA, ou DNA genômico na amostra pré-administração com o polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, mRNA, ou DNA genômico na amostra ou amostras pós-administração; e (vi) alterar a administração do agente ao sujeito, por conseguinte. Por exemplo, a administração aumentada do agente pode ser desejável para aumentar a expressão ou a atividade de PD-L3 ou VISTA a níveis mais elevados do que detectado, ou seja, para aumentar a efetividade do agente. Alternativamente, a administração reduzida do agente pode ser desejável para reduzir a expressão ou a atividade de PD-L3 ou VISTA a níveis mais baixos do que detectado, ou seja, diminuir a efetividade do agente. De acordo com dita uma modalidade, a expressão ou atividade de PD-L3 ou VISTA pode ser utilizada como um indicador da efetividade de um agente, mesmo na ausência de uma resposta observável fenotípica.

D. Métodos de Tratamento

[00275] A presente invenção fornece métodos profiláticos e terapêuticos do tratamento de um sujeito em risco de (ou seja, suscetível a) um distúrbio caracterizado pela produção insuficiente ou excessiva de proteína PD-L3 ou VISTA ou produção de formas de proteínas PD-L3 ou VISTA que têm atividade reduzida ou anormal comparada com proteína PD-L3 ou VISTA tipo selvagem. Além disso, os anticorpos anti-PD-L3 ou VISTA da invenção podem ser utilizados para detectar e isolar proteínas PD-L3 ou VISTA, regular a biodisponibilidade de proteínas PD-L3 ou VISTA, e modular atividade PD-L3 ou VISTA, por exemplo, pela interação da modulação de PD-L3 ou VISTA com o seu contrarreceptor.

1. Métodos profiláticos

[00276] Em um aspecto, a invenção fornece um método para a prevenção em um indivíduo, de um distúrbio ou condição associado com

uma expressão ou atividade anormal ou indesejada de PD-L3 ou VISTA, por administração ao indivíduo de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou um agente que modula a expressão de PD-L3 ou VISTA, ou pelo menos uma atividade de PD-L3 ou VISTA. Indivíduos em risco de uma doença ou distúrbio, que é causado ou agravado por atividade ou expresso anormal ou indesejada de PD-L3 ou VISTA podem ser identificados por, por exemplo, qualquer um ou uma combinação de ensaios de diagnóstico ou de prognóstico, como aqui descrito. A administração de um agente profilático pode ocorrer antes da manifestação dos sintomas característicos da anormalidade de PD-L3 ou VISTA, de modo que uma doença ou distúrbio seja prevenida ou, em alternativa, atrasada na sua progressão. Dependendo do tipo de anormalidade de PD-L3 ou VISTA, por exemplo, um agente polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, agonista PD-L3 ou VISTA ou antagonista PD-L3 ou VISTA (por exemplo, um anticorpo anti-PD-L3 ou VISTA) pode ser utilizado para o tratamento do sujeito. O agente apropriado pode ser determinado com base em ensaios de triagem aqui descritos.

2. Métodos Terapêuticos

[00277] Um aspecto importante do invenção se refere a métodos de modulação da expressão ou atividade ou interação de PD-L3 ou VISTA com os seus parceiros de ligação naturais, relevantes para a terapia PD-L3 ou VISTA demonstraram inibir a coestimulação de CD28, para inibir a ativação do TCR de células imunes, para inibir a proliferação de células imunes ativadas (células T CD4+ e CD8+), para inibir a produção de citocinas pelas células T (IL-2, interferon gama) e para transmitir um sinal de inibição de células imunes. Assim, a atividade e/ou expressão de PD-L3 ou VISTA, bem como a interação entre PD-L3 ou VISTA e seus parceiros de ligação) em células T pode ser modulada de forma a modular a resposta imune. Porque PD-L3 ou VISTA se liga a receptores inibitórios (em células T), a suprarregulação de

atividade de PD-L3 ou VISTA deve resultar em infrarregulação de respostas imunes, enquanto a infrarregulação de atividade de PD-L3 ou VISTA deveria resultar suprarregulação de respostas imunes. Em uma modalidade preferencial, PD-L3 ou VISTA se liga a receptores inibitórios. Como observado anteriormente, contra intuitivamente anticorpos específicos PD-L3 ou VISTA produzidos pelo Requerente que *in vitro* (na presença de PD-L3 ou VISTA-Ig) melhoram as atividades supressivas de proteínas de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig (ou seja, estes anticorpos aumentam a supressão de atividades relacionadas a PD-L3 ou VISTA como PD-L3 ou VISTA na produção de citocinas, proliferação de célula T, diferenciação ou ativação e outras funções mencionadas anteriormente), comportam-se contrariamente ao esperado *in vivo*, ou seja, estes anticorpos demonstraram ser imunossupressores *in vivo*.

[00278] Métodos moduladores da invenção envolvem o contato de uma célula com um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou um agente que modula uma ou mais das atividades de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA associado à célula, por exemplo, um agente que modula a expressão ou atividade de PD-L3 ou VISTA e/ou modula a interação do PD-L3 ou VISTA e seus parceiros naturais de ligação. Um agente que modula atividade do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode ser um agente como aqui descrito, como um ácido nucleico ou um polipeptídeo, um parceiro de ligação que ocorre naturalmente de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou anticorpo PD-L3 ou VISTA, uma agonista ou antagonista PD-L3 ou VISTA, um peptidomimético de um agonista ou antagonista de PD-L3 ou VISTA, ou outra pequena molécula. As formas solúveis de PD-L3 ou VISTA podem também ser utilizadas para interferir com a ligação de PD-L3 ou VISTA a qualquer um dos seus parceiros de ligação natural ou ligantes.

[00279] Um agente que modula a expressão de PD-L3 ou VISTA é, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico antissenso, oligonucleo-

tídeo triplex, ribozima, ou um vetor recombinante para a expressão de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, um oligonucleotídeo complementar à área em torno de um local de iniciação de tradução do polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode ser sintetizado. Um ou mais oligonucleotídeos antissenso podem ser adicionados ao meio celular, tipicamente a 200 mug/mL, ou administrado a um paciente para prevenir a síntese de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. O oligonucleotídeo antissenso é absorvido pelas células e hibridiza com um mRNA PD-L3 ou VISTA para impedir a tradução. Alternativamente, um oligonucleotídeo que se liga a DNA de cadeia dupla para formar um construto triplex para evitar o desenrolamento do DNA e transcrição podem ser usados. Como resultado de uma delas, a síntese de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA é bloqueada. Quando a expressão de PD-L3 ou VISTA é modulada, preferencialmente, essa modulação ocorre por um meio diferente de knocking out o gene PD-L3 ou VISTA.

[00280] Os agentes que modulam a expressão, em virtude do fato de que controlam a quantidade de PD-L3 ou VISTA em uma célula, também modulam a quantidade total de atividade PD-L3 ou VISTA em uma célula. Em uma modalidade, o agente que modula PD-L3 ou VISTA estimula uma ou mais atividades PD-L3 ou VISTA. Exemplos de ditos agentes estimuladores incluem polipeptídeo ativo PD-L3 ou VISTA e uma molécula de ácido nucleico que codifica PD-L3 ou VISTA que tenha sido introduzido na célula. Em outra modalidade, o agente inibe uma ou mais atividades de PD-L3 ou VISTA. Exemplos de ditos agentes inibidores incluem moléculas de ácido nucleico antissenso PD-L3 ou VISTA, anticorpos anti- PD-L3 ou VISTA, inibidores PD-L3 ou VISTA, e os compostos identificados nos ensaios de triagem no sujeito. Em outra modalidade preferencial, um agente inibidor é uma combinação de um anticorpo anti- PD-L3 ou VISTA e um anticorpo anti-PD-LI ou anti-PD-L2. Estes métodos moduladores podem ser reali-

zados *in vitro* (por exemplo, através do contato da célula com o agente) ou, alternativamente, através do contato com um agente com células *in vivo* (por exemplo, através da administração do agente a um sujeito). Como tal, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo afetado com uma condição ou distúrbio que poderia se beneficiar de modulação pra cima ou para baixo de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, por exemplo, um distúrbio caracterizado por atividade indesejada, insuficiente, ou anormal de uma molécula de ácido nucleico ou polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Em uma modalidade, o método envolve a administração de um agente (por exemplo, um agente identificado por um ensaio de triagem aqui descrito), ou combinação de agentes que modulam (por exemplo, regula para cima ou para baixo) a expressão ou atividade de PD-L3 ou VISTA. Em outra modalidade, o método envolve a administração de uma molécula de ácido nucleico ou polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, como terapia para compensar a expressão ou atividade reduzida, anormal ou indesejada de PD-L3 ou VISTA.

[00281] As doenças que podem ser tratadas com os agentes de ligação de PD-L3 ou VISTA do sujeito são identificadas anteriormente e incluem vários distúrbios inflamatórias, autoimunes, câncer, alérgicos e infecciosos. Uma indicação preferencial é particularmente esclerose múltipla.

[00282] A estimulação da atividade PD-L3 ou VISTA é desejável em situações em que PD-L3 ou VISTA é anormalmente regulada para baixo e/ou em que a atividade aumentada de PD-L3 ou VISTA é susceptível de ter um efeito benéfico. Da mesma forma, a inibição da atividade de PD-L3 ou VISTA é desejável em situações em que PD-L3 ou VISTA é anormalmente regulada para cima e/ou em que a atividade reduzida de PD-L3 ou VISTA é susceptível de ter um efeito benéfico. Agentes exemplares para uso em modulação para baixo de PD-L3 ou

VISTA (ou seja, antagonistas de PD-L3 ou VISTA) incluem, por exemplo, moléculas de ácido nucleico antissenso, anticorpos que reconhecem e bloqueiam PD-L3 ou VISTA, combinações de anticorpos que reconhecem e bloqueiam PD-L3 ou VISTA e anticorpos que reconhecem e bloqueiam PD-L3 ou VISTA contrarreceptores, e compostos que bloqueiam a interação de PD-L3 ou VISTA com seus parceiros de ligação de ocorrência natural em uma célula imune (por exemplo, moléculas solúveis monovalentes PD-L3 ou VISTA; formas solúveis de moléculas PD-L3 ou VISTA que não se ligam a receptores Fc em células apresentadoras de antígeno; formas solúveis de parceiros de ligação PD-L3 ou VISTA; e compostos identificados em ensaios de triagem de sujeitos). Agentes exemplares para uso em modulação para cima PD-L3 ou VISTA (ou seja, agonistas PD-L3 ou VISTA) incluem, por exemplo, moléculas de ácido nucleico que codificam polipeptídeos PD-L3 ou VISTA, formas multivalentes de PD-L3 ou VISTA, compostos que aumentam a expressão de PD-L3 ou VISTA, compostos que aumentam a interação de PD-L3 ou VISTA com seus parceiros de ligação de ocorrência natural e células que expressam PD-L3 ou VISTA.

3. Infrarregulação de respostas imunes

[00283] Há várias modalidades da invenção para a suprarregulação da função inibitória de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, para desse modo regular para baixo as respostas imunes. A infrarregulação pode estar na forma de inibição ou bloqueio de uma resposta imune já em progresso ou pode envolver a prevenção da indução de uma resposta imune. As funções das células imunes ativadas podem ser inibidas por infrarregulação de respostas imunes celulares ou através da indução de anergia específica em células imunes, ou ambos. Por exemplo, em modalidades onde PD-L3 ou VISTA se liga a um receptor inibidor, as formas de PD-L3 ou VISTA que se ligam ao receptor inibidor, por exemplo, PD-L3 ou VISTA multivalente em uma superfície da célula,

pode ser usado para modular para baixo a resposta imune. Em uma modalidade da invenção, um anticorpo ativador utilizado para estimular a atividade de PD-L3 ou VISTA é um anticorpo biespecífico. Por exemplo, dito um anticorpo pode compreender um sítio de ligação PD-L3 ou VISTA e um outro sítio de ligação, que tem como alvo um receptor de superfície celular em uma célula imune, por exemplo, uma célula T, uma célula B ou uma célula mieloide. Em uma modalidade, dito um anticorpo, que compreende, além de um sítio de ligação PD-L3 ou VISTA, pode compreender ainda um sítio de ligação que se liga a um receptor de antígeno de célula B, um receptor de antígeno de célula T, ou um receptor Fc, de modo a direcionar a molécula a uma população de células específica. A seleção deste segundo antígeno ao anticorpo biespecífico fornece flexibilidade na seleção de população de células a ser alvo de inibição. Agentes que promovem uma atividade de PD-L3 ou VISTA ou que aumentam a interação de PD-L3 ou VISTA com seus parceiros naturais de ligação (por exemplo, PD-L3 ou VISTA ativando anticorpos ou PD-L3 ou VISTA ativando pequenas moléculas) podem ser identificados pela sua capacidade para inibir a proliferação de células imunes e/ou função efetora, ou para induzir a anergia, quando adicionada a um ensaio in vitro. Por exemplo, as células podem ser cultivadas na presença de um agente que estimula a transdução de sinal através de um receptor de ativação. Uma série de leituras reconhecidas na técnica de ativação das células pode ser utilizada para medir, por exemplo, a proliferação celular, ou função efetora (por exemplo, a produção de anticorpos, produção de citocinas, fagocitose) na presença do agente de ativação. A capacidade de um agente de teste para bloquear esta ativação pode ser facilmente determinada através da medição da capacidade do agente em efetuar uma diminuição na proliferação ou função efetora a ser medida. Em uma modalidade, em concentrações baixas de antígeno, interações de célula imune PD-L3 ou

VISTA inibem sinais fortes B7-CD28. Em outra modalidade, concentrações elevadas de antígeno, interações das células imunes PD-L3 ou VISTA pode reduzir a produção de citocinas, mas não inibe a proliferação de células T. Por conseguinte, a capacidade de um composto de ensaio para bloquear a ativação pode ser determinada através da medição da produção de citocinas e/ou proliferação em diferentes concentrações de antígeno.

[00284] Em uma modalidade da invenção, a tolerância é induzida contra antígenos específicos, por co-administração de um antígeno com um agonista PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, a tolerância pode ser induzida a polipeptídeos específicos. Em uma modalidade, as respostas imunes a alergênos ou polipeptídeos estranhos para a qual uma resposta imune é indesejável podem ser inibidas. Por exemplo, os pacientes que recebem o Fator VIII frequentemente geram anticorpos contra este fator de coagulação. A coadministração de um agente que estimula a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação com o seu parceiro natural de ligação, com fator recombinante VIII (ou fisicamente ligando PD-L3 ou VISTA ao Fator VIII, por exemplo, ligação cruzada) pode resultar em modulação para baixo de resposta imune.

[00285] Em uma modalidade, um agonista PD-L3 ou VISTA e outro agente que pode bloquear a atividade de coestimulação de receptores de uma célula imune pode ser utilizado para modular para baixo as respostas imunes. Moléculas exemplares incluem: formas de agonistas de outros ligantes PD, formas solúveis de CTLA-4, anticorpos anti-B7-1, anticorpos anti-B7-2 ou suas combinações. Alternativamente, dois peptídeos separados (por exemplo, um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA com formas de bloqueio de polipeptídeos B7-2 e/ou B7-1), ou uma combinação de anticorpos (por exemplo, ativando anticorpos contra um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA com bloqueio anticorpos monoclonais anti-B7-2 e/ou anti-B7-1) pode ser combinado como uma composição única ou

administrada separadamente (simultaneamente ou sequencialmente) para regular para baixo as respostas imunes mediadas por célula em um sujeito. Além disso, uma quantidade terapeuticamente ativa de um ou mais peptídeos contendo uma atividade de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA, juntamente com um ou mais polipeptídeos contendo B7-1 e/ou atividade B7-1, pode ser usada em conjunto com outros reagentes de modulação para baixo para influenciar as respostas imunes. Exemplos de outros reagentes de imunomoduladores incluem anticorpos que bloqueiam um sinal de coestimulação (por exemplo, contra CD28 ou ICOS), anticorpos que ativam um sinal inibitório via CTLA4, e/ou anticorpos contra outros marcadores de células imunes (por exemplo, contra CD40, ligante CD40, ou citocinas), proteínas de fusão (por exemplo, CTLA4-Fc ou PD-1-Fc) e imunossupressores (por exemplo, rapamicina, ciclosporina A ou FK506). Os polipeptídeos PD-L3 ou VISTA podem também ser úteis na construção de agentes terapêuticos que bloqueiam a função celular imune pela destruição das células. Por exemplo, partes de um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA podem ser vinculados a uma toxina para tornar um agente citotóxico capaz de desencadear a destruição de células ao qual se vincula.

[00286] Para preparar agentes citotóxicos, polipeptídeos da invenção podem ser ligados ou operativamente anexados, a toxinas usando técnicas que são conhecidas. Uma grande variedade de toxinas é conhecida que podem ser conjugadas a polipeptídeos ou anticorpos da invenção. Os exemplos incluem: várias toxinas úteis derivadas de planta, fungos ou bactérias, que, a título de exemplo, incluem: várias toxinas de cadeia A, particularmente cadeia A de ricina; ribossoma que inativa proteínas como saporina ou gelonina; alfa-sarcina; aspergilina; restrictocina; e ribonuclease como ribonucleases placentária, angiogênica, toxina da difteria ou exotoxina de pseudomonas. Uma fração de toxina preferencial para uso em conexão com a invenção é toxina ca-

deia A que foi tratada para modificar ou remover os resíduos de carboidratos, cadeia A deglicosilada. (Patente US 5.776.427).

[00287] A infusão de um ou uma combinação desses agentes citotóxicos (por exemplo, ricina PD-L3 ou VISTA (sozinho ou em combinação com o PD-L1-ricina), em um paciente pode resultar na morte de células imunes, particularmente tendo em conta o fato de que células imunes ativadas que expressam quantidades mais elevadas de parceiros de ligação PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, porque PD-1 é induzido na superfície de linfócitos ativados, um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA pode ser usado para direcionar o esgotamento dessas células específicas por mecanismos dependentes de Fc-R ou por ablação por conjugação de uma droga citotóxica (por exemplo, ricina, saporina ou caliqueamicina) ao polipeptídeo PD-L3 ou VISTA. Em outra modalidade, a toxina pode ser conjugada com um anticorpo anti- PD-L3 ou VISTA para direcionar para a morte de célula apresentadora de antígeno que expressa PD-L3 ou VISTA. Em outra modalidade, o anticorpo PD-L3 ou VISTA pode ser um anticorpo biespecífico. Tais anticorpos biespecíficos são úteis para o direcionamento de uma população celular específica, por exemplo, usando um marcador encontrado apenas em um determinado tipo de célula, por exemplo, linfócitos B, monócitos, células dendríticas ou células de Langerhans. Respostas imunes de regulação para baixo ativando atividade de PD-L3 ou VISTA ou a interação de célula imune PD-L3 ou VISTA (e, assim, estimulando a função de sinalização negativa de PD-L3 ou VISTA) é útil na modulação par abaixo da resposta imune, por exemplo, em situações de transplante de tecido, pele ou órgão, em doença de enxerto-versus- hospedeiro (GVHD), ou alergias, ou em doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla. Por exemplo, o bloqueio da função de célula imune resulta na destruição do tecido reduzida em transplante de tecido. Normalmente, em transplantes de tecidos, a re-

jeição do transplante é iniciada por meio de seu reconhecimento como estrangeiro por células do sistema imune, seguido por uma reação imune que destrói o transplante. A administração de uma molécula que promove a atividade de PD-L3 ou VISTA ou a interação do PD-L3 ou VISTA com seus parceiros de ligação natural em células imunes (como uma forma solúvel multimérica de polipeptídeo PD-L3 ou VISTA) sozinhos ou em conjunto com outro agente modulador para baixo antes ou no momento do transplante pode inibir a geração de um sinal de coestimulação. Além disso, a promoção da atividade de PD-L3 ou VISTA também pode ser suficiente para anergizar as células imunes, assim induzindo tolerância em um sujeito.

[00288] Para conseguir suficiente imunossupressão ou tolerância em um sujeito, também pode ser desejável bloquear a função coestimulatória de outras moléculas. Por exemplo, pode ser desejável bloquear a função de B7-1 e B7-2 através da administração de uma forma solúvel de uma combinação de peptídeos com uma atividade de cada um desses antígenos ou bloqueio de anticorpos contra esses antígenos (separadamente ou juntos em uma composição única) antes ou no momento do transplante. Alternativamente, pode ser desejável promover a atividade inibitória de PD-L3 ou VISTA e inibir a atividade coestimulatória de B7-1 e/ou B7-2. Outros agentes moduladores para baixo que podem ser usados em conexão com os métodos modulatórios para baixo da invenção incluem, por exemplo, agentes que transmitem um sinal inibitório via CTLA4, formas solúveis de CTLA4, anticorpos que ativam um sinal inibitório via CTLA4, bloqueando os anticorpos contra outros marcadores de células imunes, ou formas solúveis de outros pares de ligante do receptor (por exemplo, agentes que interrompem a interação entre CD40 e ligante CD40 (por exemplo, anticorpos ligante CD40)), anticorpos contra citocinas ou drogas imunossupressoras. Por exemplo, ativando a atividade de PD-L3 ou VISTA ou a

interação do PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural, é útil no tratamento de doenças autoimunes. Muitos distúrbios autoimunes são o resultado da ativação inadequada de células do sistema imune que são reativos contra auto-tecido e que promovem a produção de citocinas e auto-anticorpos envolvidos na patologia das doenças. Impedindo a ativação de células do sistema imunes autorreativas pode reduzir ou eliminar os sintomas da doença. A administração de agentes que promovem a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação de PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural, pode induzir tolerância específica de antígeno de células imunes autorreativas que poderia conduzir ao alívio de longo prazo da doença. Além disso, a co-administração de agentes que bloqueiam a coestimulação de células do sistema imune interrompendo as interações de ligante-receptor de moléculas B7 com receptores de coestimulação pode ser útil em inibir a ativação de células imunes para evitar a produção de auto-anticorpos ou citocinas, que podem estar envolvidas no processo de doença. A eficácia dos reagentes em prevenir ou aliviar distúrbios autoimunes pode ser determinada usando um número de modelos animais bem caracterizados de doenças autoimunes humanas. Exemplos incluem experimental encefalite autoimune experimental imune, lúpus eritematoso sistêmico em camundongos MRL/lpr/lpr ou NZB híbrido, artrite colágeno autoimune em murino, diabetes mellitus em camundongos NOD e ratos BB, miastenia gravis experimental em murino (ver Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-856).

[00289] A inibição de ativação de célula imune é terapeuticamente útil no tratamento de alergias e reações alérgicas, por exemplo, inibindo a produção de IgE. Um agente que promove a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação com PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural pode ser administrado a um sujeito alérgico para inibir as

respostas alérgicas mediadas por célula imune no sujeito. A atividade ou interação de PD-L3 ou VISTA com seus parceiros de ligação natural pode ser acompanhada por exposição a alergeno em conjunto com moléculas MHC apropriadas. As reações alérgicas podem ser sistêmicas ou locais na natureza, dependendo da via de entrada do alergeno e o padrão de deposição de IgE em mastócitos ou basófilos. Assim, as respostas alérgicas mediadas por célula imune podem ser inibidas localmente ou sistemicamente pela administração de um agente que promove a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interações de célula imune PD-L3 ou VISTA.

[00290] A inibição da ativação de células imunes através da estimulação da atividade PD-L3 ou VISTA ou interação de PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural, também pode ser importante terapeuticamente em infecções patogênicas de células imunes (por exemplo, por vírus ou bactérias). Por exemplo, na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a replicação viral é estimulada pela ativação de células imunes. A estimulação da atividade PD-L3 ou VISTA pode resultar em inibição da replicação viral e, assim, melhorar o curso da AIDS.

[00291] A infrarregulação de uma resposta imune através da estimulação da atividade PD-L3 ou VISTA ou interação de PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural, também pode ser útil no tratamento de um ataque autoimune de tecidos autólogos. Assim, as condições que são causadas ou exacerbadas por ataques autoimunes (por exemplo, doença cardíaca, infarto do miocárdio ou aterosclerose) podem ser amenizadas ou melhoradas, aumentando a atividade de PD-L3 ou VISTA ou ligação de PD-L3 ou VISTA ligando ao seu parceiro de ligação natural. Está, portanto, dentro do escopo da invenção para modular condições agravadas por ataques autoimunes, como distúrbios autoimunes (bem como condições como doença cardíaca, in-

farto do miocárdio e aterosclerose) estimulando atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu contrarreceptor.

4. Suprarregulação de respostas imunes

[00292] A inibição de atividade PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural, como um meio de suprarregulação de respostas imunes é ainda útil na terapia. A suprarregulação de respostas imunes pode estar na forma de melhorar uma resposta imune existente ou induzir uma resposta imune inicial. Por exemplo, melhorar uma resposta imune através da inibição da atividade de PD-L3 ou VISTA é útil em casos de infecções causadas por micróbios, por exemplo, bactérias, vírus ou parasitas, ou em casos de imunossupressão. Por exemplo, em uma modalidade, um agente que inibe atividade de PD-L3 ou VISTA, por exemplo, um anticorpo não ativador (ou seja, um anticorpo de bloqueio) contra PD-L3 ou VISTA, ou uma forma solúvel de PD-L3 ou VISTA, é terapeuticamente útil em situações onde a suprarregulação de anticorpo e respostas mediadas por célula, resultando em clearance mais rápido ou completo de um virus, bactéria ou parasita, poderia ser benéfico. Estas condições incluem doenças virais da pele como Herpes ou herpes, em que caso tal agente pode ser entregue topicamente na pele. Além disso, doenças virais sistêmicas como influenza, o resfriado comum e encefalite podem ser aliviados pela administração desses agentes sistemicamente. Em certos casos, pode ser desejável para administrar ainda outros agentes que regulam para cima respostas imunes, por exemplo, formas de membros da família B7 que transduz sinais via receptores de coestimulação, em ordem para ainda aumentar a resposta imune.

[00293] Alternativamente, as respostas imunes podem ser reforçadas em um paciente infectado removendo as células imunes do paciente, contatando as células imunes *in vitro* com um agente que inibe a atividade PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu par-

ceiro de ligação natural e reintroduzindo as células imunes estimuladas no paciente. Em outra modalidade, um método de melhorar a resposta imune envolve isolar células infectadas de um paciente, por exemplo, células infectadas por vírus, transfectando as mesmas com uma molécula de ácido nucleico que codifica uma forma de PD-L3 ou VISTA que não é possível ligar a seu parceiro de ligação natural, de modo que as células expressam todas ou uma parte da molécula PD-L3 ou VISTA em sua superfície e reintroduzir as células transfectadas no paciente. As células transfectadas podem ser capazes de impedir um sinal inibitório para, e ativando assim, as células imunes *in vivo*.

[00294] Um agente que inibe a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural, pode ser usado profilaticamente em vacinas contra vários polipeptídeos, por exemplo, polipeptídeos derivados de patógenos. Imunidade contra um patógeno, por exemplo, um vírus, pode ser induzida pela vacinação com um polipeptídeo viral juntamente com um agente que inibe a atividade de PD-L3 ou VISTA, em um adjuvante apropriado. Alternadamente, um vetor compreendendo genes que codificam para ambos antígeno patogênico e uma forma de PD-L3 ou VISTA que bloqueia a interação PD-L3 ou VISTA com células do sistema imune pode ser usado para a vacinação. Vacinas de ácidos nucleicos podem ser administradas por uma variedade de meios, por exemplo, por injeção (por exemplo, intramuscular, intradérmica, ou injeção biolística de partículas de ouro revestidas com DNA com um gene gun que usa um acelerador de partículas ou um gás comprimido para injetar partículas na pele (Haynes *et al*. (1996) J. Biotechnol. 44:37)). Alternativamente, as vacinas de ácidos nucleicos podem ser administradas por meios não invasivos. Por exemplo, DNA puro ou formulação lipídica pode ser liberado ao sistema respiratório ou direcionada para outro local, por exemplo, adesivos Peyers por liberação oral do DNA (Schubbert

(1997) Proc Natl. Acad. Sci. USA 94:961). Microorganismos atenuados podem ser usados para liberar em superfícies mucosas (Sizemore *et al*. (1995) Science 270:29).

[00295] Em outra modalidade, o antígeno na vacina é um autoantígeno. Dita uma vacina é útil na modulação de tolerância em um organismo. A imunização com autoantígeno e um agente que bloqueia a atividade PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural pode quebrar a tolerância (ou seja, interferir com a tolerância de um auto-antígeno). Dita uma vacina também pode incluir adjuvantes como alumínio ou citocinas (por exemplo, GM-CSF, IL-12, B7-1 ou B7-2). Em uma modalidade, um agente que inibe a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural, pode ser administrado com polipeptídeos de MHC de classe I por, por exemplo, uma célula transfectada para coexpressar um polipeptídeo PD-L3 ou VISTA ou bloqueio de anticorpo e MHC de classe I.alfa, polipeptídeo de cadeia e microglobulina beta2 para resultar na ativação de células T e fornecer imunidade a partir de infecção. Por exemplo, patógenos virais para as quais as vacinas são úteis incluem: hepatite B, hepatite C, vírus Epstein-Barr, citomegalovírus, HTV-1, HIV-2, tuberculose, malária e esquistosomose.

Em outra aplicação, a inibição da atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação de PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural, pode ser útil no tratamento da imunidade do tumor. As células do tumor (por exemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma ou carcinoma) podem ser transfectadas com uma molécula de ácido nucléico que inibe a atividade de PD-L3 ou VISTA. Estas moléculas podem ser, por exemplo, moléculas de ácido nucleico que são antissenso a PD-L3 ou VISTA, ou podem codificar anticorpos anti- PD-L3 ou VISTA não ativantes. Essas moléculas também podem ser a região variável do anticorpo de anti- PD-L3 ou VISTA. Se desejado, as

células do tumor podem também ser transfectadas com outros polipeptídeos que ativam coestimulação (por exemplo, B7-1 ou B7-2). As células do tumor transfectadas são retornadas ao paciente, o que resulta em inibição (por exemplo, inibição local) de atividade PD-L3 ou VISTA. Alternativamente, técnicas de terapia gênica podem ser usadas para direcionar uma célula tumoral para transfecção *in vivo*.

[00297] A estimulação de uma resposta imune a células tumorais também pode ser alcançada por inibir a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação com seu parceiro de ligação natural, tratando um paciente com um agente que inibe a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural. Exemplos preferenciais desses agentes incluem, por exemplo, moléculas de ácido nucleico antissenso, anticorpos que reconhecem e bloqueiam PD-L3 ou VISTA e compostos que bloqueiam a interação PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação que ocorre naturalmente em uma célula imune (por exemplo, moléculas de PD-L3 ou VISTA solúveis, monovalentes; formas solúveis de moléculas de PD-L3 ou VISTA que não se ligam a receptores Fc nas células apresentadoras de antígeno; formas solúveis de parceiros de ligação a PD-L3 ou VISTA; e os compostos identificados nos ensaios de triagem de sujeito). Além disso, células de tumor desprovida de moléculas MHC classe I ou moléculas de MHC classe II, ou que falham em expressar quantidades suficientes de moléculas de MHC classe I ou moléculas de MHC classe II, podem ser transfectadas com ácido nucleico codificando todas ou uma parte de (por exemplo, uma porção truncada de domínio citoplasmático) de um MHC classe I.alfa, polipeptídeo de cadeia e polipeptídeo microglobulina beta2 ou um MHC classe II .alfa, polipeptídeo de cadeia e um MHC classe II .beta, polipeptídeo de cadeia, assim, expressa polipeptídeos MHC classe I ou MHC classe II na superfície da célula. A expressão do MHC classe I ou classe II em conjunto com uma PD-L3 ou VISTA

inibindo o polipeptídeo ou ácido nucleico antissenso induz uma resposta imune mediada por célula T contra a célula de tumor transfectada. Opcionalmente, um gene que codifica um construto antissenso que bloqueia a expressão de um polipeptídeo associado a MHC de classe II, como a cadeia invariante, também pode ser cotransfectado com um DNA que codifica um polipeptídeo que inibe PD-L3 ou VISTA ou ácidos nucleicos antissenso para promover a apresentação de antígenos associados a tumor e induzir imunidade específica do tumor. A expressão de B7-1 por células de tumor murino negativo para B7-1 demonstrou induzir imunidade específica mediada por células T acompanhado por rejeição do tumor e prolongada proteção ao desafio de tumores em camundongos (Chen, L. *et al*. (1992) Cell 71 : 1093-1 102; Townsend, S. E. and Allison, J. P. (1993) Science 259:368-370; Baskar, S. *et al*. (1993) Proc Natl. Acad. Sci. 90:5687-5690). Assim, a indução de uma resposta imune mediada por célula imune em um sujeito humano pode ser suficiente para superar a tolerância especifica ao tumor no sujeito. Em outra modalidade, a resposta imune pode ser estimulada pela inibição da atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural, de modo que a tolerância pré-existente é superada. Por exemplo, respostas imunes contra antígenos ao qual um sujeito não pode montar uma resposta imune significativa, por exemplo, antígenos específicos do tumor, podem ser induzidos pela administração de um agente que inibe a atividade de PD-L3 ou VISTA ou a capacidade de PD-L3 ou VISTA em ligar ao seu parceiro de ligação natural, podem ser usadas como adjuvantes para impulsionar respostas a antígenos estranhos no processo de imunização ativa.

[00298] Em uma modalidade, as células do sistema imune são obtidas de um sujeito e cultivadas *ex vivo* na presença de um agente que inibe a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA

com seu parceiro de ligação natural, para expandir a população de células do sistema imune. Em outra modalidade as células imunes são então administradas a um sujeito. As células do sistema imune podem ser estimuladas a proliferar *in vitro* por, por exemplo, fornecer as células imunes com um sinal de ativação primária e um sinal de coestimulação, como é conhecido na técnica. Várias formas de polipeptídeos PD-L3 ou VISTA ou agentes que inibem a atividade PD-L3 ou VISTA também podem ser usadas para coestimular a proliferação de células do sistema imune. Em uma modalidade, as células do sistema imune são cultivadas *ex vivo* de acordo com os métodos descritos no pedido PCT No. WO 94/29436. A molécula coestimulatória pode ser solúvel, ligado a uma membrana celular ou ligado a uma superfície sólida, como uma conta.

[00299] Em uma modalidade adicional, na realização de qualquer um dos métodos descritos aqui, está no escopo da invenção para regular para cima uma resposta imune através da administração de um ou mais agentes adicionais. Por exemplo, o uso de outros agentes que estimulam a resposta imune, como citocinas, adjuvantes ou formas estimulatórios de moléculas de coestimulação ou seus ligantes pode ser usado em conjunto com um agente que inibe a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural.

E. Identificação das citocinas modulada por modulação de atividade de PD-L3 ou VISTA ou interações PD-L3 ou VISTA com seu contrarreceptor em células T

[00300] As moléculas PD-L3 ou VISTA aqui descritas podem ser usadas para identificar as citocinas que são produzidas por ou cuja produção é melhorada ou inibida em células imunes em resposta a modulação da atividade PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com seu parceiro de ligação natural. As células imunes podem ser estimuladas sub idealmente *in vitro* com um sinal de ativação primária,

por exemplo, as células T podem ser estimuladas com éster forbol, anticorpo anti-CD3 ou, preferencialmente, antígeno, em associação com uma molécula do MHC classe II e conferido um sinal coestimulação, por exemplo, por uma forma estimulante de antígeno da família B7, por exemplo, uma célula transfectada com ácido nucleico que codifica um polipeptídeo B7 e expressando o peptídeo em sua superfície, ou por uma forma solúvel, estimulatória do peptídeo. As células, em seguida, podem ser contatadas com células expressando PD-L3 ou VISTA (por exemplo, anticorpos contra PD-L3 ou VISTA. Citocinas conhecidas liberadas no meio podem ser identificadas por ELISA ou a capacidade de um anticorpo que bloqueia a citocina para inibir a proliferação das células imunes ou proliferação de outros tipos de células que são induzidas pela citocina. Por exemplo, um kit de ELISA de IL-4 está disponível de Genzyme (Cambridge, Massachusetts), como é um anticorpo de bloqueio da IL-7. Os anticorpos de bloqueio contra IL-9 e IL-12 estão disponíveis de Genetics Institute (Cambridge, Mass.). O efeito de estimular ou bloquear a atividade PD-L3 ou VISTA ou PD-L3 ou VISTA PD-L3 ou VISTA e seu parceiro de ligação sobre o perfil de citocinas, em seguida, pode ser determinado. Como observado acima e mostrado nos exemplos PD-L3 ou VISTA aparentemente suprime a expressão de IL-2 e interferon gama por células do sistema imune.

[00301] Um ensaio de coestimulação *in vitro* de células imunes, conforme descrito acima também pode ser usado em um método para identificar novas citocinas que podem ser moduladas pela modulação da atividade de PD-L3 ou VISTA. Por exemplo, onde a estimulação da via CD28/CTLA4 parece aumentar a secreção de IL-2, estimulação da via ICOS parece aumentar a secreção de IL-10 (Hutloff*et al*. (1999) Nature 397:263). Se uma determinada atividade induzida mediante coestimulação, por exemplo, proliferação de células imunes, não pode ser inibida pela adição de anticorpos de bloqueio para citocinas co-

nhecidas, a atividade pode resultar da ação de uma citocina desconhecida. Após a coestimulação, esta citocina pode ser purificada do meio por métodos convencionais e sua atividade medida pela sua capacidade de induzir a proliferação das células imunes.

[00302] Para identificar citocinas que podem desempenhar um papel na indução de tolerância, um ensaio de coestimulação de células T *in vitro* como descrito acima pode ser usado. Neste caso, as células T poderiam dar o sinal de ativação primária e contatadas com uma citocina selecionada, mas não dariam o sinal de coestimulação. Depois de lavar e descansar as células do sistema imune, as células seriam novamente desafiadas ambas com um sinal de ativação primário e um sinal de coestimulação. Se as células do sistema imune não responderem (por exemplo, proliferar ou produzir citocinas) tornaram-se tolerantes e as citocinas não impediram a indução de tolerância. No entanto, se as células do sistema imune respondem, a indução de tolerância foi impedida pela citocina. As citocinas que são capazes de evitar a indução de tolerância podem ser direcionadas para bloqueio *in vivo* em conjunto com reagentes que bloqueiam antígenos de linfócito B como meio mais eficiente para induzir a tolerância em receptores de transplante ou sujeitos com doenças autoimunes. Por exemplo, pode-se administrar um anticorpo de bloqueio da citocina a um sujeito juntamente com um agente que promove a atividade de PD-L3 ou VISTA ou interação PD-L3 ou VISTA com um parceiro de ligação.

[00303] Assim, para resumir um novo membro da família de ligante de morte programada (PDL) agora foi identificado que é expresso pelas células Treg. Esta nova proteína foi designada PD-L3 ou VISTA. Os receptores desta família PD-L tipo-I são proteínas transmembrana que contêm um único domínio de IgV, enquanto os ligantes são proteínas transmembrana tipo I, expressando ambos domínios extracelulares de IgV e IgC. Como outros membros da família PDL, PD-L3 ou

VISTA coestimula proliferação de αCD3 de células T *in vitro*. Além disso, a expressão do PD-L3 ou VISTA é aumentada em Treg ativada por αCD3 e reduzida na presença de αGITR.

[00304] Uma segunda proteína, como TNF também foi identificada como sendo regulada pra cima na estimulação αCD3/αGITR. Esta proteína foi designada Treg-sTNF. Estas proteínas podem estar envolvidas em supressão paracrina e dependente de contato de imunidade e, portanto, são úteis para modulação (por exemplo, inibindo ou estimulando) uma resposta imune e no tratamento de doenças e condições que envolvem sinalização Treg. Por exemplo, a proteína de PD-L3 ou VISTA pode ser usada como um sinal coestimulatório para estimular ou reforçar a ativação de células imunes. Proteínas PD-L3 ou VISTA e agentes de ligação a PD-L3 ou VISTA e agonistas e antagonistas PD-L3 ou VISTA são especialmente úteis no tratamento de condições imunes em que a regulação de imunidade de célula T é desejada, por exemplo, modulação de ativação de célula T, diferenciação e proliferação, e, em particular, modulação de proliferação de célula T CD4+ e CD8+, produção de citocina, e respostas de célula T durante interações cognadas entre as células T e ACPs derivadas de mieloide.

[00305] Esta invenção ainda é ilustrada através de exemplos a seguir, que não devem ser interpretados como limitantes. Os conteúdos de todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados ao longo deste pedido, bem como figuras e listagem de sequência, são incorporados aqui por referência.

Exemplos

[00306] Os seguintes materiais e métodos foram usados nos exemplos que se seguem: Materiais e métodos

Perfilamento de expressão

[00307] Para facilitar comparações com perfis de expressão estabelecidos foram utilizados células Treg, condições de crescimento e ati-

vação padrões foram empregados (McHugh, *et al*. (2002) supra). Resumidamente, células Treg recém-isoladas (-96% positivas) foram inoculadas em 106/mL em meio RPMI completo complementado com 10% soro bovino fetal e 100 unidades de IL-2 em uma placa de 24 poços pré-revestida com anti-CD3 com ou sem anti-GITR (DTA-I)(Shimizu, *et al*. (2002) supra). As células foram cultivadas em 37ºC por 0 e 12 horas, RNA foi purificado e subsequentemente analisado usando um arranjo de oligonucleotídeo A430 de genoma de camundongo Affymetrix ®.

[00308] Comparando os dados dos grupos de células T CD4+CD25+ em repouso ou ativadas, padrões de expressão do gene demonstraram serem semelhantes àqueles estabelecidos na técnica (Gavin, *et al*. (2002) supra; McHugh, *et al*. (2002) supra). Para identificar genes regulados por sinalização GIRT, perfis de expressão de gene foram comparados entre as populações de célula diferentes, com ou sem tratamento anti-GITR. Uma lista de conhecidos, assim como genes desconhecidos, foi compilada incluindo PD-L3 ou VISTA e Treg-sTNF não caracterizadas anteriormente.

Camundongos

[00309] Camundongos C57BL/6 e ratos transgênicos OTII CD4 foram adquiridos do laboratório Jackson. Camundongos repórter FoxP3-GFP foram como descritos anteriormente por Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L. Farr A.G. e Rudensky A.Y. (2005). Regulatoru T cell lineage specification by the forkhead transcription factor-foxp3. Immunity 22, 329-341 e foram generosamente fornecidos por Alexander Rudensky, Universidade de Washington, Escola de Medicina, Seattle, WA. Os camungondos PD-1 KO foram generosamente fornecidos por Dr. Tasuku Honjo (Universidade de Quioto, Japão) Nishimura, H., Nose, M., H., Minato, N., e Honjo, T. (1999). Developmento of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding na ITIM

motif-carrying immunoreceptor, Immunity 11,141-151; Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., e Honjo T. (2001), Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science 291, 319-322. Todos os animais foram mantidos em uma instalação isenta de patógenos em Darthmouth Medical School.

Abs, linhagens celulares e reagente:

[00310] Anticorpos αCD3 (2C11), αCD28 (PV-1), αCD4 (GK1.5), αCD8 (53-6.7), αCD11b (Ml/70), OF4/80 (BM8), αCD11c (N418), αNK1. l (PK136), αGrl (RB6-8C5), αPD-Ll (MIN5), αPD-L2 (TY25), αB7-H3 (M3.2D7), αB7-H4 (188) foram adquiridos de Ebioscience.LPS (Sigma), DPeprotech de LFN murino recombinante), LL-2 humana (Peprotech), proteína de fusão solúvel PD-L1-Ig (sistemas R&D) foram usados nas concentrações indicadas. Adjuvante completo de Freund (CFA) e ovalbumina de frango (OVA) foram comprados da Sigma. A linhagem de células CHO expressando molécula MHCII I-Ad e molécula de coestimulação B7-2 foi gentilmente cedida pelo Dr. Arlene Sharpe (Harvard Medical School).

Clonagem molecular de PD-L3 ou VISTA, produção de retrovírus e transdução retroviral de células

[00311] PD-L3 ou VISTA de comprimento completo foi clonada a partir de células T CD4+ purificadas murinas. O RNA total foi isolado de células T CD4+ usando o kit da Qiagen RWAmini. cDNA foi gerado usando o kit de síntese Bio-Rad iScriptTM cDNA. PD-L3 ou VISTA comprimento total foi amplificada e clonada em sítio ECorI-XhoI de um vetor retroviral pMSCV-IRES- GFP Zhang, X., e Ren, R. (1998). Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony- stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. Blood 92, 3829-3840, em que o fragmento IRES-GFP foi substituído por

RFP, assim, resultando em uma proteína de fusão de PD-L3 ou VISTA fundida a N-terminal de RFP. Retrovírus isento de helper foi gerado em células T HEK293 por transfecção transitória de vetor retroviral PD-L3 ou VISTA-RFP junto com vetor de empacotamento ecotrófico pCL-Eco (IMGENEX corp.). A transdução retroviral de células EL4 de linhagem de célula T murina, ou DCs derivadas de medula óssea foi conduzida por infecção girando a 2000rpm em RT por 45min na presença de 8μg/mL polybrene (Sigma).

Produção de proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig

[00312] O domínio extracelular do PD-L3 ou VISTA (aminoácido 32-190) foi amplificado e clonado nos sítios SpeI-BamHI do vetor parental CDM7B. Hollenbaugh, D., Douthwright, J., McDonald, V. e Aruffo, A. (1995). J Immunol Methods 188, 1-7. Este vetor contém a forma mutante das regiões constante e dobradiça de IgG1 humana, que reduziu muito a ligação a receptores de Fc. O vetor resultante CDM7B-PD-L3 ou VISTA foi co-transfectado com um vetor de expressão DHFR vetorial pSV-dhfr (McIvor, R. S., and Simonsen, C. C. (1990)). Nucleic Acids Res 18, 7025-7032 em linhagem de célula CHO (dhfr-) (ATCC #CRL-9096). Clones de células CHO estáveis que expressam PD-L3 ou VISTA-Ig foram selecionados em meio MEM-alfa sem nucleotídeos (Invitrogen). Mais amplificação com 0,5-1 μM metotrexato (Sigma M9929) gerou clones que expressam altos níveis de proteína de fusão solúvel PD-L3 ou VISTA-Ig. A proteína de fusão foi ainda mais purificada de sobrenadante da cultura usando cromatografia de afinidade de coluna padrão de proteína G.

Geração de anticorpos monoclonais PD-L3 ou VISTA

[00313] Hamsters armênios foram imunizados 4x vezes com células EL4 que super expressam PD-L3 ou VISTA-RFP semanalmente, então estimulados com proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig emulsificada em CFA. Quatro semanas após o estímulo, hamsters foram impulsio-

nadas novamente com a proteína de fusão solúvel PD-L3 ou VISTA-Ig. Quatro dias após o último estímulo, células de baço de hamster foram coletadas e fundidas à célula de linhagem de mieloma SP2/0-Agl4 (ATCC #CRL-1581), utilizando técnicas de fusão de hibridoma padrão Shulman, M., Wilde, C. D. e Kohler, G. (1978), A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies, Nature 276, 269-270. Clones de hibridoma que secretam anticorpos específicos PD-L3 ou VISTA foram selecionados após limitar a diluição e triagos por métodos de ELISA e citometria de fluxo.

RNA e RT-PCR

[00314] O RNA total de várias amostras de tecido de camundongo ou tipos de células hematopoiéticas purificados foram coletados usando o método TrizolTM (Invitrogen), seguindo instruções da empresa. Os cDNAs foram preparadas usando o kit de síntese do cDNA de iScriptTM (Bio-Rad). Quantidades iguais de cDNAs de tecido (10ng) foram usados para reações de RT-PCR para amplificar PD-L3 ou VISTA de comprimento completo. Os produtos de PCR foram visualizados depois de correr através de um gel de agarose a 1%.

Citometria de fluxo

[00315] Análise de citometria de fluxo foi realizada em FACSCAN, usando o software CellQuest (BD Bioscience). A análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo (Treestar).

Preparação de célula

[00316] Células T CD4+ totais foram isoladas de camundongos naive, usando o kit de isolamento de célula T CD4+ total (Miltenyi). Quando indicado, células T CD4+ enriquecidas foram classificadas em populações naive (CD44low CD25-CD62Lhi) e de memoria (CD44hi CD25-CD62Llow) sorteadas por fluxo. Para ensaios de proliferação *in vitro*, células T CD4+ foram marcados com 5 μm CFSE (Molecular Probes) por 10 min a 37°C e lavadas duas vezes antes de ser estimulado.

Ensaio de ativação de células T ligadas a placa *in vitro*

[00317] Células T CD4+ purificadas (100.000 células por poço) foram cultivadas em placas de poços de fundo plano, na presença de anti-CD3 (clone 2C11) e PD-L3 ou VISTA-Ig ou controle-Ig em proporções de concentração indicadas. Por exemplo, para uma titulação de faixa completa, as placas de 96 poços foram revestidas com 2,5µg mL de um aCD3 misturado junto com 1,25µg/mL (proporção 2: 1), 2,5 µg/mL (proporção 1:1), 5 µg/mL (proporção 1:2), ou 10 µg/mL (proporção 1:4) PD-L3 ou VISTA-Ig ou proteína de controle -Ig em PBS 4ºC durante a noite. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS antes de adicionar as células T CD4+. Culturas em replicata em meio completo RPMI 1640 complementado com 10% FBS, 10 mM HEPES, 50 µ M β-ME, Penicilina/Estreptomicina L-Glutamina. Quando indicado, 100U/mL de IL-2 humano (PeproTech) ou quantidade titulada de CD28 (clone PV-1, Bio X cell) foram revestidas juntos com CD3 para resgatar os efeitos inibitórios do PD-L3 ORVISTA-Ig. As culturas foram analisadas no dia 3 para perfis GFSE, ou de acordo com um curso de tempo como indicado.

Cultura de DCs derivadas de medula óssea, transdução retroviral e estimulação das células T CD4+ transgênicas

[00318] DCs derivadas de medula óssea foram geradas como descrito em Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., e Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods 223, 77-92; Son, Y. I., Egawa, S., Tatsumi, T., Redlinger, R. E., Jr., Kalinski, P., e Kanto, T. (2002). A novel bulk- culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. J Immunol Methods 262, 145-157 com algumas modificações. Brevemente, no dia 0, células da medula óssea foram isoladas de tíbia e fêmur irrigando com agulha 27G. Após a lise

dos glóbulos vermelhos, células de medula óssea 1-2 x 106 foram ressupensas em 1 mL de meio RPMI 1640 completo, contendo 20 ng/mL de GM-CSF (Peprotech Inc), em placas de cultura de célula 6x (Nunc, Inc.). 2 mL de sobrenadante contendo RFP ou PD-L3 ou VISTA-RFP retrovírus foi adicionado às células de medula óssea. Polybrene (Sigma) também foi adicionado a uma concentração final 8 µg/mL. A infecção foi realizada girando a placa a 2000 rpm por 45 min em RT As células foram cultivadas então por mais 2 horas antes de meio fresco ser adicionado. Procedimento de infecção semelhante procedimento foi repetido no dia+1, dia+3, dia+5 e dia+7. Células frouxamente aderentes (90% são CD11c+) foram coletadas no dia+10 e células CD11c+ RFP+ duplas positivas foram classificadas e usadas para estimular células T CD4+ OT-II transgênicas. Para ensaios de proliferação de célula T OT-II, 100.000 células T CD4+ OT-II marcadas com CFSE foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo redondo com 30.000 classificadas RFP+ ou PD-L3 ou VISTA- RFP+ BMDCs, na presença de quantidade titulada de peptídeo sintético de OVA323-339 (Anaspec). A proliferação de células T OT-II foi analisada em 72 horas examinando perfis CFSE.

Estudos de expressão do PD-L3 ou VISTA em resposta à imunização

[00319] Para imunizar camundongos transgênicos DO 11.10, 300 µg OVA (Sigma) foram emulsificados em CFA (200 µl), e injetados subcutâneamente nos flancos de camundongos. Os linfonodos inguinais de drenagem e não drenagem foram coletados em pontos de tempo indicados. As suspensões celulares simples foram preparadas e analisadas para a expressão do PD-L3 ou VISTA e outros marcadores de superfície por citometria de fluxo.

Atividade inibitória de PD-L3 ou VISTA.

[00320] A atividade inibitória de PD-L1 foi revelada usando células apresentadoras de antígeno que super expressam PD-L1 *in vitro* com

células T transgênicas de receptor de antígeno de célula T CD4+ e CD8+ e estimulação de antígeno (Carter, *et al*. (2002) Eur. J. Immunol. 32:634- 43). De modo semelhante, o lentivetor revelado aqui, que expressa PD-L3 ou VISTA de comprimento completo, é transduzido em linhagens de células que expressam complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC) e MHC de classe I. A resposta de células T transgênicas TEa Tg ou 2C ao antígeno apresentado por vetor vazio transduzido ou células apresentadoras de antígeno transduzido PD-L3 ou VISTA é determinada de acordo com métodos estabelecidos.

[00321] Expressão de Proteína. Os padrões de expressão em subconjuntos linfoides e células dendríticas, bem como tecidos não hematopoiéticos, é determinado por RT-PCR e análise western blot usando protocolos padrões com o anticorpo de coelho aPD-L3 ou VISTA revelado aqui.

[00322] Produção do anticorpo Monoclonal. PD-L3 ou VISTA foi super expresso em linhagem de células B de murino A20, e a linhagem celular recombinante foi usada para imunizar hamsters armênios. Após 5x de imunização de célula, hamsters foram estimulados com proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig purificada emulsionada em CFA. Quatro semanas mais tarde, um estímulo final foi fornecido com solúvel PD-L3 ou VISTA-Ig. Posteriormente, fusões de esplenócitos de hamster com células de SP2/0 foram realizadas no dia 4. Dezesseis diferentes clones foram identificados que reconheceram a proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig por ELISA, bem como PD-L3 ou VISTA corados, mas não PD-L1 super expresso na linhagem de célula T EL4 murino. Onze dos clones foram subclonados com êxito e preparados para a avaliação da sua capacidade em corar PD-L3 ou VISTA endógeno em células e tecidos e bloquear funções de PD-L3 ou VISTA.

Ensaios de proliferação:

[00323] Ensaios de proliferação de células T CD4 *in vitro* foi proje-

tado para a triar atividade PD-L3 ou VISTA. Neste ensaio, as células T foram estimuladas por anti-CD3 imobilizado em poços de microplacas, que se ligam de modo cruzado a receptores de célula T. Usando uma proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig, que é composta de domínio extracelular de PD-L3 ou VISTA fundida à porção Fc de IgG humano, a atividade de mAb PD-L3 ou VISTA foi detectada em duas diferentes configurações. Primeiro, quando mAb foi co-imobilizada com αCD3, este potencialmente inibiu a proliferação de célula T, somenta na presença de proteína de fusão solúvel adicionada PD-L3 ou VISTA-Ig. Esta atividade era dependente da capacidade de PD-L3 ou VISTA-Ig para se ligar ao mAb imobilizado no poço. Usando esta forma do ensaio, foram identificados clones que foram de alta, intermediária ou baixa atividade supressiva. Segundo, quando mAb foi adicionado como um reagente solúvel, este exerceu potente atividade supressiva em proliferação de célula T, sinergizando com a proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig imobilizada. Nesta forma de ensaio, os clones foram identificados que foram de várias atividades supressivas.

EXEMPLO 1: Análise de clonagem e sequência de PD-L3 ou VISTA.

[00324] PD-L3 ou VISTA e Treg-sTNF foram identificados por perfilhamento de transcrição global de Treg em repouso, Treg ativado com αCD3 e Treg ativado com αCD3/αGITR. αGITR foi selecionado para esta análise como acionamento do GITR em Treg demonstrou extinguir sua atividade supressora dependente de contato (Shimizu, *et al*. (2002) supra). PD-L3 ou VISTA e Treg-sTNF foram identificados em arranjos de DNA AFFIMETRIX(R) baseado em seus padrões de expressão únicos (Tabela 1). PD-L3 ou VISTA apresentou um aumento na expressam em Treg ativado por αCD3 e expressão reduzida na presença de αGITR; e Treg-sTNF apresentou um aumento dependente de αCD3/αGITR na expressão.

[00325] Células T CD4+CD25+ purificadas foram estimuladas em cultura durante a noite com nenhum, αCD3, ou αCD3/αGITR, e RNA isolado para análise de PCR em tempo real. Expressão listada é relativa à actina.

Tabela 1.

mRNA	Expressão Relativa		
	Nenhum	αCD3	αCD3/αGITR
PD-L3 OR VISTA	6	10	7
T^{reg}-sTNF	0,2	0,3	1,5

[00326] Análise de Affymetrix de nTregs CD25+ CD4+ ativada vs. em repouso revelou a expressão de um produto de gene (RIKEN cDNA 4632428N05, ou 4632428N05Rik) com função desconhecida, mas com homologia de sequência à superfamília de Ig.

[00327] Mais especificamente, um produto de gene 930 bp foi clonado da biblioteca de cDNA de célula CD4+ T, que corresponde ao tamanho previsto e sequência. Silico-sequência e análise estrutural prevê uma proteína transmembrana de 309 aminoácidos após a maturação, com um domínio extracelular de 159 aminoácidos, um domínio transmembrana de 22 aminoácidos e uma cauda citoplasmática de 95 aminoácidos (Figura 1A). Alinhamento da sequência de aminoácidos revela um domínio tipo imunoglobulina (Ig) tipo V homólogo a família de ligantes B7 como PD-L1, PD-L2, B7-H3 e B7-H4, bem como os receptores de família B7 (ou seja, PD-1, CTLA-4, CD28, BTLA, ICOS) (Figura 1B-C). Embora a identidade de sequência dos domínios Ig-V entre ligantes de família B7 e receptores em geral não é muito alta (<40%), o domínio do Ig-V de 4632428N05Rik tem a mais alta homologia com ligantes de família B7 de PD-L1 e PD-L2. O alinhamento da sequência também revela várias cisteínas altamente conservadas (Figura lB) que são importantes para a formação de ligação de dissulfeto intra-cadeia, que é característica de ligantes da família B7 Sica *et al*., (2003). Immunity 18, 849-861.

[00328] O domínio extracelular de 4632428N05Rik contém apenas o domínio de Ig-V mas não tem o domínio do Ig-C (Figura 1B-C). Esta característica única é característica dos receptores da família B7 e distingue o 4632428N05Rik de todos os outros ligantes da B7, que contêm domínios Ig-V e Ig C. Freeman, G. J. (2008). Proc Natl Acad Sci U S A 105, 10275-10276; Lazar-Molnar *et al*., (2008). Proc Natl Acad Sci U S A 105, 10483- 10488; Lin *et al*., (2008), Proc Natl Acad Sci U S A 105, 301 1-3016; Schwartz *et al*., (2001), Nature 410, 604-608.; Stamper *et al*., (2001), Nature 410, 608-61. .Consistentemente, a análise filogenética usando algoritmo PhyML (probabilidade de filogenética máxima) colocou 4632428N05Rik em uma distância evolutiva mais perto com receptores de família B7, em particular com o PD-1, do que os ligantes de família B7 (Figura 2), Guindon S. e Gascuel, O. (2003). Um algoritmo simples, rápido e preciso para estimar grandes filogenias por probabilidade máxima. Syst Biol 52, 696-704 . No entanto, a cauda citoplasmática da PD-L3 ou VISTA não contém qualquer domínio de sinalização (por exemplo ITIM, ITAM ou ITSM), que são os domínios de assinatura dos receptores de família B7. Sharpe, A. H. e Freeman, J. G. (2002). A superfamília B7-CD28. Nat Rev Immunol 2, 116-126. É, portanto, a hipótese de que, apesar de sua estreita relação evolutiva com os receptores inibitórios PD-1, 4632428N05Rik representa um novo membro da família de ligante B7. Com base nestas características estruturais e filogenéticas, esta molécula foi nomeada PD-1-expresso como ligante (PD-L3 ou VISTA). PD-L3 ou VISTA é também altamente conservado entre o ortólogos de camundongo e humano, compartilhando 77% de identidade de sequência (Figura 1D).

[00329] A sequência de ácido nucleico que codifica PD-L3 ou VISTA de camundongo é definida aqui como SEQ ID NO: 1 e a sequência da proteína PD-L3 ou VISTA de cadmungondo é definida como SEQ ID NO:2.

[00330] O homólogo humano do PD-L3 ou VISTA está localizado no cromossoma 10 (72,9 Mb) e composto de 6 éxons assim gerando um transcrito de 4689 bases em comprimento que codifica para um resíduo de proteína 311. A sequência de codificação de mRNA do homólogo humano é fornecida em número de adesão GENBANK NM_022153 e a sequência da proteína dada como NP_071436. A sequência de ácido nucleico que codifica PD-L3 ou VISTA humana é definida aqui como SEQ ID NO:3 e a sequência da proteína PD-L3 ou VISTA humana é definida como SEQ ID NO:4. Genes de camundongos e humanos compartilham 74% de homologia e são 68% idênticos em nível de proteína. Homólogos foram ainda identificados em *Rattus norvegicus* no cromossoma 20 (27,7 Mb; número de adesão GENBANK BC098723), bem como o *Fugu rubripes* e *Danio rerio*. Em modalidades particulares, proteínas PD-L3 ou VISTA da presente compartilham a sequência atual de aminoácidos comuns estabelecidos em SEQ ID NO:5.

EXEMPLO 2: Estudos de expressão do PD-L3 ou VISTA por análise de RT-PCR e citometria de fluxo

[00331] Como mostrado nos experimentos na Figura 3, análise RT-PCR foi usada para determinar o padrão de expressão de RNAm de PD-L3 ou VISTA em tecidos de camundongo (Figura 3A). PD-L3 ou VISTA manifesta-se principalmente nos tecidos hematopoiéticos (baço, timo, medula óssea), ou tecidos com ampla infiltração de leucócitos (ou seja, pulmão). A fraca expressão também foi detectada em tecidos não hematopoiéticos (ou seka, coração, rins, cérebro e ovário). A análise dos vários tipos de células hematopoiéticas revela expressão do PD-L3 ou VISTA em macrófagos peritoneais, monócitos CD11b+ esplênicos, DCs CD11c+, células T CD4+ e células T CD8+, mas reduz o nível de expressão de células B (Figura 3B). Este padrão de expressão também é amplamente consistente com o banco de dados de arranjo de gene

(Genomics Institute da Novartis Research Foundation). Su *et al*., (2002), Proc Natl Acad Sci U S A 99, 4465-4470, bem como banco de dados NCBI GEO (ônibus de expressão gênica) (Figura 4A-D).

[00332] A fim de estudar a expressão da proteína, anticorpos monoclonais específicos de hamster 8D8 e 6E7 PD-L3 ou VISTA foram produzidos. A especificidade é demonstrada por coloração positiva em células T EL4 murina que super expressa PD-L3 ou VISTA, mas coloração negativa em células EL4 que super expressão PD-L1 (Figura 5).

[00333] Anticorpos policlonais e monoclonais foram levantados contra PD-L3 ou VISTA. Usar um anticorpo anti-PD-U OR VISTA de coelho, proteína PD-L3 ou VISTA foi localizada a órgãos linfoides e proeminentemente encontradas no tecido cerebral. Dos anticorpos monoclonais identificados, a especificidade da αPD-L3 ou VISTA clone 8D8 foi ainda avaliada. Nesta análise, o clone 8D8 foi testado por ligação contra um painel de moléculas de proteína de fusão tipo PD-L Ig incluindo CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7- 1, B7-2, PD- L3 OR VISTA e hlg. Os resultados desta análise indicam que 8D8 3 αPDL foi altamente específico para o PD-L3 ou VISTA.

[00334] Especificamente, usando o mAb anti-PD-L3 ou VISTA clone 8D8, expressão de PD-L3 ou VISTA foi analisada em células hematopoiéticas por citometria de fluxo. Camundongos repórter foxp3GFP *knock-in* foram usados para distinguir CD4+ nTregs (34). Em órgãos linfoides periféricos (baço e linfonodos), a expressão significativa é observavdo em todos os subconjuntos de células T CD4+ (ver total de célula T CD4+ T, ou células T Foxp3- naive e células T Foxp3+ nTreg, e células T de memória CD4+), enquanto que células T CD8+ expressam marcadamente quantidade inferior de PD-L3 ou VISTA de superfície (Figura 3C). No timo, a expressão de PD-L3 ou VISTA é negativa em timocitos duplos positivos CD4+CD8+, baixa em células positivas simples CD4, e detectável em células positivas simples CD8. Em se-

guida, uma correlação forte de expressão alta PD-L3 ou VISTA com marcador CD11b pode ser observado em ambas células esplênicas e peritoneais, incluindo ambos macrófagos F4/80 e CD11c+ DCs mieloides (Figura 3D-E). Por outro lado, as células B e células NK são principalmente negativas para a expressão de PD-L3 ou VISTA. Uma pequena porcentagem de granulócitos Gr-1+ expressam também PD-L3 ou VISTA (Figura 3F).

[00335] Um padrão de expressão diferencial é mostrado na mesma linhagem de células de diferentes órgãos linfoides (Figura 3G). Para células T CD4+ e monócitos intermediários CD11b, o nível de expressão após o padrão de linfonodo mesentérico > LN periférico e baço > cavidade peritoneal e sangue. Este padrão é que menos pronunciado para células CD11bhi. Estes dados sugerem que a expressão de PD-L3 ou VISTA em certos tipos de células pode ser regulada por maturidade celular e/ou microambiente de tecido.

[00336] Além das células recém-isoladas, a expressão de PD-L3 ou VISTA foi analisada em células T CD4+ esplênicas, monócitos CD11bhi e DCs CD11c+ em cultura *in vitro* com e sem ativação (Figura 6). As células do baço foram cultivadas com meio, ou com anti-CD3 (para ativar células T), ou com IFN□ e LPS (para ativar monócitos e DCs) por 24hrs antes de serem analisadas para a expressão de PD-L3 ou VISTA e outros ligantes de família B7 (por exemplo PD-L1, PD-L2, B7-H3 e B7-H4). Esta comparação revelou padrões de expressão distintivos entre estas moléculas. Expressão de PD-L3 ou VISTA é rapidamente perdido em todos os tipos de células em cultura *in vitro*, independentemente do status de ativação. Em contraste, a expressão de PD-L1 é regulada para cima em células T CD4+ após a estimulação, ou em monócitos CD11bhi e DCs CD11c+ na cultura em meio isolado e ainda mais melhorada em face de estimulação. A expressão de PD-L2, B7-H3 e B7-H4 não são proeminentes nas condições de cultura

utilizadas. A perda de expressão de PD-L3 ou VISTA *in vitro* é única quando comparado com outros ligantes de família B7, mas podem refletir as condições de cultura não ideal que não conseguem imitar o microambiente do tecido.

[00337] Para direcionar como a expressão de PD-L3 ou VISTA pode ser regulada *in vivo*, camundongos transgênicos CD4 TCR DO 11.10 foram imunizados com o antígeno cognato de ovalbumina de galinha (OVA) emulsificado em adjuvante de Freund completo (CFA). Em 24 horas após a imunização, as células de linfonodo de drenagem foram analisadas para expressão de PD-L3 ou VISTA (Figura 7A). A imunização com antígeno (CFA/OVA), mas não o adjuvante isolado reduziu drasticamente a população de célula mieloide CD11b+ PD-L3 OR V1STA+, que continha uma população mista de macrófagos F4/80+ e CD11c+ DCs. Outra comparação com PD-LI e PD-L2 revela que até mesmo PD-L1 has tem o nível de expressão constitutivo mais alto, PD-L3 ou VISTA é o mais altamente regulado para cima durante dita uma resposta imune inflamatória (Figura 7B). Coletivamente, estes dados sugerem fortemente que a expressão do PD-L3 ou VISTA em APCs mieloides é firmemente regulada pelo sistema imune, que possam contribuir para o seu papel de controlar respostas imunes e regulando imunidade de células T.

[00338] Em contraste com sua expressão aumentada em APCs, a expressão PD-L3 ou VISTA é diminuída em células T CD4+ DO11.10 CD4+ em ponto de tempo posterior na imunização (ou seja, em 48hr mas não em 24hr) (Figura 8). Este resultado sugere que a expressão de PD-L3 ou VISTA em células T CD4 *in vivo* pode ser regulado pelo seu status de ativação e microambiente de citocina durante uma resposta imune ativa.

EXEMPLO 3: Impacto funcional da sinalização PD-L3 ou VISTA respostas de células T CD4+ e CD8+

[00339] Proteínas de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig foram produzidas para avaliar as funções reguladoras de PD-L3 ou VISTA nas respostas de células T CD4+. A proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig contém o domínio extracelular do PD-L3 ou VISTA fundida à região de IgG1 Fc humana. Quando imobilizados na microplaca, PD-L3 ou VISTA-Ig, mas sem controle Ig suprimiu a proliferação de células T CD4+ e CD8+ T bulk purificadas em resposta à estimulação anti-CD3 ligado a placa, conforme determinado divisão celular interrompida (Figura 9A-B). A proteína de fusão PD-L3 ou VISTA Ig não afetou a absorção de anticorpos anti-CD3 aos poços plásticos, conforme determinado por ELISA (dados não mostrados), assim, excluindo a possibilidade de efeitos inibidores não específicos. As células T CD4+ PD-1 KO foram ainda suprimidas (Figura 9C), indicando que PD-1 não é o receptor para PD-L3 ou VISTA. O efeito inibitório do PD-Ll-Ig e PD-L3 ou VISTA-Ig também foi comparado diretamente (Figura 10). Quando tituladas quantidades de proteínas da fusão Ig foram absorvidas às microplacas juntamente com □CD3 para estimular células T CD4+, PD-L3 ou VISTA-Ig mostrou eficácia inibitória semelhante como proteína de fusão PD-L1-Ig.

[00340] Uma vez que células T CD4+ em bulk purificadas contêm vários subconjuntos, o impacto do PD-L3 ou VISTA-Ig em subconjuntos de células T CD4+ classificadas em naive (CD25-CD441owCD62Lhi) e de memória (CD25-CD44hiCD62Llow) foi avaliado (Figura 11). É mostrado que o PD-L3 ou VISTA pode suprimir a proliferação de ambos subconjuntos, embora com muito menos eficácia sobre as células de memória.

[00341] Para entender melhor o mecanismo de supressão mediada por PD-L3 ou VISTA, a expressão de marcadores de ativação de TCR e apoptose foram medidos após a ativação de células T na presença ou ausência de PD-L3 ou VISTA-Ig. Consistente com o impacto negativo sobre a proliferação celular, há uma supressão global sobre a expressão dos marcadores de ativação precoces CD69, CD44 e CD62L

(complementar na Figura 12A). Por outro lado, a proteína de fusão PD-L3 ou VISTA-Ig não induz a apoptose. Ao contrário, menos apoptose (conforme determinado pela porcentagem de células anexina V+ 7AAD-) foi observada na presença de PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig do que o controle Ig, no início (24 horas) e posteriormente (48 h) de ativação de TCR (Figura 12B). Por exemplo, no ponto de tempo de 24hr, uma população total não ativada, -27% células foram apoptóticas na presença de PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig, mas -39% de células de controle foram apoptóticas. Quando avaliando as células dentro da célula viva RI gate, é aparente que PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig fortemente inibiu a morte celular induzida por ativação (ACDD), porque cerca de 72,6% de células de controle se tornaram apoptóticas enquanto que somente 43,5% de células foram apoptóticas com PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig. Resultados semelhantes foram observados para o ponto de tempo 48 hr. Portanto, parece que PD-L3 ou VISTA ou VISTA negativamente regula as respostas de células T CD4+ por supressão precoce de ativação TCR e interrompendo a divisão celular, mas com mínimo de impacto direto em apoptose. Este mecanismo de supressão é semelhante ao de B7-H4 Sica, G. L., Choi, I. H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S. D., Tamura, H., Chapoval, A. I., Flies, D. B., Bajorath, J., e Chen, L. (2003). B7-H4, uma molécula da família B7, regula negativamente imunidade de células T. Immunity 18, 849-861.

[00342] Um ensaio de 2 etapas foi desenvolvido para determinar se PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig pode suprimir as células T DC4 pré-ativadas e quão persistente seu efeito supressivo é. É mostrado que o efeito supressivo da proteína de fusão PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig persiste após a sua remoção na ativação 24 horas pós-ativação (Figura 9). Além disso, ambas células T CD4+ pré-ativadas poderiam ser suprimidas por PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig (Figura 9Di, 9Diii e 9Div).

[00343] Em seguida, o impacto de PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig em produção de citocina de célula T CD4+ foi analisado. PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig suprimiu a produção de citocinas Th I IL-2 e IFNalfa de cultura de célula T CD4+ em bulk purificado (Figura 13A- B). O impacto de PD-L3 ou VISTA ou VISTA foi ainda testado em populações de célula T CD4+ naive (CD25-CD441owCD62Lhi) e de memória (CD25-CD44hiCD62Llow) separadas. É mostrado que as células T CD4+ de memória são a principal fonte para a produção de citocina dentro do compartimento de célula CD4+, e PD-L3 ou VISTA ou VISTA pode suprimir esta produção (Figura 3C-D). O efeito inibitório semelhante de PD-L3 ou VISTA ou VISTA em produção de IFNalfa de células T CD8+ foi ainda mostrado (Figura 13E). Este efeito inibitório de PD-L3 ou VISTA ou VISTA na produção de citocina por células T CD4+ e CD8+ T é consistente com a hipótese que PD-L3 ou VISTA ou VISTA é umLigante inibitório que regula para baixo as respostas imunes.

[00344] Em seguida, os estudos foram projetados para determinar os fatores que são capazes de superar o efeito inibitório de PD-L3 ou VISTA ou VISTA. Dado que PD-L3 ou VISTA ou VISTA suprimiu a produção de IL-2, e IL-2 é crítico para a sobrevivência e proliferação de célula T, hipotetizamos que IL-2 pode conseguir a atividade inibitória de PD-L3 ou VISTA ou VISTA. Como mostrado na Figura 14A, IL-2 exógena, mas não IL-15, IL-7, ou IL-23, reverteu parcialmente o efeito supressivo do PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig na proliferação celular. O resgate incompleto por níveis elevados de IL-2 indica que PD-L3 ou VISTA ou VISTA sinalizando alvos mais amplos de vias de ativação de célula T do que simplesmente a produção de IL-2. Por outro lado, um sinal potente de coestimulação fornecido pelo antocorpo anti-CD28 agonístico completamente reverteu PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig mediado por supressão (Figura 14B), enquanto que os níveis intermediários de coestimulação ainda são suprimidos por PD-L3 ou VISTA ou

VISTA de sinalização (Figura 14). Este resultado sugere que resposta imune mediada por PD-L3 ou VISTA ou VISTA seria mais efetivo sob condições menos inflamatórias, mas será inevitavelmente oprimida por sinais fortes de coestimulação positiva. A este respeito, PD-L3 ou VISTA ou VISTA compartilha esta característica com outros ligantes supressivos da família B7 como PD-L1 e B7-H4. Sica *et al*., (2003), Immunity 18, 849-861.; Carter *et al*., (2002), Eur J Immunol 32, 634-643.

[00345] Além de proteína de fusão PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig, é necessário confirmar que PD-L3 ou VISTA ou VISTA expressa em APCs pode suprimir a ativação de célula T específica de antígeno durante as interações de cognato entre APCs e células T. Para esta finalidade, PD-L3 ou VISTA ou VISTA-RFP ou proteína de controle RFP foi super expressa através de transdução retroviral em uma linhagem celular apresentadora de antígeno artificial (CHO-APC) que expressa estavelmente moléculas MHCII e B7-2 Latchman *et al*., (2001), Nat Immunol 2, 261 -268. Um problema em expressar PD-L3 ou VISTA ou VISTA em CHO é que a maioria dos PD-L3 ou VISTA ou VISTA falha em localizar à superfície da célula, talvez devido o ambiente estranho que não tem suporte para PD-L3 ou VISTA ou localização de superfície VISTA (dados não mostrados). Embora não haja motivos claros presentes na cauda citoplasmática de PD-L3 ou VISTA ou VISTA para sugerir o modo de regulação, especulamos que a cauda pode desempenhar um papel para sua localização intracelular. Consequentemente, um mutante sem cauda PD-L3 ou VISTA ou VISTA foi projetado e demonstrou localizar com sucesso a superfície de célula CHO (dados não mostrados).

[00346] Para estimular a resposta a célula T, células CHO-PD-L3 ou VISTA ou VISTA ou CHO-RFP foram incubadas junto com células T CD4+ DO 11.10 na presença de peptídeo OVA antigênico. Como mostrado na Figura 15 A-C, CHO-PD-L3 ou VISTA ou VISTA induziu menos

proliferação de células DO 11.10 do que células CHO-RFP. Este efeito supressor é mais pronunciado em menores concentrações de peptídeo, consistente com a noção que um sinal estimulatório mais forte poderia superar o impacto supressivo de PD-L3 ou VISTA ou VISTA.

[00347] Além disso, o efeito inibitório de PD-L3 ou VISTA comprimento total ou VISTA em APCs naturais foi confirmado. Células dendríticas derivadas de medula óssea cultivadas *in vitro* (BMDC) não expressão nível alto de PD-L3 ou VISTA ou VISTA (Figura 16). PD-L3 ou VISTA ou VISTA-RFP ou RFP foi expresso em BMDCs por transdução retroviral durante o período de cultura de 10 dias. As células transduzidas foram classificadas até homogeneidade baseadas em expressão de RFP. O nível de expressão de PD-L3 ou VISTA ou VISTA em DCs transduzidas foi estimada por coloração com mAb anti-PD-L3 ou VISTA ou VISTA, e demonstraram ser semelhantes ao nível em macrófagos peritoneais isolados recentemente, assim, dentro da faixa de expressão fisiológica (Figura 16). BMDCs classificados foram então usados para estimular células T transgênicas específicas de OVA (OTII) na presença de peptídeo OVA (Figura 15D). É demonstrado aqui que a expressão de PD-L3 ou VISTA ou VISTA em BMDCs suprimiu o cognato das respostas proliferativas de célula T CD4+. Este resultado é consistente com os dados anteriores usando proteína de fusão PD-L3 ou VISTA ou VISTA-Ig e células CHO-APC, sugerindo que PD-L3 ou VISTA ou VISTA pode suprimir as respostas imunes mediadas por célula T.

EXEMPLO 4: Avaliação de Anticorpos Anti-PD-L3 ou VISTA ou VISTA em Modelo Animal de Esclerose múltipla (EAE)

[00348] Devido ao fato de que mAbs ϒCPD-L3 ou VISTA ou VISTA *in vivo* parecem suprimir respostas de células T, ϒPD-L3 ou VISTA ou VISTA foi testado para avaliar se este pode inibir uma doença autoimune mediada por célula T. Usando o modelo experimental de encefalomielite alérgica (EAE), o impacto funcional de mAbs ϒPDL-L3 em do-

enças inflamatórias foi determinado. EAE é um modelo murino amplamente usado da doença autoimune humana esclerose múltipla. EAE pode ser induzida por imunização com antígenos mielina em adjuvante ou por transferência adotiva de células T específicas a mielina, que resulta em infiltrados inflamatórios de várias células T e células B efetoras, e macrófagos, e desmielinização de sistemas nervosos centrais.

[00349] mAb aPDL-L3 foi testado no modelo EAE passivo para evitar a indução de anafilaxia devido a injeção de quantidade grande de mAb como antígeno estranho. Neste modelo de EAE de transferência adotiva, os camundongos SJL doadores foram imunizados com peptídeo CFA e PLP. No dia 10, linfócitos totais de LN de drenagem foram isolados, e cultivados *in vitro* com peptídeo PLP, IL-23 (20 ng/mL) e anti-IFNg (10µg/mL) por 4 dias. As células T CD4 foram então purificadas e transferidas de modo adotivo em camundongos receptores naive. Esta análise indicou que mAb αPDL-L3 retardou início da doença, bem como a gravidade reduzida, assim, mudando a curva de progressão da doença de modo significativo (Figura 17). Além disso, este reduziu a gravidade em um grande percentual dos camundongos e aumentou muito a sobrevida de cerca de 22% a mais do que 75%. Esta atividade demonstrada de mAb ctPDL-L3 em EAE é consistente com os dados *in vitro*, e demonstra o uso deste reagente como um novo reagente imunoregulador em várias doenças inflamatórias.

EXEMPLO 5: EXPRESSÃO DE VISTA NO SNC

[00350] A expressão de VISTA no SNC também foi realizada. Estes ensaios revelaram que em camundongos com doença, a expressão de VISTA é marcadamente reduzida (de 76% ->33%) nas células CD11 b+ (Fig 23), consistente com a hipótese que a perda de VISTA pode ser permissiva para inflamação aumentada. Isso é interessante, e provavelmente funcionalmente importante quando se contrasta células mieloides inflamatórias aqui, com o MDSC em tumores que expressam ní-

veis extremamente altos de VISTA. Foi reportado que camundongos EAE têm números elevados de células supressoras derivadas de mieloide (CD 11 b+Ly-6Chigh MDSC) no baço que são potencialmente supressivas para a ativação de célula T e podem temperar a doença 32. Os nossos dados apoiam fortemente a hipótese de que VISTA pode desempenhar um papel na supressão mediada por mieloide em EAE.

EXEMPLO 6: O impacto de VISTA sobre o destino e função de células T em EAE.

[00351] Ainda são conduzidos experimentos avaliando o efeito de VISTA sobre o destino e função das células T na EAE. Queríamos avaliar se VISTA altera o desenvolvimento de agentes patogênicos, células T encefalitogênicas, expansão clonal de células T, polaridade de célula T, longevidade e conversão de Teff $\rightarrow$ Treg. Estudamos o impacto do bloqueio de VISTA em célula T destino em EAE. Consistente com a maior classificação de doença, a análise do SNC no final do curso da doença confirmou significativamente infiltração de célula T CD4+ produzindo IL17A (a partir de 0,66 $\rightarrow$ 11 %) em 13F3 (VISTA) grupo tratado (Fig. 24).

EXEMPLO 7: Camundongos knockout ou transgênicos PD-L3 ou VISTA ou VISTA

[00352] Usando infecção por lentivírus de embriões, quatro camundongos transgênicos expressando ubiquamente PD-L3 ou VISTA ou VISTA foram produzidos. Estes camundongos expressam PD-L3 ou VISTA ou VISTA de comprimento completo sob o controle do promotor de fator de alongamento humano 1. Estes camundongos foram gerados usando vetor lentiviral pWPT. Semelhante a outros membros da família PD- Ll (Appay, *et al*. (2002) J. Immunol. 168:5954-8), é contemplado que PD-L3 ou VISTA ou VISTA irá funcionar como um regulador negativo *in vivo* enquanto funcionando para coestimular proliferação de célula T αCD3 T *in vitro*. A este respeito, estes camundongos

são esperados para desenvolver espontaneamente autoimunidade e respostas imunes *in vivo* em camundongos transgênicos PD-L3 ou VISTA ou VISTA (ou seja, as respostas imunes humorais, iniciação de células T, etc.) são avaliados para avaliar o desenvolvimento de doença autoimune sistêmica.

[00353] Para camundongos knockout, PD-L3 ou VISTA ou VISTA é inativada por recombinação homóloga. Um clone BAC contendo sequência de comprimento completo de PD-L3 ou VISTA ou VISTA foi adquirido de INVITROGE (TM) (Carlsbad, CA). Um vetor direcionador de PD-L3 ou VISTA ou VISTA foi gerado iserindo um fragmento de 1,6 kb localizado na extremidade 5' do segundo éxon de gene PD-L3 ou VISTA ou VISTA a montante do gene de neomicina e o fragmento de 5 kb localizado na extremidade 3' do terceiro éxon de gene PD-L3 ou VISTA ou VISTA a jusante de gene neomicina. Células-tronco embrionárias derivadas de B6 (ES) são eletroporadas com vetor eletroporador PD-L3 ou VISTA ou VISTA e clones recombinados são selecionados. Os clones selecionados são então injetados em blastocistos C57BL/6 e a prole de machos quiméricos resultantes é combinada a camundongos FLP-deleter para remover o cassete de neomicina. A transmissão de alelo direcionado na prole é determinada por PCR de DNA genômico. O segundo e terceiro éxons contêm o domínio PD-L3 ou VISTA ou VISTA, portanto, o camundongo resultante tem somente a forma inativada da molécula PD-L3 ou VISTA ou VISTA.

[00354] A capacidade geral de camundongos deficientes em PD-L3 ou VISTA ou VISTA é determinada como com outros camundongos PD-L-/-, incluindo avaliação de respostas de célula T a antígeno, respostas imunes humorais, evidente autoimunidade (por exemplo, Lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória do intestino), e aumento da susceptibilidade à doença autoimune induzida (encefalomielite autoimune experimental) (Chen (2004) supra).

EXEMPLO 8: Anticorpos específicos para PD-L3 ou VISTA ou VISTA testados em modelo animal de artrite induzida por colágeno

[00355] Como mostrado nos experimentos na Figura 18, camundongos machos DBA 1J foram imunizados na base da cauda com 100 µl de emulsão contendo 100 µg de colágeno tipo II de pinto (C-II) em CFA (*mycobacterium tuberculosis* 3,5 mg/mL) e estimulados IP com 100 µg aquoso de C-II no dia 21 pós-imunização. Os camundongos de cada grupo de tratamento (n=6) foram ou não tratados (NT-círculos pretos), injetados com 300 µg de IgG de hamster (Ham Ig-quadrados pretos) ou injetados com 300 µg de anticorpo monoclonal "7c9" (triângulo vermelho) ou " 13F3" (triângulo verde), conforme indicado. As injeções foram dadas a cada 2 dias. O inchaço artrítico foi classificado em uma escala de 0-4 para cada pata de cada camundongo nos dias indicados. A classificação de artrite mostrada é a classificação total de todas as patas dos camundongos em cada grupo de tratamento, dividida pelo número de camundongos no grupo.

EXEMPLO 9: O bloqueio de VISTA por um anticorpo monoclonal específico para VISTA aumenta as respostas de células T *in vitro*.

[00356] Um mAb específico de VISTA (13F3) foi identificado que neutraliza a supressão mediada por VISTA (Fig. 19). APCs mieloides $CD11b^{hi}$ foram purificadas de camundongos naive para estimular as células T CD4+ transgênicas OT-II na presença ou ausência de 13F3. Consistente com seu efeito neutralizante, 13F3 melhorou a proliferação de célula T estimulada por células mieloides $CD11b^{hi}$, que demostraram expressar altos níveis de VISTA.

EXEMPLO 10: Anti-VISTA aumenta a imunidade anti-tumor.

[00357] Devido à capacidade de anti-VISTA em aumentar a ativação de célula T, avaliamos se anti-VISTA poderia aumentar a resposta imune protetora em um tumor imunogênico. Um modelo em que temos uma grande quantidade de experiência é o carcinoma da bexiga, MB49. MB49

expressa o antígeno masculino, e, assim, é modestamente imunogênico em camundongos fêmeas, embora este irá crescer e matar camundongos fêmeas se não houver intervenção na imunidade. Para testar a eficácia de terapia com □VISTA, camundongos fêmeas foram administradas com células de tumor MB49 via subcutânea (sq) e tratadas com □VISTA. Dias após, o tamanho do tumor foi medido até que o camundongo fosse sacrificado. Como pode ser prontamente visto na Figura 20 a terapia com anti-VISTA enormemente compromete o crescimento de tumor. Acreditamos que isto é devido à capacidade de anti-VISTA em intensificar as respostas imune mediadas por célula (CMI).

EXEMPLO 11: Efeito de □VISTA sobre a regressão do tumor em 4 modelos de tumor murino.

[00358] Os experimentos no tumor MB49 de carbinoma de bexiga imunogênico demonstraram que a neutralização de VISTA usando mab 13F3 e protege o hospedeiro do crescimento do tumor. Os dados indicam que VISTA tem um papel imunorregulador negativo considerável no microambiente de um tumor devido a sua expressão extremamente alta de MDSCs. Os estudos avaliando o efeito de anti-VISTA de camundongo no crescimento de modelos de tumor imunogênicos (MB49) e altamente não imunogênicos (B16) irão ainda confirmar a eficácia de terapia com αVISTA, joga luz sobre o mecanismo de ação e fornece a base para selecionar a dose ideal e tempo. A justificativa para cada modelo de tumor é detalhada abaixo.

Nome do tumor	Tipo de tumor	Hospedeiro	Grupos	Ensaios
	Carcinoma de Bexiga	B6 Fêmea	□VISTA Controle Ig	Crescimento de tumor Sobrevivência Ensaios Imune/Autoimune
	Carcinoma de Bexiga	B6 Macho		
	Melanoma	B6 Macho ou Fêmea		
	Câncer ovariano	B6 Fêmea		

[00359] MB49 em camundongos fêmeas: Já demonstramos a eficácia neste modelo murino. MDSCs neste modelo ainda apresentou níveis elevados de VISTA (não mostrado). Neste modelo, devido à presença de antígeno H-Y, o tumor MB49 é modestamente imunogênico. Uma vez que sabemos que a terapia anti-VISTA é efetiva, usaremos este modelo como um controle "positivo" para determinar o doseamento (1-100 ug/camundongo; e tempo (dia de inoculação do tumor, ou 4, 7, 10 dias após o tumor; intervenção terapêutica) de terapia anti-VISTA.

[00360] MB49 em camundongos machos: Usando doses e tempo efetivos em camundongos fêmeas, a eficácia de terapia anti-VISTA em camundongos machos (em que o tumor é menos imunogênico) é determinada.

[00361] Melanoma B16: mAb anti-CTLA-4 se mostrou altamente efetivo neste modelo, e representa um tumor não imunogênico onde o modelo de camundongo foi valioso para prever o sucesso em humanos. Os regimes de dose e tempo serão semelhantes aqueles mostrados como efetivos no modelo MB49.

[00362] Carcinoma ovariano ID8: Neste modelo, a expressão de VISTA demonstrou ser extremamente alta em MDSCs. Camundongos com tumor ID8 são tratados com uma αVISTA no tempo de inóculo do tumor ou no dia 5, 15, 25 após a inoculação.

[00363] Métodos. Camundongos B6WT são usados para determinar a dose ideal e tempo de tratamento anti-VISTA para a remissão de todos os modelos de tumor murino observados. Os modelos a serem usados são listados na tabela acima.

[00364] A leitura para este ensaio de dose e tempo são as cinéticas de crescimento do tumor. Para estudos MB49 e B16, todos os estudos de tumor são preparados por inoculação via intradérmica (i.d.) e, portanto, o tamanho do tumor pode ser prontamente medido. As medidas

de tumor são coletadas a cada 2- 3 dias usando um paquímetro. Em cada um destes modelos, o impacto de cada anti-VISTA ou anticorpo de controle será mais bem testado para sua capacidade de reduzir o crescimento de tumor ou facilitar a regressão do tumor. O crescimento de JD8 será seguido usando um ID8 transduzido com luciferase e imageamento de corpo total usando uma Estação de Trabalho IVIS. Além disso, a sobrevivência do hospedeiro será ainda determinada.

[00365] Os dados sobre o crescimento do tumor são expressos como volume de tumor médio +- SEM e diferenças entre grupos serão analisadas por ANOVA de bicaudal. Valores de probabilidade (p) inferiores a valores de 0,05 são considerados estatisticamente significativos. Dados de sobrevivência são analisados utilizando o método de Kaplan-Meier com o teste de Wilcoxon e o teste de log-rank utilizados para verificar a significância da diferença na sobrevivência entre os grupos. Nos modelos B16, as freqüências de camundongos que desenvolvem vitiligo são determinadas.

[00366] Usando estes métodos o crescimento de tumor retardado e/ou regressão de tumor em camundongos tratados com mAb anti-VISTA é obtido comparado com camundongos tratados com Ab controle nos vários modelos de tumor não imunogênicos. Já foi demonstrado que o tratamento anti-VISTA retarda o crescimento do tumor em um modelo de tumor imunogênico. Como cada um destes modelos de tumor tem sua própria cinética de crescimento e, dependência antecipada em VISTA para conferir crescimento de tumor e suprimir a imunidade, os camundongos serão administrados com mab no momento da inoculação do tumor ou em momentos posteriores. Além disso, pelo menos 3 diferentes concentrações de um mab VISTA são testadas para determinar a dose ideal para beneficio terapêutico.

[00367] Como mostrado na Figura 21A-E, tratamento com mab VISTA reduziu o crescimento de tumor em todos os 4 destes modelos

de tumor em que os camundongos foram inoculados sq com A. MB49, B. MCA 105, ou C. células de tumor EG7, ou D. ip com células de tumor ID8-luciferase, e tratados com mab VISTA 13F3 em dias alternados (300μg) começando no dia +1. O crescimento do tumor subcutâneo foi monitorado. Para tumor ID8-luciferase, os camundongos foram imageados no dia 30 usando Xenogen IVIS. E. Expressão de VISTA em leucócitos mieloides em camundongos contendo tumor foi ainda determinado. LN de drenagem e tecidos de tumor (ascites) foram analisados para expressão de VISTA. Estes achados mostram que VISTA expressa em MDSC é uma molécula supressiva principal que interfere com o desenvolvimento de imunidade anti-tumor protetora, e VISTA alivia esta atividade supressora permitindo a intervenção imune e retardamento do crescimento do tumor. Estes achados ainda suporta a conclusão de que VISTA em células mieloides em doenças autoimunes desempenham um papel principal na regulação da extensão da inflamação.

EXEMPLO 12: Síntese de VISTA oligomérica e proteínas de fusão VISTA úteis no tratamento de autoimunidade.

[00368] VISTA-Ig solúvel *in vitro* não é supressora nem sua ligação as células podem ser prontamente detectada. Em contraste, esta molécula ligada ao plástico é profundamente supressora. Além disso, estudos utilizando VISTA-Ig *in vivo* não mostraram atividade manifestada (dados não mostrados). Com relação a estes estudos, VISTA-Ig, que foi criado tem mutações em domínio CH2-CH3 impedindo a ligação FcR e, portanto, não é citofílico *in vivo*. Estudos recentes demonstraram que a PD-L1 tetramérica ligada 100X superior (Kd 6x 10-8 M) do que o PD-L1 26 monomérica a PD-1, e que a ligação às células foi prontamente detectável. PD-L1 tetramérica não foi testada *in vivo*, mas *in vitro* demonstrou bloquear a supressão funcional por PD-Ll nativa. Utilizando métodos semelhantes oligômeros são preparados que terão

como alvo a via VISTA e indução de potente atividade imunossupressora *in vitro* e *in vivo*.

[00369] Ditos oligômeros são construídos usando domínio extracelular monomérico de VISTA ou um fragmento do mesmo, por exemplo, pelo menos 50, 75, 100, 125, 150, 175 ou 200 aminoácidos em comprimento cujo domínio extracelular ou uma porção do mesmo é útil como os blocos de ligação para oligômero. Nestes métodos os inventores têm a vantagem de teconologias de MHC tetrâmero bem estabelecidas. Nestes métodos o constructo de ectodominio VISTA ou um fragmento é ligado a N-terminal de uma variedade de domínios de oligomerização (identificados supra) para gerar uma série de complexos VISTA com valências que abrangem de divalente a heptavalente.

[00370] Assim, uma série de oligômeros não covalentes é criada com base em domínios espirais de afinidade que direcionam a formação estável de montagens dimérica, triméricas, tetraméricas, pentaméricas e heptaméricas. Estes construtos oligoméricos são expressos em uma célula hospedeira, por exemplo, E. coli. Quando a expressão é efetuada em E coli os oligômeros expressos são então novamente dobrados e purificados a partir de corpos de inclusão usando protocolos de laboratório padrão. Esta abordagem rotineiramente produziu material de alta qualidade para análise biológica e estrutural, incluindo complexos de peptídeo MHC e GITRL66 trimérico. As proteínas oligoméricas isoladas são então avaliadas por SDS-PAGE, filtração em gel analítico, ultracentrifugação analítica e espectrometria de massa. Estas medidas de controle de qualidade garantem a disponibilidade, materiais bem caracterizados para estudos *in vitro* e *in vivo*. A organização paralela destes construtos resulta em moléculas em que a valência é igual ao estado oligomérico uma vez que cada complexo VISTA individual é posicionado para produtivamente interagir com a superfície de célula ligada ao receptor de VISTA. Os construtos acima possuem

extrema estabilidade e homogeneidade de estado oligomérico (domínios de oligomerização enrolados de modo não covalente apresentam normalmente temperaturas de fusão que excedem os 100ºC, exceto para a sequência heptamérica que apresenta uma temperatura de fusão de 95ºC).

[00371] Além disso, VISTA-Ig dimérico é tetramerizado que é citofílico ou não citofílico. Os construtos de fusão Fc de VISTA na região com o IgG1 Fc (tanto IgG1 tipo selvagem quando o existente IgG1 de ligação a não FcR) são modificados com um sítio N-terminal BirA para biotinilação enzimática e clonados no vetor pIRES2-EGFP. A biotinilação enzimática irá permitir a modificação de resíduo único específico e orientação na multimerização de avidina. Esta abordagem foi útil para a geração de várias proteínas de fusão a Ig, incluindo B7-1, PD-L1, PD-L2 e TDVI-3. As proteínas expressas são então enzimaticamente biotiniladas *in vitro*, purificadas por HPLC de exclusão de tamanho, e tetramerizadas usando PE-Avidina. Os tetrâmeros resultantes que são citofílicos ou não, são avaliados *in vivo*.

[00372] Estas proteínas VISTA multiméricas projetadas são úteis no tratamento de autoimunidade e outras condições em que a intervenção na via de VISTA e imunossupressão é terapeuticamente garantida.

EXEMPLO 13: Vetores adenovirais de VISTA para induzir supressão imune.

[00373] A transferência de gene usando adenovírus associado recombinante (AAV) tem visto grande desenvolvimento tecnológico na terapia genética. Especificamente, a liberação de gene mediado por AAV do gene PD-L1, ou CTLA4-Ig e CD40-Ig conseguiu eficácia terapêutica em modelos de doença autoimune de lúpus e transplante cardíaco. Estes métodos serão usados para liberar VISTA de comprimento total, ou ectodomínios de VISTA oligomérica, e seus efeitos terapêuticos são avaliados no modelo EAE. O vetor adenovírus recom-

binante que expressa VISTA murina de comprimento total, ou ectodomínio de VISTA oligomérico, é criado usando um sistema de expressão Adeno-XTM (Clontech) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, VISTA é clonada em um vetor de expressão a base de pAdDEST com E1 e E3 apagados, sob o controle de promotor de citomegalovírus humano (CMV). VISTA e controle lacZ expressando adenovírus são então purificados de lisados de células. Para super expressão sistêmica de VISTA, adenovírus é administrado aos camundongos por injeção intravenosa na veia caudal (1 x 109 unidades formadoras de placa [Pfu]) antes de ou imediatamente após a indução da doença através da imunização, ou após o início da doença. Os camundongos de controle receberão 100 µl de PBS. O desenvolvimento da doença e alterações são monitorados em ambos camundongos SJL e camundongos C57BL/6, que apresentam padrão de progressão de doença diferente, e que representam duas formas distintas de manifestação clinica de pacientes MS humanos.

EXEMPLO 14: Estudos funcionais com proteínas projetada e vetores adenovirais

[00374] Os camundongos são ainda administrados (5- 100 ug de proteína /camundongo x 3 semanalmente) com VISTA projetada e/ou vetores adenovirais. Após a administração, a expansão de célula T, diferenciação, bem como desenvolvimento de EAE é determinado.

EXEMPLO 15: Estudos estruturais em VISTA e determinação de determinantes moleculares de função VISTA

[00375] Afinidade, especificidade, estado oligomérico e a formação e localização de complexos de sinalização organizados são contribuintes críticos para a função imune. Todas estas características impactam a sinalização e regulação imune, conforme a organização dos ectodomínios de ligante-receptor diretamente controlam o recrutamento, organização e função de sinalização citoplasmática associada não cova-

lentemente e moléculas estruturais. A estrutura em cristal de alta resolução de VISTA é determinada usando técnicas incluindo sistemas de expressão bacteriano, de inseto e mamíferos, bem como cristalização de alto rendimento e abordagens de determinação de estrutura. Para validar o padrão de ponte dissulfeto observada por meio cristalográfico, exploramos a espectrometria de massa de alta resolução usando abordagens que suportaram com sucesso nossos estudos publicados de TIM-3 e DcR359 humana. Com base nestes resultados estruturais, uma série de mutantes com propriedades oligoméricas alteradas é projetada, bem como mutantes na vizinhança de qualquer região perturbada do domínio VISTA IgV. Estas proteínas mutantes irão fornecer mecanismos diretos adicionais dentro da função VISTA e deveria ser úteis na terapêutica em que a imunossupressão é desejada como as doenças autoimunes, alérgicas e inflamatórias identificadas aqui. Estas mutantes, especialmente oligômeros, são testadas em sistemas *in vitro* e são avaliadas em modelos de doença autoimune em animal e doença inflamatória para avaliar o efeito imunossupressor na progressão da doença, remissão da doença ou para proteger o animal do desenvolvimento da condição autoimune ou inflamatória.

[00376] Estas proteínas VISTA oligoméricas irão ativar a via VISTA e funcionar como um alvo de intervenção imune na autoimunidade. Esta intervenção irá suprimir a imunidade e exercer um benefício terapêutico em doença autoimune e outras condições em que a supressão autoimune é desejada. Isto é conseguido administrando as proteínas VISTA oligomerizadas em diferentes modelos autoimune e inflamatório como os modelos animais de EAE e de artrite induzida por colágeno. Além disso, como descrito acima, os vetores adenovirais que super expressão VISTA de comprimento total ou oligômeros de VISTA são construídos e testados *in vivo*. Estes estudos irão confirmar os efeitos imunossupressores de oligômeros VISTA.

EXEMPLO 16: Experimentos usando super expressão condicional de cepa de camundongo transgênico VISTA (cepa de camundongo transgênico VISTA: R26StopFL VISTA (VISTA).

[00377] Um construto direcionador contendo cDNA de comprimento total de VISTA precedido por um cassete loxP-flanked STOP, foi direcionado no local ROSA26 ubiquamente expresso. Vários corretamente direcionados filhotes R26StopFL/-VISTA nasceram, e criados em cepa CMV-Cre deleter 60. Os dados preliminares em VISTA x CMV-cre confirmam GFP e expressão intensificada de VISTA. Estudos em status imune destes camundongos (respostas de célula T ao antígeno, títulos de anticorpo, etc.) irão confirmar um fenótipo suprimido. A cepa VISTA seria entre criada com CD4-cre, CD11c-cre, e Lys-Cre para determinar se a localização da linhagem de expressão de VISTA influencia a supressão. O fenótipo e função de células T é ainda determinado e é determinante se a super expressão de VISTA resulta em geração de uma aTreg. Nestes estudos Tregs de cepa OVA-immune cre x VISTA são adotivamente transferidas em hospedeiros WT, para verificar se a imunização de antígeno na presença de VISTA super expressa induz Tregs específicas de antígeno. Isto deveria verificar que VISTA impacta na diferenciação de Treg.

[00378] Além disso, os estudos são efetuados no modelo EAE por meio do qual o impacto de proteínas VISTA em diferentes linhagens (por entre criação com CD4-, CD11c-, Lys-cre) com relação ao desenvolvimento da doença é avaliado. Assumindo que a doença pode ser suprimida por superexpressão restrita por linhagem de mutantes VISTA ou em uma mutante CMV x VISTA o controle temporal do desenvolvimento da doença é ainda usando Cre-ERT2x VISTA□. Através da administração de tamoxifeno podemos induzir a super expressão de VISTA antes de, ou no início da doença ou no pico da doença para determinar se VISTA pode impactar na indução e/ou fases efetoras de

imunidade. Usando camundongos quiméricos BM, a super expressão restrita temporalmente de VISTA pode ser restrita ao compartimento hematopoiético. Para uma apreciação de controle da janela de tempo VISTA é super expressa, VISTA é geneticamente ligada, então sorologicamente desligada com a administração de um mab anti-VISTA. Estes estudos irão determinar onde e quando VISTA deve atuar para controlar o desenvolvimento e progressão de doença autoimune.

EXEMPLO 17: Efeito de anticorpos anti-VISTA vacina agonista de CD40 TLR

[00379] Como mostrado na Figura 22, experimentos foram conduzidos que avaliaram o efeito de anticorpos anti-VISTA na eficácia de vacina. Estes resultados mostram que anti-VISTA aumenta a eficácia terapêutica de uma vacina CD40/TLR.Camundongos C57BL/6 foram desafiados com $1X10^5$ células de melanoma B16.F10 metastático. Quatro dias depois, os camundongos foram vacinados com 100µg de antígeno associado a tumor ΔV, 100µg αCD40 FGK45 (anticoropo agonista de CD40) e 100µg de S-27609 (agonista TLR7) com ou sem anti-VISTA (200 ug x 3/semana). O crescimento do tumor foi monitorado por medidas de paquímetro.

[00380] Tendo descrito a invenção, as seguintes reivindicações são fornecidas. Estas reivindicações pretendem cobrir todas as características genéricas e específicas descritas aqui e todas as declarações de escopo que, como matéria de linguagem, possam ser consideradas entre estas.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão VISTA imunossupressora multimérica isolada ou recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos duas cópias de um polipeptídio que consiste no domínio extracelular do polipeptídio VISTA humano ou murino de SEQ ID NO: 2 ou 4, e em que o pelo menos dois polipeptídeos VISTA são cada, diretamente ou indiretamente ligados a uma proteína Ig.

2. Proteína de fusão VISTA multimérica imunossupressora isolada ou recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um domínio de oligomerização que liga a Ig a um ou mais polipeptídeos VISTA.

3. Proteína de fusão de VISTA multimérica imunossupressora isolada ou recombinante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que compreende um domínio de oligomerização selecionado a partir de GCN4, COMP, SNARE, CMP, MAT, LLR contendo 1 NLRC, NLRC2 de ligação ao nucleotídeo NOD2, LRR contendo 1 NLRC, NLRC2 de ligação ao nucleotídeo NOD2; e PSORAS 1.

4. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína de fusão VISTA multimérica imunossupressora isolada ou recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que compreende ainda pelo menos um outro agente imunossupressor selecionado a partir de PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4 e proteínas de fusão ICOS e anticorpos imunossupressores específicos para qualquer um dos anteriores.

6. Proteína de fusão VISTA multimérica isolada ou recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é para uso na preparação de um medicamento para induzir a imunossupressão em um indivíduo ou tratar um indivíduo com um distúr-

bio alérgico, inflamatório ou autoimune.

7. Proteína de fusão VISTA multimérica isolada ou recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o medicamento é para tratamente de um distúrbio selecionado a partir de psoríase, dermatite, dermatite atópica, dermatite, esclerodermia sistêmica, esclerose, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome de angústia respiratória, síndrome de dificuldade respiratória do adulto (ARDS); dermatite, meningite; encefalite, uveíte, colite; glomerulonefrite; eczema, asma, aterosclerose, deficiência de adesão leucocitária, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistémico (SLE), diabetes mellitus (por exemplo, diabetes mellitus tipo I ou diabetes mellitus insulina dependente), esclerose múltipla; síndrome de Reynaud; tiroidite autoimune, encefalomielite alérgica, síndroma de Sjorgen, diabete juvenil, tuberculose, sarcoidose, polimiosite, granulomatose e vasculite; anemia perniciosa (doença de Addison), distúrbio inflamatório do sistema nervoso central (SNC), síndrome de lesão de múltiplos órgãos, anemia hemolítica, crioglobinemia ou anemia positiva de Coombs, miastenia gravis; doenças mediadas por complexo antígeno-anticorpo; doença da membrana basal antiglomerular, síndrome antifosfolipídeo, neurite alérgica, doença de Graves; Síndrome miastênica de Lambert-Eaton, penfigoide bolhoso, pênfigo; Poliendocrinopatias autoimunes; doença de Reiter; síndrome do homem com músculo dolorido; doença de Behcet, arterite de células gigantes, nefrite complexo imune; nefropatia de IgA; polineuropatias de IgM; púrpura trombocitopênica imunológica (ΓΓΡ) e trombocitopenia autoimune.

8. Proteína de fusão VISTA multimérica isolada ou recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o medicamento é para tratamente de um distúrbio ou doença selecionado a partir de artrite, artrite reumatoide, artrite aguda, artrite reumatoide crônica, artrite gotosa, artrite gotosa

aguda, artrite inflamatória crônica, artrite degenerativa, artrite infecciosa, artrite de Lyme, artrite proliferativa, artrite psoriática, artrite vertebral, e artrite reumatoide juvenil-início, osteoartrite, artrite crônica progressiva, artrite deformante, poliartrite crônica primária, artrite reativa, espondilite anquilosante, doenças inflamatórias da pele hiperproliferativa, psoríase, tal como psoríase em placas, psoríase gutatte, psoríase pustular e psoriase das unhas, dermatite incluindo dermatite de contato, dermatite de contato crônica, dermatite alérgica, dermatite de contato alérgica, dermatite herpetiforme, e, dermatite atópica, síndrome de hiper IgM ligado ao X, urticária, tal como urticária crônica alérgica e urticária idiopática crônica, incluindo urticária crônica autoimune, polimiosite / dermatomiosite, dermatomiosite juvenil, necrólise epidérmica tóxica, esclerodermia, esclerodermia sistêmica, esclerose, esclerose sistêmica, esclerose múltipla (MS), espino-óptico MS, MS progressiva primária (PPMS), com exacerbação-remissão (EMRR), esclerose sistêmica progressiva, aterosclerose, arteriosclerose, esclerose disseminada, e esclerose atáxica, doença inflamatória do intestino (iBD), doença de Crohn, colite, colite ulcerativa, colite ulcerosa, colite microscópica, colite colagenosa, colite poliposa, enterocolite necrosante, colite transmural, doença intestinal inflamatória autoimune, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangite esclerosante primária, episclerite, síndrome de angústia respiratória, síndrome do desconforto respiratório agudo ou adulto (ARDS), a meningite, a inflamação de toda ou parte da úvea, irite, coroidite, um distúrbio autoimune hematológico, espondilite reumatoide, perda súbita de audição, doenças mediadas por IgE tais anafilaxia e rinite alérgica e atópica, encefalite, encefalite de Rasmussen, encefalite límbica e ou de tronco, uveíte, uveíte anterior, uveíte anterior aguda, uveíte granulomatosa, uveíte nongranulomatosa, uveíte posterior, uveíte autoimune, glomerulonefrite (GN), GN idiopática membranosa ou nefropatia idiopática membranosa, GN mem-

brano ou membranosa proliferativa (MPGN), GN rapidamente progressiva, condições alérgicas, miocardite autoimune, deficiência de adesão de leucócitos, lúpus eritematoso sistêmico (SLE) ou lúpus eritermatoso sistêmico taiscomo SLE cutâneo, lúpus eritematoso cutâneo subagudo, síndrome de lúpus neonatal (NLE), disseminatus lúpus eritematoso, lúpus (incluindo nefrite, cerebrite, pediátrica, não-renal, extra-renal, discoide, alopecia), juvenil (Tipo I) diabetee mellitus, incluindo pediátrica insulino-dependente diabetes mellitus (IDDM), diabetes mellitus de início adulto (diabetes Tipo II), diabetes autoimune, diabetes insipidus idiopática) 'respostas imunológicas associadas com hipersensibilidade aguda e retardada mediada por citoquinas e linfócitos T, tuberculose, sarcoidose, granulomatose incluindo granulomatose linfomatoide, granulomatose de Wegener, agranulocitose, vasculite, incluindo vasculite (incluindo vasculite de grandes vasos (incluindo polimialgia reumática e célula gigante (de Takayasu) arterite), vasculite navio meio (incluindo a doença de Kawasaki e poliarterite nodosa), poliarterite microscópica , SNCvasculite SNC, "necrotizantes, cutânea, ou vasculite de hipersensibilidade, vasculite necrosante sistêmica e vasculite ANCA-associada, tais como vasculite de Churg-Strauss e síndrome de (CSS)), arterite temporal, anemia aplástica, anemia aplástica autoimune, anemia positiva de Coombs , Diamond Blackfan anemia, anemia hemolítica ou anemia hemolítica imune, incluindo anemia hemolítica autoimune (AHAI), anemia perniciosa (anemia perniciosa), pancitopenia doença de Addison, anemia pura vermelha ou aplasia (PRCA), deficiência de fator VIII, a hemofilia A, neutropenia autoimune, leucopenia, doenças que envolvem diapedese de leucócitos, doenças inflamatórias do sistema nervoso central, síndrome de lesão de múltiplos órgãos, tais como aquelas secundária ao trauma, septicemia ou hemorragia, complexo de antígeno-anticorpo doenças mediadas, doenças glomerular antimembrana basal, antifosfolipídeo síndrome anticorpo,

neurite alérgica , Bechet, ou da doença de Behçet, a síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren, Stevens Johnson, penfigoide, tais como penfigoide bolhoso e pele pemphigoiaYpemphigus (incluindo pênfigo vulgar, pênfigo pênfigo, penfigoide muco membrana pênfigo, e pênfigo eritematoso), polyendocrinopafhies autoimunes, doença de Reiter ou síndrome, nefrite complexo imune, mediada por anticorpos, nefrite, neuromielite óptica, polineuropatias, neuropatia crônica, tais como polineuropatias de IgM ou IgM mediada por neuropatia, trombocitopenia, púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), púrpura trombocitopênica idiopática (FTP), autoimune orquite e ooforite, hipotireoidismo primário, hipoparatiroidismo, tireoidite autoimune, doença de Hashimoto, cromo tireoidite (tireoidite de Hashimoto); tireoidite subaguda, doença autoimune da tiroide, hipotiroidismo idiopática, doença de Graves, síndromes poliglandular tais como autoimunes síndromes poliglandular (ou síndromes endocrinopatia poliglandular), síndromes paraneoplásicas neurológicas, incluindo síndromes paraneoplásicas tais como síndroma de Lambert-Eaton ou miastênica de Eaton-Lambert, síndrome de dura ou dura-homem pessoa, encefalomielite, encefalomielite alérgica, encefalomielite alérgica experimental (EAE), miastenia grave, associada a timoma miastenia gravis, degeneração cerebelar, neuromyotonia, síndrome de opsoclonus ou opsoclonus mioclonia (OMS) e neuropatia sensorial, motora multifocal neuropatia, síndrome de Sheehan, hepatite autoimune, hepatite crônica, hepatite lúpica, hepatite de células gigantes, hepatite crônica ativa ou hepatite autoimune crônica ativa, pneumonite intersticial linfoide, bronquiolite obliterante (transplante não-) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barré, doença de Berger * s (nefropatia de IgA), nefropatia idiopática por IgA, IgA linear dermatose, cirrose biliar primário, pneumonocirrose, síndrome de enteropatia autoimune, doença celíaca, doença coelíaca, sprue celíaca (enteropatia

glúten), sprue refratório, sprue idiopática, crioglobulinemia, esclerose lateral amiotrófica (ALS, doença de Lou Gehrig), doença arterial coronariana, doença autoimune da orelha, como doença autoimune da orelha interna (AGED), perda auditiva autoimune, síndrom *opsoclonus mioclonus* (OMS), policondrite, tais como policondrite reincidente ou refratária, proteinose alveolar pulmonar, amiloidose, esclerite, uma linfocitose não-canceroso, uma linfocitose primária, que inclui linfocitose de células B monoclonais (por exemplo, gamopatia monoclonal benigna e garnmopatia monoclonal de significado indeterminado, MGUS), neuropatia periférica, síndrome paraneoplásica, canalopatias tais como a epilepsia, enxaqueca, distúrbios arritimia muscular, surdez, cegueira, paralisia periódica, e canalopatias do SNC, autismo, miopatias inflamatórias, focais glomeruloesclerose segmentar (FSGS), oftalmopatia endócrina, uveoretinitis , coriorretinite, distúrbio autoimune hepatológico, fibromialgia, insuficiência endócrina múltipla, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demência pré-senil, doenças desmielinizantes, tais como a doenças autoimunes desmielinizantes, nefropatia diabética, síndrome Dressle s, alopecia greata, síndrome CREST (calcinose, fenômeno de Raynaud, dismotilidade esofágica, sclerodatyl), e telangietasia), infertilidade masculino e feminino autoimune, doença mista do tecido conjuntivo, doença de Chagas, febre reumática, aborto recorrente, pulmão do fazendeiro, eritema multiforme, síndrome pós-cardiotomia, síndrome de Cushing, pulmão de criador de pássaros, a angeíte granulomatosa alérgica, angeíte linfocítica benigna; 'síndrome de Alport, alveolite, como alveolite alérgica e alveolite fibrosante, doença intersticial pulmonar, reação transfusional, hanseníase, malária, leishmaniose, kypanosomiasis, esquistossomose, ascaridíase, aspergilose, síndrome Sampler, síndrome de Caplan, dengue, endocardite, endomiocardiofibrose, fibrose pulmonar difusa, fibrose intersticial pulmonar, fibrose pulmonar idiopática, fibrose císti-

ca, endoftalmite, eritema elevado *et diutinum*, eritroblastose fetal, eosinofílica faciitis, síndrome de Shulman, síndrome de Felt, flariasis, ciclite como ciclite crônica, ciclite heterocronia, iridociclite, ou ciclite Fuch, a púrpura de Henoch-Schönlein, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), infeção echovirus, cardiomiopatia, doença de Alzheimer, parvovirose, infeção pelo vírus da rubéola, pós-vacinação síndromes, infeção da rubéola congênita, o vírus Epstein-Barr infeção, caxumba, síndrome de Evan, insuficiência gonadal autoimune, coréia de Sydenham, nefrite pós-estreptocócica, *thromboangitis ubiterans*, tireotoxicose, *tabes dorsalis*, *chorioiditis*, células gigantes polimialgia, oftalmopatia endócrina, crônica pneumonite por hipersensibilidade, ceratoconjuntivite seca, epidemia de ceratoconjuntivite, idiopática síndrome nefrítica, alterações mínimas nefropatia, lesão familiar e isquemia-reperfusão benigna, autoimunidade retiniana, inflamação das articulações, bronquite, doença das vias respiratórias obstrutiva crônica, silicose, aftas, estomatite aftosa, doenças arterioscleróticas, hemólise, aspermiogenese autoimune, doença de Boeck, a crioglobulinemia, contratura de Dupuytren, *endophthalmia phacoanaphylatica*, enterite alérgica, eritema nodoso hansênico, paralisia idiopatrliafacial, síndrome da fadiga crônica, febris reumática, doença de Hamman-Rich, perda auditiva sensoneural, hemoglobinúria paroxysmatica, hipogonadismo; regionalis ileíte, leucopenia, mononucleose infetiosa, mielite transversal, idiopática primária mixedema, nefrose, symphatica oftalmia orquite granulomatosa, pancreatite, poliradiculite acuta, pioderma gangrenoso, thyreoiditis Quervain, adquirido atrofia spenic, infertilidade devido à antobodies antispermatozoan, não malignas timoma, vitiligo, SCID e vírus de Epstein-Barr virus associados a doenças, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), parasitárias doenças tais como Lesihmania, tóxicos síndrome do choque, intoxicação alimentar, condições que envolvem infiltração de células T, leucócito-adesão de deficiência, respostas

imunológicas associadas com hipersensibilidade aguda e retardada mediada por citoquinas e linfócitos T, doenças que envolvem diapedese de leucócitos, síndrome de lesão de múltiplos órgãos , complexo de antígeno-anticorpo, doenças mediadas antiglomerular doença da membrana basal, neurite alérgica, polyendocrmopathies autoimunes, ooforite, mixedema primário, gastrite atrófica autoimune, oftalmia simpática, doenças reumáticas, doença mista do tecido conjuntivo, síndrome nefrótica, insulite, insuficiência polyendocrine, neuropatia periférica, tipo de síndrome autoimune poliglandular I, adulto-início hipoparatireoidismo (AOIH), alopecia *totalis*, cardiomiopatia dilatada, epidermolisis bolhosa adquirida (EBA), hemocromatose, miocardite síndrome nefrótica, colangite esclerosante primária, sinusite purulenta ou não purulenta, sinusite aguda ou crônica, etmoide , sinusite frontal, maxilar, ou esfenoide, um transtorno de eosinófilos relacionados, tais como eosinofilia, pulmonar infiltração eosinofilia, eosinofilia-mialgia, síndrome Lo filer, cromo pneumonia eosinofílica, tropical eosinofilia pulmonar, broncopneumonia aspergilose, aspergiloma, ou granulomas contendo eosinófilos, anafilaxia , espondiloartrites seronegativos, a doença autoimune polyendocrine, colangite esclerosante, esclera, episclera crônica mucocutânea candidíase, síndrome de Bruton, hipogamaglobulinemia transitória da infância, síndroma de Wiskott-Aldrich, ataxia telangietasia, perturbações autoimunes associadas à doença do colagénio, reumatismo, doença neurológica, isquemia distúrbio de reperfusão, a redução na resposta da pressão arterial, a disfunção vascular, antgietasis, lesão tecidual, isquemia cardiovascular, hiperalgesia isquemia cerebral e doença de vascularização de acompanhamento, distúrbios de hipersensibilidade alérgica, glomenilonephritides, lesão de reperfusão, lesão de reperfusão de tecidos do miocárdio ou outros, dermatoses com aguda componentes inflamatórios agudos, meningite purulenta ou do sistema nervoso central, outras distúrbios inflamató-

rias, oculares e doenças inflamatórias orbital; granulócitos transfusão associadas síndromes, citocina induzida por toxicidade, inflamação grave aguda, inflamação crônica intratável, pielite, pneumonocirrhosis, retinopatia diabética, diabético artéria de grande hiperplasia distúrbio, endarterial, úlcera péptica, valvite, e endometriose.

9. Proteína de fusão multimérica VISTA isolada ou recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que o referido tratamento inclui ainda o uso de pelo menos um outro imunossupressor agente selecionado a partir de proteínas de fusão PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4 e ICOS e anticorpos imunossupressores específicos para qualquer um dos anteriores.

SEQUÊNCIA COMPLETA DE PD-XL MURINO

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

FIG. 1A

ALINHAMENTO DE DOMÍNIOS EXTRACELULARES DE PD-XL MURINO COM B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H3, E B7S1.

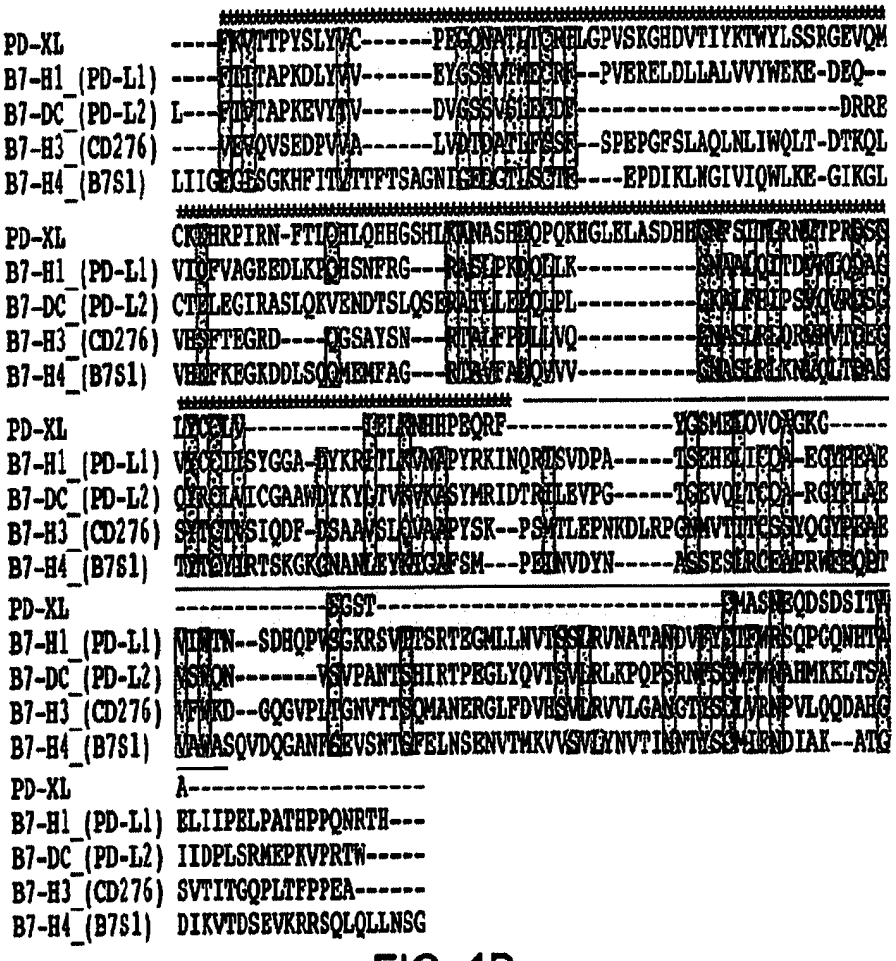


FIG. 1B

ALINHAMENTO DE DOMÍNIOS EXTRACELULARES DE PD-XL MURINO COM RECEPTORES PD-1, CTLA-4, CD28, BTLA, E ICOS.

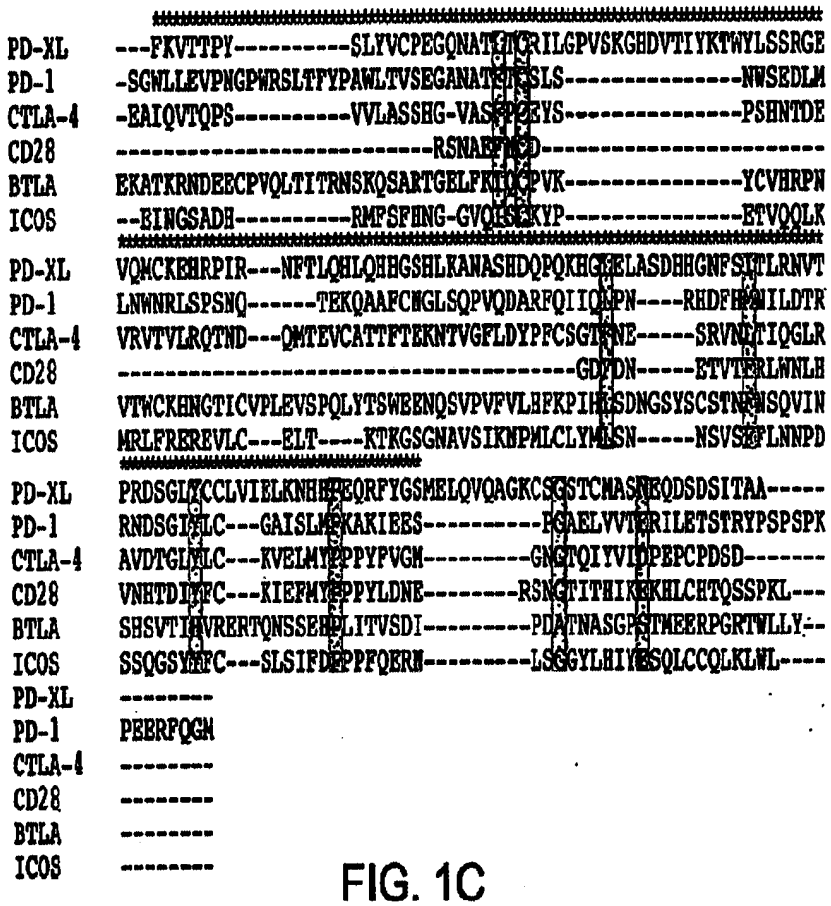
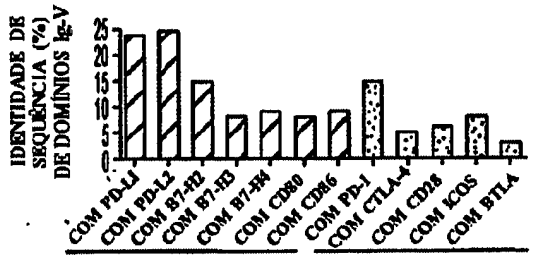


FIG. 1C

IDENTIDADE DE SEQUÊNCIA (%) DE DOMÍNIOS Ig-V ENTRE PD-XL E RECEPTORES E LIGANTES DA FAMÍLIA B7 SELECIONADOS.



COMPARAÇÃO DE PD-XL COM: LIGANTES DA FAMÍLIA B7 COM RECEPTORES DA FAMÍLIA B7

FIG. 1D

ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIA DE PD-XL HUMANO E MURINO

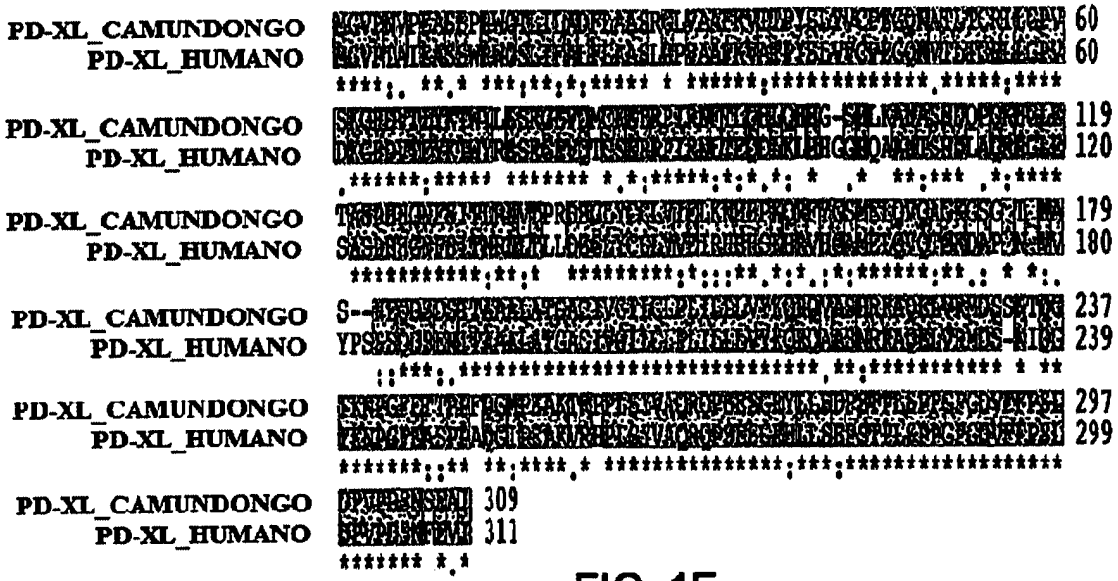


FIG. 1E

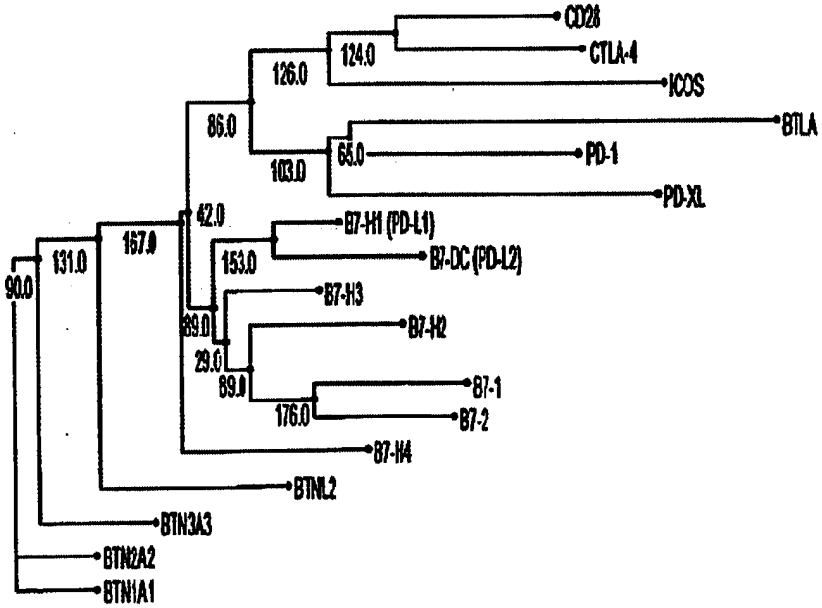


FIG. 2



FIG. 3A

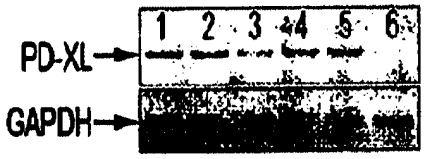


FIG. 3B

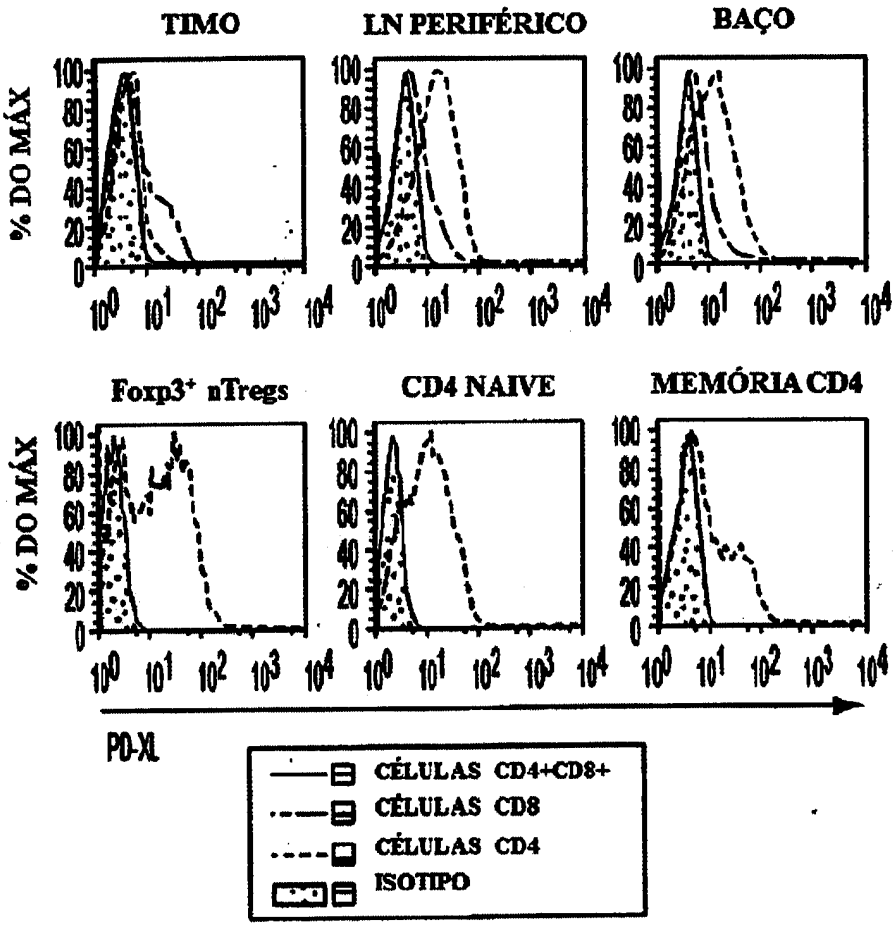


FIG. 3C

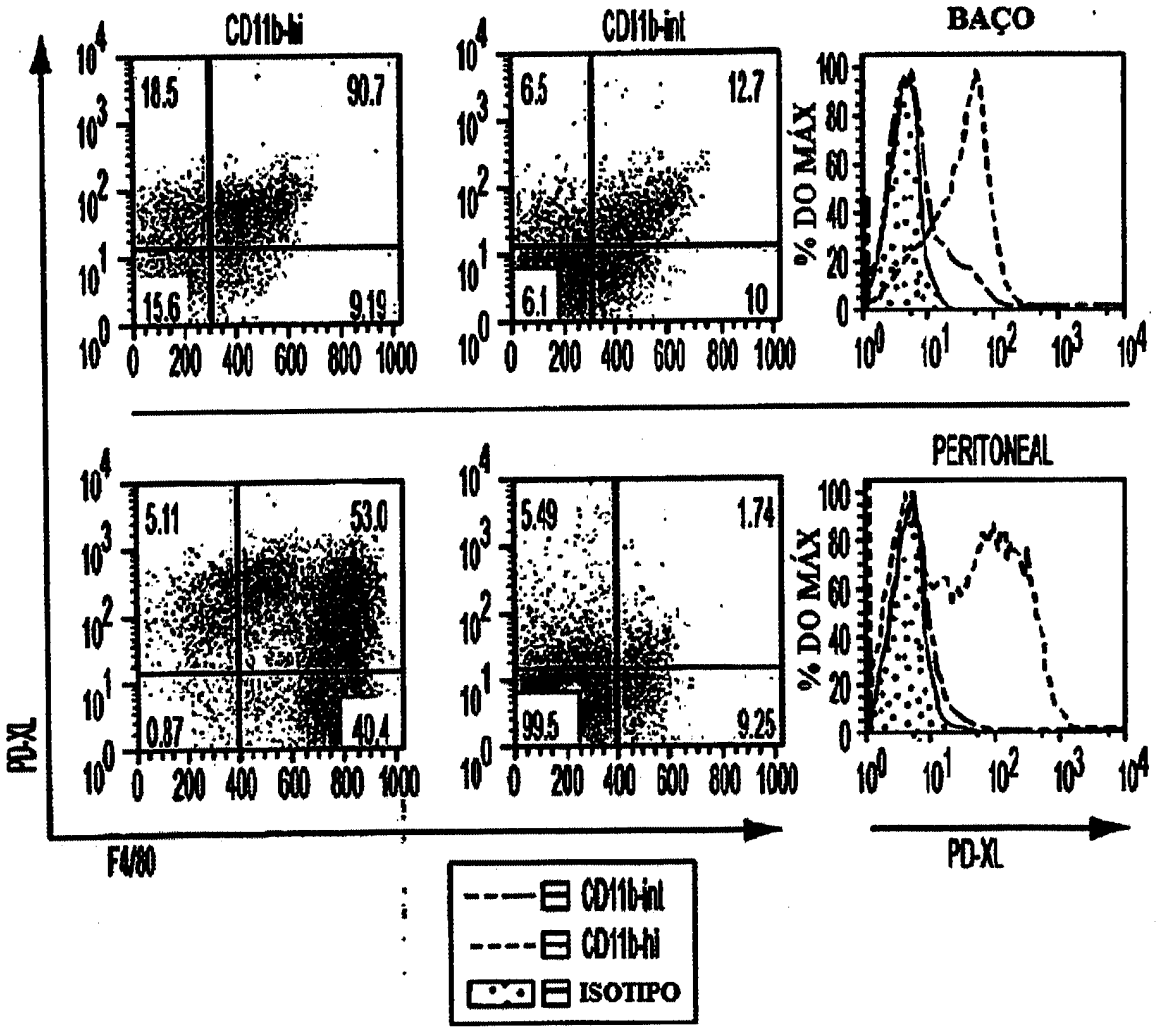

CD11b-hi
CD11b-int
BAÇO
PERITONEAL
18.5
90.7
15.6
9.19
6.5
12.7
6.1
10
5.11
53.0
0.87
40.4
5.49
1.74
99.5
9.25
% DO MÁX
PD-XL
F4/80
CD11b-int
CD11b-hi
ISOTIPO

FIG. 3D

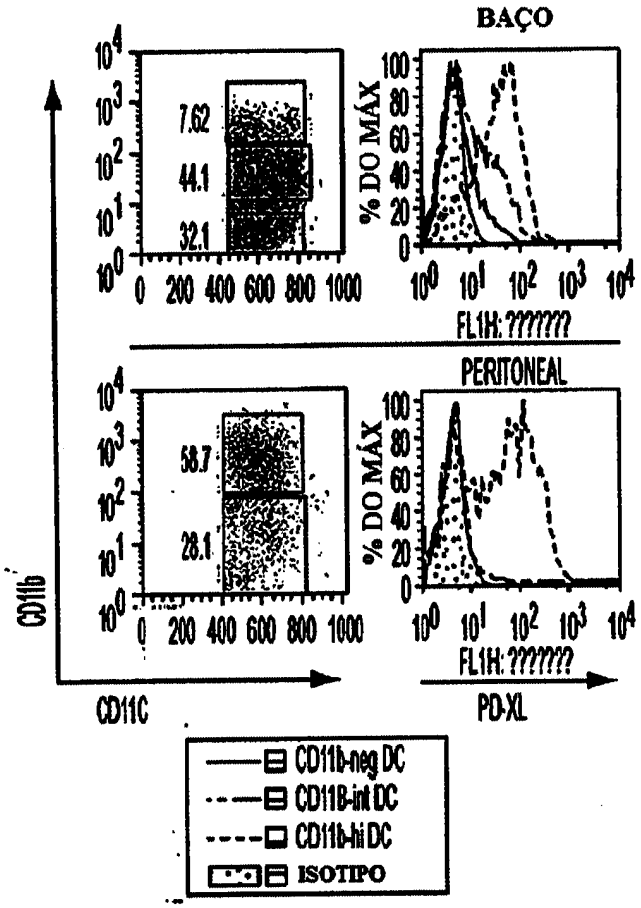

BAÇO
7.62
44.1
32.1
% DO MÁX
FL1H: ???????
PERITONEAL
58.7
28.1
% DO MÁX
FL1H: ???????
CD11b
CD11C
PD-XL
CD11b-neg DC
CD11B-int DC
CD11b-hi DC
ISOTIPO

FIG. 3E

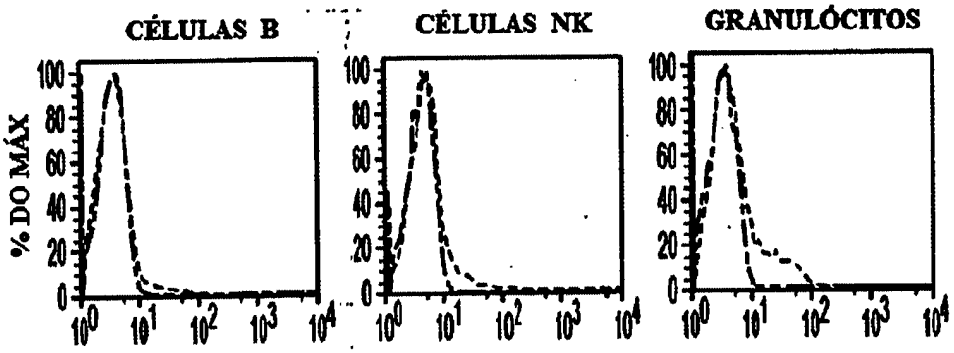

CÉLULAS B
CÉLULAS NK
GRANULÓCITOS
% DO MÁX

FIG. 3F

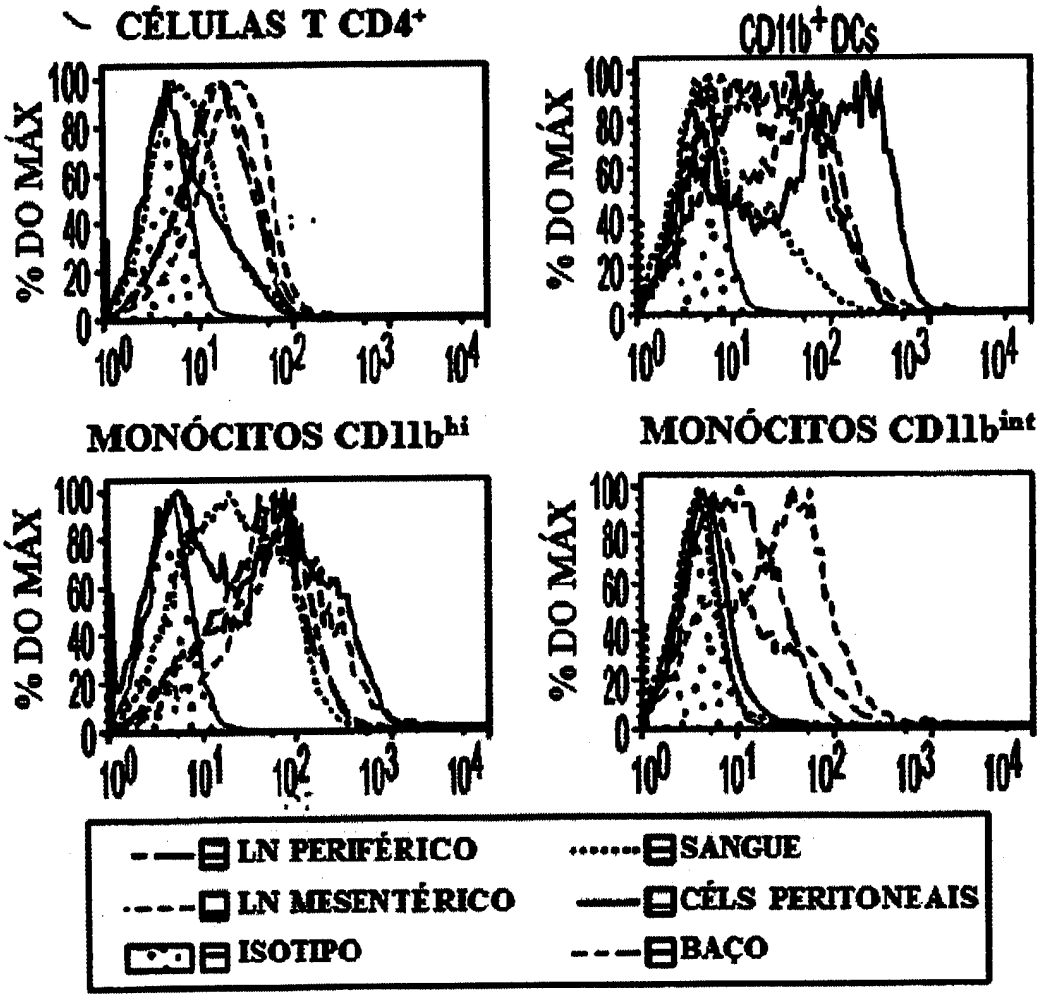

CÉLULAS T CD4+
CD11b+DCs
MONÓCITOS CD11bhi
MONÓCITOS CD11bint
% DO MÁX
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
LN PERIFÉRICO
LN MESENTÉRICO
ISOTIPO
SANGUE
CÉLS PERITONEAIS
BAÇO

FIG. 3G

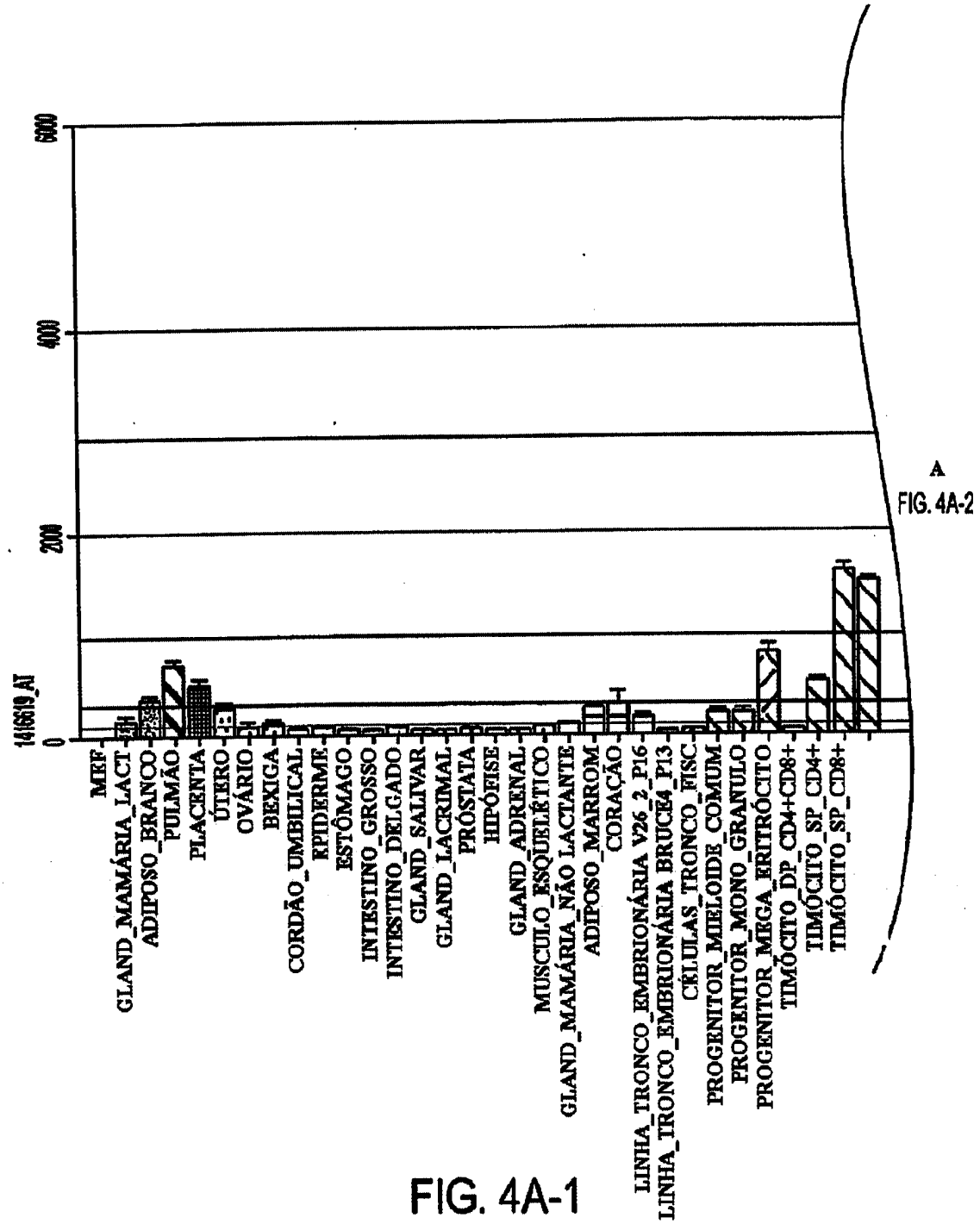

1416619_AT
0
2000
4000
6000
MFF
GLAND_MAMÁRIA_LACT
ADIPOSO_BRANCO
PULMÃO
PLACENTA
ÚTERO
OVÁRIO
BEXIGA
CORDÃO_UMBILICAL
EPIDERME
ESTÔMAGO
INTESTINO_GROSSO
INTESTINO_DELGADO
GLAND_SALIVAR
GLAND_LACRIMAL
PRÓSTATA
HIPÓFISE
GLAND_ADRENAL
MUSCULO_ESQUELÉTICO
GLAND_MAMÁRIA_NÃO LACTANTE
ADIPOSO_MARROM
CORAÇÃO
LINHA_TRONCO_EMBRIONÁRIA V26_2_P16
LINHA_TRONCO_EMBRIONÁRIA BRUCE4_P13
CÉLULAS_TRONCO_FISC
PROGENITOR_MIELOIDE_COMUM
PROGENITOR_MONO_GRANULO
PROGENITOR_MEGA_ERITRÓCITO
TIMÓCITO_DP_CD4+CD8+
TIMÓCITO_SP_CD4+
TIMÓCITO_SP_CD8+
A
FIG. 4A-2

FIG. 4A-1

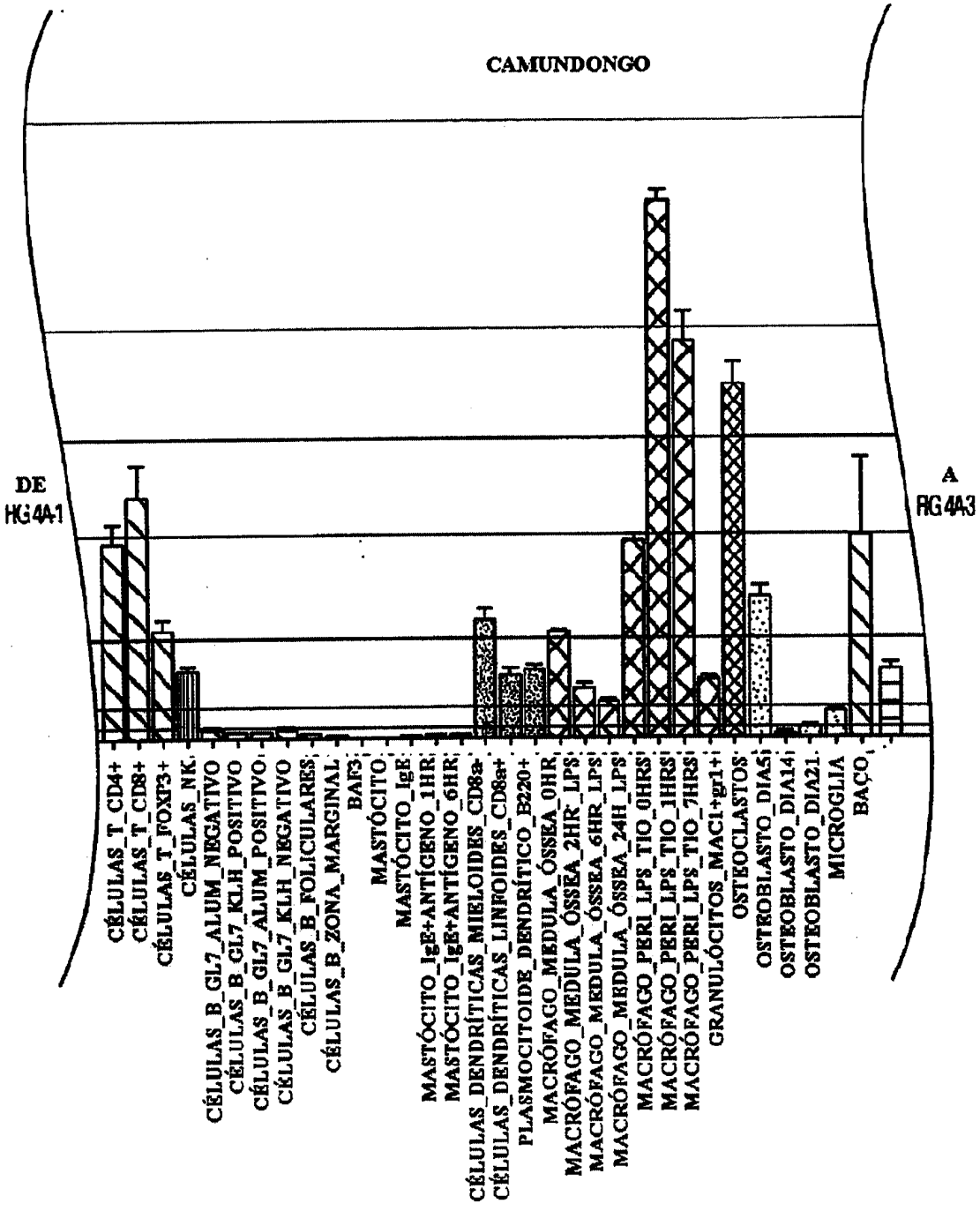

CAMUNDONGO
DE HG4A1
A HG4A3
CÉLULAS_T_CD4+
CÉLULAS_T_CD8+
CÉLULAS_T_FOXP3+
CÉLULAS_NK
CÉLULAS_B_GL7_ALUM_NEGATIVO
CÉLULAS_B_GL7_KLH_POSITIVO
CÉLULAS_B_GL7_ALUM_POSITIVO
CÉLULAS_B_GL7_KLH_NEGATIVO
CÉLULAS_B_FOLICULARES
CÉLULAS_B_ZONA_MARGINAL
BAF3
MASTÓCITO
MASTÓCITO_IgE
MASTÓCITO_IgE+ANTÍGENO_1HR
MASTÓCITO_IgE+ANTÍGENO_6HR
CÉLULAS_DENDRÍTICAS_MIELOIDES_CD8a-
CÉLULAS_DENDRÍTICAS_LINFOIDES_CD8a+
PLASMOCITOIDE_DENDRÍTICO_B220+
MACRÓFAGO_MEDULA_ÓSSEA_0HR
MACRÓFAGO_MEDULA_ÓSSEA_2HR_LPS
MACRÓFAGO_MEDULA_ÓSSEA_6HR_LPS
MACRÓFAGO_MEDULA_ÓSSEA_24H_LPS
MACRÓFAGO_PERI_LPS_TIO_0HRS
MACRÓFAGO_PERI_LPS_TIO_1HRS
MACRÓFAGO_PERI_LPS_TIO_7HRS
GRANULÓCITOS_MAC1+gr1+
OSTEOCLASTOS
OSTEOBLASTO_DIA5
OSTEOBLASTO_DIA14
OSTEOBLASTO_DIA21
MICROGLIA
BAÇO

FIG. 4A-2

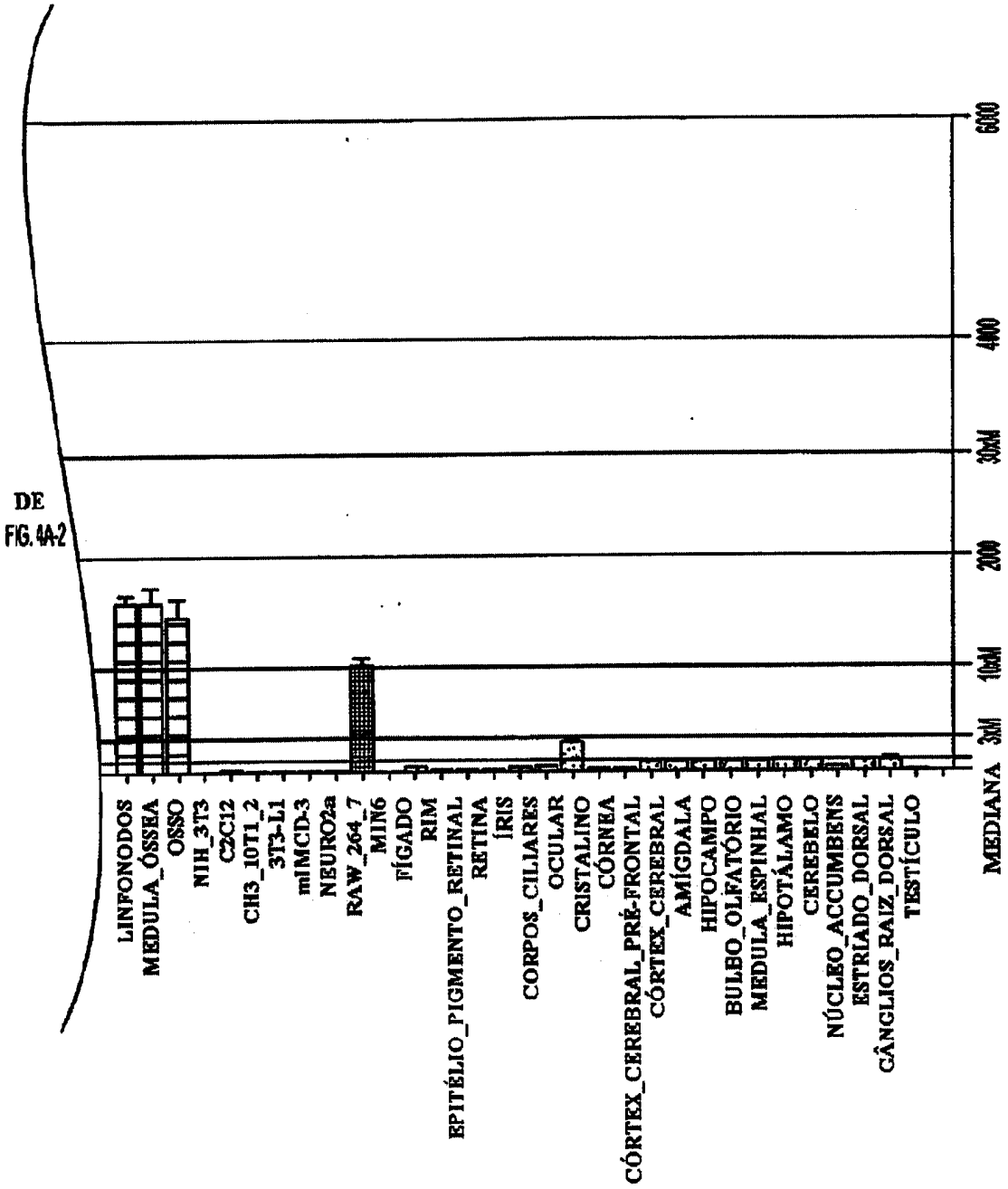

DE
FIG. 4A-2
LINFONODOS
MEDULA_ÓSSEA
OSSO
NIH_3T3
C2C12
CH3_10T1_2
3T3-L1
mIMCD-3
NEURO2a
RAW_264_7
MIN6
FÍGADO
RIM
EPITÉLIO_PIGMENTO_RETINAL
RETINA
ÍRIS
CORPOS_CILIARES
OCULAR
CRISTALINO
CÓRNEA
CÓRTEX_CEREBRAL_PRÉ-FRONTAL
CÓRTEX_CEREBRAL
AMÍGDALA
HIPOCAMPO
BULBO_OLFATÓRIO
MEDULA_ESPINHAL
HIPOTÁLAMO
CEREBELO
NÚCLEO_ACCUMBENS
ESTRIADO_DORSAL
GÂNGLIOS_RAIZ_DORSAL
TESTÍCULO
MEDIANA
3nM
10nM
30nM
2000
4000
6000

FIG. 4A-3

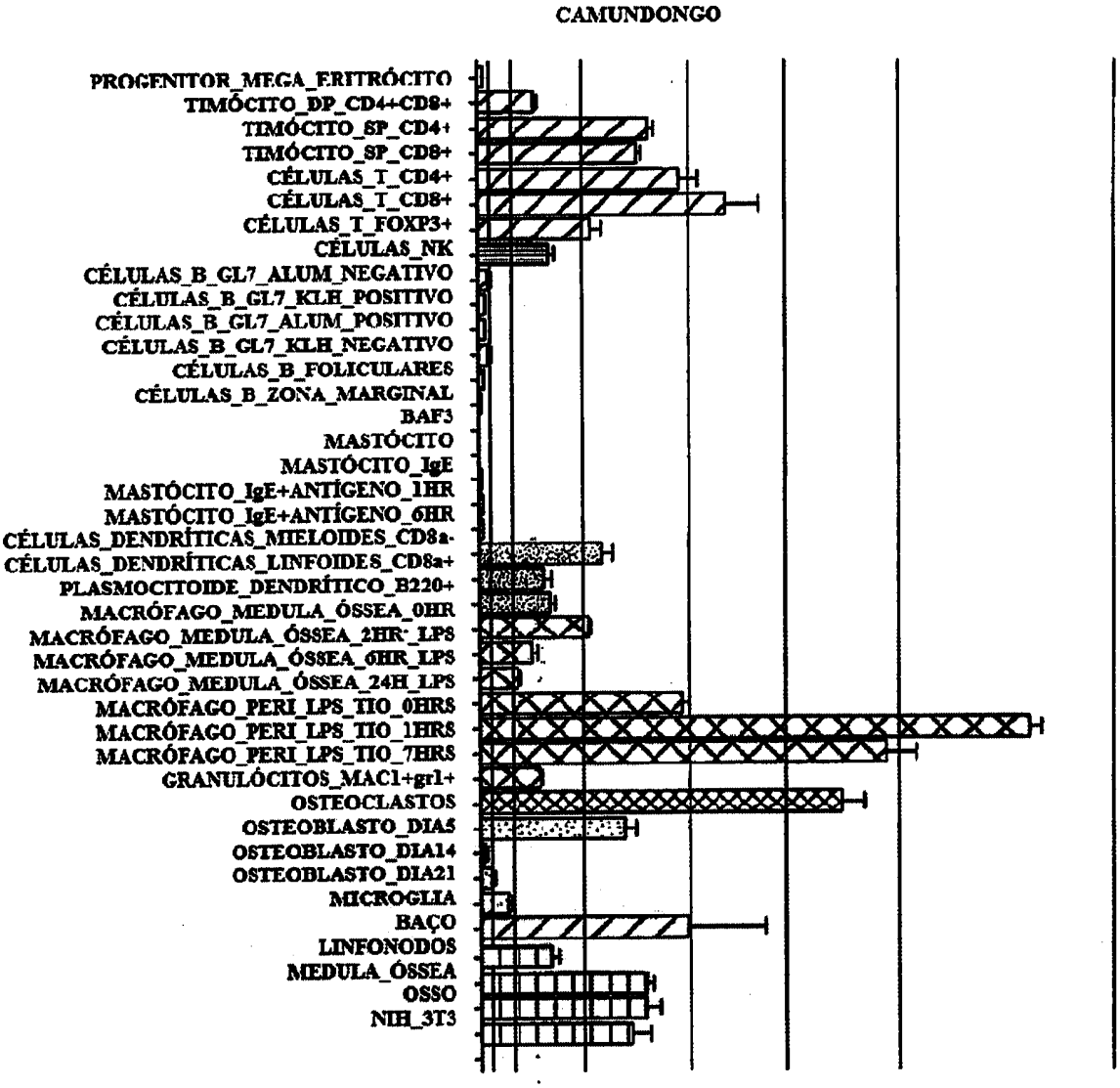
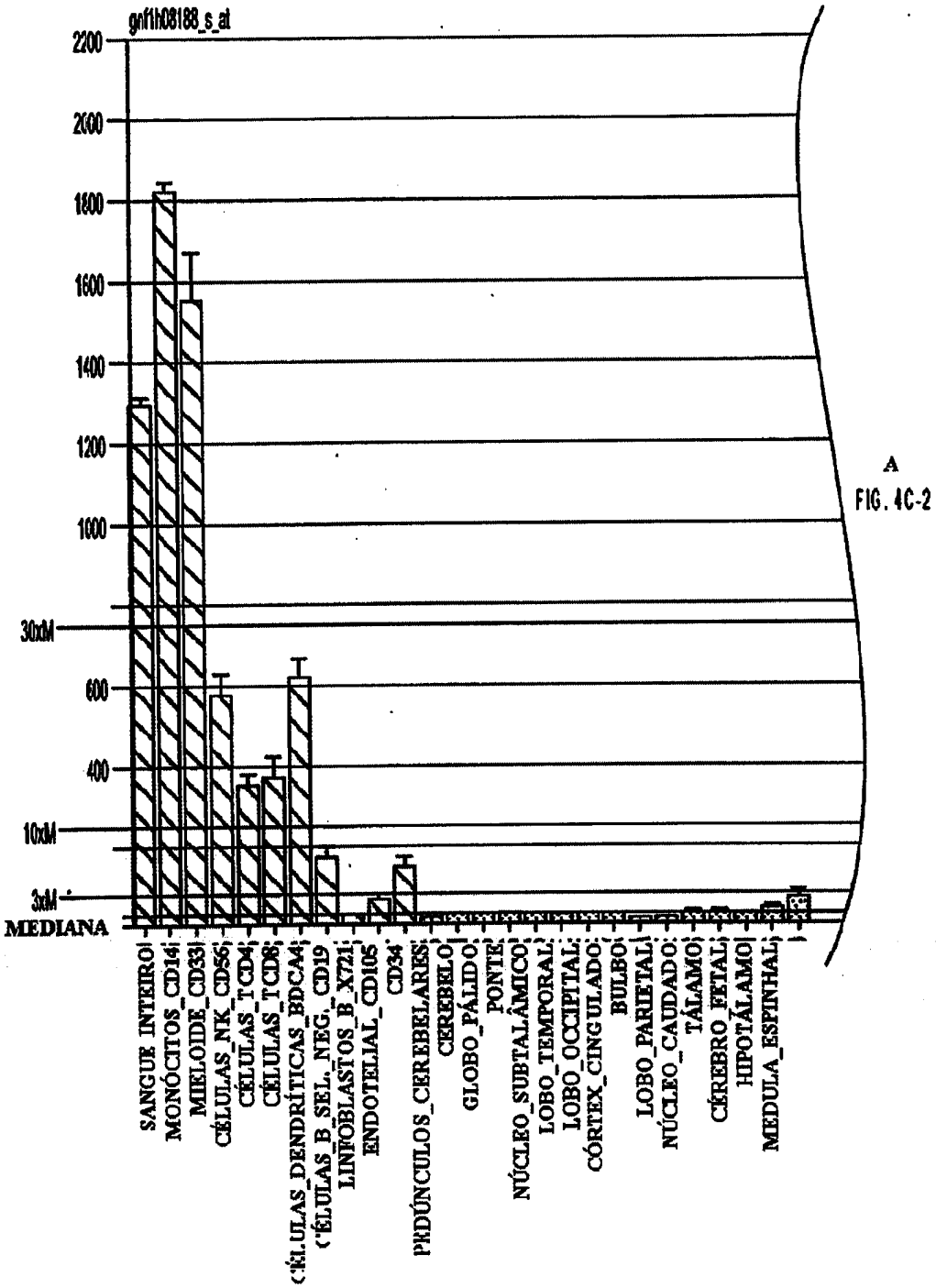

CAMUNDONGO
PROGENITOR_MEGA_ERITRÓCITO
TIMÓCITO_DP_CD4+CD8+
TIMÓCITO_SP_CD4+
TIMÓCITO_SP_CD8+
CÉLULAS_T_CD4+
CÉLULAS_T_CD8+
CÉLULAS_T_FOXP3+
CÉLULAS_NK
CÉLULAS_B_GL7_ALUM_NEGATIVO
CÉLULAS_B_GL7_KLH_POSITIVO
CÉLULAS_B_GL7_ALUM_POSITIVO
CÉLULAS_B_GL7_KLH_NEGATIVO
CÉLULAS_B_FOLICULARES
CÉLULAS_B_ZONA_MARGINAL
BAF3
MASTÓCITO
MASTÓCITO_IgE
MASTÓCITO_IgE+ANTÍGENO_1HR
MASTÓCITO_IgE+ANTÍGENO_6HR
CÉLULAS_DENDRÍTICAS_MIELOIDES_CD8a-
CÉLULAS_DENDRÍTICAS_LINFOIDES_CD8a+
PLASMOCITOIDE_DENDRÍTICO_B220+
MACRÓFAGO_MEDULA_ÓSSEA_0HR
MACRÓFAGO_MEDULA_ÓSSEA_2HR_LPS
MACRÓFAGO_MEDULA_ÓSSEA_6HR_LPS
MACRÓFAGO_MEDULA_ÓSSEA_24H_LPS
MACRÓFAGO_PERI_LPS_TIO_0HRS
MACRÓFAGO_PERI_LPS_TIO_1HRS
MACRÓFAGO_PERI_LPS_TIO_7HRS
GRANULÓCITOS_MAC1+gr1+
OSTEOCLASTOS
OSTEOBLASTO_DIA5
OSTEOBLASTO_DIA14
OSTEOBLASTO_DIA21
MICROGLIA
BAÇO
LINFONODOS
MEDULA_ÓSSEA
OSSO
NIH_3T3

FIG. 4B



A
FIG. 4C-2

FIG. 4C-1

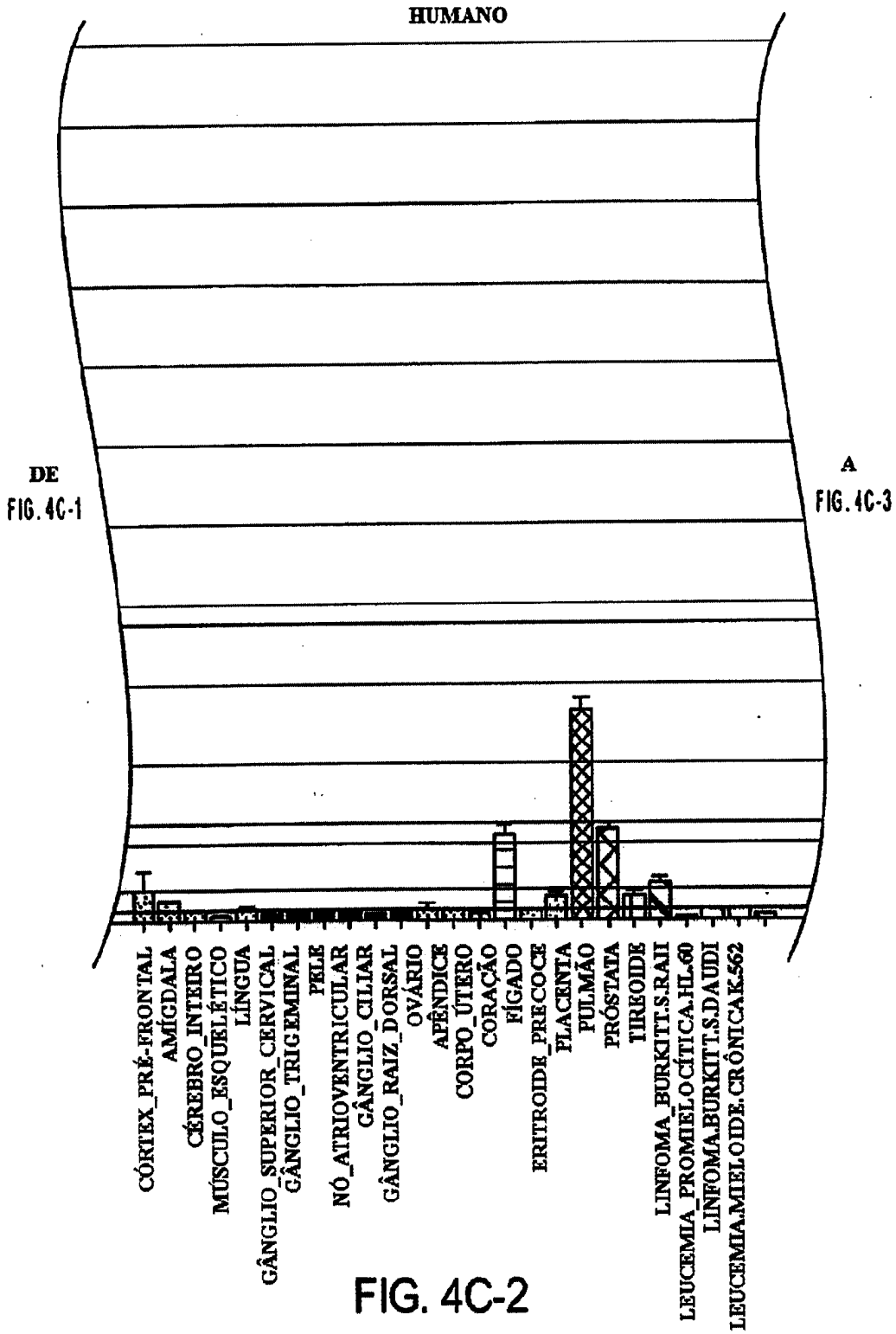

HUMANO
DE
FIG. 4C-1
A
FIG. 4C-3
CÓRTEX_PRÉ-FRONTAL
AMÍGDALA
CÉREBRO_INTEIRO
MÚSCULO_ESQUELÉTICO
LÍNGUA
GÂNGLIO_SUPERIOR_CERVICAL
GÂNGLIO_TRIGEMINAL
PELE
NÓ_ATRIOVENTRICULAR
GÂNGLIO_CILIAR
GÂNGLIO_RAIZ_DORSAL
OVÁRIO
APÊNDICE
CORPO_ÚTERO
CORAÇÃO
FÍGADO
ERITROIDE_PRECOCE
PLACENTA
PULMÃO
PRÓSTATA
TIREOIDE
LINFOMA_BURKITT.S.RAJI
LEUCEMIA_PROMIELOCÍTICA.HL-60
LINFOMA.BURKITT.S.DAUDI
LEUCEMIA.MIELOIDE.CRÔNICA.K.562

FIG. 4C-2

DE
FIG. 4C-2

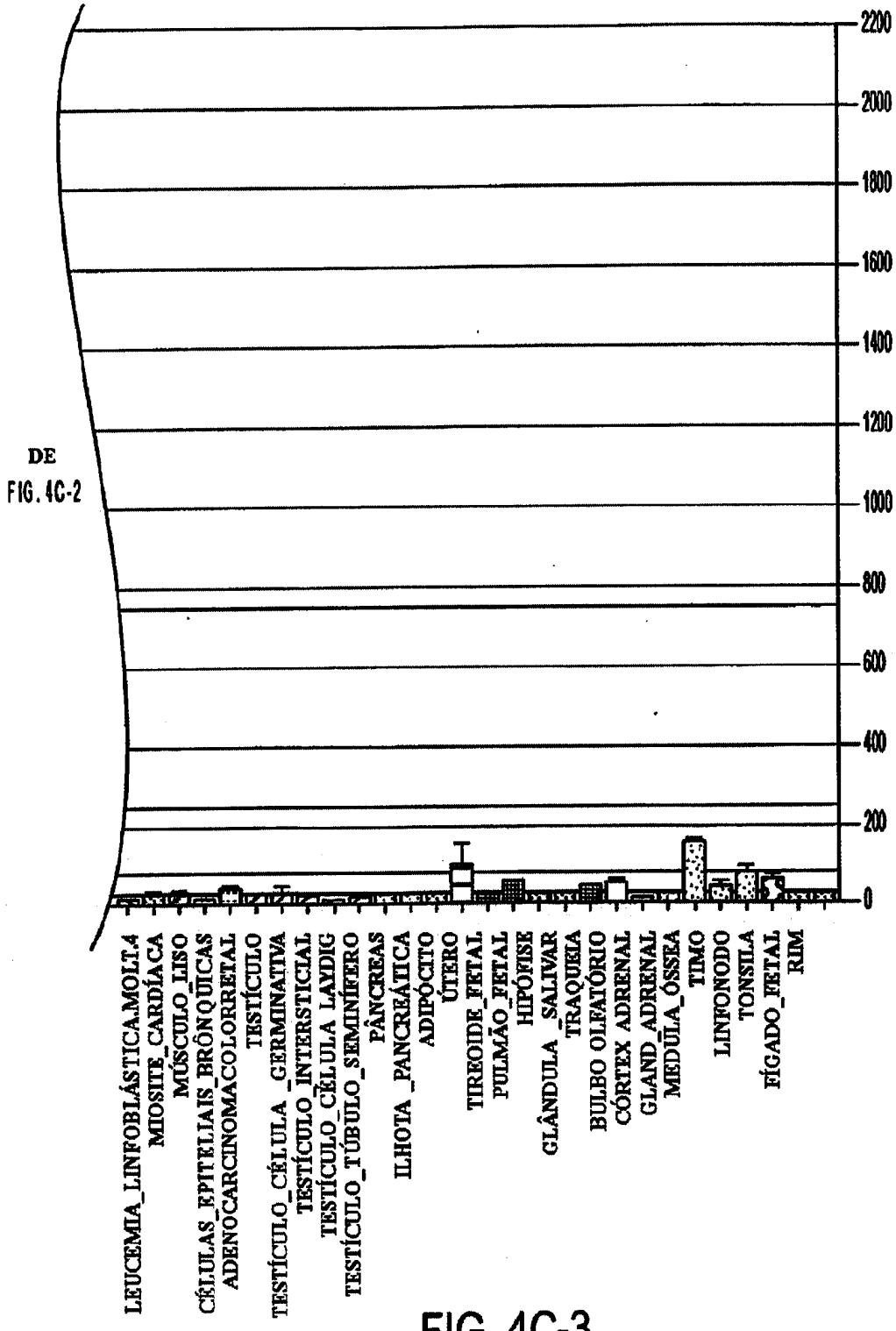


FIG. 4C-3

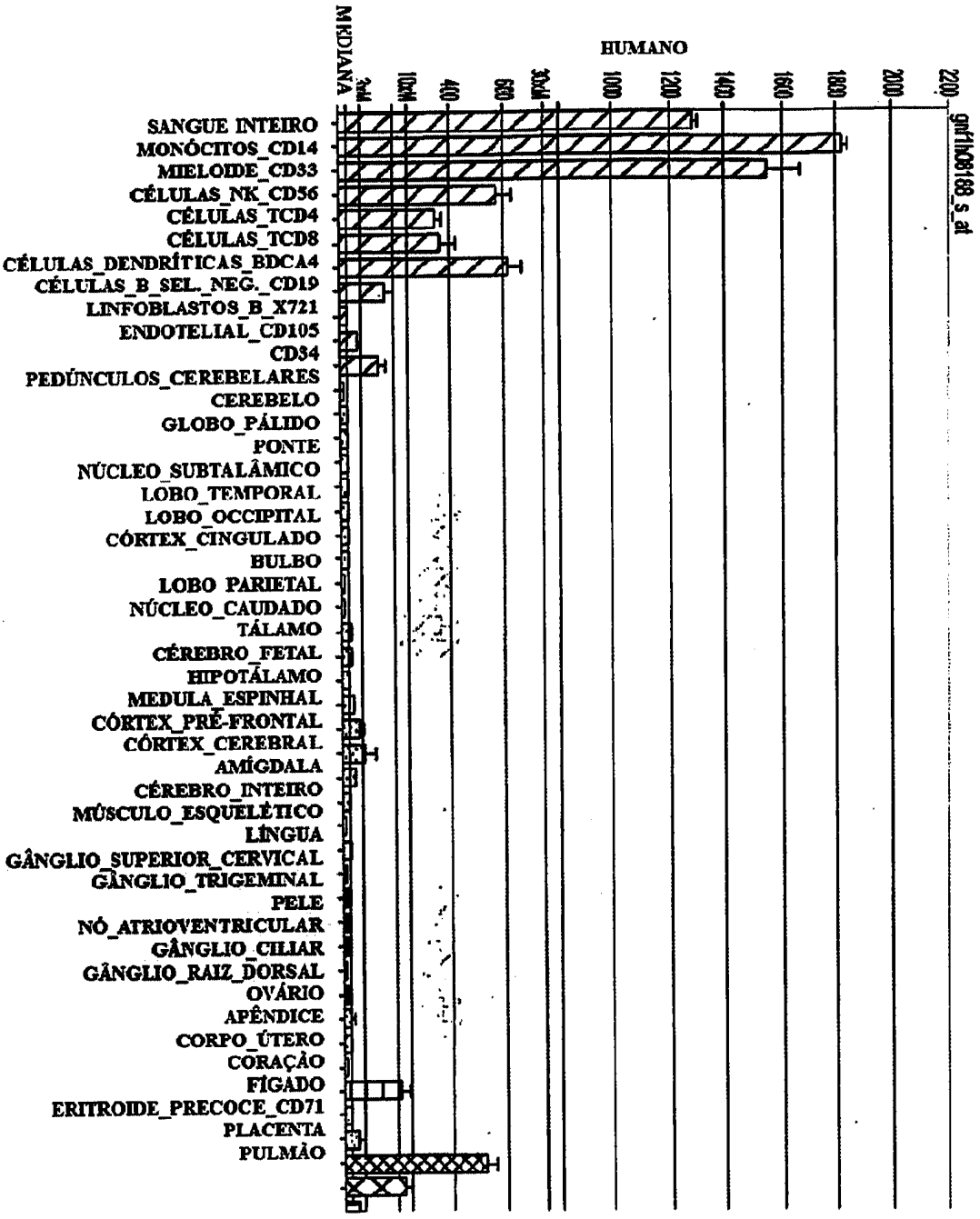

HUMANO
MEDIANA
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
gnf1h08188_s_at
SANGUE INTEIRO
MONÓCITOS_CD14
MIELOIDE_CD33
CÉLULAS_NK_CD56
CÉLULAS_TCD4
CÉLULAS_TCD8
CÉLULAS_DENDRÍTICAS_BDCA4
CÉLULAS_B_SEL._NEG._CD19
LINFOBLASTOS_B_X721
ENDOTELIAL_CD105
CD34
PEDÚNCULOS_CEREBELARES
CEREBELO
GLOBO_PÁLIDO
PONTE
NÚCLEO_SUBTALÂMICO
LOBO_TEMPORAL
LOBO_OCCIPITAL
CÓRTEX_CINGULADO
BULBO
LOBO PARIETAL
NÚCLEO_CAUDADO
TÁLAMO
CÉREBRO_FETAL
HIPOTÁLAMO
MEDULA_ESPINHAL
CÓRTEX_PRÉ-FRONTAL
CÓRTEX_CEREBRAL
AMÍGDALA
CÉREBRO_INTEIRO
MÚSCULO_ESQUELÉTICO
LÍNGUA
GÂNGLIO_SUPERIOR_CERVICAL
GÂNGLIO_TRIGEMINAL
PELE
NÓ_ATRIOVENTRICULAR
GÂNGLIO_CILIAR
GÂNGLIO_RAIZ_DORSAL
OVÁRIO
APÊNDICE
CORPO_ÚTERO
CORAÇÃO
FÍGADO
ERITROIDE_PRECOCE_CD71
PLACENTA
PULMÃO

FIG. 4D

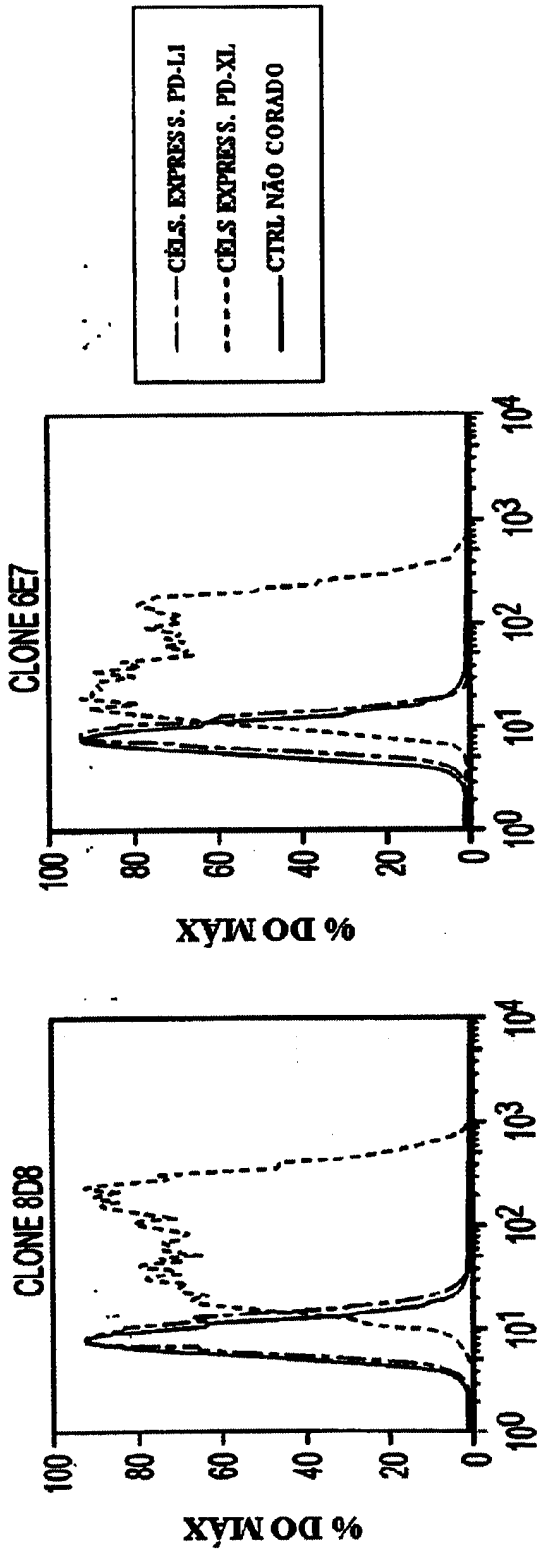

CÉLS. EXPRESS. PD-L1
CÉLS EXPRESS. PD-XL
CTRL NÃO CORADO
CLONE 6E7
CLONE 8D8
% DO MAX
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 5

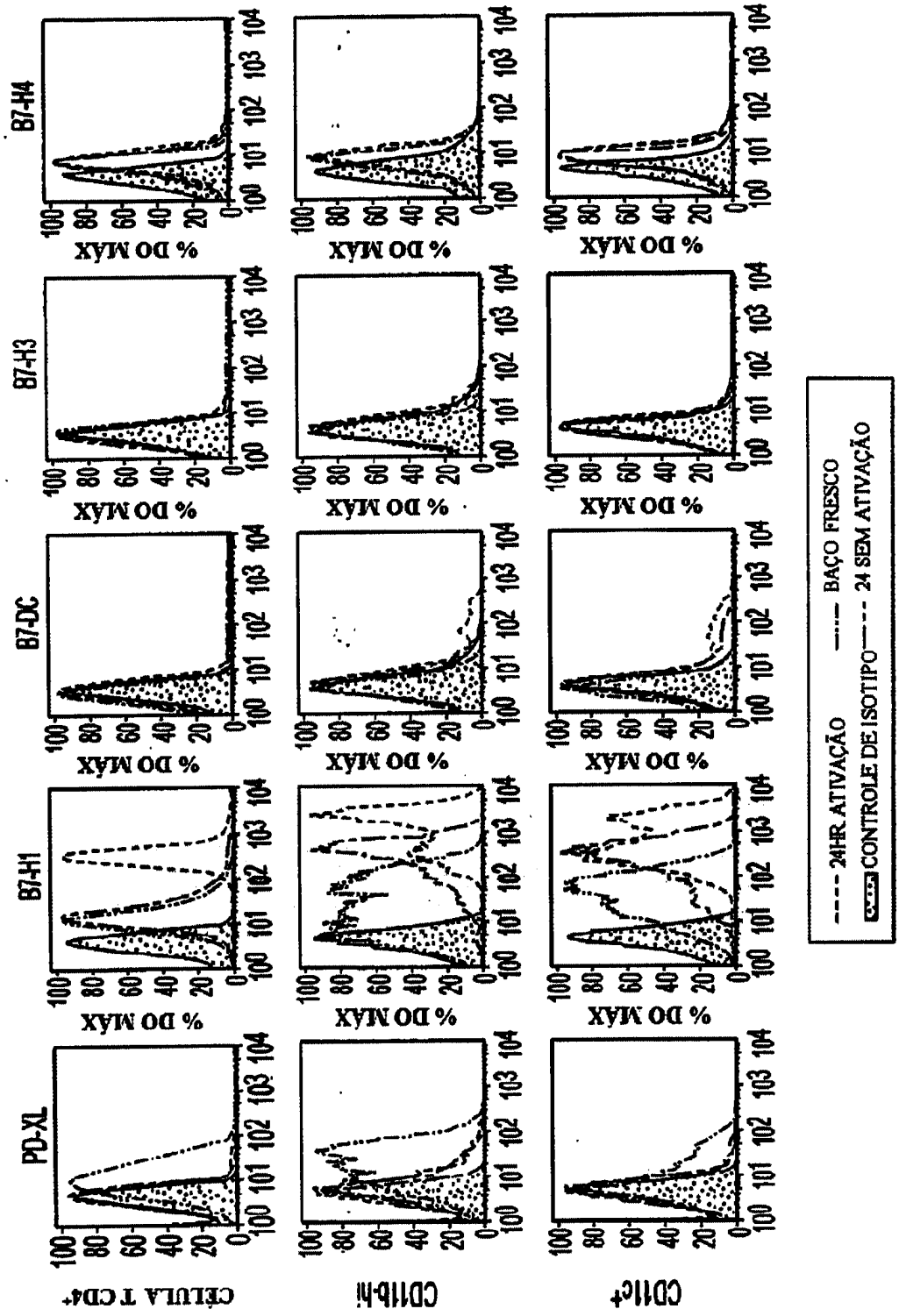

PD-XL
B7-H1
B7-DC
B7-H3
B7-H4
CÉLULA T CD4+
CD11b-hi
CD11c+
% DO MAX
24HR ATIVAÇÃO
BAÇO FRESCO
CONTROLE DE ISOTIPO
24 SEM ATIVAÇÃO

FIG. 6

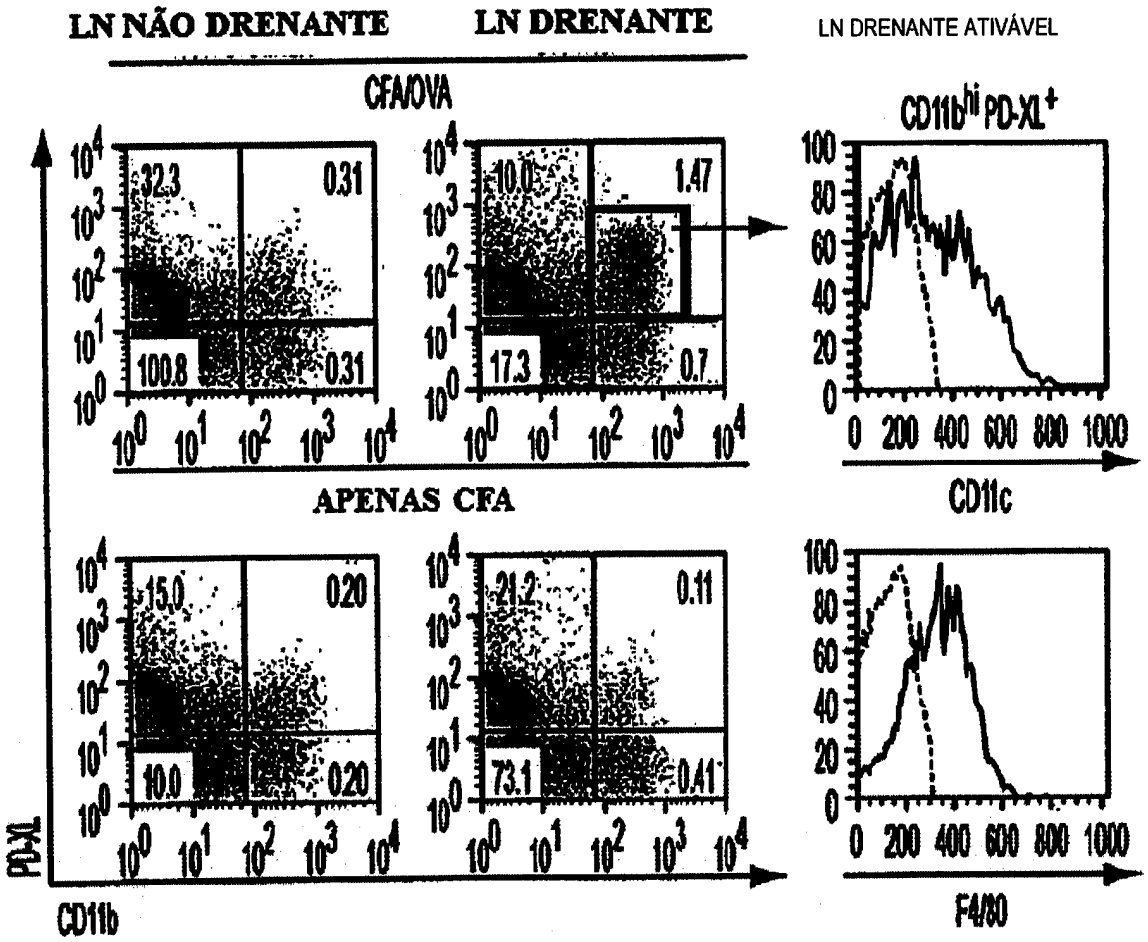

LN NÃO DRENANTE
LN DRENANTE
LN DRENANTE ATIVÁVEL
CFA/OVA
APENAS CFA
CD11b^hi PD-XL+
32.3
0.31
100.8
0.31
10.0
1.47
17.3
0.7
15.0
0.20
10.0
0.20
21.2
0.11
73.1
0.41
PD-XL
CD11b
CD11c
F4/80

FIG. 7A

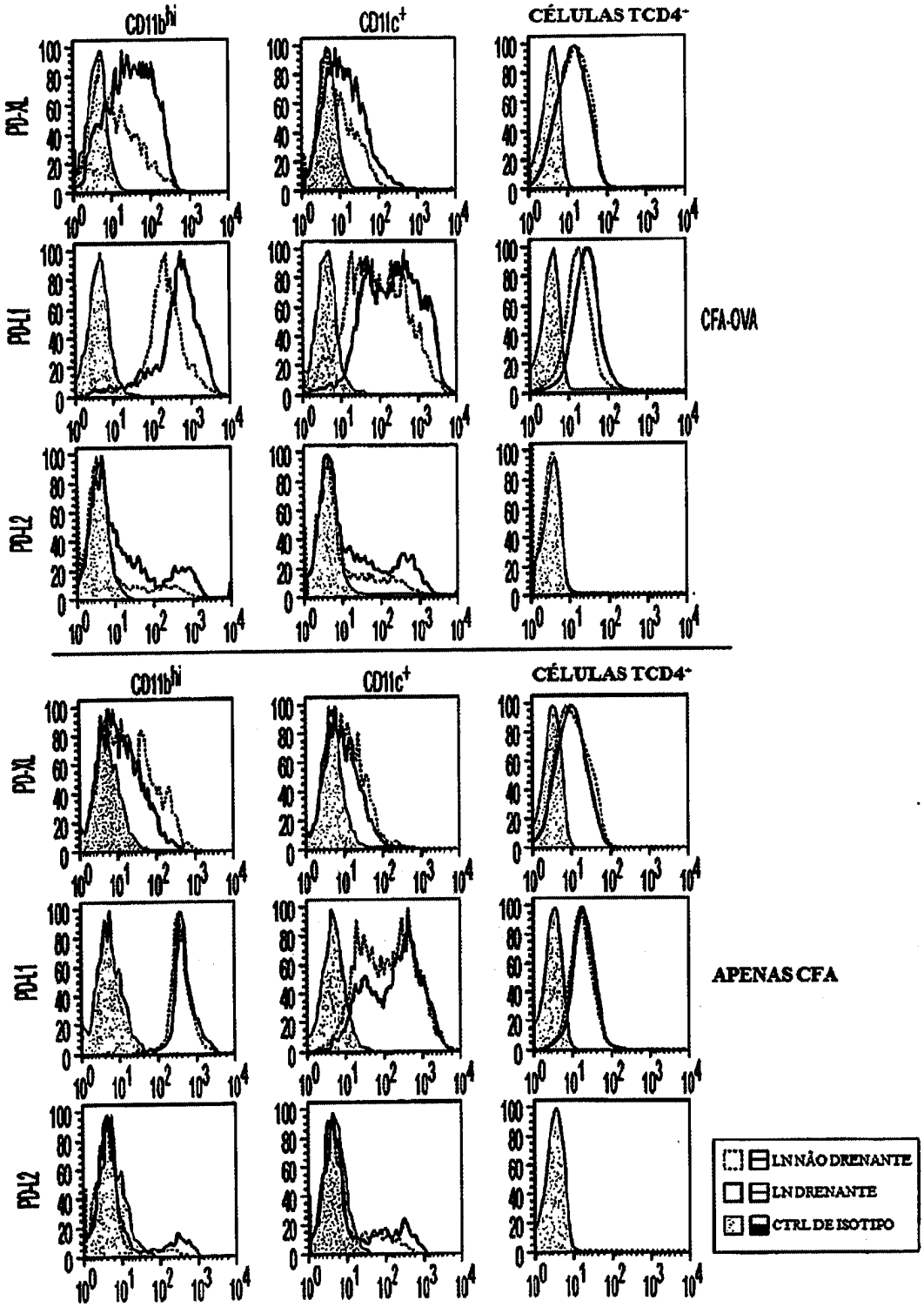

CD11b^hi
CD11c^+
CÉLULAS TCD4^-
PD-XL
PDL1
PDL2
CFA-OVA
APENAS CFA
LN NÃO DRENANTE
LN DRENANTE
CTRL DE ISOTIPO

FIG. 7B

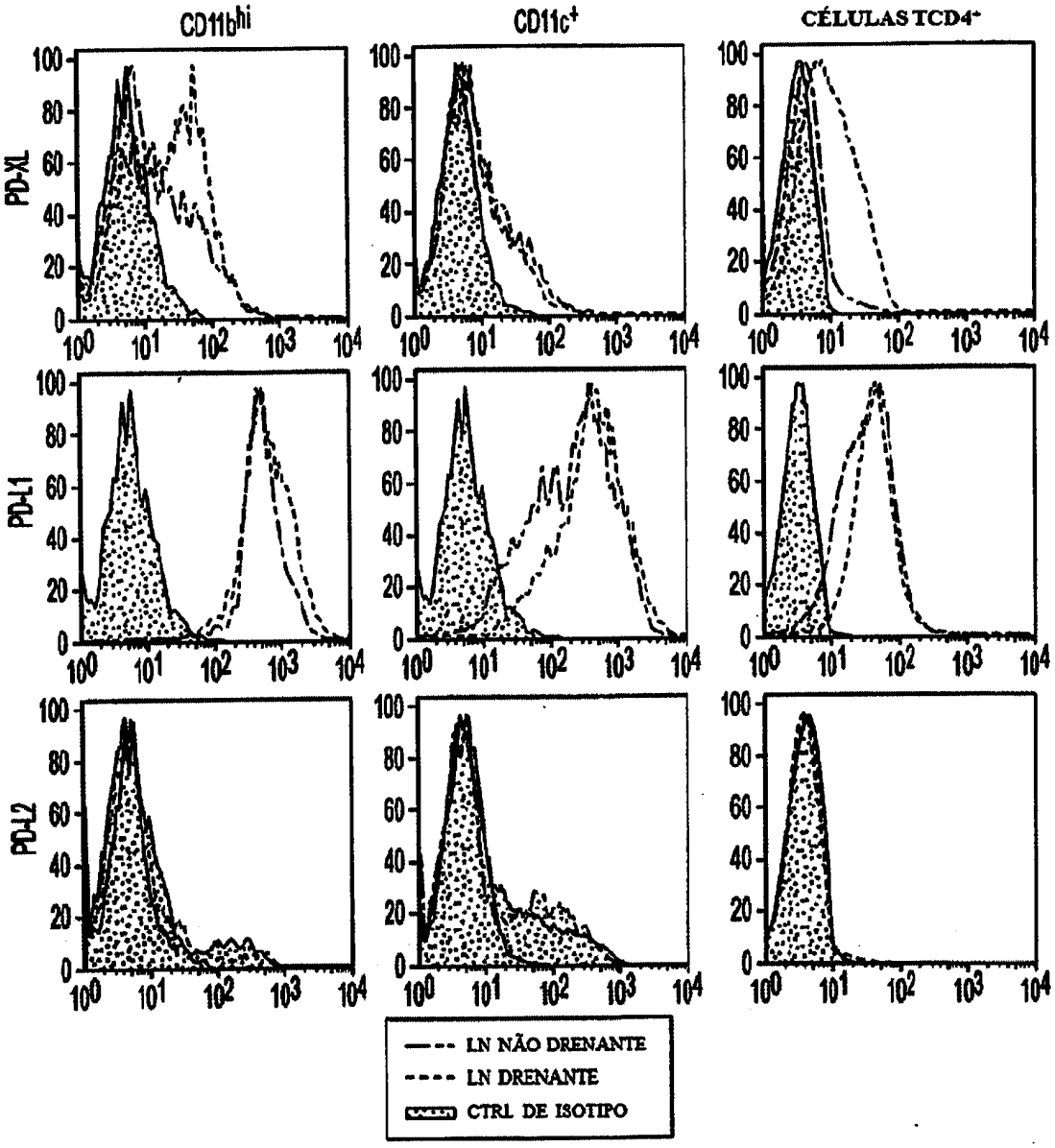

CD11b^hi
CD11c^+
CÉLULAS TCD4^+
PD-XL
PD-L1
PD-L2
LN NÃO DRENANTE
LN DRENANTE
CTRL DE ISOTIPO

FIG. 8

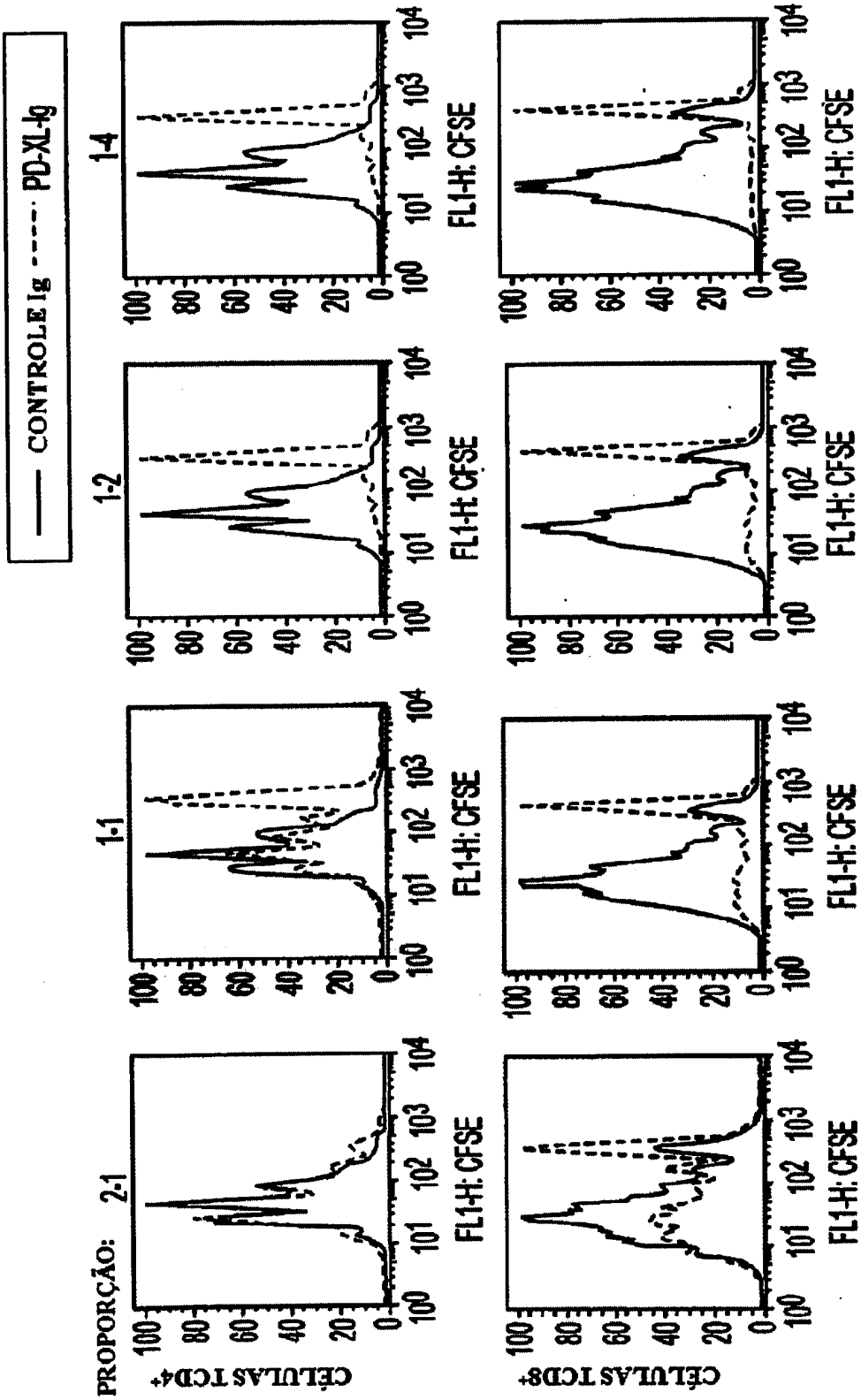

CONTROLE Ig ----- PD-XL-Ig
PROPORÇÃO: 2:1
1:1
1:2
1:4
CÉLULAS TCD4+
CÉLULAS TCD8+
FL1-H: CFSE

FIG. 9A

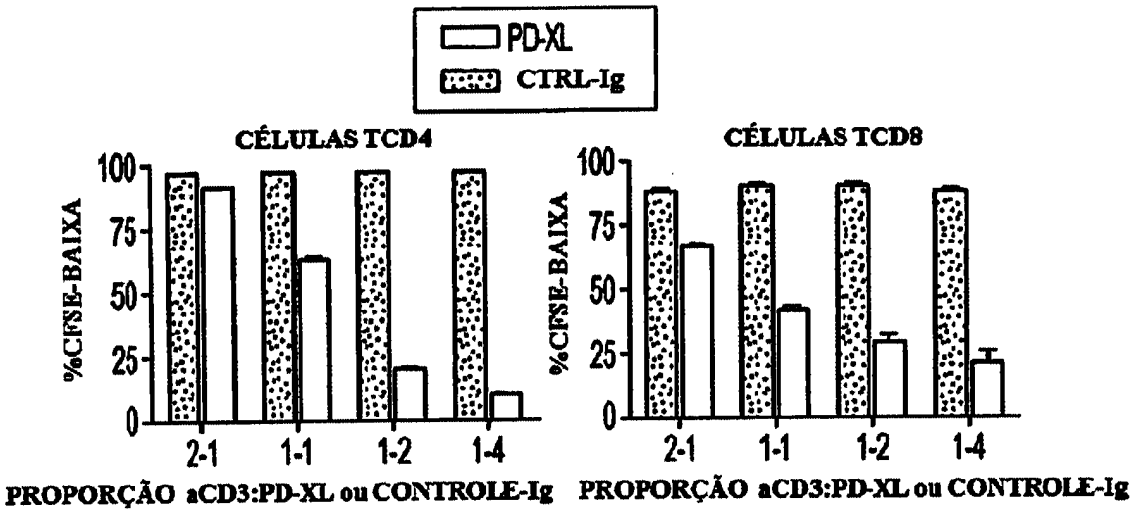

PD-XL
CTRL-Ig
CÉLULAS TCD4
CÉLULAS TCD8
%CFSE-BAIXA
100
75
50
25
0
2-1
1-1
1-2
1-4
PROPORÇÃO aCD3:PD-XL ou CONTROLE-Ig

FIG. 9B

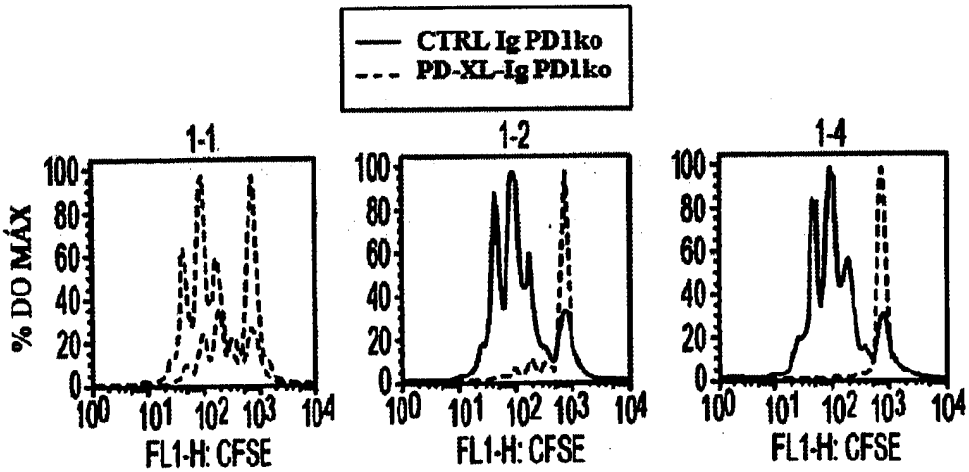

CTRL Ig PD1ko
PD-XL-Ig PD1ko
1-1
1-2
1-4
% DO MÁX
100
80
60
40
20
0
100
101
102
103
104
FL1-H: CFSE

FIG. 9C

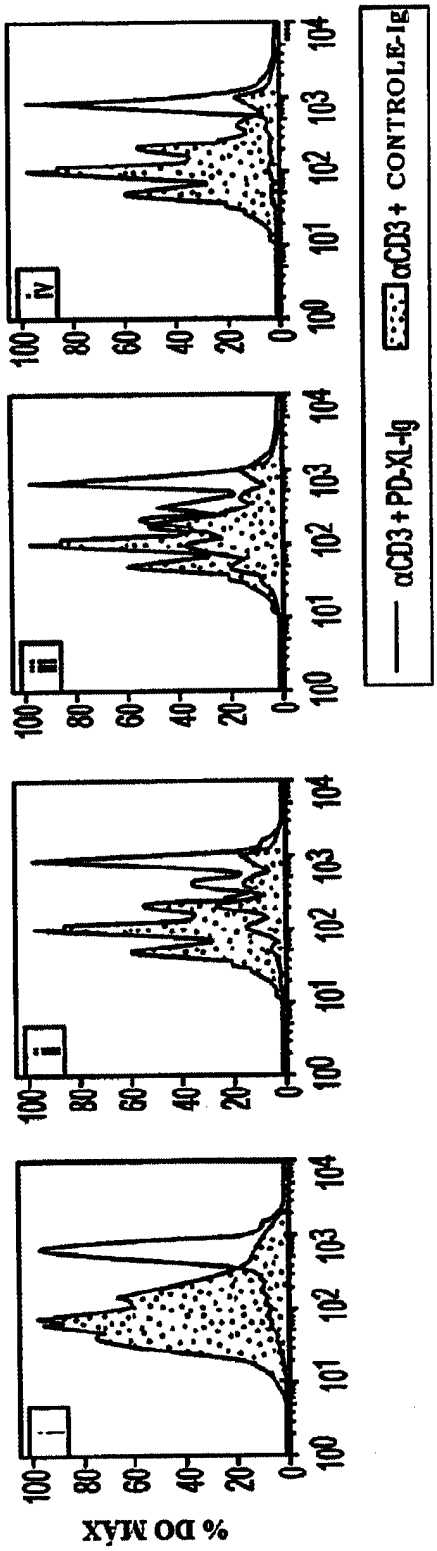


FIG. 9D

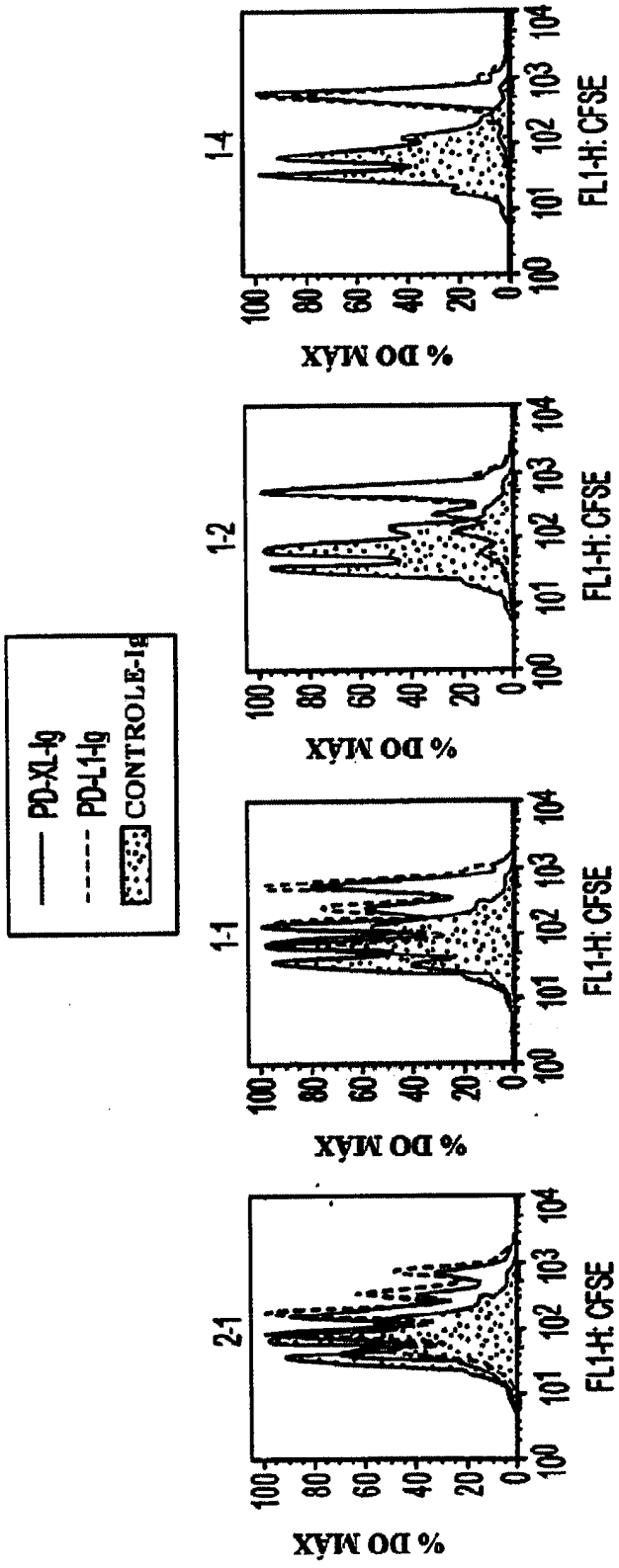

PD-X1-Ig
PD-L1-Ig
CONTROLE-Ig
1-4
1-2
1-1
2-1
% DO MAX
FL1-H: CFSE
0
20
40
60
80
100
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴

FIG. 10

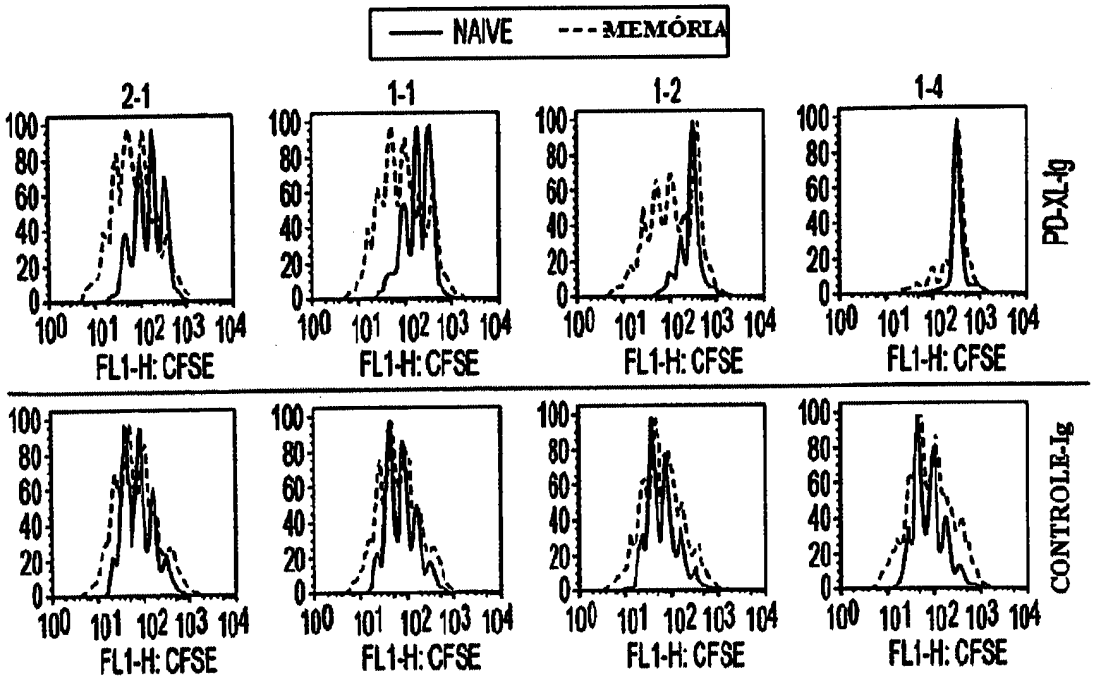


FIG. 11A

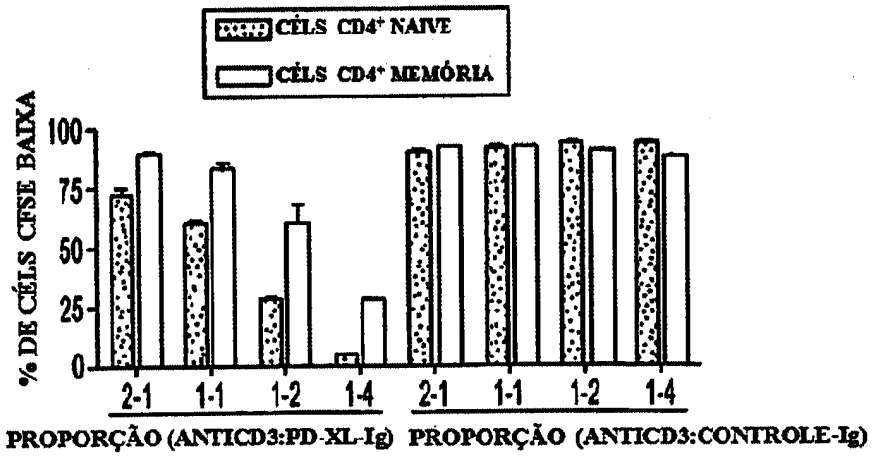


FIG. 11B

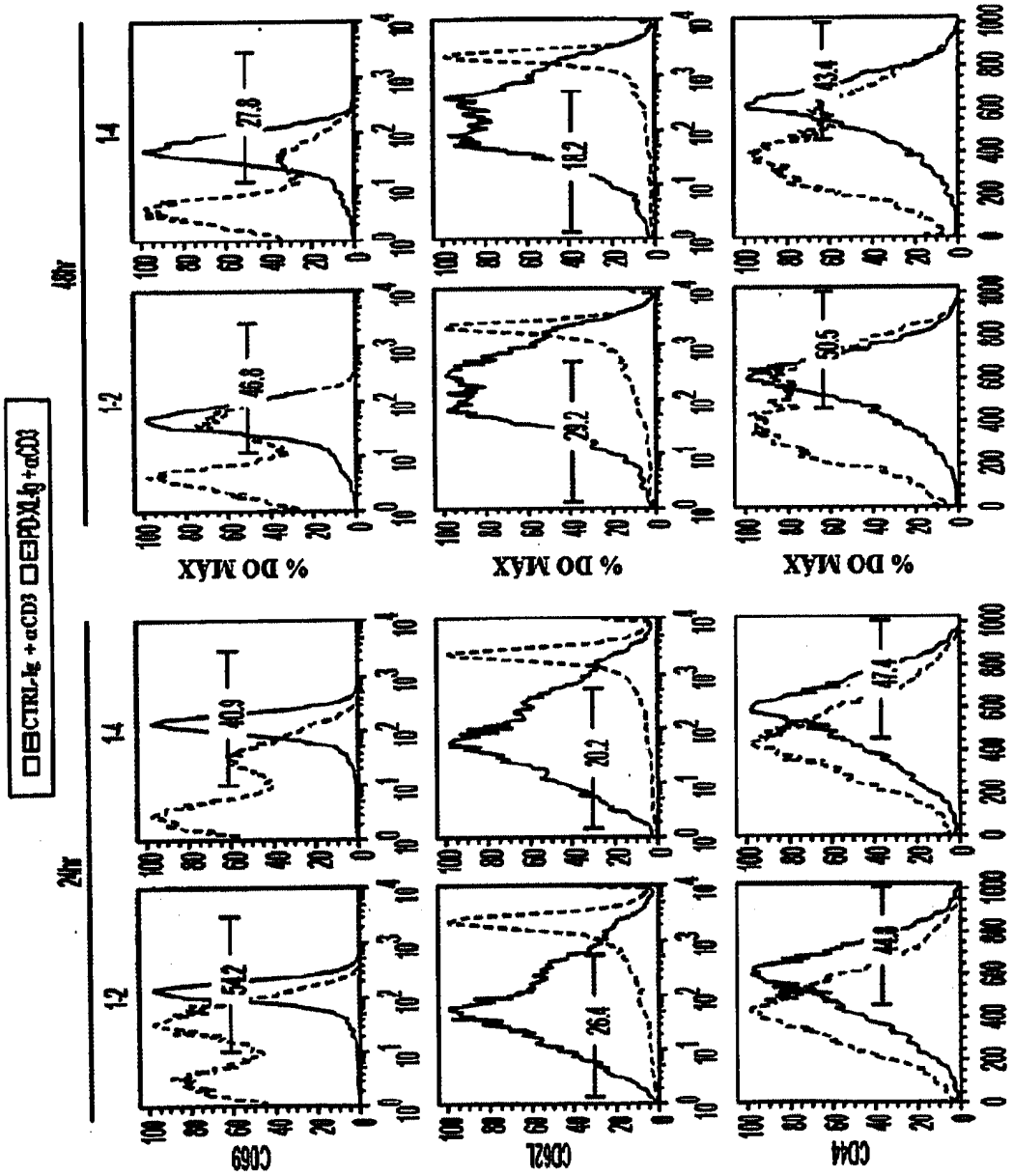

CTRL-Ig + αCD3
DO11.10-Ig + αCD3
24hr
48hr
1:2
1:4
% DO MAX
CD69
CD62L
CD44
54.2
40.3
46.8
27.8
26.4
20.7
28.2
10.2
44.8
47.4
50.5
43.4

FIG. 12A

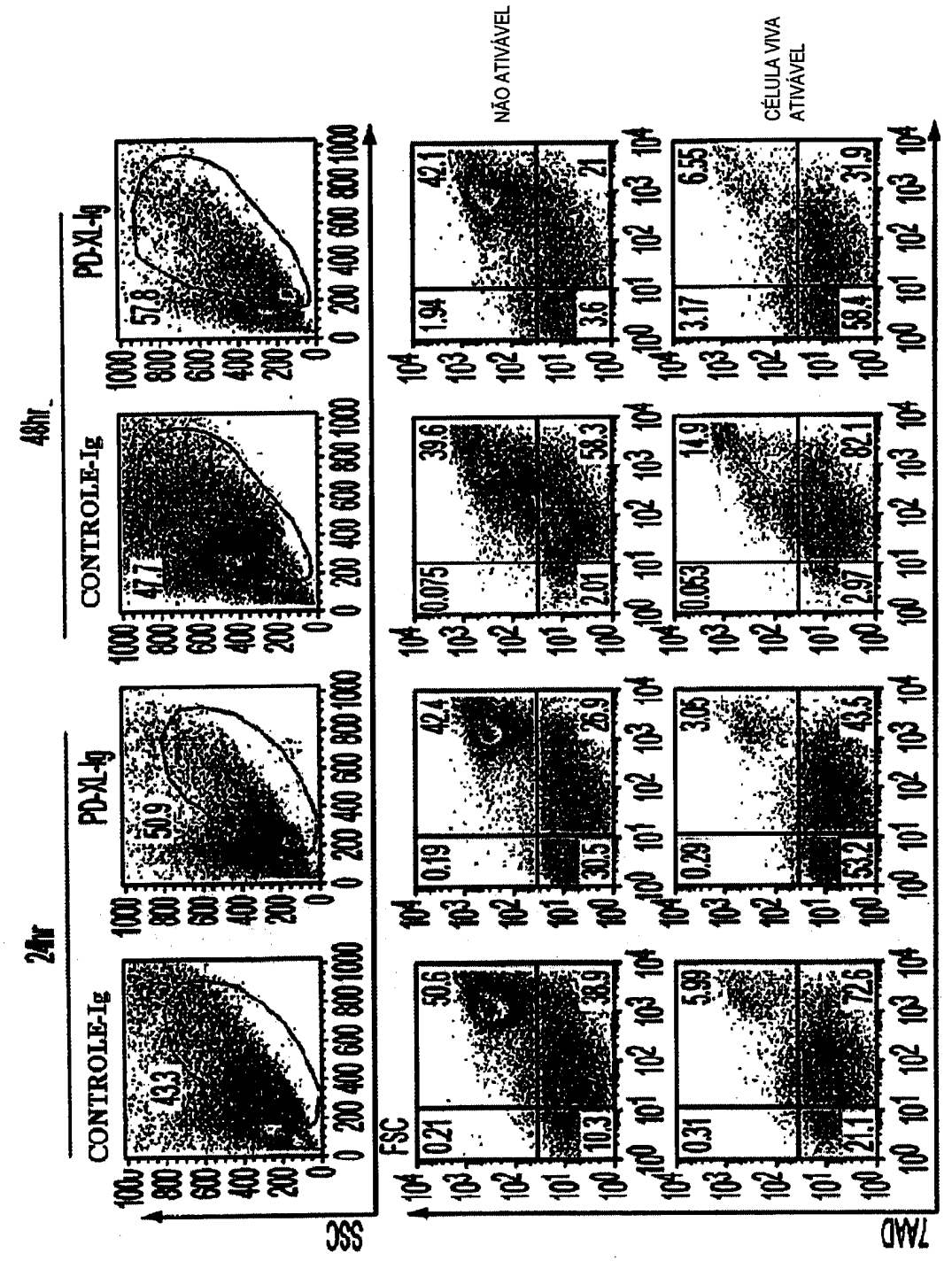

24hr
48hr
CONTROLE-Ig
PD-XL-Ig
CONTROLE-Ig
PD-XL-Ig
SSC
FSC
7AAD
ANEXINA-V
NÃO ATIVÁVEL
CÉLULA VIVA ATIVÁVEL
43.3
50.9
47.7
57.8
0.21
50.6
10.3
38.9
0.19
42.4
30.5
26.9
0.075
39.6
2.01
58.3
1.94
42.1
3.6
21
0.31
5.99
21.1
72.6
0.29
3.05
53.2
43.5
0.063
14.9
2.97
82.1
3.17
6.55
58.4
31.9

FIG. 12B

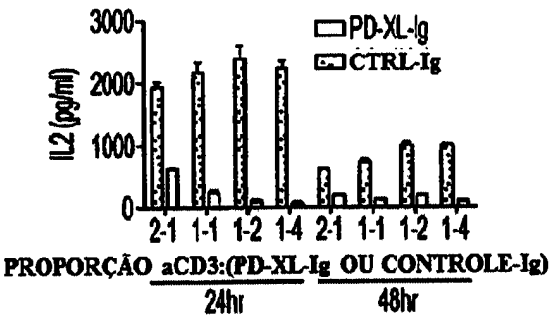


FIG. 13A

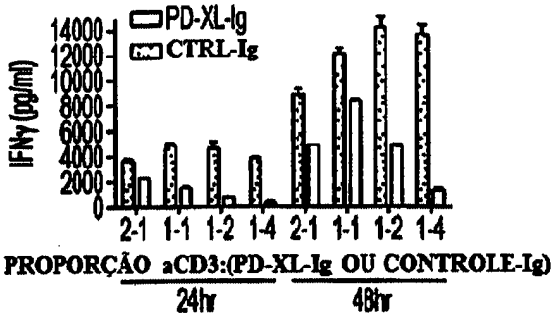


FIG. 13B

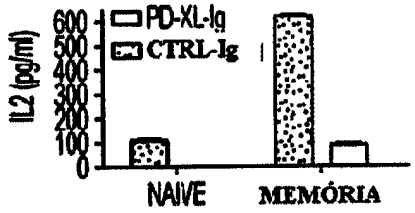


FIG. 13C

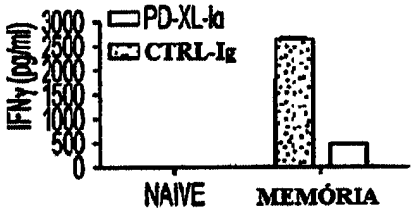


FIG. 13D

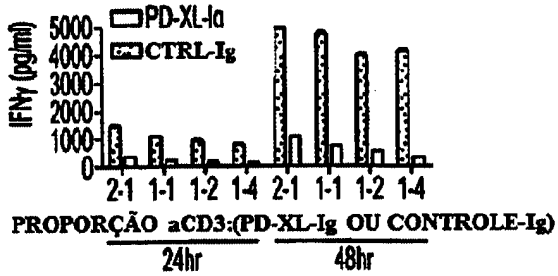


FIG. 13E

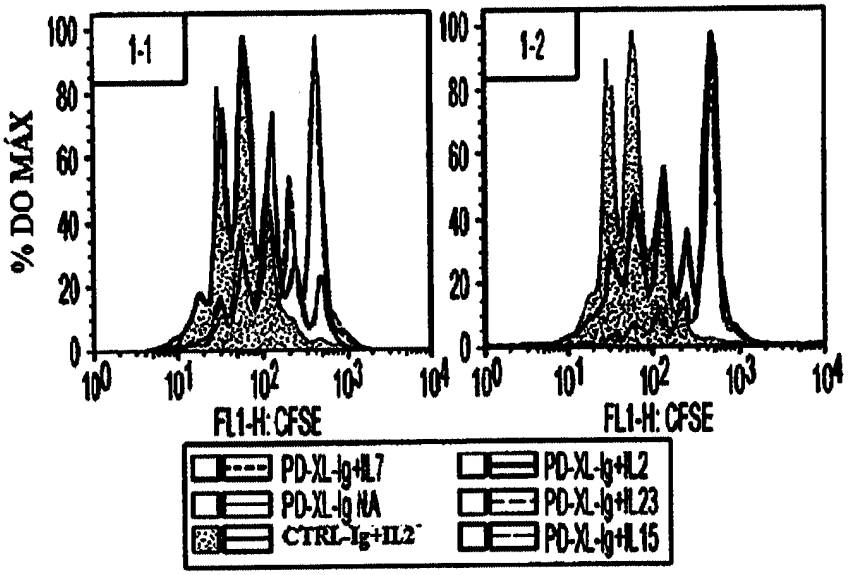


FIG. 14A

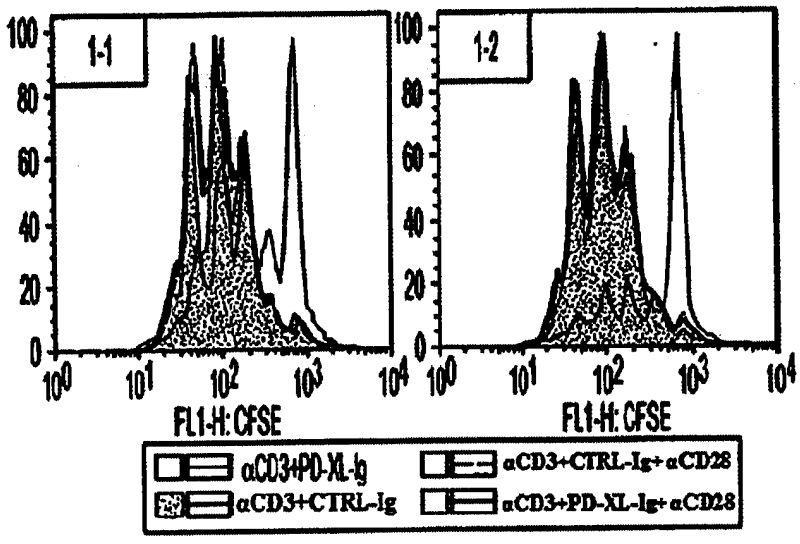


FIG. 14B

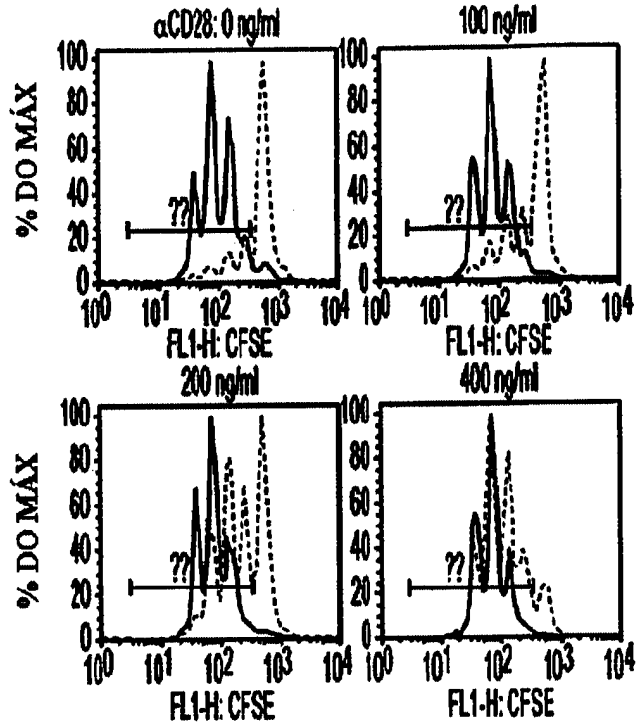


FIG. 14C

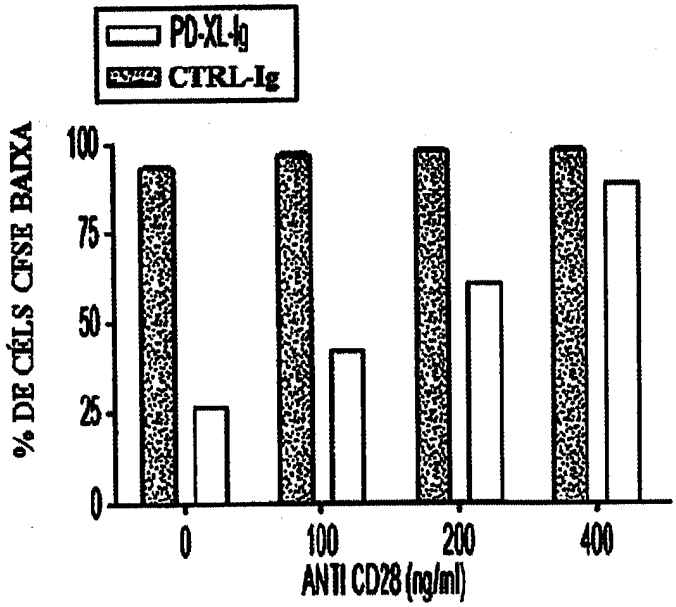


FIG. 14D

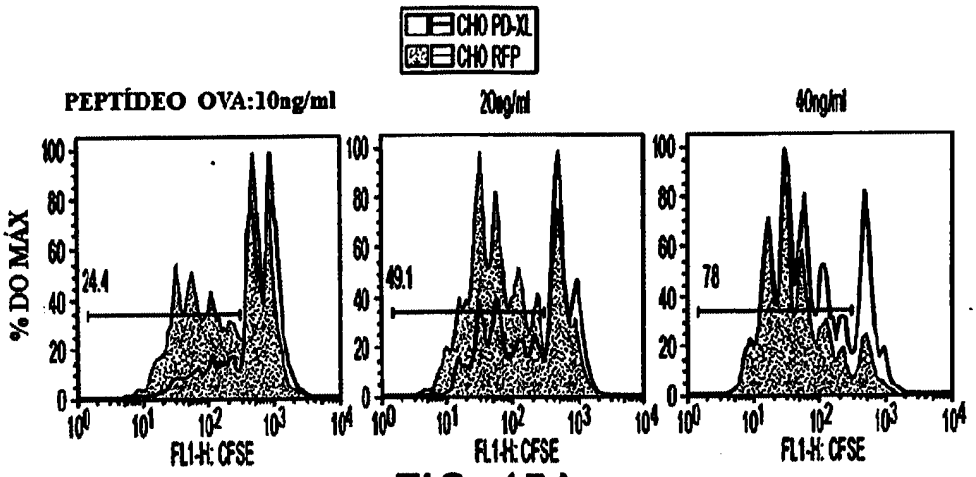


FIG. 15A

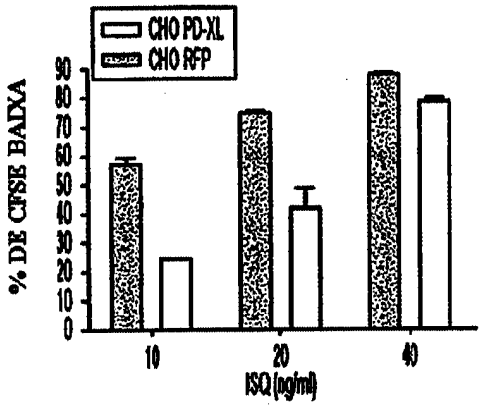


FIG. 15B

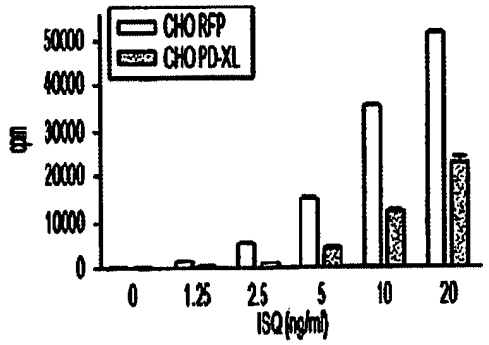


FIG. 15C

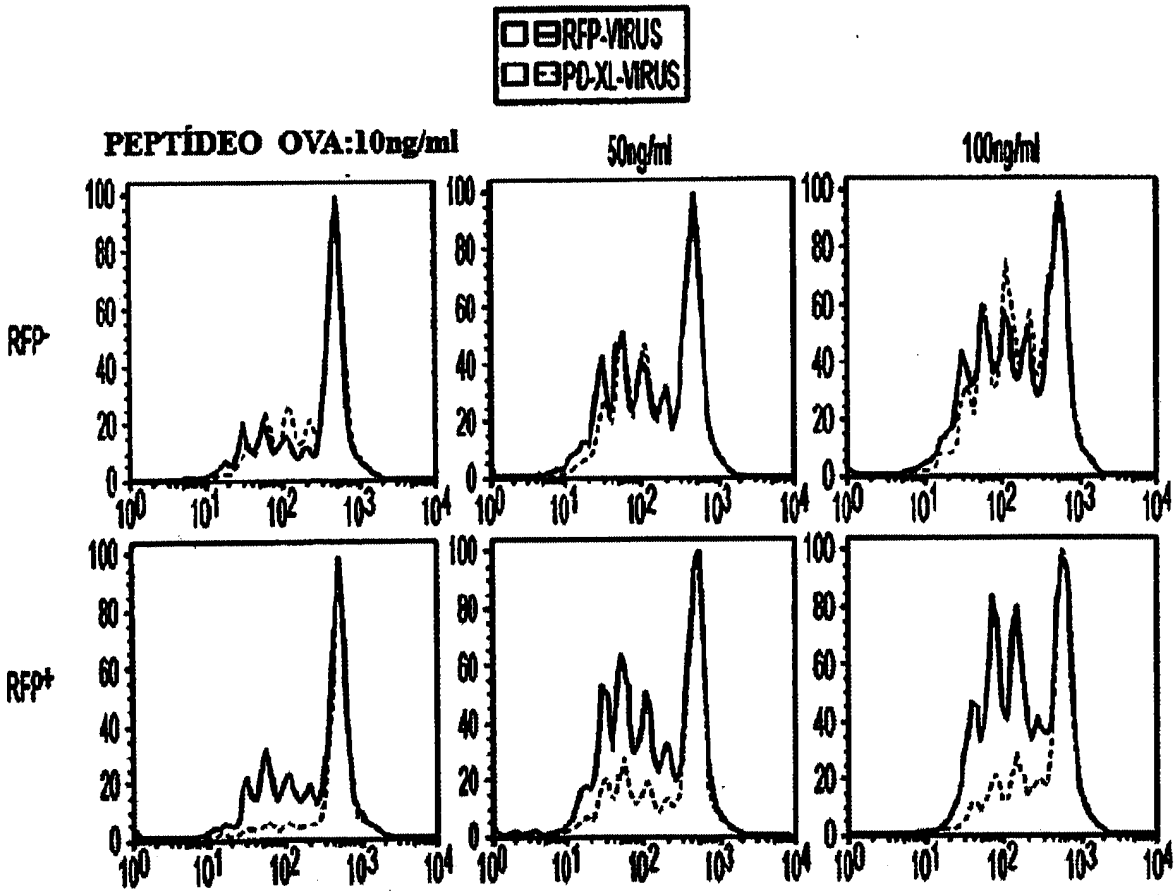

RFP-VIRUS
PD-XL-VIRUS
PEPTÍDEO OVA:10ng/ml
50ng/ml
100ng/ml
RFP-
RFP+

FIG. 15D

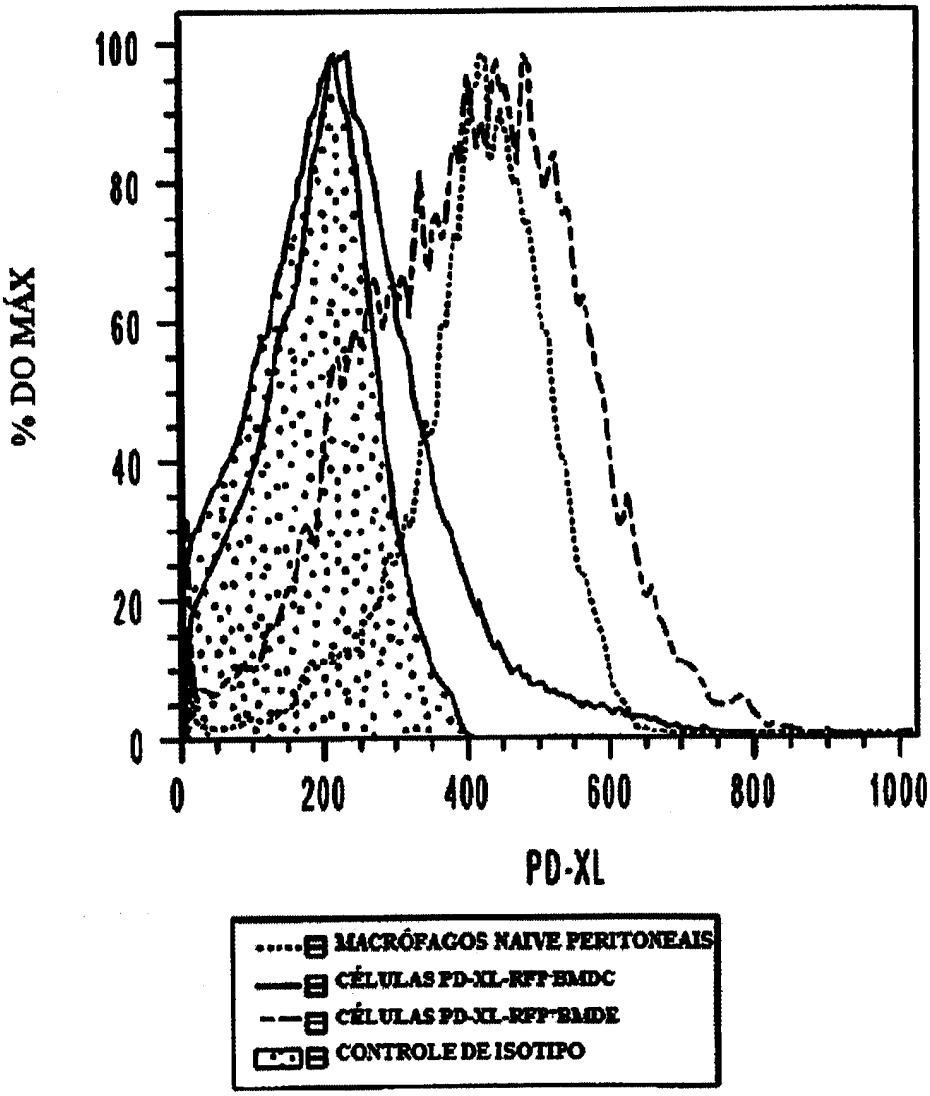

100
80
60
40
20
0
% DO MÁX
0
200
400
600
800
1000
PD-XL
MACRÓFAGOS NAIVE PERITONEAIS
CÉLULAS PD-XL-RFP BMDC
CÉLULAS PD-XL-RFP BMDE
CONTROLE DE ISOTIPO

FIG. 16

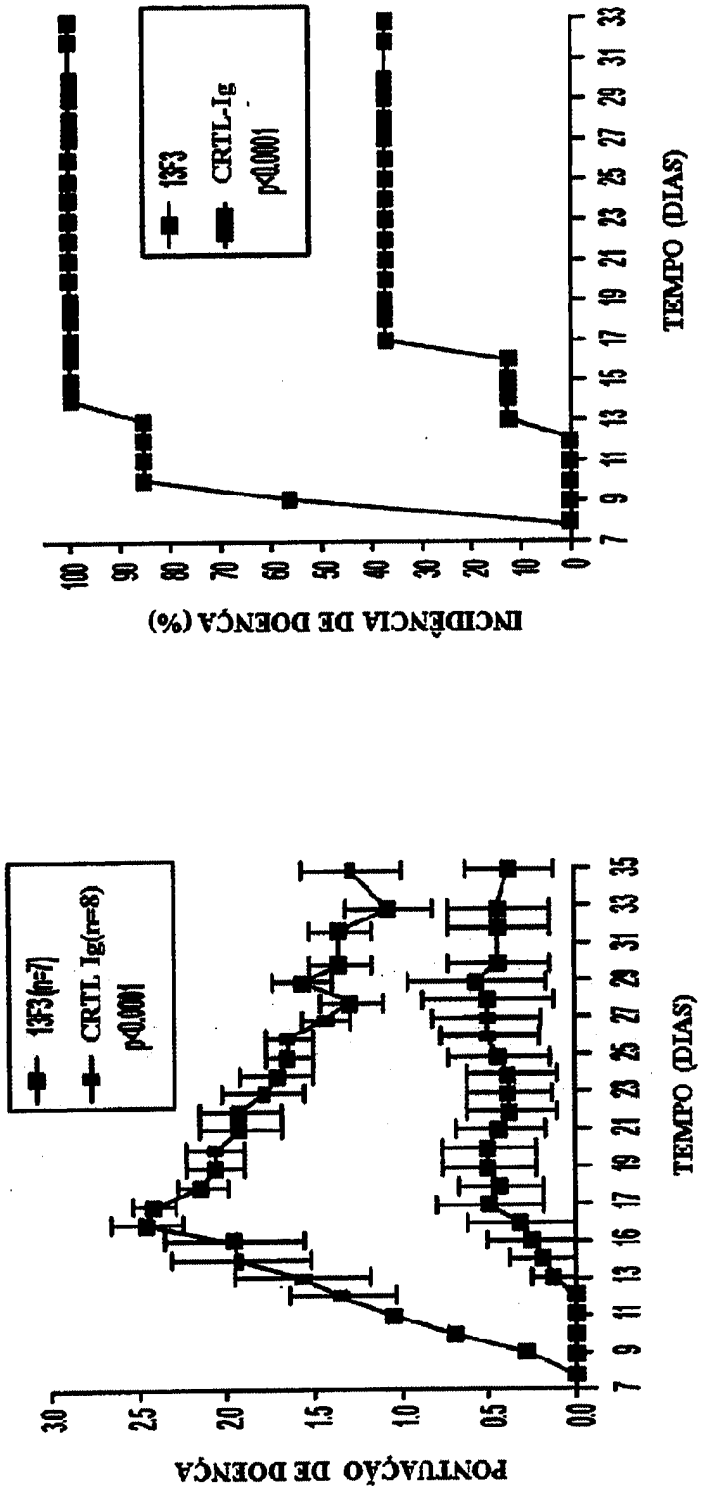

INCIDÊNCIA DE DOENÇA (%)
TEMPO (DIAS)
1F3
CRTL-Ig
p<0.0001
PONTUAÇÃO DE DOENÇA
TEMPO (DIAS)
1F3(n=7)
CRTL Ig(n=8)
p<0.0001

FIG. 17

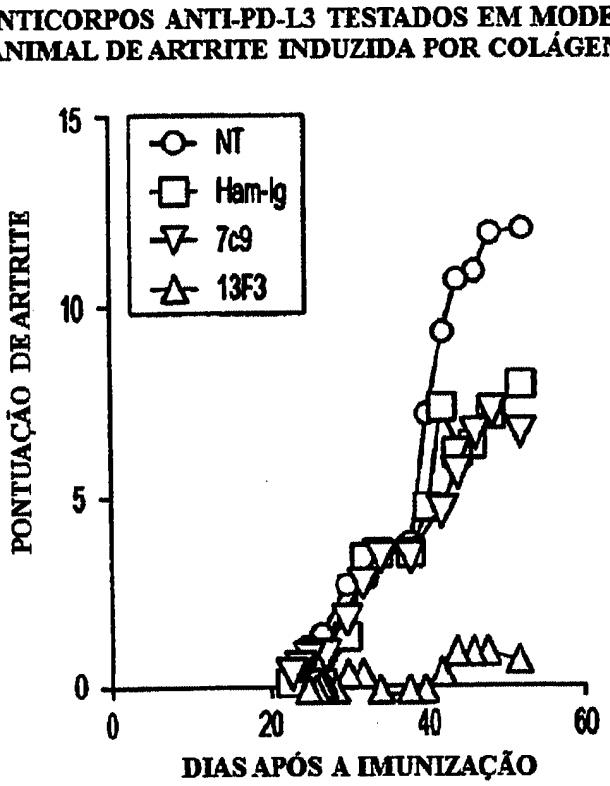

ANTICORPOS ANTI-PD-L3 TESTADOS EM MODELO ANIMAL DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO
PONTUAÇÃO DE ARTRITE
15
10
5
0
NT
Ham-Ig
7c9
13F3
0
20
40
60
DIAS APÓS A IMUNIZAÇÃO

FIG. 18

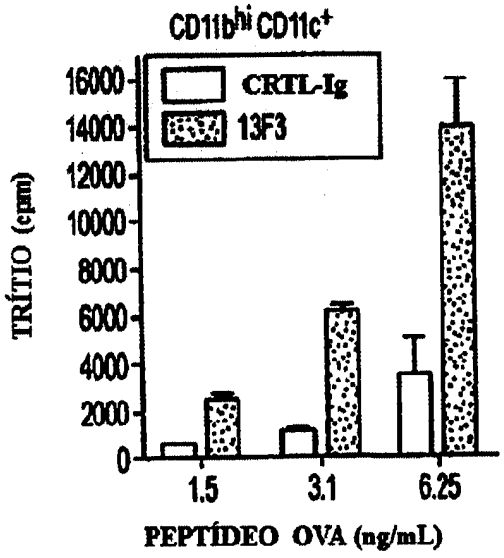

CD11b^hi CD11c^+
TRÍTIO (cpm)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CRTL-Ig
13F3
1.5
3.1
6.25
PEPTÍDEO OVA (ng/mL)

FIG. 19

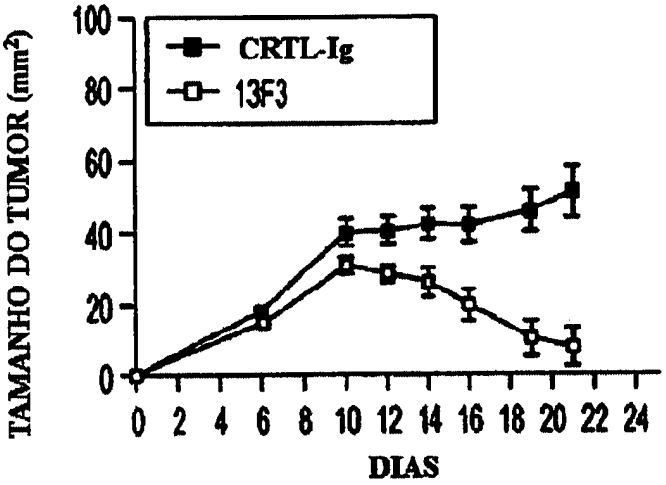


FIG. 20

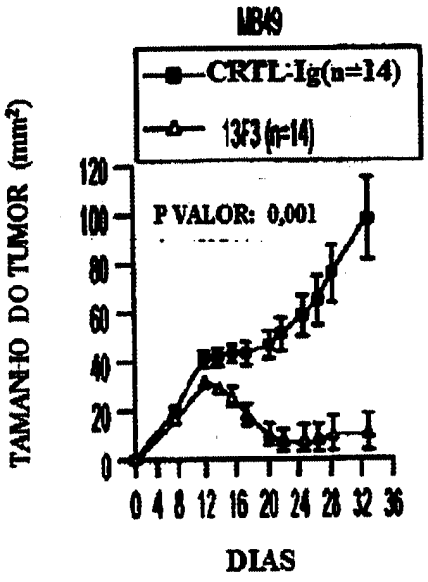


FIG. 21A

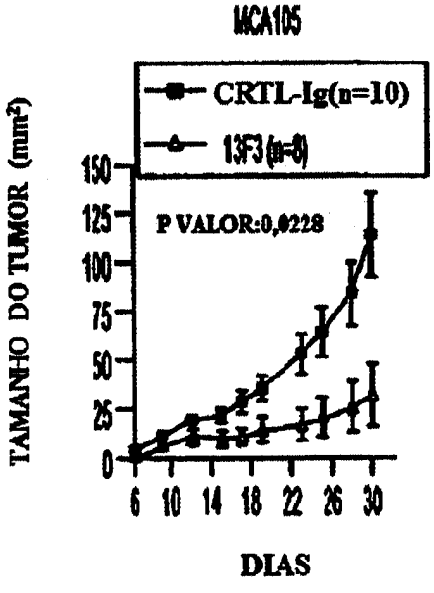


FIG. 21B

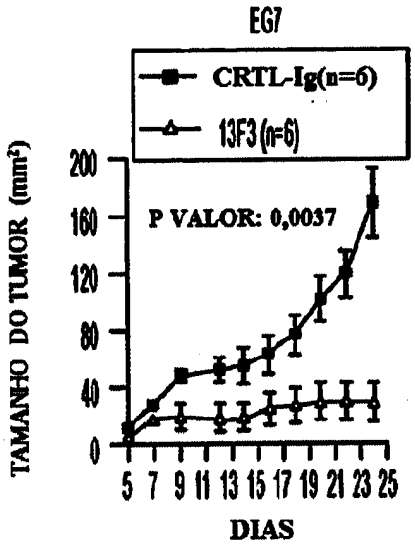


FIG. 21C

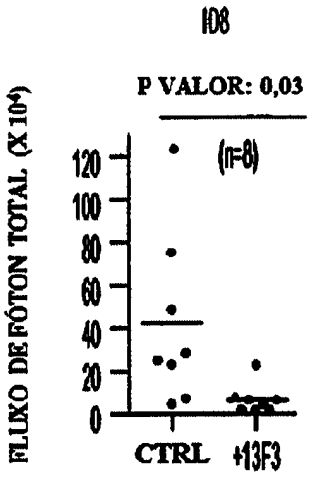


FIG. 21D

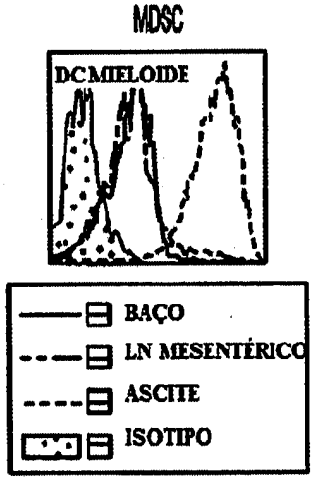


FIG. 21E

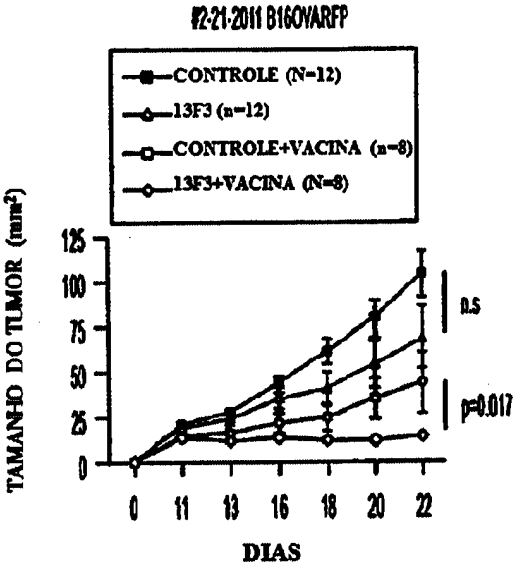

#2-21-2011 B16OVARFP
CONTROLE (N=12)
13F3 (n=12)
CONTROLE+VACINA (n=8)
13F3+VACINA (N=8)
TAMANHO DO TUMOR (mm²)
125
100
75
50
25
0
0
11
13
16
18
20
22
DIAS
0.5
p=0.017

FIG. 22

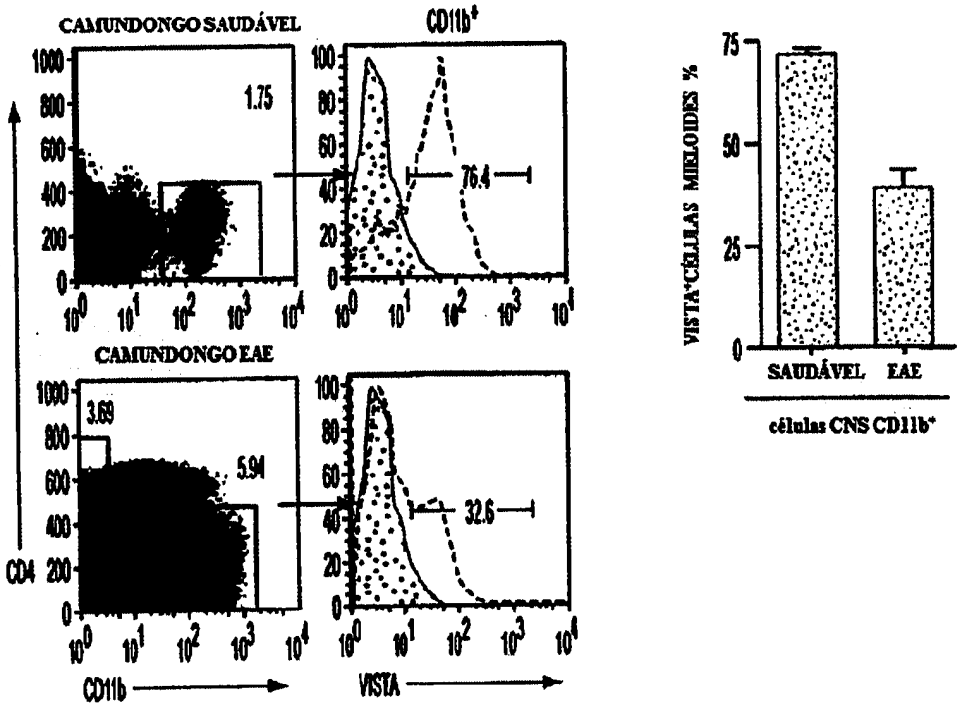

CAMUNDONGO SAUDÁVEL
CD11b+
1.75
76.4
CAMUNDONGO EAE
3.69
5.94
32.6
CD4
CD11b
VISTA
VISTA+CÉLULAS MIELOIDES %
75
50
25
0
SAUDÁVEL
EAE
células CNS CD11b+

FIG. 23

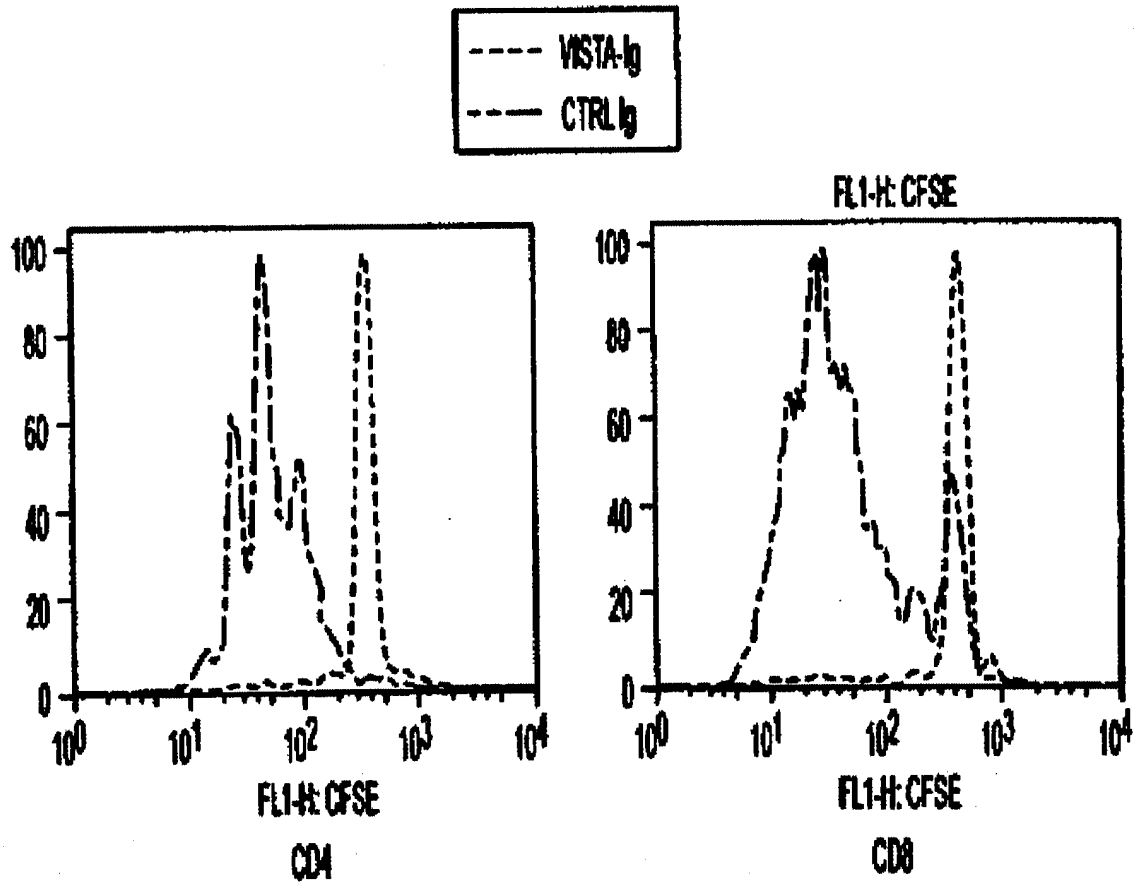

VISTA-Ig
CTRL Ig
FL1-H: CFSE
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H: CFSE
CD4
FL1-H: CFSE
CD8

FIG. 24