(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105246507 B
(45)授权公告日 2019.01.25

(21)申请号 201380058195.9
(22)申请日 2013.09.09
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105246507 A
(43)申请公布日 2016.01.13
(30)优先权数据
61/698,003 2012.09.07 US
PCT/US2013/047009 2013.06.21 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.05.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/058785 2013.09.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/039983 EN 2014.03.13
(73)专利权人 达特茅斯大学理事会
地址 美国新罕布什尔州
专利权人 伦敦国王学院
(72)发明人 R·J·诺埃勒
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 李程达
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2006116181 A2,2006.11.02,
WO 2011120013 A2,2011.09.29,
Wieger J. Norde等.Co-inhibitory molecules in hematological malignancies: targets for therapeutic intervention.《Blood》.2012,第120卷728-736.
Li Wang 等.VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses.《JEM》.2011,第208卷(第3期),577-592.
审查员 奚静

权利要求书2页 说明书133页
序列表46页 附图48页

(54)发明名称

用于诊断和治疗癌症的VISTA调节剂

(57)摘要

本公开涉及在有需要的患者中活化免疫反应的组合物和治疗方法。在一个优选实施方案中,任选地与第二检查点通路的拮抗剂如PD-1组合,所述主题方法和组合物能够拮抗VISTA的活性,所述VISTA是一种有助于免疫耐受性的天然存在的“检查点”蛋白。例如,这些方法和组合物可以适用于预防和治疗结肠癌或另一种癌症。本文中显示示例性VISTA拮抗剂,具体来说是抗VISTA抗体,会体外和体内活化针对癌细胞的免疫反应,从而赋予减小肿瘤负荷的保护性抗肿瘤免疫性。另外,当VISTA拮抗剂与第二检查点蛋白拮抗剂,具体来说是针对PD-1配体(PD-L1)的抗体组合使用时观测到附加益处。

CN 105246507 B

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

1.抗VISTA抗体和抗PD-L1抗体组合用于制备用于治疗具有癌症的受试者的试剂的用途。

2.如权利要求1所述的用途，其中所述癌症是结肠直肠癌。

3.如权利要求1所述的用途，其中所述癌症是肉瘤、黑素瘤、淋巴瘤、白血病、神经母细胞瘤或恶性肿瘤。

4.如权利要求1-3中任一项所述的用途，其中所述试剂进一步包含药学上可接受的载体。

5.如权利要求1所述的用途，其中所述癌症是棘皮瘤、腺泡细胞癌、听神经瘤、肢端雀斑样痣黑素瘤、肢端汗腺瘤、急性嗜酸粒细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、急性巨核母细胞白血病、急性单核细胞性白血病、急性髓母细胞性白血病伴成熟、急性骨髓树突细胞白血病、急性骨髓白血病、急性早幼粒细胞白血病、釉质瘤、腺癌、腺样囊性癌、腺瘤样牙原性肿瘤、肾上腺皮质癌、成人T细胞白血病、侵袭性NK细胞白血病、AIDS相关癌症、肺泡样软组织肉瘤、釉母细胞纤维瘤、肛门癌、多形性大细胞淋巴瘤、多形性甲状腺癌、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、血管肌脂瘤、血管肉瘤(angiosarcoma)、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎瘤横纹肌样肿瘤、基底细胞癌、基底细胞样恶性肿瘤、B细胞白血病、贝利尼管恶性肿瘤、胆道癌、膀胱癌、胚细胞瘤、骨癌、脑肿瘤、乳癌、布伦纳瘤、支气管肿瘤、细支气管肺泡癌、棕色瘤、伯基特氏淋巴瘤、原发部位不明癌症、类癌瘤、原位癌、阴茎癌、原发部位不明恶性肿瘤、癌肉瘤、卡斯尔曼氏病、中枢神经系统胚胎性瘤、宫颈癌、胆管癌、软骨瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、绒毛膜癌、脉络丛乳头状瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性单核细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性骨髓增殖性病症、慢性中性粒细胞白血病、透明细胞瘤、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、德戈斯病、隆凸性皮肤纤维肉瘤、皮样囊肿、促结缔组织增殖小圆细胞肿瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、胚胎发育不良性神经上皮肿瘤、胚胎癌、内胚层窦瘤、子宫内膜癌、子宫内膜子宫癌、子宫内膜样肿瘤、肠病相关T细胞淋巴瘤、成室管膜细胞瘤、室管膜瘤、上皮样肉瘤、红白血病、食道癌、敏感性神经胚细胞瘤、尤文氏家族肿瘤、尤文氏家族肉瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、乳腺外佩吉特氏病、输卵管癌、胎内胎、纤维瘤、纤维肉瘤、滤泡性淋巴瘤、滤泡性甲状腺癌、胆囊癌、节细胞神经瘤、胃淋巴瘤、胃肠癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠间质瘤、生殖细胞肿瘤、胚组织瘤、妊娠性绒毛膜癌、妊娠性滋养母细胞肿瘤、骨巨细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、血管球瘤、升糖素瘤、性腺母细胞瘤、粒层细胞瘤、毛细胞白血病、头颈癌、心脏癌、血管母细胞瘤、血管外皮瘤、血管内皮肉瘤(hemangiosarcoma)、血液科恶性疾病、肝细胞癌、肝脾性T细胞淋巴瘤、遗传性乳房-卵巢癌综合征、霍奇金氏淋巴瘤、下咽癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌、青少年骨髓单核细胞性白血病、卡波西肉瘤、肾癌、肝门胆管肿瘤、柯根勃瘤、喉癌、恶性小痣黑素瘤、唇和口腔癌、脂肉瘤、肺癌、黄体瘤、淋巴管瘤、淋巴管肉瘤、淋巴上皮癌、淋巴细胞性白血病、巨球蛋白血症、恶性纤维组织细胞瘤、恶性间皮瘤、恶性周边神经鞘肿瘤、恶性横纹肌样瘤、恶性蝾螈瘤、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、肥大细胞白血病、纵隔肿瘤、骨髓甲状腺癌、成神经管细胞瘤、髓上皮瘤、脑脊髓膜瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、潜伏的原发性转移性鳞片状颈癌、转移性尿道上皮癌、苗勒管混合瘤、单核细胞性白血病、口腔癌、粘液性肿瘤、多发性内分泌瘤综合征、多发性骨髓瘤、蕈样真菌病、脊髓发育不良疾病、骨髓白血病、骨髓肉瘤、骨髓增殖性疾病、粘液瘤、鼻腔癌、鼻咽癌、赘瘤、神经鞘瘤、神经纤维瘤、神经瘤、结节性黑素瘤、非霍奇

金淋巴瘤、非黑素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、眼部肿瘤、寡突星形细胞瘤、大嗜酸粒细胞瘤、视神经鞘脑脊髓膜瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低度恶性潜在肿瘤、乳房佩吉特氏病、潘科斯特肿瘤、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、乳头状瘤病、鼻窦癌、甲状旁腺癌、血管周上皮样细胞肿瘤、咽癌、嗜铬细胞瘤、中分化松果体实质肿瘤、成松果体细胞瘤、垂体肿瘤、浆细胞赘瘤、胸膜肺胚细胞瘤、多胚瘤、前体T-淋巴母细胞性淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、原发性肝癌、原发性腹膜癌、原始神经外胚层瘤、前列腺癌、腹膜假粘液瘤、直肠癌、肾细胞癌、牵涉染色体15上的NUT基因的呼吸道恶性肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌瘤、横纹肌肉瘤、里克特氏转化、骶尾骨畸胎瘤、唾液腺癌、许旺细胞瘤病、皮脂腺恶性肿瘤、继发性赘瘤、精原细胞瘤、浆液肿瘤、史脱力-雷迪格细胞瘤、性索间质瘤、塞扎里综合征、印戒细胞癌、小圆蓝细胞瘤、小细胞恶性肿瘤、小细胞肺癌、小细胞淋巴瘤、小肠癌、软组织肉瘤、生长抑素瘤、煤烟疣、脊髓瘤、脊椎瘤、脾脏边缘区淋巴瘤、鳞状细胞癌瘤、胃癌、浅表性弥散型黑素瘤、幕上原始神经外胚层瘤、表面上皮间质肿瘤、滑膜肉瘤、T细胞白血病、畸胎瘤、末端淋巴癌、睾丸癌、泡膜细胞瘤、咽喉癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、移行细胞癌、脐尿管癌、尿道癌、泌尿生殖器赘瘤、子宫肉瘤、葡萄膜黑素瘤、阴道癌、弗纳-莫里森综合征、疣状癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症、沃辛氏肿瘤、威尔姆氏肿瘤或其任何组合。

用于诊断和治疗癌症的VISTA调节剂

[0001] 相关申请公开

[0002] 本申请要求2012年9月7日提交的美国临时申请61/698,003的优先权。另外，本申请涉及2012年6月22日提交的标题为“VISTA-IG FOR TREATMENT OF AUTOIMMUNE DISORDERS AND INFLAMMATORY DISORDERS”的美国临时申请61/663,431(代理卷号76799.000600)和2012年6月25日提交的标题为“VISTA-IG FOR TREATMENT OF AUTOIMMUNE DISORDERS AND INFLAMMATORY DISORDERS”的美国临时申请61/663,969(代理卷号76799.000600)。所有前述专利申请由此都以引用的方式整体并入。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于在有需要的患者中活化免疫反应的组合物和治疗方法。在一个优选实施方案中，任选地与第二检查点通路的拮抗剂如PD-1组合，主题方法和组合物能够拮抗VISTA的活性，所述VISTA是一种有助于免疫耐受性的天然存在的“检查点”蛋白。例如，这些方法和组合物可以适用于预防和治疗结肠癌，或另一种癌症。本文中显示一种示例性VISTA拮抗剂，具体来说是一种抗VISTA抗体会体外和体内活化针对癌细胞的免疫反应，从而赋予减小肿瘤负荷的保护性抗肿瘤免疫性。另外，当VISTA拮抗剂与第二检查点蛋白拮抗剂，具体来说是针对PD-1配体(PD-L1)的抗体组合使用时观测到附加益处。

[0004] 另一方面，本公开涉及诊断方法，其包括测量VISTA的表达水平以诊断由免疫耐受性所介导的疾病。例如，在患者样本中检测到高的VISTA表达水平(例如VISTA蛋白或mRNA)可以表示存在癌症。另外，这些诊断性测试可以用于对患者指定治疗，例如通过基于对患者样本中高的VISTA表达水平的检测而施用VISTA拮抗剂来实现。

[0005] 背景

[0006] 通过多个检查点，包括CTLA-4、PD-L1/PD-1和B7-H4通路来调控针对外来病原体和癌症的免疫反应。其用作多种免疫抑制细胞(包括Treg、骨髓源性抑制因子(MDSC)和致耐受性DC)的“效应分子”，以减损肿瘤特异性T细胞反应。

[0007] CTLA-4在T细胞上在活化时得到诱导，并且组成性表达在Foxp3+CD4+CD25+天然Treg(nTreg)上。CTLA-4关键性地调控周边耐受性、抑制T细胞反应并且促进Treg介导性免疫抑制(参考文献6-10)。当与细胞疫苗组合的抗体介导性CTLA-4阻断诱导确立的免疫原性差的B16黑素瘤消退时，CTLA-4在抑制肿瘤特异性免疫方面显示重要作用(11)。已经批准伊匹单抗(Ipilimumab)，即人aCTLA-4mAb用于治疗晚期黑素瘤，但是在转移性黑素瘤中的存活反应是适度的(12)。还已经针对其它癌症对其进行了早期试验(13)。然而，与CTLA-4敲除(KO)小鼠中的严重自体免疫性表型一致，aCTLA-4疗法与患者严重的自体免疫性毒性相关(14)。

[0008] 程序化死亡-1(PD-1)和其配体PD-L1呈递另一免疫检查点通路(参考文献15、16)。PD-1 KO小鼠会产生自体免疫疾病(参考文献17、18)。在癌症中，异常PD-L1表达见于肿瘤细胞，其与癌症患者的不良预后相关(参考文献19、20)。PD-L1/PD-1轴通过诱导T细胞凋亡、无变应性、对细胞毒性T细胞介导性溶解的抗性、功能耗尽和产生IL10来下调肿瘤特异性免疫

(参考文献21-23)。我们和其它人先前证明了在DC上的PD-L1表达会促进Foxp3+适应性Treg(aTreg)的诱导,并且PD-L1是TME内的aTreg的强力诱导物(2)。阻断PD-L1/PD-1通路结合以其它免疫疗法如CTLA-4阻断会抑制肿瘤进展(参考文献24-29)。MDX-1106,即人aPD-1MAb已经进入临床试验,其显示出有前途的抗肿瘤作用,并且与伊匹单抗(Ipilumimab)相比毒性较小(30)。

[0009] B7-H4是B7抑制性配体家族的较新的一个成员(参考文献31-33)。在许多人癌症中检测到B7-H4表达。在人卵巢癌中,在肿瘤相关巨噬细胞(TAM)上诱导了B7-H4表达,并且B7-H4的阻断恢复了肿瘤特异性T细胞反应并且有助于肿瘤消退(34)。人Treg还通过APC产生的IL10上调B7-H4表达而向APC传达抑制活性(35)。

[0010] 综上所述,免疫检查点的阻断会提高内源性和疫苗引发性抗肿瘤免疫反应两者,但在临床试验中仅产生有限的反应。

[0011] Foxp3+CD4+CD25+调控性T细胞(Treg)在正常生理条件下维持周边耐受性方面,以及在癌症中抑制抗肿瘤免疫反应方面是重要的(36-38)。在人卵巢癌中,Foxp3+Treg大量浸润与存活率降低相关(39)。全身性除去Treg或者使其功能衰减会增强天然和疫苗诱导性抗肿瘤T细胞反应,从而产生提高的治疗功效(37、40)。由IDO+浆细胞样DC活化的Treg会以PD-L1依赖性方式上调目标DC上的B7-H1表达并且抑制T细胞反应(41)。

[0012] 单核细胞是组织巨噬细胞和单核细胞源性DC(mo-DC)的前体,其对先天免疫性和适应免疫性两者都起到重要作用(42-46)。将鼠类单核细胞鉴别为CD115+CD11b+F4/80+(47),其由以下两个子集组成:LY6C+CX3CR1^{int}和LY6C-CX3CR1^{hi}(48、49)。人对应物分别是CD14+CD16-CCR2+CX3CR1^{int}和CD14loCD16+CX3CR1^{hi}单核细胞。将鼠类Ly6C+炎症性单核细胞(IMC)募集到炎症部位并且分化成M1巨噬细胞和炎症性mo-DC,其会产生高水平的TNF/iNOS(Tip DC)并且对于微生物清除是重要(43、50-53)。相比之下,驻留型LY6C^{neg}单核细胞以稳态巡视血管,并且在感染和炎症期间分化成M2类巨噬细胞(46)。

[0013] IMC关键性地影响着适应性免疫反应。对于人,TLR诱导单核细胞分化成巨噬细胞和mo-DC,其为最优T细胞反应所需(54、55)。在小鼠模型中,单核细胞源性M1巨噬细胞和mo-DC对于通过产生炎症性细胞因子如IL-12来诱导T细胞针对微生物感染或接种的免疫性是必需的,并且引导T细胞初免(56-58)。

[0014] 在有肿瘤的小鼠和癌症患者中,IMC会异常扩增并且有助于骨髓源性抑制细胞(MDSC)的单核子集(59-61)。将MDSC一起标记为CD11b+Gr1+,其由单核(Ly6G+/-LY6C^{-hi})和粒细胞(Ly6G+LY6C^{低})子集组成(62)。MDSC会抑制T细胞反应并且阻碍癌症免疫疗法的功效(60、62-64)。消除MDSC或中和其活性或者诱导其分化的策略已经在癌症免疫疗法中显示功效(60、63)。大部分肿瘤相关的DC是单核细胞源性DC。其在抗原呈递方面典型地具有缺陷,缺乏共刺激分子并且会上调抑制分子,如PD-L1(29、65、66)。因此,这些mo-DC不会有效地启动T细胞反应,从而产生缺失性耐受性,或者诱导功能上惰性的T细胞,和甚至Treg扩增和诱导(40、60、62、63、67、68)。通过PD-L1阻断、CD40/TLR刺激或免疫毒素介导性耗尽对肿瘤DC进行治疗性靶向会明显增加肿瘤特异性T细胞反应并且提高存活率(29、69-74)。

[0015] 我们最近已经发现一种新型的免疫球蛋白(Ig)家族配体,将其命名为T细胞活化的V域免疫球蛋白抑制因子(VISTA)(Genbank:JN602184)75。VISTA的关键特征包括以下。VISTA对PD-L1有着有限的同源性,但是因其独特的结构而不属于B7家族。VISTA仅在造血室

内表达，在CD11b^{高}骨髓细胞上的表达水平极高，并且在CD4+和CD8+T细胞以及Treg上的表达水平较低。在APC上表达的可溶性VISTA-Ig融合蛋白或VISTA充当通过与PD-1无关的未鉴别受体来抑制CD4+和CD8+T细胞增殖和细胞因子产生的配体。抗VISTA mAb(13F3)会通过增强抗肿瘤T细胞反应在多种鼠类肿瘤模型中体外逆转VISTA介导性T细胞抑制并且抑制肿瘤生长。在肿瘤细胞上的VISTA过表达削弱了接种宿主中的保护性抗肿瘤免疫性。VISTA KO小鼠产生针对周边耐受性损失的炎症表型。参见美国专利8,236,304和8,231,872，即公开的国际申请WO/2011/120013和WO/2006/116181；美国公开申请2008/0287358、2011/0027278和2012/0195894，以及2005年4月25日提交的美国临时专利申请60/674,567、2012年6月22日提交的61/663,431、2012年6月25日提交的美国临时专利申请61/663,969、2010年10月6日提交的61/390,434、2011年1月26日提交的61/436,379，以及2011年3月7日提交的61/449,882，其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0016] 因此我们假设VISTA是一种新型的关键性地调控免疫反应的免疫检查点蛋白配体，并且VISTA阻断将逆转肿瘤微环境(TME)的抑制特征并且引起产生保护性抗肿瘤免疫性。

[0017] 由共刺激性和共抑制性配体与受体密切控制免疫系统。这些分子不仅提供T细胞活化的第二信号而且提供正负信号的平衡网络以最大化针对感染的免疫反应，同时将免疫限于自体。

[0018] 免疫反应的诱导需要T细胞扩增、分化、缩小和建立T细胞记忆。T细胞必须对抗抗原呈递细胞(APC)并且通过APC上的T细胞受体(TCR)/主要组织相容性复合体(MHC)相互作用进行通信。一旦TCR/MHC相互作用建立，需要其它组的在T细胞和APC之间的受体-配体接触，也就是通过CD154/CD40和CD28/B7.1-B7.2进行共同刺激。在这些接触之间的协同作用产生能够清除病原体和肿瘤的多产性免疫反应，并且可能会诱导自体免疫。

[0019] 已经鉴别了另一控制水平，即调控性T细胞(T_{reg})。T细胞的这个特定子集在胸腺中产生、递送到周边，并且能够恒定和可诱导地控制T细胞反应。Sakaguchi(2000)Cell 101(5):455-8；Shevach(2000)Annu.Rev.Immunol.18:423-49；Bluestone和Abbas(2003)Nat.Rev.Immunol.3(3):253-7。T_{reg}由CD4+CD25+表型呈递，并且还表达高水平的细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)、OX-40、4-1BB和糖皮质激素诱导型TNF受体相关蛋白(GITR)。McHugh等，(2002)Immunity16(2):311-23；Shimizu等，(2002)Nat.Immun.3(2):135-42。通过5天新生儿胸腺切除术或使用抗CD25耗尽抗体而消除T_{reg}细胞，导致诱导自体免疫病理以及加剧T细胞对外来和自体抗原的反应，包括提高的抗肿瘤反应。Sakaguchi等，(1985)J.Exp.Med.161(1):72-87；Sakaguchi等，(1995)J.Immunol.155(3):1151-64；Jones等，(2002)Cancer Immun.2:1。另外，T_{reg}还已牵涉于移植耐受的诱导和维持中，因为用抗CD25单克隆抗体耗尽T_{reg}会导致移植耐受的消除以及快速移植排斥。Jarvinen等，(2003)Transplantation 76:1375-9。在由Treg表达的受体中，GITR似乎是一种重要的组分，因为用激动性单克隆抗体接合T_{reg}表面上的GITR会导致T_{reg}活性快速终止，从而导致自体免疫病理和移植耐受消除。

[0020] 共同刺激和共同抑制性配体与受体不仅提供T细胞活化的“第二信号”，而且提供正负信号的平衡网络，以最大化针对感染的免疫反应，同时限制自体免疫。表征最好的共同刺激性配体是B7.1和B7.2，它们由专职性APC表达，并且其受体是CD28和CTLA-4。Greenwald

等,(2005)Annu Rev Immunol 23,515-548;Sharpe和Freeman(2002)Nat Rev Immunol 2,116-126。CD28由原生的并活化的T细胞表达,并且对最优的T细胞活化是重要的。相比之下,CTLA-4在T细胞活化时诱导,并通过结合于B7.1/B7.2而抑制T细胞活化,因此削弱CD28介导性共同刺激。CTLA-4还通过其细胞质ITIM基序而转导负信号。Teft等,(2006).Annu Rev Immunol 24,65-97。B7.1/B7.2KO小鼠的适应性免疫反应削弱(Borriello等,(1997)Immunity 6,303-313;Freeman等,(1993)Science 262,907-909),而CTLA-4 KO小鼠不能充分地控制炎症并且会产生全身性自体免疫疾病。Chambers等,(1997)Immunity 7,885-895;Tivol等,(1995)Immunity 3,541-547;Waterhouse等,(1995)Science 270,985-988。B7家族配体已扩展到包括共同刺激性B7-H2(ICOS配体)和B7-H3,以及共同抑制性B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)和B7-H6。参见Brandt等,(2009)J Exp Med 206,1495-1503;Greenwald等,(2005)Annu Rev Immunol 23:515-548。

[0021] 诱导型共同刺激性(ICOS)分子在活化的T细胞上表达并且结合于B7-H2。参见Yoshinaga等,(1999)Nature 402,827-832。ICOS对T细胞活化、分化和功能是重要的,以及对T-辅助细胞诱导性B细胞活化、Ig类别转换和生发中心(GC)形成必不可少。Dong等,(2001)Nature 409,97-101;Tafuri等,(2001)Nature 409,105-109;Yoshinaga等,(1999)Nature 402,827-832。程序化死亡1(PD-1)另一方面会负调控T细胞反应。PD-1 KO小鼠根据遗传背景产生狼疮样自体免疫疾病或自体免疫扩张型心肌病。Nishimura等,(1999)Immunity 11,141-151。Nishimura等,(2001)Science 291:319-322。自体免疫很可能因PD-L1和PD-L2两种配体的信号传导丢失所致。最近,CD80已被鉴别为将抑制性信号转导至T细胞中的PD-L1的第二受体。Butte等,(2007)Immunity 27:111-122。B7-H3和B7-H4的受体仍不得而知。

[0022] 表征最好的共同刺激性配体是B7.1和B7.2,它们属于Ig超家族并且在专职性APC上表达,并且其受体是CD28和CTLA-4。Greenwald等,(2005)Annu Rev.Immunol.23:515-548。CD28由原生的并活化的T细胞表达,并且对最优的T细胞活化是重要的。相比之下,CTLA-4在T细胞活化时诱导,并通过结合于B7.1/B7.2而抑制T细胞活化,因此削弱CD28介导性共同刺激。B7.1和B7.2KO小鼠的适应性免疫反应削弱(Borriello等,(1997)Immunity 6:303-313),而CTLA-4 KO小鼠不能充分地控制炎症并且会产生全身性自体免疫疾病。Tivol等,(1995)Immunity3:541-547;Waterhouse等,(1995)Science 270:985-988;Chambers等,(1997)Immunity 7:885-895。

[0023] B7家族配体已扩展到包括共同刺激性B7-H2(诱导型T细胞共同刺激物[ICOS]配体)和B7-H3,以及共同抑制性B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)和B7-H6。Greenwald等,(2005)Annu Rev.Immunol.23:515-548;Brandt等,(2009)J.Exp.Med.206:1495-1503。因此,已经鉴别了另外的CD28家族受体。ICOS在活化的T细胞上表达并且结合于B7-H2。ICOS是一种正共同调节剂,其针对T细胞活化、分化和功能是重要的。Yoshinaga等,(1999)Nature402:827-832;Dong等,(2001)J.Mol.Med.81:281-287。相比之下,PD-1(程序化死亡1)负调控T细胞反应。PD-1 KO小鼠产生狼疮样自体免疫疾病或自体免疫扩张型心肌病。Nishimura等,(1999)Immunity11:141-151;Nishimura等,(2001)Science 291:319-322。自体免疫很可能因PD-L1和PD-L2两种配体的信号传导丢失所致。最近,CD80已被鉴别为将抑制性信号转导至T细胞中的PD-L1的第二受体。Butte等,(2007)Immunity 27:111-

122。

[0024] 两种抑制性B7家族配体PD-L1和PD-L2具有不同的表达模式。PD-L2诱导式表达在DC和巨噬细胞上，而PD-L1广泛地表达在造血细胞和非造血细胞类型两者上。Okazaki和Honjo(2006)Trends Immunol.27(4):195-201;Keir等,(2008)Ann Rev Immunol.26:677-704。与PD-1受体的免疫抑制作用一致，使用PD-L1$^{-/-}$和PD-L2$^{-/-}$小鼠的研究已显示，两种配体在抑制T细胞增殖和细胞因子产生方面具有重叠作用。Keir等,(2006)J Immunol.175(11):7372-9。PD-L1缺乏在自体免疫性糖尿病的非肥胖型糖尿病模型和多发性硬化症(实验性自体免疫性脑脊髓炎,[EAE])的小鼠模型中都会加速疾病进展。Ansari等,(2003)J.Exp.Med.198:63-69;Salama等,(2003)J.Exp.Med.198:71-78;Latchman等,(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.101:10691-10696。PD-L1$^{-/-}$T细胞在两种疾病模型中都产生升高的促炎性细胞因子水平。另外，BM嵌合实验已经证明，PD-L1的组织表达(即，在胰腺内)对其区域性控制炎症的能力有独特的贡献。Keir等,(2006)J.Exp.Med.203:883-895;Keir等,(2007)J.Immunol.179:5064-5070;Grabie等,(2007)Circulation 116:2062-2071。PD-L1还在胎盘合体滋养细胞上高表达，这些细胞关键性地控制对同种异体胎儿的母体免疫反应。Guleria等,(2005)J.Exp.Med.202:231-237。

[0025] 与其免疫抑制作用一致，PD-L1强力抑制抗肿瘤免疫反应并且帮助肿瘤逃避免疫监督。PD-L1可诱导表达高水平PD-1的浸润性细胞毒性CD8^{+}T细胞的凋亡。Dong等,(2002)Nat.Med.8:793-800;Dong和Chen(2003)J.Mol.Med.81:281-287。阻断PD-L1-PD-1信号传导通路，结合以其它免疫疗法会通过提高抗肿瘤CTL活性和细胞因子产生来预防肿瘤进展。Iwai等,(2002)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99:12293-12297;Blank等,(2004)Cancer Res.64:1140-1145;Blank等,(2005)Cancer Immunol.Immunother.54:307-314;Geng等,(2006)Int.J.Cancer 118:2657-2664。在DC上的PD-L1表达会促进适应性Foxp3^{+}CD4^{+}调控性T细胞(T_{reg}细胞)的诱导，并且PD-L1是在肿瘤微环境内的aT_{reg}细胞的强力诱导物。Wang等,(2008)Proc Natl.Acad.Sci.USA 105:9331-9336。靶向B7家族调控分子的最近发展显示在治疗免疫相关疾病如自体免疫和癌症方面是有希望的。Keir等,(2008)Annu.Rev.Immunol.26:677-704;Zou和Chen(2008)Nat.Rev.Immunol.8:467-477。

[0026] 发明概述

[0027] 靶向免疫检查点蛋白如CTLA-4和PD-1的癌症免疫疗法已在临床试验中显示有希望的结果。鉴于所涉及患者的不良预后和治疗选择，这是尤其有希望的。然而，总反应率已低得让人失望，在多个伊匹单抗(aCTLA-4)试验中，6-21％患者具有目标反应3-5。因此，亟需鉴别起到非冗余作用并且与已知检查点通路协同的新型检查点蛋白。作为新型的免疫检查点通路，VISTA提供了一种用于癌症免疫介入的新目标。VISTA阻断会逆转TME的抑制特征，并且引起产生保护性抗肿瘤免疫性。本文所述的结果有助于显示VISTA阻断是用于靶向突出的免疫抑制细胞(包括癌症如结肠直肠癌(CRC)中的Treg和MDSC)的有效治疗策略。

[0028] 一方面，本公开提供一个新范例，其中新型免疫检查点通路VISTA关键性地控制抗肿瘤免疫反应。这个范例构成设计靶向VISTA通路的新型治疗策略的基础。在VISTA和另一免疫检查点通路PD-L1/PD-1之间的合作性相互作用反对“冗余”，并且强调靶向所有免疫抑制通路以得到最大影响的必要性。基于此，本申请进一步提供新型组合策略并且改变了当前在癌症免疫疗法中靶向单一通路的方案。此外，对VISTA在天然肿瘤发生期间的作用的研

究将产生更多临床上相关的信息，并且指导产生更好的肿瘤疗法。

[0029] 在特定方面，本发明提供治疗患有将受益于免疫反应上调的病状的受试者的方法，其包括施用VISTA拮抗剂，从而抑制免疫反应的VISTA介导性抑制，以治疗将受益于免疫反应上调的病状。

[0030] 在其它特定方面，本发明提供治疗患有将受益于免疫反应上调的病状的受试者的方法，其包括：从所述受试者移出免疫细胞、使所述免疫细胞体外接触VISTA拮抗剂，从而体外刺激所述免疫细胞，并且将所述体外刺激的免疫细胞再引入所述受试者，所述免疫细胞例如为CD4+T细胞和/或CD8+T细胞，其免疫细胞群体可以体外扩增。

[0031] 另一方面，本发明提供治疗患有将受益于免疫反应上调的病状的受试者的方法，其包括：从受试者移出免疫细胞、用编码不能结合其天然结合伴侣的的VISTA形式的核酸分子转染所述免疫细胞，以使细胞表达所有或一部分的VISTA分子，并且将所述转染的细胞再引入受试者，从而所述转染细胞会防止VISTA介导性抑制性信号传到免疫细胞，并从而上调免疫反应，所述免疫细胞例如为CD4+T细胞和/或CD8+T细胞，其任选地可以体外扩增。

[0032] 另一方面，本发明提供治疗受试者的癌症的方法，其包括：用抑制VISTA(PD-L3)活性的核酸分子转染所述受试者的癌细胞，从而所述转染的细胞防止VISTA介导性抑制性信号传到免疫细胞，并从而针对所述癌症上调免疫反应，其中所述免疫细胞任选地可以包含任选地可以体外扩增的CD4+T细胞和/或CD8+T细胞。

[0033] 在本发明的另一方面，任一前述方法都可以另外包括用一种或多种实现免疫系统共同刺激的其它多肽转染所述癌细胞，所述其它多肽例如为B7-1和/或B7-2，和/或所有或部分的I类MHCα链多肽、β2小球蛋白多肽、II类MHCα链多肽，和/或II类MHCβ链多肽，从而使得所述癌细胞在细胞表面上表达I类MHC或II类MHC多肽。

[0034] 在本发明的另一方面，这些上述方法可以另外包括引入抑制II类MHC相关多肽任选地恒定链表达的siRNA或siRNA编码基因，从而促进肿瘤相关抗原的呈递，其任选地可以离体实现，以及将所述癌细胞再引入所述受试者或可以体内实现。

[0035] 另一方面，本发明提供治疗受试者的癌症的方法，其包括：用抑制VISTA活性的核酸分子转染所述受试者的癌细胞，从而所述转染的细胞防止VISTA介导性抑制性信号传到免疫细胞、从受试者移出免疫细胞、使所述转染的细胞与所述免疫细胞接触，从而针对所述癌症上调免疫反应，以及将所述体外刺激的免疫细胞再引入所述受试者。

[0036] 在另一实施方案中，本公开提供一种检测样本中VISTA的方法，其可以包含使样本与抗VISTA抗体或抗体片段接触以及检测抗VISTA抗体-VISTA缀合物。在另一实施方案中，样本可为生物样本。在另一实施方案中，抗VISTA抗体结合SEQ ID NO:2、3或5的氨基酸序列。

[0037] 在另一实施方案中，用于治疗、诊断或免疫调节用途的组合物可以包含分离的可溶性VISTA(PD-L3)蛋白或者VISTA融合蛋白(例如可溶性VISTA-Ig融合蛋白或多聚VISTA蛋白)，所述蛋白可以包含优选地可以与SEQ ID NO:2、4或5中所述的人或鼠类VISTA(PD L3)多肽或者其直系同源体或片段具有70-90％同一性的氨基酸序列，其由与SEQ ID NO:1或3特异性杂交的体内调节VISTA的基因编码；以及药学上可接受的载体。在一些实施方案中，可溶性或多聚VISTA蛋白可以直接或间接地连接到异源(非VISTA)蛋白或者可以由病毒载体或细胞(例如转染的免疫细胞，如T细胞)表达。

[0038] 在一个实施方案中，分离的或重组的VISTA(PD-L3)多肽(例如蛋白质、多肽、肽或者片段或其部分)。在一个实施方案中，分离的VISTA(PD-L3)多肽或VISTA(PD-L3)融合蛋白包含至少一个以下域：信号肽域、IgV域、细胞外域、跨膜域或胞浆域。

[0039] 在一个实施方案中，VISTA(PD-L3)多肽包含至少一个以下域：信号肽域、IgV域、细胞外域、跨膜域或胞浆域，并且包含与SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列具有至少约71％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％同一性的氨基酸序列。在另一实施方案中，VISTA(PD-L3)多肽包含至少一个以下域：信号肽域、IgV域、细胞外域、跨膜域或胞浆域，并且可以具有VISTA(PD-L3)活性(如本文所述)。

[0040] 在一个实施方案中，分离的VISTA蛋白可以包含与SEQ ID NO:2、4、5、16-25、36或37的多肽序列的细胞外域具有至少约90％序列同一性的多肽。在另一实施方案中，多肽可以与SEQ ID NO:2、4、5、16-25、36或37的多肽序列具有至少约95％序列同一性。

[0041] 在另一实施方案中，VISTA多肽包含至少一个以下域：信号肽域、IgV域、细胞外域、跨膜域或胞浆域，并且可以由一个核酸分子编码，所述核酸分子具有在严格杂交条件下与可以包含SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列的核酸分子的互补序列杂交的核苷酸序列。

[0042] 在另一实施方案中，多肽的片段或部分可以包含SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列，其中所述片段包含SEQ ID NO:2或4的氨基酸序列的至少15个氨基酸(即连续氨基酸)。在另一实施方案中，VISTA(PD-L3)多肽包含以下或由以下组成：SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列。在另一实施方案中，VISTA(PD-L3)多肽可以由核酸分子编码，所述核酸分子可以包含与SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列或其互补序列具有至少约70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％同一性的核苷酸序列。VISTA(PD-L3)多肽可以由核酸分子编码，所述核酸分子由在严格杂交条件下与可以包含SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列的核酸分子的互补序列杂交的核苷酸序列组成。

[0043] 在一个实施方案中，VISTA多肽可为激动剂，其中所述激动剂会诱导抑制。在另一实施方案中，VISTA多肽可为拮抗剂，其中所述拮抗剂会干扰抑制。

[0044] 可以使本发明的多肽或其部分，例如其生物活性部分可操作地连接于非VISTA(PD-L3)多肽(例如异源氨基酸序列)以形成融合多肽。

[0045] 在一个实施方案中，表达载体可以包含编码VISTA蛋白的分离的核酸，所述蛋白可以与SEQ ID NO:2、4或5中所述的人或鼠类VISTA氨基酸序列或其片段或直系同源体具有至少约70-99％同一性，其任选地可以与编码另一蛋白质如Ig多肽(例如Fc区)或报道分子的序列融合；以及含有所述载体的宿主细胞。

[0046] 在另一实施方案中，编码VISTA多肽，优选地编码可溶性融合蛋白和多聚VISTA蛋白的分离的核酸分子以及核酸片段适用作引物或杂交探针以便检测VISTA(PD-L3)编码核酸。在一个实施方案中，本发明的VISTA(PD-L3)核酸分子可以与SEQ ID NO:1或3中的编码VISTA(PD-L3)的核苷酸序列(例如与核苷酸序列的全长)或其互补序列具有至少约70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％同一性。

[0047] 在另一实施方案中，VISTA(PD-L3)核酸分子包含编码多肽的核苷酸序列，所述多肽具有与SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列具有特定百分比同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中，VISTA(PD-L3)核酸分子包含编码多肽的核苷酸序列，所述多肽具有与SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列的全长或与其细胞外域具有至少约71％、75％、80％、85％、90％、

95％、96％、97％、98％、99％同一性的氨基酸序列。

[0048] 在另一实施方案中，分离的核酸分子编码人或鼠类VISTA或其中保守区或功能域的氨基酸序列。在又一个实施方案中，核酸分子包含编码多肽的核苷酸序列，所述多肽可以包含SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列。在又一个实施方案中，核酸分子的长度可为至少约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150个核苷酸。在另一实施方案中，核酸分子的长度可为至少约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150个核苷酸，并且所述核酸分子编码具有VISTA(PD-L3)活性或调节VISTA(PD-L3)功能的多肽。

[0049] 另一实施方案的特征在于核酸分子、优选地VISTA(PD-L3)核酸分子，其相对于编码非VISTA(PD-L3)多肽的核酸分子特异性检测VISTA(PD-L3)核酸分子。例如，在一个实施方案中，核酸分子的长度可为至少约880、900、950、1000、1050、1100、1150个核苷酸并且所述核酸分子在严格条件下与编码SEQ ID NO:2、4或5中所示的多肽或其互补序列的核酸分子杂交。在另一实施方案中，核酸分子的长度可为至少20、30、40、50、100、150、200、250、300个核苷酸，并且所述核酸分子在严格条件下与编码VISTA(PD-L3)的片段的核酸分子杂交，例如长度可以包含至少约20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950个核苷酸，包含SEQ ID NO:1和3中所公开的核酸序列(所述核酸序列编码SEQ ID NO:2、4或5中的VISTA(PD-L3)多肽)或其互补序列的至少15个(即15个连续)核苷酸，并且在严格条件下与可以包含SEQ ID NO:1或3中所示的核苷酸序列或其互补序列的核酸分子杂交。

[0050] 在一个实施方案中，所述核酸分子编码可以包含SEQ ID NO:2或4或5的氨基酸序列的多肽的天然存在的等位变体，其中核酸分子在严格条件下与可以包含SEQ ID NO:1或3或其互补序列的核酸分子的互补序列杂交。

[0051] 本发明的另一实施方案提供VISTA(PD-L3)核酸分子的分离反义分子(例如与SEQ ID NO:1或3的VISTA(PD-L3)核酸分子的编码链反义)。

[0052] 本发明的另一方面提供可以包含VISTA(PD-L3)核酸分子的载体。在某些实施方案中，载体可为重组表达载体。

[0053] 在另一实施方案中，宿主细胞包本发明的载体。在又一个实施方案中，宿主细胞包含本发明的核酸分子。本发明还提供一种如下产生多肽、优选地VISTA(PD-L3)多肽的方法：在合适的培养基中培养本发明的含有重组表达载体的宿主细胞，例如哺乳动物宿主细胞，如非人哺乳动物细胞，使得可产生多肽。

[0054] 在一个实施方案中，靶向从VISTA DNA转录的VISTA mRNA的siRNA分子可以包含SEQ ID NO:1或3的核酸序列。在另一实施方案中，靶向从VISTA DNA转录的VISTA mRNA的siRNA分子编码SEQ ID NO:2、4或5中所述的氨基酸序列。在另一实施方案中，靶向VISTA的siRNA分子可以包含SEQ ID NO:38-67中任一个的核酸序列。在另一实施方案中，靶向VISTA的ORF或UTR区的siRNA分子可以包含SEQ ID NO:38-47中任一个的氨基酸序列。在另一实施方案中，仅靶向VISTA的UTR区的siRNA分子可以包含SEQ ID NO:48-57中任一个的氨基酸序列。在另一实施方案中，仅靶向VISTA的ORF区的siRNA分子可以包含SEQ ID NO:58-67中任一个的氨基酸序列。在一个实施方案中，靶向VISTA的siRNA分子可以由SEQ ID NO:38-67中

任一个的核酸序列组成。在一个实施方案中，靶向VISTA的ORF或UTR区的siRNA分子可以由SEQ ID NO:38-47中任一个的氨基酸序列组成。在一个实施方案中，仅靶向VISTA的UTR区的siRNA分子可以由SEQ ID NO:48-57中任一个的氨基酸序列组成。在一个实施方案中，仅靶向VISTA的ORF区的siRNA分子可以由SEQ ID NO:58-67中任一个的氨基酸序列组成。

[0055] 在另一实施方案中，组合物可以包含siRNA分子，所述siRNA分子包含SEQ ID NO:38-67中任一个的核酸序列。在另一实施方案中，组合物可以包含siRNA分子，所述siRNA分子由SEQ ID NO:38-67中任一个的核酸序列组成。在另一实施方案中，组合物可为药物组合物。

[0056] 在一个实施方案中，拮抗剂可以特异性结合于VISTA(PD-L3)蛋白，所述VISTA(PD-L3)蛋白可包含SEQ ID NO:2、4或5中所述的氨基酸序列或其变体、片段或直系同源体。在一个实施方案中，缀合剂体外或体内调节(激动或拮抗)VISTA活性。

[0057] 在一个实施方案中，VISTA拮抗剂可为VISTA配体。在另一实施方案中，VISTA拮抗剂可为蛋白质。在另一实施方案中，VISTA拮抗剂可为抗体或其抗体片段、肽、糖苷生物碱(glycoalkoid)、反义核酸、核糖酶、类视色素、avemir、小分子或其任何组合。

[0058] 在一个实施方案中，VISTA拮抗剂可具有功能性质，包括但不限于：调节VISTA(PD-L3)对免疫性的特定作用，如所述蛋白质对TCR活化的抑制作用、所述蛋白质对CD4 T细胞对抗CD3的增殖反应的抑制作用、抑制同源CD4 T细胞的抗原特异性增殖反应、VISTA(PD-L3)对特定细胞因子(例如IL-2和γ干扰素)的表达的抑制作用。

[0059] 在一个实施方案中，拮抗剂、任选地蛋白质拮抗剂会特异性结合于VISTA多肽、多聚VISTA多肽或VISTA融合蛋白。在另一实施方案中，拮抗剂、任选地蛋白质拮抗剂可以显示抗肿瘤或抗转移活性。在另一实施方案中，拮抗剂、任选地蛋白质拮抗剂可以特异性结合包含在残基1-20、20-40、30-50、60-80、70-90、80-100或90-110中的抗原表位。在另一实施方案中，拮抗剂、任选地蛋白质拮抗剂可以结合所述VISTA蛋白的IgV、茎区(stalk region)、细胞质区或跨膜区中包含的抗原表位。在另一实施方案中，拮抗剂、任选地蛋白质拮抗剂可以引发至少一种以下活性：(a)上调细胞因子；(b)诱导T细胞扩增；(c)促进抗原特异性T细胞免疫性；或(d)促进CD4+和/或CD8+T细胞活化。

[0060] 在另一实施方案中，分离的缀合剂、优选地抗体或抗体片段可以特异性结合于VISTA(PD-L3)蛋白，所述VISTA(PD-L3)蛋白可以包含SEQ ID NO:2、4或5中所述的氨基酸序列或其变体、片段或直系同源体。在一个实施方案中，缀合剂体外或体内调节(激动或拮抗)VISTA活性。在一个实施方案中，缀合剂可为激动性或拮抗性抗VISTA抗体。

[0061] 在一个实施方案中，抗VISTA(PD-L3)抗体可具有功能性质，包括但不限于：调节VISTA(PD-L3)对免疫性的特定作用，如所述蛋白质对TCR活化的抑制作用、所述蛋白质对CD4 T细胞对抗CD3的增殖反应的抑制作用、抑制同源CD4 T细胞的抗原特异性增殖反应、VISTA(PD-L3)对特定细胞因子(例如IL-2和γ干扰素)的表达的抑制作用。

[0062] 在另一实施方案中，抗体、任选地单克隆或多克隆抗体可以特异性结合VISTA(PD-L3)多肽，包括人VISTA多肽。

[0063] 在一个实施方案中，分离的抗体或其抗体片段会特异性结合于VISTA多肽、多聚VISTA多肽或VISTA融合蛋白。在另一实施方案中，抗体或其抗体片段可以显示抗肿瘤或抗转移活性。在另一实施方案中，抗体或其抗体片段可以特异性结合包含在残基1-20、20-40、

30-50、60-80、70-90、80-100或90-110中的抗原表位。在另一实施方案中，抗体或其抗体片段可以特异性结合所述VISTA蛋白的IgV、茎区、细胞质区或跨膜区中包含的抗原表位。在另一实施方案中，抗体或其抗体片段可以引发至少一种以下活性：(a)上调细胞因子；(b)诱导T细胞扩增；(c)促进抗原特异性T细胞免疫性；或(d)促进CD4+和/或CD8+T细胞活化。在另一实施方案中，抗体或片段可为重组的。在另一实施方案中，抗体或片段可以具有抗肿瘤活性。在另一实施方案中，抗体片段可为Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、CDR、互补位，或能够结合抗原的抗体的部分。在另一实施方案中，抗体可为嵌合的、人源化的、抗独特型的、单链的、双官能的或共特异性的。在另一实施方案中，抗体或片段可直接或间接地结合于标签、细胞毒性剂、治疗剂或免疫抑制剂。在另一实施方案中，可为化学发光标记、顺磁标记、MRI对比剂、荧光标记、生物发光标记或放射性标记。

[0064] 在一个实施方案中，本发明提供抗VISTA抗体和其抗体片段。在一个实施方案中，抗体片段为Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv和scFv片段。在一个实施方案中，抗体或其抗体片段可以包含Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、单链可变片段(scFv)、IgNAR、SMIP、骆驼抗体(camelbody)或纳米抗体(nanobody)。在另一实施方案中，重组蛋白可以包含抗VISTA抗体的超突变区并且选择性结合VISTA。在另一实施方案中，抗体片段可以选择性结合VISTA，所述VISTA可以包含SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列。

[0065] 另外，可以将VISTA(PD-L3)多肽(或其生物活性部分)或VISTA(PD-L3)分子的调节剂(例如抗VISTA抗体)并入药物组合物中，任选地可以包含药学上可接受的载体。

[0066] 在另一实施方案中，本发明提供疫苗，所述疫苗可以包含抗原以及调节(提高或抑制)VISTA(PD-L3)活性的试剂。在一个实施方案中，疫苗抑制在VISTA(PD-L3)和其天然结合伴侣之间的相互作用。在另一实施方案中，疫苗可以包含抗原以及抑制在VISTA(PD-L3)和其天然结合伴侣之间的相互作用的试剂。在另一实施方案中，疫苗可以包含抗原以及促进在VISTA(PD-L3)和其天然结合伴侣之间的相互作用的试剂。在一个实施方案中，疫苗包含赋形剂、佐剂或载体。

[0067] 在一个实施方案中，试剂盒可以包含VISTA融合蛋白。在另一实施方案中，试剂盒可以包含多聚VISTA蛋白。在另一实施方案中，可以将VISTA融合蛋白或多聚VISTA蛋白直接或间接地固定于固相支撑物。在另一实施方案中，固相支撑物可为珠粒、试管、薄片、培养皿或测试条。在另一实施方案中，固相支撑物可为阵列。

[0068] 在另一实施方案中，可以将免疫细胞活化，则可以包括使免疫细胞与VISTA多肽、VISTA-Ig融合蛋白或抗VISTA抗体接触。在另一实施方案中，免疫细胞可为T细胞、B细胞或抗原呈递细胞。随后可将根据本发明的方法活化的免疫细胞离体扩增并且用于治疗和预防多种疾病；例如，已经体外克隆和扩增的人T细胞维持其调控活性。在扩增之前，可以自受试者(例如哺乳动物，如人、狗、猫、小鼠、大鼠或其转基因物种)获得T细胞来源。T细胞可获自许多来源，包括周边血液单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、脾脏组织、肿瘤或T细胞系。T细胞可以获自使用熟练技术人员已知的任何数目的技术，如FICOLL®分离，从受试者采集的一单位的血液。

[0069] 在另一实施方案中，一种用于调节VISTA(PD-L3)活性的方法可以包括使能够表达VISTA(PD-L3)的细胞与调节VISTA(PD-L3)活性的试剂、优选地抗VISTA(PD-L3)抗体接触，使得可调节细胞中的VISTA(PD-L3)活性。在一个实施方案中，所述试剂抑制VISTA(PD-L3)

活性。在另一实施方案中，所述试剂刺激VISTA(PD-L3)活性。在另一实施方案中，所述试剂干扰或增强在VISTA(PD-L3)多肽和其天然结合伴侣之间的相互作用。在一个实施方案中，所述试剂可为特异性结合于VISTA(PD-L3)多肽的抗体。在另一实施方案中，所述试剂可为肽、肽模拟物，或结合于VISTA(PD-L3)多肽的其它小分子。

[0070] 在另一实施方案中，所述试剂通过调节VISTA(PD-L3)基因的转录、VISTA(PD-L3)mRNA的翻译或VISTA(PD-L3)多肽的翻译后修饰来调节VISTA(PD-L3)的表达。在另一实施方案中，所述试剂可为核酸分子，所述核酸分子的核苷酸序列可以与VISTA(PD-L3)mRNA或VISTA(PD-L3)基因的编码链反义。在另一实施方案中，所述试剂可为靶向VISTA(PD-L3)mRNA的siRNA分子。

[0071] 在一个实施方案中，一种用于调节VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣在免疫细胞上的相互作用的方法可以包括使表达VISTA(PD-L3)的抗原呈递细胞与选自一种形式的VISTA(PD-L3)，或调节VISTA(PD-L3)和其天然结合伴侣的相互作用的试剂的试剂接触使得可以调节VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣在免疫细胞上的相互作用，以及评估VISTA与其天然结合伴侣的相互作用。在一个实施方案中，调节VISTA(PD-L3)和其天然结合伴侣的相互作用的试剂可为特异性结合于VISTA(PD-L3)的抗体。在一个实施方案中，可以上调VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣的相互作用。在另一实施方案中，可以下调VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣的相互作用。在一个实施方案中，所述方法进一步包括使免疫细胞或抗原呈递细胞与调节免疫反应的另一试剂接触。在一个实施方案中，所述接触步骤可以体外进行。在另一实施方案中，所述接触步骤可以体内进行。在一个实施方案中，免疫细胞可以选自T细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞和骨髓细胞。

[0072] 在一个实施方案中，用于抑制免疫细胞中的活化的方法可以包括抑制细胞中VISTA(PD-L3)的活性或表达使得可以抑制免疫细胞活化。在一个实施方案中，用于增大免疫细胞中的活化的方法可以包括增大细胞中VISTA(PD-L3)的活性或表达使得可以增大免疫细胞活化。

[0073] 在另一实施方案中，用于上调免疫反应的方法可以包括施用抑制VISTA(PD-L3)和其天然结合伴侣之间在免疫细胞上的相互作用的试剂。在一个实施方案中，所述试剂包含结合于VISTA(PD-L3)并且抑制VISTA(PD-L3)和其天然结合伴侣之间的相互作用的阻断抗体或小分子。在另一实施方案中，所述方法进一步包括向受试者施用上调免疫反应的第二试剂。在另一实施方案中，用于下调免疫反应的方法可以包括在免疫细胞上施用刺激VISTA(PD-L3)和其天然结合伴侣之间的相互作用的试剂。

[0074] 在一个实施方案中，用于治疗选自肿瘤、病原性感染、炎症免疫反应或病状、优选地不太明显的炎症病状，或免疫抑制性疾病的病状的方法可以包括施用有效量的VISTA多肽或VISTA-Ig融合蛋白。特定实例包括多发性硬化症、甲状腺炎、类风湿性关节炎、II型和I型糖尿病以及晚期和早期形式的癌症，包括转移性癌症(例如膀胱癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌)，其中VISTA抑制有效的抗肿瘤反应。可以向受试者施用表达编码抗VISTA抗体或VISTA融合蛋白的核酸的细胞或病毒载体。

[0075] 在一个实施方案中，用于治疗选自移植、过敏症、传染性疾病、癌症和炎症性或自体免疫性病症(例如炎症性免疫病症)的病状的方法可以包括施用有效量的VISTA(PD-L3)蛋白、缀合剂或VISTA(PD-L3)拮抗剂或激动剂。在另一实施方案中，可以治疗1型糖尿病、多

发性硬化症、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、全身性红斑狼疮、风湿性疾病、过敏性病症、哮喘、过敏性鼻炎、皮肤病症、肠胃病症如克罗恩氏病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎、移植排斥反应、链球菌感染后和自体免疫性肾衰竭、败血性休克、全身性炎症反应综合征(SIRS)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)和毒液螯入(envenomation);自体炎症疾病以及变性骨和关节疾病,包括骨关节炎、结晶性关节炎和囊炎以及其它关节病,所述治疗可以包括施用有效量的VISTA(PD-L3)蛋白、缀合剂或VISTA(PD-L3)拮抗剂或激动剂。此外,所述方法和组合物可以包含有效量的VISTA(PD-L3)蛋白、缀合剂或VISTA(PD-L3)拮抗剂或激动剂,其可以用于治疗腱炎、韧带炎和创伤性关节损伤。在一个实施方案中,所述试剂包含刺激VISTA(PD-L3)和其天然结合伴侣之间的相互作用的抗体或小分子。在另一实施方案中,所述方法进一步包括施用第二试剂,所述第二试剂会下调对主题如对其具有特异性的PD-L1、PD-L2或CTLA-4融合蛋白或抗体的免疫反应。

[0076] 在实施方案中,主题VISTA(PD-L3)蛋白、核酸和对VISTA(PD-L3)具有特异性的配体、优选地对VISTA(PD-L3)功能具有所需作用的抗体可以用于治疗包括但不限于以下的病状:癌症、自体免疫性疾病、过敏症、炎症病症或感染和更具体地免疫系统病症如重症综合性免疫缺陷、多发性硬化症、全身性红斑狼疮、I型糖尿病、淋巴组织增殖性综合征、炎症性肠病、过敏、哮喘、移植物抗宿主疾病,和移植排斥反应;对感染性病原体如细菌和病毒的免疫反应;以及免疫系统癌症如淋巴瘤和白血病。在一个实施方案中,调节VISTA活性的试剂可以缓解T细胞耗尽并且增强对传染性疾病的免疫性。

[0077] 在一个实施方案中,治疗有需要的患者的癌症的方法可以包括施用有效量的VISTA蛋白、多聚VISTA蛋白、VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白,其中所述VISTA蛋白、多聚VISTA蛋白和/或VISTA融合蛋白通过抑制由骨髓树状抑制细胞表达的VISTA的免疫抑制活性来增强抗肿瘤免疫性。在另一实施方案中,会发现在治疗之前的患者在免疫细胞上表达较高水平的VISTA蛋白。

[0078] 在一个实施方案中,增强放射疗法、化学疗法或抗癌生物剂的功效的方法包括在包括施用放射疗法、化学疗法或抗癌生物剂的治疗方案中施用有效量的VISTA蛋白、多聚VISTA蛋白、VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白。在另一实施方案中,患者在治疗之前可患有不会响应于所述放射疗法、化学疗法或抗癌生物剂的癌症。

[0079] 在一个实施方案中,治疗结肠直肠癌、膀胱癌、卵巢癌或黑素瘤癌症的方法可以包括施用有效量的VISTA蛋白、多聚VISTA蛋白、VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白,其中所述癌症处于早期(非转移性)或转移形式并且VISTA-Ig会阻断与其受体的相互作用。

[0080] 在一个实施方案中,用于调节免疫细胞反应的方法可以包括在初级信号存在下使免疫细胞与有效量的VISTA蛋白、多聚VISTA蛋白、VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白接触使得调节免疫细胞的反应。

[0081] 在一个实施方案中,调节有需要的受试者的Treg细胞的方法可以包括施用有效量的VISTA蛋白、多聚VISTA蛋白、VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白。

[0082] 在一个实施方案中,释放VISTA对免疫性的抑制作用的方法可以包括施用有效量的VISTA蛋白、多聚VISTA蛋白、VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白。在另一实施方案中,会发现所治疗的患者在治疗之前表达较高水平的VISTA。在另一实施方案中,可以在治疗后监测VISTA水平以评估可能已经增强了免疫反应。

[0083] 在一个实施方案中，增强有需要的受试者的细胞介导的免疫性的方法可以包括施用有效量的VISTA蛋白、多聚VISTA蛋白、VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白。

[0084] 在一个实施方案中，用于调节免疫细胞反应的方法可以包括在初级信号存在下使免疫细胞与有效量的VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白或多聚VISTA蛋白接触使得调节免疫细胞的反应。在另一实施方案中，所述接触可以在体外、体内或离体进行。

[0085] 在一个实施方案中，调控在T细胞和骨髓源性APC之间同源相互作用期间的T细胞反应的方法可以包括施用有效量的VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白或多聚VISTA蛋白。

[0086] 在一个实施方案中，引发有需要的个体的免疫抑制的方法可以包括施用有效量的VISTA蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白，或多聚VISTA蛋白。

[0087] 在另一实施方案中，用于减小免疫细胞活化的方法可以包括向受试者施用有效量的VISTA(PD-L3)多肽或VISTA-Ig融合蛋白，其中所述VISTA(PD-L3)多肽或VISTA-Ig融合蛋白充当用于减小免疫细胞活化的抑制信号。在一个实施方案中，抑制了免疫细胞活化。在另一实施方案中，明显减小了免疫细胞活化。在一个实施方案中，抑制信号结合于免疫细胞上的抑制性受体(例如CTLA-4或PD-1)，从而拮抗结合于活化受体(例如通过TCR、CD3、BCR或Fc多肽)的初级信号。在一个实施方案中，VISTA多肽或VISTA-Ig融合蛋白抑制第二信使产生；抑制免疫细胞增殖；抑制免疫细胞中的效应功能(例如减小吞噬作用、减少抗体产生、减小细胞的细胞毒性、使免疫细胞不能产生介体(过敏性反应的细胞因子(例如IL-2)和/或介体)；或产生无变应性)。

[0088] 在一个实施方案中，初级信号可为结合TCR并且引发初级刺激信号的配体(例如CD3或抗CD3)。TCR配体包括但不限于抗CD3抗体OKT3和抗CD3单克隆抗体G19-4。在一个实施方案中，可以将初级信号通过其它机构递送到T细胞，所述其它机构包括蛋白激酶C活化剂如佛波酯(例如肉豆蔻酸佛波醇乙酸酯)和钙离子载体(例如离子霉素，其会提高细胞质钙浓度)。使用这些试剂绕过了TCR/CD3复合物，但会向T细胞递送刺激信号。充当初级信号的其它试剂可以包括天然配体和合成配体。天然配体可以包含有或无呈递肽的MHC。其它配体可以包括但不限于肽、多肽、生长因子、细胞因子、趋化因子、糖肽、可溶性受体、类固醇、激素、分裂素(例如PHA)或其它超级抗原、肽-MHC四聚体和可溶性MHC二聚体。

[0089] 在另一实施方案中，检测生物样本中VISTA(PD-L3)核酸分子、蛋白质或多肽的存在的方法包括使生物样本与能够检测VISTA(PD-L3)核酸分子、蛋白质或多肽的试剂接触，使得可以在生物样本中检测到VISTA(PD-L3)核酸分子、蛋白质或多肽的存在。可使用VISTA(PD-L3)表达以检测某些疾病部位如炎症部位。

[0090] 在另一实施方案中，检测生物样本中VISTA(PD-L3)活性的存在的方法包括使生物样本与能够检测VISTA(PD-L3)活性指标的试剂接触，使得可以在生物样本中检测到VISTA(PD-L3)活性的存在。在另一实施方案中，用于检测生物样本中可溶性VISTA的方法可以包括使生物样本与能够检测VISTA(PD-L3)活性指标的试剂接触，使得可以在生物样本中检测到VISTA(PD-L3)活性的存在。在另一实施方案中，用于检测生物样本中可溶性VISTA的方法可以包括使生物样本与能够结合VISTA(PD-L3)的试剂，任选地与抗VISTA抗体或抗体片段接触，以及检测VISTA-抗体复合物的存在。在另一实施方案中，测量可以是定量的，任选地是Western印迹密度测定法、比色的或荧光的。

[0091] 在另一实施方案中，用于鉴别VISTA基因中存在或不存在基因改变的诊断性分析包括获得可以包含核酸的样本，以及分析所述样本，其中所述基因改变是通过以下至少一者表征：(i)编码VISTA(PD-L3)多肽的基因的异常修饰或突变；(ii)基因误调节；以及(iii)VISTA(PD-L3)多肽的异常翻译后修饰，其中基因的野生型形式编码具有VISTA(PD-L3)活性的多肽。在一个实施方案中，核酸可为DNA或mRNA。

[0092] 在一个实施方案中，针对具有用作治疗性或免疫性调节剂的可能用途，选择抗VISTA抗体的方法可以包括：(a)用VISTA蛋白、免疫原性片段或其缀合物将免疫细胞或宿主免疫；(b)选择表达特异性结合于VISTA的抗体的淋巴细胞；(c)选择抗VISTA抗体或其抗体片段；(d)针对抑制或增强VISTA(PD-L3)或VISTA的至少一种以下活性的能力筛选所述抗VISTA抗体或其抗体片段：(i)抑制T细胞活化或分化；(ii)抑制CD4+或CD8+T细胞增殖，或者抑制T细胞的细胞因子产生；(iii)其中具有至少一种(d)中的活性的抗体或其抗体片段具有用作治疗性或免疫性调节剂的可能用途。

[0093] 在其它实施方案中，选择具有所需功能性质的抗VISTA(PD-L3)抗体的方法可以包括基于所需功能性质筛选针对这种蛋白质或VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白产生的单克隆抗体组，所述功能性质包括：调节VISTA(PD-L3)对免疫性的特定作用，如所述蛋白质对TCR活化的抑制作用、所述蛋白质对CD4 T细胞对抗CD3的增殖反应的抑制作用、抑制同源CD4 T细胞的抗原特异性增殖反应、VISTA(PD-L3)对特定细胞因子(例如IL-2和γ干扰素)的表达的抑制作用，以及选择所需抗体。

[0094] 在另一实施方案中，用于鉴别结合于VISTA(PD-L3)多肽或调节其活性的化合物的方法可以包括提供指标组合物，所述指标组合物可以包含具有VISTA(PD-L3)活性的VISTA(PD-L3)多肽、使指标组合物与测试化合物接触，以及测定测试化合物对指标组合物中VISTA(PD-L3)活性的作用以鉴别调节VISTA(PD-L3)多肽的活性的化合物。

[0095] 在另一实施方案中，用于筛选调节VISTA(PD-L3)的活性的化合物的基于细胞的分析可以包括使表达VISTA(PD-L3)目标分子的细胞与测试化合物接触以及测定测试化合物调节VISTA(PD-L3)目标分子的活性的能力。

[0096] 在另一实施方案中，用于筛选调节VISTA(PD-L3)对目标分子的结合的化合物的无细胞分析可以包括使VISTA(PD-L3)多肽或其生物活性部分与测试化合物接触，以及测定测试化合物结合于VISTA(PD-L3)多肽或其生物活性部分的能力。

[0097] 在另一实施方案中，鉴别化合物，例如调节VISTA(PD-L3)对在第一和第二抗原浓度下的T细胞活化或细胞因子产生的作用的抗VISTA(PD-L3)抗体的方法可以包括使表达VISTA(PD-L3)目标分子的T细胞与测试化合物在第一抗原浓度下接触、测定测试化合物调节在第一抗原浓度下的T细胞增殖或细胞因子产生的能力、使表达VISTA(PD-L3)目标分子的T细胞与测试化合物在第二抗原浓度下接触，以及测定测试化合物调节在第二抗原浓度下的T细胞增殖或细胞因子产生的能力，从而鉴别调节在第一和第二抗原浓度下的T细胞活化或细胞因子产生的化合物。

[0098] 在其它实施方案中，可以基于哪些抗VISTA抗体抑制或促进VISTA(PD-L3)对CD4+和CD8+T细胞分化、增殖和/或细胞因子产生的作用，对抗VISTA(PD-L3)抗体和VISTA(PD-L3)蛋白的组进行筛选和选择。在另一实施方案中，可使用已经工程化以表达人VISTA的小鼠来测试抗人VISTA抗体在调控免疫性方面的功能。

[0099] 附图详述

[0100] 图1描绘了序列分析。(A)鼠类VISTA(PD-L3)的全长氨基酸序列(SEQ ID NO:17)。(B)在鼠类VISTA(PD-L3)(SEQ ID NO:25)和所选B7家族配体(包括B7-H1(PD-L1)(SEQ ID NO:26)、B7-DC(PD-L2)(SEQ ID NO:27)、B7-H3(CD276)(SEQ ID NO:28)和B7-H4(B7S1)(SEQ ID NO:29))之间的细胞外Ig域的氨基酸序列比对。(C)VISTA(PD-L3)(SEQ ID NO:30)Ig域与B7家族受体(包括PD-1(SEQ ID NO:31)、CTLA-4(SEQ ID NO:32)、CD28(SEQ ID NO:33)、BTLA(SEQ ID NO:34)和ICOS(SEQ ID NO:35))的比对。Ig-v域,“....”;Ig-c域,“___”。使用MUSCLE算法(通过Log-Expectation进行多重序列比较)进行比对。(D)使用ClustalW2程序计算在VISTA(PD-L3)和其它B7家族配体和受体之间的Ig-V域的序列同一性(%)。(E)序列比对,以示出在人(SEQ ID NO:37)和鼠类VISTA(PD-L3)(SEQ ID NO:36)之间的序列同源性。相同的残基以黑色阴影表示。高度保守和半保守残基分别以深浅灰度的阴影表示。

[0101] 图2描绘了小鼠VISTA(PD-L3)与其它免疫球蛋白(Ig)超家族成员的系统发育分析(hylogenic analysis)。使用PhyML算法(系统发育最大可能性)来分析小鼠VISTA(PD-L3)和其它Ig超家族成员(包括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和BTN1A1)的全长序列。分支距离示于树枝节点处。

[0102] 图3描绘了VISTA(PD-L3)的组织表达和造血细胞表达模式。A.来自小鼠组织的全长VISTA(PD-L3)的RT-PCR。泳道:(1)肌肉,(2)心脏,(3)眼睛,(4)胸腺,(5)脾脏,(6)小肠,(7)肾,(8)肝,(9)脑,(10)乳腺,(11)肺,(12)卵巢,(13)骨髓。B.来自纯化的造血细胞类型的全长VISTA(PD-L3)的RT-PCR。泳道:(1)腹膜巨噬细胞,(2)脾脏CD11b+单核细胞,(3)脾脏CD11c+DC,(4)脾脏CD4+T细胞,(5)脾脏CD8+T细胞,(6)脾脏B细胞。C-E.在来自胸腺和脾脏的脾脏CD4+和CD8+T细胞(C)上、在CD11b+单核细胞(D)上,和在来自脾脏和腹膜腔的CD11c+DC子集(E)上的VISTA(PD-L3)表达的流式细胞术分析。(F)还分析了脾脏B细胞、NK细胞和粒细胞。(G)VISTA(PD-L3)在来自不同组织部位(包括肠系膜LN、周边LN、脾脏、血液和腹膜腔)的造血细胞上的差异性表达。示出来自至少3个独立实验的代表性数据。

[0103] 图4描绘了VISTA,新型且结构独特的Ig超家族抑制性配体,其细胞外域有着与B7家族配体PD-L1最高的同源性,如显示在抗原呈递细胞上,以及其它CD和B7家族成员。VISTA具有93个aa胞浆域,除可能的蛋白激酶C结合位点以外没有明显的信号转导基序。

[0104] 图5描绘了VISTA(PD-L3)仓鼠单克隆抗体的特异性。使用来自杂交瘤培养物的上清液将与RFP融合的过表达PD-L1或VISTA(PD-L3)的小鼠EL4细胞系染色,并且通过流式细胞术进行分析。示出两种代表性阳性克隆,即8D8和6E7。

[0105] 图6描绘了在体外培养的脾脏细胞上的VISTA(PD-L3)表达与其它B7家族配体的比较。比较了VISTA(PD-L3)和其它B7家族配体(即PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4)在造血细胞类型(包括CD4+T细胞、CD11bhi单核细胞和CD11c+DC)上的表达。细胞为新鲜分离的,或者体外培养24小时,有和没有活化。用与板结合的αCD3(5μg/ml)活化CD4+T细胞,用IFNα(20ng/ml)和LPS(200ng/ml)活化CD11bhi单核细胞和CD11c+DC。示出来自三个独立实验的代表性结果。

[0106] 图7描绘了VISTA(PD-L3)和其它B7家族配体在免疫期间体内表达模式的比较。将DO11.10TCR转基因小鼠在侧腹用乳化在完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant;

CFA)中的鸡卵白蛋白(OVA)免疫。免疫后24小时收集引流和非引流淋巴结细胞,并且通过流式细胞术分析VISTA(PD-L3)、PD-L1和PD-L2的表达。示出了来自至少四个独立实验的代表性结果。(A)免疫后24小时在引流淋巴结内用CFA/OVA,而非仅用CFA诱导表达高水平VISTA(PD-L3)的CD11b+细胞群体。这些细胞具有F4/80+巨噬细胞和CD11C+树突细胞的混合表型。(B)在免疫后24小时分析了VISTA(PD-L3)、PD-L1和PD-L2在CD11bhi单核细胞、CD11c+DC和CD4+T细胞上的表达。

[0107] 图8描绘了在活化的CD4+T细胞、$CD11b^{+}$和$CD11c^{+}$细胞上的VISTA(PD-L3)表达响应于免疫所产生的损失。将DO11.10小鼠在侧腹用乳化在完全弗氏佐剂(CFA)中的鸡卵白蛋白(OVA)免疫。免疫后48小时收集引流和非引流淋巴结细胞,并且通过流式细胞术来分析VISTA(PD-L3)表达。示出了来自2个独立实验的代表性结果。

[0108] 图9描绘了固定的VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白会抑制CD4+和CD8+T细胞增殖。(A)通过有或无共同吸附的VISTA(PD-L3)-Ig的与板结合的αCD3刺激CFSE标记的CD4+和CD8+T细胞。对CFSE-低细胞的百分比定量并且示于(B)中。(C)来自PD-1ko小鼠的CD4+T细胞还被VISTA(PD-L3)-Ig抑制。(D)VISTA(PD-L3)-Ig介导性抑制具有持续性并且后来也可起作用。在VISTA(PD-L3)-Ig或对照Ig存在下活化CD4+T细胞,持续72小时(i),或24小时(ii、iii和iv)。收集预活化24小时的细胞并且在规定条件下再刺激另外48小时。在72小时培养结束时分析细胞增殖。(ii)用VISTA(PD-L3)-Ig预活化并且用抗CD3再刺激;(iii)用抗CD3预活化并且用VISTA(PD-L3)-Ig再刺激;(iv)用VISTA(PD-L3)-Ig活化并且用VISTA(PD-L3)-Ig再刺激。针对所有条件分析复制孔。示出来自四个实验的代表性结果。

[0109] 图10描绘了PD-L1-Ig和VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白对CD4+T细胞增殖的类似抑制作用。将粗纯化CD4+T细胞用CFSE标记并且用与板结合的αCD3以及滴定量的PD-L1-Ig或VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白刺激。在72小时分析CFSE稀释度并且定量CFSE低细胞的百分比。针对所有条件分析复制孔。示出了来自2个独立实验的代表性结果。

[0110] 图11描绘了VISTA(PD-L3)-Ig对原生和记忆CD4+T细胞的增殖的抑制性影响。(A)对原生(CD25-CD44低CD62Lhi)和记忆(CD25-CD44hiCD62L低)CD4+T细胞子集进行分选、CFSE标记,并且用在指定比率下的与板结合的抗CD3(2.5μg/ml)以及VISTA(PD-L3)-Ig或对照Ig进行刺激。在72小时通过考查CFSE分裂谱来分析细胞增殖。如通过CFSE低细胞的百分比测定,计算增殖细胞的百分比并且将其示于B中。针对所有条件分析复制孔。示出了来自两个独立实验的代表性结果。

[0111] 图12描绘了VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白会抑制早期TCR活化和细胞增殖,但是不会直接诱导凋亡。用在1-2比率(分别是2.5μg/ml和5μg/ml)下的与板结合的抗CD3以及VISTA(PD-L3)-Ig或对照Ig刺激本体纯化的CD4+T细胞。在24小时和48小时通过流式细胞术分析细胞的CD69、CD62L和CD44的表达。还用早期凋亡标记膜联蛋白-V和细胞死亡标记7-氨基放线菌素D(7-AAD)对细胞染色。示出了来自两个独立实验的代表性结果。

[0112] 图13描绘了VISTA-Ig会抑制CD4+和CD8+T细胞产生细胞因子。(A-B)用在规定比率下的与板结合的抗CD3和VISTA-Ig或对照Ig刺激本体纯化的CD4+T细胞。在24小时和48小时之后收集培养物上清液。通过ELISA分析IL-2和IFNγ的水平。(C-D)将CD4+T细胞分选到原生(CD25-CD44低CD62Lhi)和记忆(CD25-CD44hiCD62L低)细胞群体中。用在1:2比率下的与板结合的αCD3和VISTA(PD-L3)-Ig或对照Ig刺激细胞。在48小时收集培养物上清液并且通

过ELISA分析IL-2和IFNγ的水平。(E)用在指定比率下的与板结合的抗αCD3和VISTA(PD-L3)-Ig或对照Ig刺激本体纯化的CD8+T细胞。通过ELISA分析培养物上清液中的IFNγ。对于所有条件,汇集六个复制孔的上清液以进行ELISA分析。示出来自三个实验的代表性结果。

[0113] 图14描绘了VISTA-Ig介导性抑制可以克服由CD28提供的适度的共同刺激水平,但是由高水平的共同刺激完全逆转,以及由外源性IL-2部分救援。A-B.通过在1-1比率和1-2比率下的与板结合的αCD3以及VISTA(PD-L3)-Ig或对照Ig活化小鼠CD4+T细胞。对于细胞因子救援,将可溶性mIL-2、mIL7、mIL15和mIL-23(都在40ng/ml下)添加到细胞培养物中(A)。为了考查共同刺激的作用,将αCD28(1μg/ml)与αCD3和Ig蛋白在指定比率下一起固定(B)。在72小时通过考查CFSE分裂谱来分析细胞增殖。C-D.为了考查在较低水平的共同刺激存在下VISTA(PD-L3)的抑制活性,涂布滴定量的αCD28以及抗CD3(2.5μg/ml)和VISTA-Ig融合蛋白或对照Ig融合蛋白(10μg/ml)以刺激小鼠CD4+T细胞增殖。在72小时分析细胞增殖。定量增殖的CFSE低细胞的百分比并且将其示于D中。对于所有条件都分析复制孔。示出来自三个独立实验的代表性CFSE谱。

[0114] 图15描绘了在抗原呈递细胞上表达的VISTA(PD-L3)会抑制CD4T细胞增殖。A-C将稳定地表达MHCII分子I-Ad和共同刺激分子B7-2的CHO细胞系用作亲本细胞系。用表达VISTA-RFP或RFP对照分子的逆转录病毒转导细胞。分选转导的细胞以实现均匀的表达水平。为了测试其作为抗原呈递细胞的能力,将CHO-VISTA或CHO-RFP细胞用丝裂霉素C处理并且与OVA特异性转基因CD4+T细胞DO11.10混合,在滴定量的OVA肽存在下进行。在72小时通过CFSE分裂谱(A-B)或通过并入氚(C)来分析DO11细胞的增殖。(D)在10天的培养期间用RFP或B7B-H5-RFP逆转录病毒转导骨髓源性树突细胞。将转导的CD11c+RFP+DC和未转导的CD11c+RFP-DC分选并且用于刺激OVA特异性转基因CD4+T细胞OTII,在滴定量的OVA肽存在下进行。在第3天通过考查CFSE分裂来分析细胞增殖。对于所有实验,在所有条件下都分析复制孔,并且示出来自三个独立实验的代表性结果。

[0115] 图16描绘了在逆转录病毒转导的骨髓源性DC中的VISTA(PD-L3)的表面表达水平。在GM-CSF(20ng/mml)存在下培养骨髓源性DC(BMDC)并且用如本文所述的RFP或VISTA-RFP逆转录病毒进行转导。在第10天,在培养的BMDC上分析VISTA的表面表达水平,并且将其与新鲜分离的腹膜巨噬细胞相比。

[0116] 图17示出了抗PDL3单克隆抗体在被动转移EAE模型中显示功效。在此过继转移EAE模型中,将供体SJL小鼠用CFA和PLP肽免疫。在第10天,从引流LN分离了总淋巴细胞,在体外用PLP肽、IL-23(20ng/ml)和抗IFNg(10ng/ml)培养了4天。然后纯化扩增的CD4T细胞,并且过继转移至原生接受者小鼠。监测疾病进展,并按以下评分:0:无疾病;0.5:丧失尾音;1:尾无力;2:尾无力+后肢轻瘫;2.5:单后肢瘫痪;3:双后肢瘫痪;3.5:前肢虚弱;4:后肢瘫痪+单侧前肢瘫痪。当疾病评分达到4时将小鼠处死。*,表示小鼠被处死。

[0117] 图18示出了在抗原呈递细胞上表达的VISTA会抑制CD4+T细胞增殖。

[0118] 图19示出了抗VISTA抗体会在移植有MB49肿瘤细胞的小鼠中抑制肿瘤生长。

[0119] 图20示出了在四个不同小鼠抗肿瘤模型(A-D)中VISTA单克隆抗体的抗肿瘤作用。图21E示出了在ID8模型中VISTA在不同细胞上的表达。在不同解剖学位置在骨髓树突细胞上有极高表达。如可看到,在腹水细胞中在骨髓树突细胞上,即肿瘤生长和白血球浸润的部位有极高水平。

[0120] 图21示出了VISTA单克隆抗体对CD40/TLR激动剂疫苗(由使用激动性αCD40mab、TLR激动剂和OVA肽组成)的功效的加强作用。

[0121] 图22示出了在健康小鼠中或在产生EAE的小鼠中在CNS细胞上的VISTA表达。

[0122] 图23描绘了VISTA的序列和结构分析。(A)Ig-V域、茎片段和跨膜区分别以粗体、斜体和Times New Roman字体突出的小鼠VISTA的一级氨基酸序列。通过加下划线指示胞外域区域中的半胱氨酸。(B)几种B7家族成员和VISTA的Ig-V域的多重序列比对。将预测的二级结构(链、螺旋和β转角分别使用箭头、弹簧和"T")标记在比对上方并且以VISTA结构模型作为基础。VISTA(SEQ ID NO:15)、PD1L1(SEQ ID NO:11)、PD1L2(SEQ ID NO:12)、B7H4(SEQ ID NO:13)和B7H3(SEQ ID NO:14)。(C)VISTA直系同源物的多重序列比对。恒定残基由红色背景表示,并且物理化学保守的位置由红色字母表示。保守氨基酸由蓝框标记。基于36种VISTA直系同源蛋白质计算保守性,但是仅示出了9种代表物。在几乎所有的Ig超家族成员中都保守的规范半胱氨酸对(在"B"和"F"链内)由红色圆圈突出,而对VISTA具有特异性的半胱氨酸则由蓝色圆圈标记。独特的VISTA半胱氨酸模式在来自小鼠(SEQ ID NO:17)、人(SEQ ID NO:16)、袋鼠(SEQ ID NO:18)、海豚(SEQ ID NO:19)、鸡(SEQ ID NO:20)、爪蟾(SEQ ID NO:21)、斑胸草雀(SEQ ID NO:22)、斑马鱼和河豚(SEQ ID NO:23)的所有直系同源物中都是保守的。

[0123] 图24描绘了在肿瘤细胞上的VISTA过表达会克服保护性抗肿瘤免疫性。通过逆转录病毒转导产生过表达VISTA或RFP对照蛋白的MCA105肿瘤细胞并且分选到均匀。为了产生保护性免疫,用受到辐射的MCA105肿瘤细胞在左侧腹对原生小鼠皮下接种。(A)14天后用活的MCA105VISTA或MCA105RFP肿瘤细胞对接种小鼠的右侧腹进行皮下激发。每2天监测肿瘤生长。将肿瘤尺寸示为平均值±SEM。示出来自三个独立重复实验的代表性结果。(B)在活肿瘤激发之前,不对接种小鼠进行处理或者通过单克隆抗体耗尽$CD4^+$和$CD8^+$T细胞两者。如在A中监测肿瘤尺寸并且示为平均值±SEM。示出来自两个独立重复实验的代表性结果。对于所有实验,比率都表示在每组的小鼠总数中,有肿瘤的小鼠的数目。用不成对Mann-Whitney试验评估统计差异(p值)。

[0124] 图25A-F描绘了使用特异性单克隆抗体的VISTA阻断会在体外和体内增强$CD4^+$T细胞反应。(A)单克隆抗体克隆13F3中和了VISTA介导性体外抑制。将A20-RFP和A20-VISTA细胞用于在同源OVA肽存在下刺激CFSE标记的DO11.10$CD4^+$T细胞。如所示添加20μg/ml VISTA特异性单克隆抗体13F3或对照-Ig。在72小时之后分析CFSE稀释度,并且将$CFSE^{低}$细胞的百分比示为平均值±SEM。对于所有条件都分析复制孔。(B和C)辐射从原生脾细胞分选的总$CD11b^{hi}$骨髓细胞(B)或CD11b-$CD11c^-$单核细胞(C)以及$CD11b^{hi}CD11c^+$骨髓DC(D),并且将其在OVA肽存在下用于刺激CFSE标记的OT-II转基因$CD4^+$T细胞。通过在72小时培养期的最后8小时期间并入氚化胸腺嘧啶来测量细胞增殖并且将其示为平均值±SEM。在所有条件下都分析三重孔。

[0125] 图26描绘了VISTA-IgG2a会减慢实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)(多发性硬化症模型)的进展。用175μg MOG/CFA和300ng百日咳毒素(PT)(第0、2天)对小鼠进行免疫以诱导活性EAE。在第14、17和20天,施用150μg VISTA-IgG 2a(n=8)或150μg对照IgG2a(n=8)。将数据示为平均值±SEM。

[0126] 图27描绘了VISTA-IgG1和VISTA-IgG2a对实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)进展的

治疗作用。用175μg MOG/CFA和300ng百日咳毒素(PT)(第0、2天)对小鼠进行免疫以诱导活性EAE。在第6天,每周用3剂150μg对照IgG1(n=3)、150μg对照IgG2a(n=6)、150μgmVISTA-IgG1(n=3)或150μg mVISTA IgG2a(n=6)处理小鼠(总共两周)。将数据示为平均值±SEM。

[0127] 图28描绘了VISTA-IgG2a融合蛋白对实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)进展的治疗作用。用175μg MOG/CFA和300ng百日咳毒素(PT)(第0、2天)对小鼠进行免疫以诱导活性EAE。在第14天,每周用3剂PBS(n=6)、100μg对照IgG2a(n=6)、300μg对照IgG2a(n=6)、100μgVISTA-IgG2a(n=6)或300μg mVISTA IgG2a(n=6)处理小鼠(总共两周)。将数据示为平均值±SEM。

[0128] 图29描绘了通过对cDNA组织组(Origene)进行实时PCR分析来考查VISTA健康人组织的表达。(A)VISTA主要在造血组织中或在含有大量造血组织的组织中表达。这与VISTA在免疫相关功能中的重要性一致。(B)发现表达的表达模式遵循与VISTA的最接近的同系物PD-L1类似的趋势。

[0129] 图30描绘了单核细胞、树突细胞以及约20%的CD4和CD8T细胞中的VISTA蛋白表达(图30)。在血液单核细胞的‘巡视’($CD14^{dim}CD16^{+}$)和‘炎症’($CD14^{+}CD16^{+/-}$)子集内并且在树突细胞的淋巴和骨髓子集内观测到VISTA表达。

[0130] 图31描绘了本体纯化的CD4(图31A)和CD8(图31B)T细胞的CFSE稀释的抑制。产生Ig融合蛋白,其由VISTA的细胞外域和含有突变以减小Fc受体结合的人IgG的Fc区组成。将10μg/ml VISTA-Ig或对照Ig与2.5μg/ml抗CD3(OKT3)一起固定在板上,然后通过CFSE稀释来测量增殖。

[0131] 图32描绘了人VISTA-Ig以及相对于不同浓度的OKT3的人VISTA-Ig的滴定,示出了较高浓度的OKT3可被较高浓度的VISTA克服(图32A和32B)。

[0132] 图33A-C描绘了在存在或不存在VISTA-Ig下活化之后考查了细胞状态。在2天的培养期间,由抗CD3对早期活化标记CD25和CD69的上调被VISTA-Ig阻断(图33A和33B)。类似地,在培养5天之后,从CD45RA表达移到CD45RO表达,表明防止了抗原经历(图33C)。VISTA对细胞活力无影响。图34D示出了VISTA-Ig会提高FoxP3转化率。

[0133] 图34描绘了由VISTA诱导的抑制,其中在抗CD3和VISTA-Ig上培养细胞2天,然后移到抗CD3上仅待3天。这种进一步的刺激不能救援抑制(图34A和34B)。

[0134] 图35示出了VISTA-Ig会显著减少CD4(图35A)和CD8(图35B)T细胞的IL-10、TNFα和IFNγ产生,并且IL-17产生倾向于适度减少。

[0135] 图36示出了抗CD28激动性抗体向T细胞提供强力的共同刺激,并因此滴定至培养物中以激发VISTA抑制(图36A-C)。

[0136] 图37.VISTA mAb治疗减慢了肿瘤生长。对小鼠注射A.MB49;B.MCA105;C.EG7肿瘤细胞;D.ID8-荧光素酶;E.B16F10。每隔一天用VISTA mAb 13F3治疗小鼠(300μg),在第0天(A-D)或第-2天(E)开始。还将PD-L1 mAb(MIH5)施用至B16F10。用卡规监测皮下肿瘤生长并且以mm^2形式记录。对于腹膜内ID8-荧光素酶肿瘤,在第30和55天使用Xenogen IVIS对小鼠成像。对于MB49 ELISPOT分析(A),用受辐射的肿瘤细胞刺激肿瘤引流LN细胞。

[0137] 图38.人鼓膜中层DC表达VISTAa。用生物素缀合的抗人VISTA(抗体克隆GA1)对从健康结肠分离的LMPC染色以鉴别Lin-HLA-DR+LP树突细胞中的VISTA表达。

[0138] 图39.Vista-Ig对人CD4T细胞具有抑制性。用2.5μg/ml与板结合的抗CD3和指定浓

度的VISTA-Ig刺激CFSE标记的人CD4T细胞。(A)代表性CFSE稀释谱，(B)对CFSE-低细胞的百分比定量并且将其示为平均值+/-SEM。

[0139] 图40.VISTA和PD-L1/PD-1通路一致地起作用。A.用αVISTA和αPD-L1 mAb的组合治疗(第+4天)抑制了B16F10肿瘤生长。B.体外协同作用：将VISTA-Ig和PD-L1-Ig与αCD3/CD28固定在一起以刺激CD4+和CD8+原生T细胞。通过在72小时进行CFSE稀释来评估细胞增殖。C.PD-L1和VISTA在B16F10肿瘤的TME内的差异表达模式。VISTA仅在肿瘤浸润性白血球(TIL)上表达，而PD-L1在肿瘤细胞和TIL两者上都表达。

[0140] 图41.用αhVISTA mAb检测骨髓细胞上的VISTA。在无VISTA-Ig存在下(上图)或在VISTA-Ig存在下(下图)对PBL染色以证实特异性。

[0141] 发明详述

[0142] 我们已经发现一种新型的抑制配体，将其命名为T细胞活化的V域Ig抑制因子(VISTA)，其在破坏小鼠中保护性抗肿瘤免疫性方面起到关键作用(1)。VISTA对PDL1的同源性有限，并且通过与PD-1无关的未知受体关键性地抑制T细胞活化。VISTA KO小鼠显示炎症表型，表明VISTA在维持周边耐受性方面有必要的作用。VISTA在肿瘤微环境(TME)中高表达并且直接削弱最优抗肿瘤免疫性的产生。在多种小鼠肿瘤模型中，VISTA mAb介导性阻断会显著抑制肿瘤生长。

[0143] 基于这些发现，我们假设VISTA在肿瘤浸润性白血球上表达，并且这种表达对于TME中的T细胞反应具有抑制性。本申请将我们对在小鼠模型中VISTA的现有研究延及人患者。具体来说，本申请进一步描述考查患者样本中的VISTA表达以及测试其如何影响T细胞功能。基于此，VISTA抑制可以用于治疗癌症(类似于用功能上相关的蛋白质CTLA-4和PD-L1所获得的成功)。另一方面，本公开提供鉴别为此目的而产生的合适阻断抗体的方法。

[0144] 另一方面，本发明涉及调节活性和/或具体来说结合或阻断特异性调控T细胞蛋白对其反受体的结合的治疗方法。这种蛋白质名为PD-L3或VISTA(PD-L3 OR VISTA)，是一种新型且结构独特的Ig超家族抑制配体，其细胞外域对B7家族配体PD-L1有同源性。这种分子在本文中可互换称为PD-L3或VISTA或T细胞活化的V域免疫球蛋白抑制因子(VISTA)。VISTA主要在造血室内表达并且在骨髓APC和T细胞上受高度调控。VISTA抑制通路的治疗性介入提出一种调节T细胞介导性免疫性以治疗多种癌症的激励人心的方法。

[0145] 本发明具体地涉及对VISTA或PD-L3具有特异性的抗体治疗特定癌症(包括结肠直肠癌、膀胱癌、卵巢癌和黑素瘤)的用途。

[0146] 如下文所公开，VISTA表达似乎是造血室的专属并且这种蛋白质在成熟骨髓细胞($CD11b^{bright}$)上高表达，在$CD4^+$T细胞、T^{reg}和$CD8^+$T细胞上的表达水平较低。APC上的可溶性VISTA蛋白，例如可溶性VISTA-Ig融合蛋白，或VISTA的表达会抑制体外$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖和细胞因子产生。还观测到抗VISTA抗体，例如抗VISTA mab(13F3)阻断了由体外$VISTA^+$APC造成的T细胞反应的VISTA诱导性抑制。另外，已经发现抗VISTA mab会加重EAE并且提高体内致脑炎Th17的频率。更进一步，如下文详细公开，已经发现抗VISTA mab会在多种(4)鼠类肿瘤模型中诱导肿瘤缓解。在这些模型中骨髓源性抑制细胞(MDSC)上的VISTA表达极高，表明$VISTA^+$MDSC抑制肿瘤特异性免疫。如本文所示，VISTA对小鼠和人(仅体外)的体外和体内T细胞都施加免疫抑制活性，并且在控制产生对癌症的自体免疫和免疫反应方面是一种重要的介体。具体来说，数据显示：

[0147] (1)VISTA是Ig超家族的新成员,并且含有Ig-V域,所述域对PD-L1具有远的序列相似性。在本文中公开了当作为Ig融合蛋白产生时或当在人造APC上过表达时,VISTA会抑制小鼠和人CD4+和CD8+T细胞增殖和细胞因子产生。

[0148] (2)骨髓APC上的VISTA表达对于体外T细胞反应具有抑制性。

[0149] (3)在肿瘤微环境中在MDSC上的VISTA表达极高。先前表明牵涉于T细胞的MDSC介导性抑制的许多细胞表面分子的表型和功能分析:CD115、CD124、CD80、PD-L1和PD-L2由MDSC表达,但是在MDSC和来自缺乏免疫抑制活性的无肿瘤小鼠的细胞之间发现其表达水平或阳性细胞的比例没有差异。因此,我们预言VISTA将是MDSC上的主要B7负调控剂。

[0150] (4)抗体介导性VISTA阻断会诱导对自体性肿瘤的保护性免疫。

[0151] 基于此,VISTA似乎是MDSC上占优的负免疫调控分子,其会干扰保护性抗肿瘤免疫性的产生。因此,用抗VISTA抗体阻断这种分子的活性将允许在人和其它哺乳动物体内产生保护性抗肿瘤免疫性。

[0152] 因此,本发明涉及使用可溶性VISTA蛋白,例如融合蛋白和多聚VISTA蛋白(包含VISTA细胞外域的多个复本或其片段)以及VISTA缀合剂(例如小分子和抗体或其片段,其结合VISTA或调节(激动或拮抗)VISTA活性以作为免疫调节剂并且用于治疗不同癌症,例如结肠直肠癌、膀胱癌、卵巢癌和淋巴瘤、自体免疫疾病、过敏症、感染和炎症病状,例如多发性硬化症和关节炎)的方法。

[0153] 如下文详述,VISTA是一种新型的抑制配体,其细胞外Ig-V域对两种已知的B7家族配体,即程序化死亡配体1和2(PD-L1和PD-L2)具有同源性,并且显示独特的序列特征和独特的在APC和T细胞子集上的体外和体内表达模式(其将PD-L3或VISTA与其它B7家族配体区分开)。已经显示这种蛋白质对$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖和分化具有功能性影响(抑制$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖以及细胞因子产生)。基于其表达模式和对T细胞的抑制影响,PD-L3或VISTA明显用作在T细胞和骨髓源性APC发生同源相互作用期间负调控T细胞反应的调控配体。

[0154] 尽管PD-L3或VISTA似乎是B7配体家族的成员,但是不同于其它B7家族配体,这种分子仅含有Ig-V域而无Ig-C域,并且在进化史上较接近B7家族受体程序化死亡-1(PD-1)。基于此,PD-L3或VISTA和对其具有特异性的激动剂或拮抗剂可用以调控T细胞活化和分化,并且较广泛用于调节控制免疫反应的调控网络。具体来说,PD-L3或VISTA蛋白和PD-L3或VISTA激动剂或拮抗剂、优选地对PD-L3或VISTA具有特异性的抗体适用于在自体免疫、炎症反应和疾病、过敏症、癌症、传染性疾病和移植中调节免疫反应。

[0155] 因此,本发明部分地涉及例如用于治疗、诊断或免疫调节用途的组合物,所述组合物含有分离的可溶性PD-L3或VISTA蛋白或融合蛋白,例如可溶性VISTA-Ig融合蛋白或多聚VISTA蛋白,以及药学上可接受的载体,所述蛋白包含优选地与SEQ ID NO:2、4或5中所述的人或鼠类PD-L3或VISTA多肽或者其直系同源体或片段具有至少70-90%同一性的氨基酸序列,其由与SEQ ID NO:1或3特异性杂交的体内调节VISTA的基因编码。在一些实施方案中,可溶性或多聚VISTA蛋白可以直接或间接地连接于异源(非VISTA)蛋白或可以由病毒载体或细胞(含有例如转染的免疫细胞,如T细胞)表达。

[0156] 本发明还提供表达载体,所述表达载体包含编码VISTA蛋白的分离的核酸,所述蛋白与SEQ ID NO:2、4或5中所述的人或鼠类VISTA氨基酸序列或其片段或直系同源体具有至少约70-99%同一性,其任选地可以与编码另一蛋白质如Ig多肽(例如Fc区)或报道分子的

序列融合;以及含有所述载体的宿主细胞。

[0157] 本发明还具体地涉及一种分离的缀合剂、优选地抗体或抗体片段,其具体地特异性结合于PD-L3或VISTA蛋白,所述PD-L3或VISTA蛋白包含SEQ ID NO:2、4或5中所述的氨基酸序列或其变体、片段或直系同源体。在一个优选实施方案中,缀合剂体外或体内调节(激动或拮抗)VISTA活性。在最优选的实施方案中,缀合剂是激动性或拮抗性抗体。

[0158] 本发明进一步提供如下调节免疫细胞反应的方法:在初级信号存在下使体外或体内免疫细胞与VISTA蛋白或对其具有特异性的缀合剂接触,以调节免疫细胞的反应。(VISTA或其调节剂的相互作用向免疫细胞发送信号,从而调控免疫反应。PD-L3或VISTA蛋白在骨髓抗原呈递细胞(包括骨髓树突细胞(DC)和巨噬细胞)上高水平表达,并且在CD4+和CD8+T细胞上以较低密度表达。在免疫活化时,骨髓APC上的PD-L3或VISTA表达上调,而在CD4+T细胞上表达下调)。因此,本发明的PD-L3或VISTA核酸和多肽,以及其激动剂或拮抗剂例如适用于调节免疫反应。

[0159] 另外,可将PD-L3或VISTA多肽(或其生物活性部分),或者PD-L3或VISTA分子的调节剂,即如使用前述方法选择的抗体并入药物组合物中,所述药物组合物任选地包括药学上可接受的载体。

[0160] 随后可将根据本发明的方法活化的免疫细胞离体扩增并且用于治疗和预防多种疾病;例如,已经体外克隆和扩增的人T细胞维持其调控活性(Groux等,(1997)Nature 389(6652):737-42)。在扩增之前,可以自受试者(例如哺乳动物,如人、狗、猫、小鼠、大鼠或其转基因物种)获得T细胞来源。T细胞可获自许多来源,包括周边血液单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、脾脏组织、肿瘤或T细胞系。T细胞可获自使用熟练技术人员已知的任何数目的技术如ficoll™分离从受试者采集的一单位的血液。另一方面,本发明提供一种如下检测生物样本中PD-L3或VISTA核酸分子、蛋白质或多肽的存在的方法:使生物样本与能够检测PD-L3或VISTA核酸分子、蛋白质或多肽的试剂接触,以在生物样本中检测PD-L3或VISTA核酸分子、蛋白质或多肽的存在。这种PD-L3或VISTA表达可用以检测某些疾病部位,包括癌性部位。

[0161] 另一方面,本发明提供一种用于调节PD-L3或VISTA活性的方法,其包括使能够表达PD-L3或VISTA的细胞与调节PD-L3或VISTA活性的试剂、优选地抗PD-L3或VISTA抗体接触,以调节细胞中的PD-L3或VISTA活性。在一个实施方案中,所述试剂抑制PD-L3或VISTA活性。在另一实施方案中,所述试剂刺激PD-L3或VISTA活性。在另一实施方案中,所述试剂干扰或增强在PD-L3或VISTA多肽和其天然结合伴侣之间的相互作用。在一个实施方案中,所述试剂是特异性结合于PD-L3或VISTA多肽的抗体。在另一实施方案中,所述试剂是肽、肽模拟物,或结合于PD-L3或VISTA多肽的其它小分子。

[0162] 在又一个实施方案中,所述试剂通过调节PD-L3或VISTA基因的转录、PD-L3或VISTA mRNA的翻译或PD-L3或VISTA多肽的翻译后修饰来调节PD-L3或VISTA的表达。在另一实施方案中,所述试剂是核酸分子,所述核酸分子的核苷酸序列与PD-L3或VISTA mRNA或PD-L3或VISTA基因的编码链反义。

[0163] 在一个实施方案中,本发明的方法通过施用作为受试者的PD-L3或VISTA调节剂的试剂用于治疗患有特征在于异常、不足或不期望的PD-L3或VISTA多肽或核酸表达或活性的病症或病状的受试者。在一个优选实施方案中,PD-L3或VISTA调节剂是如下所述的PD-L3或

VISTA多肽，优选地是可溶性融合蛋白或多聚VISTA蛋白或抗VISTA抗体。在另一实施方案中，PD-L3或VISTA调节剂是PD-L3或VISTA核酸分子，例如在腺病毒载体中。在另一实施方案中，本发明进一步提供用另一调节免疫反应的试剂来治疗受试者。

[0164] 在又一个实施方案中，本发明提供疫苗，所述疫苗包含抗原以及调节(提高或抑制)PD-L3或VISTA活性的试剂。在一个优选实施方案中，疫苗抑制在PD-L3或VISTA和其天然结合伴侣之间的相互作用。

[0165] 另一方面，本发明提供如下鉴别结合于PD-L3或VISTA多肽或调节其活性的化合物的方法：提供包含具有PD-L3或VISTA活性的PD-L3或VISTA多肽的指标组合物、使所述指标组合物与测试化合物接触，以及测定测试化合物对指标组合物中PD-L3或VISTA活性的作用，以鉴别调节PD-L3或VISTA多肽的活性的化合物。

[0166] 一方面，本发明的特征在于一种调节PD-L3或VISTA与其天然结合伴侣在免疫细胞上的相互作用的方法，其包括使表达PD-L3或VISTA的抗原呈递细胞与选自一种形式的PD-L3或VISTA，或调节PD-L3或VISTA和其天然结合伴侣的相互作用的试剂的试剂接触，以调节PD-L3或VISTA与其天然结合伴侣在免疫细胞上的相互作用。在一个优选实施方案中，调节PD-L3或VISTA和其天然结合伴侣的相互作用的试剂是特异性结合于PD-L3或VISTA的抗体。在一个实施方案中，上调PD-L3或VISTA与其天然结合伴侣的相互作用。在另一实施方案中，下调PD-L3或VISTA与其天然结合伴侣的相互作用。在一个实施方案中，所述方法进一步包括使免疫细胞或抗原呈递细胞与调节免疫反应的另一试剂接触。

[0167] 在一个实施方案中，体外进行所述接触步骤。在另一实施方案中，体内进行所述接触步骤。在一个实施方案中，免疫细胞选自T细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞和骨髓细胞。

[0168] 另一方面，本发明涉及一种抑制或增大免疫细胞中的活化的方法，其包括增大或抑制细胞中PD-L3或VISTA的活性或表达以抑制或增大免疫细胞活化。

[0169] 在又一方面，本发明涉及一种疫苗，其包含抗原和抑制PD-L3或VISTA和其天然结合伴侣之间的相互作用的试剂。

[0170] 另一方面，本发明涉及一种治疗患有将受益于免疫反应上调的病状的受试者的方法，其包括施用抑制PD-L3或VISTA和其天然结合伴侣之间在受试者的免疫细胞上的相互作用的试剂，以治疗将受益于免疫反应上调的病状。在一个优选实施方案中，所述试剂包含结合于PD-L3或VISTA并且抑制PD-L3或VISTA和其天然结合伴侣之间的相互作用的阻断抗体或小分子。在另一实施方案中，所述方法进一步包括向受试者施用上调免疫反应的第二试剂。另一方面，本发明涉及一种治疗患有将受益于免疫反应下调的病状的受试者的方法，其包括施用刺激PD-L3或VISTA和其天然结合伴侣之间在受试者的免疫细胞上的相互作用的试剂，以治疗将受益于免疫反应下调的病状。

[0171] 例如，用PD-L3或VISTA蛋白或缀合剂治疗的病状选自：肿瘤、病原性感染、炎症免疫反应或病状、优选地不太明显的炎症病状，或免疫抑制性疾病。特定实例包括多发性硬化症、甲状腺炎、类风湿性关节炎、II型和I型糖尿病以及晚期和早期形式的癌症，包括转移性癌症，如结肠直肠癌、膀胱癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌，以及VISTA抑制有效的抗肿瘤反应的其它癌症。在某种情况下可以向个体施用表达编码抗VISTA抗体或VISTA融合蛋白的核酸的细胞或病毒载体。

[0172] 可使用根据本发明的PD-L3或VISTA蛋白、缀合剂或PD-L3或VISTA拮抗剂或激动剂治疗的示例性病状例如包括移植、过敏症、传染性疾病、癌症和炎症性或自体免疫性病症，例如炎症性免疫病症。前述病状的特定实例包括1型糖尿病、多发性硬化症、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、全身性红斑狼疮、风湿性疾病、过敏性病症、哮喘、过敏性鼻炎、皮肤病症、肠胃病症如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎、移植排斥反应、链球菌感染后和自体免疫性肾衰竭、败血性休克、全身性炎症反应综合征(SIRS)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)和毒液螫入;自体炎症疾病以及变性骨和关节疾病,包括骨关节炎、结晶性关节炎和囊炎以及其它关节病。此外,所述方法和组合物可用于治疗腱炎、韧带炎和创伤性关节损伤。

[0173] 在优选实施方案中,将主题PD-L3或VISTA蛋白、核酸和PD-L3或VISTA具有特异性的配体、优选地对PD-L3或VISTA功能具有所需作用的抗体用于治疗病状,如癌症、自体免疫性疾病、过敏症、炎症病症或感染以及更具体地免疫系统病症如重症综合性免疫缺陷、多发性硬化症、全身性红斑狼疮、I型糖尿病、淋巴组织增殖性综合征、炎症性肠病、过敏、哮喘、移植物抗宿主疾病,和移植排斥反应;对感染性病原体如细菌和病毒的免疫反应;以及免疫系统癌症如淋巴瘤和白血病。

[0174] 除上述感染剂和寄生剂以外,所需的对非感染物增强的免疫原性的另一领域是在异型增殖疾病领域,其包括但不限于癌症,其中从身体合意地消除了表达癌症抗原的细胞。可用于本发明的组合物和方法中的肿瘤抗原包括但不限于前列腺特异性抗原(PSA)、乳癌抗原、膀胱癌抗原、卵巢癌抗原、睾丸癌抗原、黑色素瘤抗原、结肠直肠癌抗原、端粒酶;多种药物抗性蛋白,如P-醣蛋白;MAGE-1、甲胎蛋白、癌胚抗原、突变体p53、乳头瘤病毒抗原、神经节苷脂或黑素瘤或其它肿瘤细胞的其它含碳水化合物含的组分。本发明预期来自任何类型肿瘤细胞的抗原都可用于本文所述的组合物和方法中。抗原可为癌细胞,或从癌细胞分离的免疫原性物质,如膜蛋白。包括生存素和端粒酶通用抗原以及癌症睾丸抗原的MAGE家族。已经显示牵涉于自体免疫并且可用于本发明的方法中以诱导耐受性的抗原包括但不限于多发性硬化症的髓磷脂碱性蛋白、髓磷脂少突细胞糖蛋白和蛋白脂质蛋白、以及类风湿性关节炎的CII胶原蛋白。

[0175] 定义

[0176] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语都具有与本发明所属普通技术人员通常所理解相同的含义。虽然与本文所述的那些类似或等效的方法和材料可用于本发明或本发明的测试,但是下文描述合适的方法和材料。材料、方法和实施例仅具有说明性并且并不旨在具有限制性。

[0177] 如本文说明书和遍及以下权利要求书中所用,除非上下文另外明显规定,否则“一个(种)”和“所述”包括复数个参考物。

[0178] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中特征典型地在于不受调控的细胞生长的生理状况。癌症的实例包括但不限于恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫恶性肿瘤、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌瘤和各种类型的头颈癌以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma;NHL);小淋巴细胞性(SL)NHL;中级/滤

泡NHL;中级弥漫性NHL;高级免疫母细胞NHL;高级淋巴母细胞NHL;高级小无核裂细胞NHL;肿块性疾病NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia));慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性淋巴母细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性骨髓母细胞白血病;多发性骨髓瘤和移植后淋巴细胞增殖性病症(PTLD)。

[0179] 依从本发明的治疗的示例性癌症包括但不限于恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴恶性疾病。此类癌症的更具体实例包括结肠直肠癌、膀胱癌、卵巢癌、黑素瘤、鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫恶性肿瘤、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌瘤和各种类型的头颈癌以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞性(SL)NHL;中级/滤泡NHL;中级弥漫性NHL;高级免疫母细胞NHL;高级淋巴母细胞NHL;高级小无核裂细胞NHL;肿块性疾病NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性淋巴母细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性骨髓母细胞白血病;和移植后淋巴细胞增殖性病症(PTLD),以及与瘢痣病相关的异常血管增殖、水肿(如与脑肿瘤相关的水肿)和梅格斯氏综合征(Meigs'syndrome)。优选地,癌症选自结肠直肠癌、乳癌、结肠直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西氏肉瘤(kaposi's sarcoma)、类癌瘤恶性肿瘤、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤。在一个示例性实施方案中,癌症是早期或晚期(包括转移性)膀胱癌、卵巢癌或黑素瘤。在另一实施方案中,癌症是结肠直肠癌。依从本发明的治疗的癌性病状包括转移性癌症,其中骨髓源性抑制细胞对VISTA的表达会抑制抗肿瘤反应和抗侵袭性免疫反应。本发明的方法特别适用于治疗血管化肿瘤。

[0180] 本发明还适用于与化学疗法或放射疗法或其它生物制剂组合治疗癌症并且适用于增强其活性,即在骨髓源性抑制细胞对VISTA的表达会抑制抗肿瘤反应和化学疗法或放射疗法的功效或生物剂功效的个体体内增强其活性。可根据本发明使用显示抗癌活性的任何化学治疗剂。优选地,化学治疗剂选自烷化剂、抗代谢物、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物及相关抑制剂、长春花生物碱、表鬼臼毒素、抗生素、L-天冬酰胺酶、拓扑异构酶抑制剂、干扰素、铂配位复合物、蒽二酮取代的脲、甲肼衍生物、肾上腺皮质抑制剂、肾上腺皮质激素、孕酮、雌激素、抗雌激素、雄激素、抗雄激素和促性腺素释放激素类似物。更优选地,化学治疗剂选自5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸(LV)、伊立替康(irenotecan)、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡培他滨(capecitabine)、紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛(doxetaxel)。两种以上化学治疗剂可以与抗VEGF抗体的施用组合施用的混合物形式使用。一种优选的组合化学疗法基于氟尿嘧啶,其包含5-FU和一种或多种其它化学治疗剂。在本领域中已知组合化学疗法的合适给药方案并且将其描述于例如Saltz等,(1999)Proc ASCO 18:233a和Douillard等,(2000)Lancet355:1041-7。生物剂可为另一免疫增效剂,如以下各物的抗体:PD-L1、PD-L2、CTLA-4和PD-L1、PD-L2、CTLA-4融合蛋白以及细胞因子、生长因子拮抗剂和激动剂、激素和抗细胞因子抗体。

[0181] 如本文所用,术语"活化受体"泛指结合抗原、复合抗原(例如在MHC分子的背景

下)、Ig-融合蛋白、配体或抗体的免疫细胞受体。活化受体但不限于T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)、细胞因子受体、LPS受体、补体受体和Fc受体。例如,T细胞受体存在于T细胞上并且与CD3分子缔合。T细胞受体在MHC分子的情形下受抗原的刺激(以及受多克隆T细胞活化试剂的刺激)。通过TCR发生的T细胞活化导致许多变化,例如蛋白磷酸化、膜脂质变化、离子流、环核苷酸改变、RNA转录变化、蛋白合成变化以及细胞容积变化。例如,T细胞受体存在于T细胞上并且与CD3分子缔合。T细胞受体在MHC分子的情形下受抗原的刺激(以及受多克隆T细胞活化试剂的刺激)。通过TCR发生的T细胞活化导致许多变化,例如蛋白磷酸化、膜脂质变化、离子流、环核苷酸改变、RNA转录变化、蛋白合成变化以及细胞容积变化。

[0182] 如本文所用,“抗原呈递细胞”泛指专职性抗原呈递细胞(如B淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞和兰格罕氏细胞(Langerhans cell))以及其它抗原呈递细胞(如角质细胞、内皮细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞和少突细胞)。

[0183] 如本文所用,“氨基酸”泛指天然存在的氨基酸和合成氨基酸,以及氨基酸类似物和氨基酸模拟物,其以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及随后被修饰的那些氨基酸(例如羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸)。氨基酸类似物是指基本化学结构与天然存在的氨基酸相同(即,碳结合于氢、羧基、氨基)并且具有R基团(例如高丝氨酸、正白氨酸、蛋氨酸亚砜、蛋氨酸甲基锍)的化合物。类似物可以具有的修饰的R基团(例如正白氨酸)或修饰的肽主链,但是保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指结构不同于氨基酸的一般化学结构,但仍以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化合物。

[0184] 如本文所用,术语“无变应性”或“耐受性”泛指对活化受体介导的刺激的折射性。折射性通常为抗原特异性的,并在停止暴露于耐受抗原后仍然存在。例如,T细胞中的无变应性(与无响应性相对)的特征在于缺乏细胞因子的产生,如IL-2。在T细胞暴露于抗原并在不存在第二信号(共同刺激信号)下收到第一信号(T细胞受体或CD-3介导的信号)时发生T细胞无变应性。在这些条件下,再次将细胞暴露于相同的抗原(即便在存在共同刺激分子的情况下发生再次暴露)将导致不能产生细胞因子,并因此不能增殖。然而,无变应性T细胞可对不相关抗原发生反应,并且在用细胞因子(如IL-2)培养时可增殖。例如,T细胞无变应性也可通过T淋巴细胞缺乏IL-2的产生而观测到,如通过ELISA或通过使用指示细胞系进行增殖分析来测量。或者,可使用报告基因构建体。例如,无变应性T细胞不能引发由异源启动子在5’IL-2基因增强子控制下或通过可见于增强子内的AP1序列的多聚体诱导的IL-2基因转录(Kang等,(1992)Science 257:1134)。共同刺激信号的调节导致免疫细胞效应功能的调节。因此,术语“PD-L3或VISTA活性”包括PD-L3或VISTA多肽结合其天然结合伴侣的能力、调节免疫细胞共同刺激性或抑制性信号的能力以及调节免疫反应的能力。免疫细胞中抑制信号的调节导致免疫细胞增殖和/或免疫细胞分泌细胞因子受到调节。

[0185] 如本文所用,术语“抗体”泛指抗体的“抗原结合部分”(还可与“抗体部分”、“抗原结合片段”、“抗体片段”互换使用)以及整个抗体分子。如本文所用,术语“抗原结合部分”是指保留特异性结合于抗原(例如VISTA(PD-L3))的能力的抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合部分”所涵盖的抗原结合片段的实例包括包括:(a)Fab片段,其为由VL、VH、CL和CH1域组成的单价片段;(b)F(ab’)2片段,其为包含由铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(c)由VH和CH1域组成的Fd

片段;(d)由抗体的单臂的VL和VH域组成的Fv片段;(e)dAb片段(Ward等,(1989)Nature 341:544-546),其由VH域组成;以及(f)分离的互补决定区(CDR)。此外,虽然Fv片段的两个域VL和VH由单独的基因编码,但是它们可通过合成连接子使用重组方法而接合,所述合成连接子使得它们能够被制备成单条蛋白链,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv))。参见例如Bird等,(1988)Science 242:423-426;Huston等,(1988)Proc Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;和Osbourn等,(1998)Nat.Biotechnol.16:778。单链抗体也旨在涵盖在术语抗体的"抗原结合部分"的范围内。特定scFv的任何VH和VL序列都可连接到人免疫球蛋白恒定区cDNA或基因组序列,以产生编码完整IgG分子或其它同种型的表达载体。VH和Vl也可使用蛋白质化学或重组DNA技术用于产生Fab、Fv或免疫球蛋白的其它片段。其它形式的单链抗体,如双链抗体也涵盖在内。双链抗体是二价双特异性抗体,其中VH和VL域在单条多肽链上表达,但使用太短而不能在同一链上的两个域之间配对的连接子,从而迫使所述域与另一条链的互补域配对并产生两个抗原结合位点。参见例如Holliger等,(1993)Proc Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak等,(1994)Structure 2:1121-1123。

[0186] 更进一步地,抗体或其抗原结合部分(抗原结合片段、抗体片段、抗体部分)可以是通过抗体或抗体部分与一种或多种其它蛋白质或肽的共价或非共价缔合而形成的较大免疫粘附分子的一部分。免疫粘附分子的实例包括使用链霉亲和素核心区制备四聚scFv分子(Kipriyanov等,(1995)Hum.Antibodies Hybridomas 6:93-101)以及使用半胱氨酸残基、标记肽和C端多组氨酸标签制备二价和生物素化scFv分子。Kipriyanov等,(1994)Mol Immunol.31:1047-1058。抗体部分如Fab和F(ab')2片段可由整个抗体使用常规技术(如分别通过整个抗体的木瓜酶或胃蛋白酶消化)制备。此外,抗体、抗体部分和免疫粘附分子可使用标准重组DNA技术获得,如本文所述。

[0187] 抗体可以是多克隆的、单克隆的、异种的、同种异体的的或同基因的,或其修饰形式,例如人源化的、嵌合的。优选地,本发明的抗体特异性结合或基本上特异性结合于VISTA(PD-L3)分子。如本文所用,术语"单克隆抗体"和"单克隆抗体组合物"是指这样一群抗体分子,其仅含有一种能够与抗原的特定抗原表位免疫反应的抗原结合位点的物质,而术语"多克隆抗体"和"多克隆抗体组合物"是指这样一群抗体分子,其含有有多种能够与特定抗原相互作用的抗原结合位点的物质。单克隆抗体组合物典型地显示出对与其发生免疫反应的特定抗原的单一结合亲和力。

[0188] 如本文所用,"抗原"泛指能够由抗体结合的分子或分子的一部分,其另外能够诱导动物产生能够结合于所述抗原的抗原表位的抗体。抗原可以具有一个抗原表位或具有的一个以上抗原表位。在本文中提及的特异性反应表示抗原将以高度选择性方式与其相应抗体而非与众多可能由其它抗原激发的其它抗体反应。在对特定相关抗原有所需增强的免疫反应的情况下,抗原包括但不限于传染性疾病抗原,针对其可引发保护性免疫反应。

[0189] 如本文所用,"过敏性疾病"泛指涉及过敏反应的疾病。更具体地,将"过敏性疾病"定义为一种鉴别出过敏原的疾病,其中在暴露于过敏原和病理变化发作之间有强相关性,并且其中已经证明所述病理变化具有免疫学机制。在本文中,免疫学机制意指白血球显示对过敏原刺激的免疫反应。

[0190] 如本文所用,"反义核酸分子"泛指与编码蛋白质的"有义"核酸互补(例如与双链

cDNA分子的编码链互补)、与mRNA序列互补或与基因的编码链互补的核苷酸序列。因此,反义核酸分子可通过氢键结合于有义核酸分子。

[0191] 如本文所用,“哮喘”泛指特征在于炎症、气管变窄和气管对吸入试剂的反应性提高的呼吸系统病症。哮喘经常但不是仅仅与特应性或过敏性症状相关。

[0192] 如本文所用,“凋亡”泛指程序化细胞死亡,其可使用在本领域中已知的技术表征。凋亡性细胞死亡的特征可在于在细胞分裂中以细胞收缩、膜起泡和染色质凝聚告终。正经历凋亡的细胞还显示核小体间DNA裂解的特征模式。

[0193] 如本文所用,“自体免疫”或“自体免疫疾病或病状”泛指由个体自体组织引起或针对个体自体组织而产生的疾病或病症,或其共分离(co-segregate)或表现、或由其产生的病状。

[0194] 如本文所用,术语“B细胞受体(BCR)”泛指见于B细胞上的在膜Ig(mIg)与其它跨膜多肽(例如Igα和Igβ)之间的复合物。mIg的信号转导功能由受体分子通过低聚抗原或多聚抗原交联触发。B细胞也可通过抗免疫球蛋白抗体活化。在BCR活化时,在B细胞中将发生许多变化,包括酪氨酸磷酸化。

[0195] 如本文所用,术语“癌症”泛指特征在于细胞分裂异常并不受控制从而导致恶性生长或肿瘤(例如细胞生长不受调控)的任何赘生性疾病(只要具有侵袭性或转移性)。

[0196] 如本文所用,“嵌合抗体”泛指一种抗体分子,其中恒定区或其部分被改变、置换或更换以使抗原结合位点(可变区)连接于不同或改变的类别、效应功能和/或物种的恒定区,或赋予嵌合抗体以新性质的完全不同的分子,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物,可变区或其部分用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、置换或更换。

[0197] 如本文所用,术语“编码区”泛指包含翻译成氨基酸残基的密码子的核苷酸序列区,而术语“非编码区”是指不翻译成氨基酸的核苷酸序列区(例如,5’和3’非翻译区)。

[0198] 如本文所用,“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者,并且关于特定核酸序列,泛指保守修饰的变体,是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸,或者其中核酸不编码基本上同一的序列的氨基酸序列。因为遗传密码的简并性,所以大量功能上相同的核酸编码任何给定蛋白质。“沉默变异”是一种保守修饰的核酸变异。在本文中编码多肽的每一核酸序列都还描述核酸的每一可能的沉默变异。普通技术人员将认识到,可以修饰核酸中的每一密码子(除通常作为蛋氨酸的唯一密码子的AUG以及通常作为色氨酸的唯一密码子的TGG以外)以得到功能上相同的分子。

[0199] 如本文所用,“互补决定区”、“高变区”或“CDR”泛指见于抗体轻链或重链可变区的高变或互补决定区(CDR)中的一个或多个。参见Kabat等,(1987)“Sequences of Proteins of Immunological Interest”National Institutes of Health,Bethesda,MD。这些表述包括如由Kabat等,(1983)“Sequences of Proteins of Immunological Interest”U.S.Dept.of Health and Human Services定义的超突变区,或抗体3维结构中的高变环。Chothia和Lesk(1987)J Mol.Biol.196:901-917。每条链中的CDR都保持在构架区的邻近处,并且在其它链的CDR的存在下有助于形成抗原结合位点。在CDR内,有已经描述的所选氨基酸作为选择性决定区(SDR),其呈现在抗体-抗原相互作用中为CDR所用的重要接触残基。Kashmiri(2005)Methods 36:25-34。

[0200] 如本文所用,“对照量”泛指可具有任何量或在一定量范围内以与标记的测试量进

行比较的标记。例如，标记的对照量可为标记在患有特定疾病或病状的患者或没有这种疾病或病状的人的体内的量。对照量可为绝对量(例如微克/毫升)或者相对量(例如相对信号强度)。

[0201] 如本文所用，术语“共同刺激受体”泛指将共同刺激信号发送给免疫细胞的受体，如CD28或ICOS。如本文所用，术语“抑制性受体”包括将负信号传递给免疫细胞的受体。

[0202] 如本文所用，“共同刺激”泛指共同刺激分子提供第二、非活化性、受体介导性信号(“共同刺激信号”)的能力，所述信号诱导增殖或效应功能。例如，共同刺激信号可引起细胞因子分泌(例如在收到了T细胞-受体介导性信号的T细胞中)。已经收到细胞受体介导性信号(例如通过活化性受体)的免疫细胞在本文中可称为“活化的免疫细胞”。

[0203] 如本文所用，“胞浆域”泛指延伸至细胞的细胞质中的蛋白质部分。

[0204] 如本文所用，“诊断”泛指鉴别病理状况的存在或性质。诊断方法的敏感性和特殊性不同。诊断分析的“敏感性”是测试阳性的患病个体的百分比(“真阳性”的百分比)。分析未检出的患病个体是“错误阴性”。将没有患病和在分析中测试阴性的受试者称为“真阴性”。诊断分析的“特殊性”是1减去错误阳性率，其中将“错误阳性”率定义为没有疾病而测试为阳性的受试者的比例。虽然特定的诊断方法可能不提供对病状的明确诊断，但是如果所述方法提供帮助诊断的阳性指示，那么也就够了。

[0205] 如本文所用，“诊断”泛指对疾病或症状分类、确定疾病严重度、监测疾病进展、预测疾病后果和/或痊愈希望。术语“检测”也可以任选地涵盖任一前述内容。在一些实施方案中，可如下实现根据本发明来诊断疾病：测定在获自受试者的生物样本中的本发明的多核苷酸或多肽水平，其中测定水平可与疾病倾向或存在或不存在所述疾病相关。应注意，“获自受试者的生物样本”也可以任选地包含还没有从受试者物理移出的样本。

[0206] 如本文所用，“有效量”泛指化合物、抗体、抗原或细胞当施用于患者以治疗疾病时足以对疾病实现这种治疗的量。有效量可为用于有效防治的量和/或用于有效预防的量。有效量可为有效减轻体征/症状的量、有效预防体征/症状出现、减小体征/症状出现的严重度、消除体征/症状出现、减缓体征/症状出现的发展、预防体征/症状出现的发展和/或实现体征/症状出现的防治的量。“有效量”可根据待治疗患者的疾病和其严重度以及年龄、体重、病史、易感性和预先存在的病状而变化。为了本发明的目的，术语“有效量”与“治疗有效量”是同义词。

[0207] 如本文所用，“细胞外域”泛指从细胞表面延伸出的蛋白质部分。

[0208] 如本文所用，“表达载体”泛指用于在任何细胞(包括原核、酵母、真菌、植物、昆虫或哺乳动物细胞)中在体外或体内组成性或诱导式表达本发明的核酸序列的目的的任何重组型表达系统。所述术语包括线性或圆形表达系统。所述术语包括在宿主细胞基因组中保持游离式或整体式的表达系统。表达系统可具有自我复制的能力或不具有该能力，即仅驱动在细胞中的短暂表达。所述术语包括重组表达盒，所述重组表达盒仅含有转录重组型核酸所需的最小元件。

[0209] 如本文所用，“家族”泛指本发明的多肽和核酸分子，其旨在意指具有常见基序结构域并且具有足够氨基酸或核苷酸序列同源性(如本文所定义)的两种或两种以上多肽或核酸分子。家族成员可为天然或非天然存在的并且可来自相同或不同的物种。例如，家族可含有人源以及其它来源的第一多肽、人源的不同多肽，可含有非人源的同系物(例如猴多

肽)。家族成员也可以具有常见的功能特征。

[0210] 如本文所用,“Fc受体”(FcR)泛指免疫球蛋白分子(Ig)的Fc部分的细胞表面受体。Fc受体见于许多参与免疫反应的细胞。在迄今为止已经鉴别的人FcR中,有识别IgG(名为FcγR)、IgE(FcεR1)、IgA(FcαR)和聚合IgM/A(FcμαR)的那些。FcR见于以下细胞类型中:FcεRI(肥大细胞)、FcεRII(许多白血球)、FcαR(嗜中性粒细胞)和FcμαR(腺上皮、肝细胞)。Hogg(1988)Immunol.Today 9:185-86。广泛研究的FcγR为细胞免疫防御中的核心,并且负责刺激自体免疫疾病发病机制中涉及的炎症和水解酶的介体的释放。Unkeless(1988)Annu.Rev.Immunol.6:251-87。FcγR在效应细胞和分泌Ig的淋巴细胞之间提供重要联系,因为巨噬细胞/单核细胞、多形核白血球和自然杀手(NK)细胞FcγR赋予由IgG介导的特异性识别的元件。人白细胞具有IgG的至少三个不同的受体:hFcγRI(见于单核细胞/巨噬细胞上)、hFcγRII(见于单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、可能有B细胞和K562细胞系上)以及FcγIII(见于NK细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞上)。

[0211] 关于T细胞,共同刺激信号向T细胞的发送涉及不受环孢菌素A抑制的信号通路。另外,共同刺激信号可在T细胞中诱导细胞因子分泌(例如IL-2和/或IL-10)和/或可在T细胞中防止诱导对抗原的无响应性、诱导无变应性或诱导细胞死亡。

[0212] 如本文所用,“构架区”或“FR”泛指在抗体轻链和重链的可变区内的构架区中的一个或多个。参见Kabat等,(1987)“Sequences of Proteins of Immunological Interest”National Institutes of Health,Bethesda,MD。这些表达包括插入抗体轻链和重链的可变区内的CDR之间的那些氨基酸序列区。

[0213] 如本文所用,“异源”泛指核酸的部分,其表明所述核酸包含两个或两个以上本质上相互未以相同关系所见的子序列。例如,典型地重组产生核酸,使其具有两个或两个以上来自不相关基因、安排以产生新功能核酸的序列(例如启动子来自一个来源并且编码区来自另一来源)。类似地,异源蛋白质表明蛋白质包含两个或两个以上本质上相互未以相同关系所见的子序列(例如融合蛋白)。

[0214] 如本文所用,“高亲和力”泛指抗体对目标抗原的KD为至少10^{-8}M、更优选地至少10^{-9}M并且甚至更优选地至少10^{-10}M。然而,“高亲和力”结合可针对其它抗体同种型而变化。例如,对IgM同种型的“高亲和力”结合是指抗体的KD为至少10^{-7}M,更优选地至少10^{-8}M。

[0215] 如本文所用,“同源性”泛指在核酸序列与参考核酸序列之间或在多肽序列与参考多肽序列之间的相似度。同源性可为部分的或整个的。整个的同源性表示核酸或氨基酸序列是相同的。部分同系的核酸或氨基酸序列是与参考核酸或氨基酸序列不相同的核酸或氨基酸序列。同源性程度可通过序列比较来确定。术语“序列同一性”可与“同源性”互换使用。

[0216] 如本文所用,术语“宿主细胞”泛指已引入了本发明的核酸分子,如本发明的重组表达载体的细胞。宿主细胞可为原核细胞(例如大肠杆菌),或真核细胞如酵母、昆虫(例如SF9)、两栖动物或哺乳动物细胞如CHO、HeLa、HEK-293,例如培养细胞、外植体和体内细胞。术语“宿主细胞”和“重组型宿主细胞”可在本文中互换使用。应了解,这些术语不仅是指特定受试者细胞,而且是指这种细胞之子代或可能的子代。因为后代中可能因突变或环境影响而出现某些修改,所以子代实际上可能不与亲本细胞相同,但是仍包括在如本文所用的术语的范围内。

[0217] 如本文所用,“人源化抗体”泛指包括通过具有可变区和恒定区的非人细胞产生的

抗体，所述可变区和恒定区已发生改变从而与将通过人细胞产生的抗体更加密切相似。例如，通过改变非人抗体氨基酸序列以引入见于人种系免疫球蛋白序列中的氨基酸。本发明的人源化抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变)，例如在CDR中。如本文所用，术语“人源化抗体”还包括这样的抗体，其中已将来源于另一种哺乳动物物种(如小鼠)种系的CDR序列移植到人构架序列上。

[0218] 如本文所用，“杂交”泛指互补性(包括部分互补性)多核苷酸链当各链相互反平行排列时通过在互补性核苷酸之间形成氢键而产生的物理相互作用。

[0219] 如本文所用，“IgV域”和“IgC域”泛指Ig超家族成员域。这些域对应于具有不同折叠模式(称为Ig折叠)的结构单元。Ig折叠包含两个β折叠的夹心结构，每个折叠包含5-10个氨基酸的反平行β链与大多数但非全部域中的两个折叠之间的保守二硫键。Ig、TCR和MHC分子的IgC域共有相同类型的序列模式并称为Ig超家族内的C1组。其它IgC域落在其它组内。IgV域也共有序列模式并称为V组域。IgV域长于C域并形成另外一对β链。

[0220] 如本文所用，术语“免疫细胞”泛指具有造血来源并在免疫反应中起作用的细胞。免疫细胞包含淋巴细胞，如B细胞和T细胞；自然杀手细胞；以及骨髓细胞，如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0221] 如本文所用，“免疫分析”泛指使用抗体以特异性结合抗原的分析。免疫分析的特征可在于使用特定抗体的特异性结合性质以分离、靶向和/或定量抗原。

[0222] 如本文所用，“免疫反应”泛指T细胞介导性和/或B细胞介导性免疫反应，其受T细胞共同刺激的调节的影响。示例性免疫反应包括B细胞反应(例如抗体产生)、T细胞反应(例如细胞因子产生，以及细胞毒性)和细胞因子反应性细胞例如巨噬细胞的活化。如本文所用，关于免疫反应的术语“下调”包括任何一种或多种免疫反应的降低，而关于免疫反应的术语“上调”则包括任何一种或多种免疫反应的提高。应了解，一种类型的免疫反应的上调可导致另一类型的免疫反应的相应下调。例如，产生某些细胞因子(例如IL-10)的上调可导致细胞免疫反应的下调。

[0223] “感染物”在本文中是指感染哺乳动物细胞、优选地人细胞并且导致疾病状况的任何病原体或物质。其实例包括细菌、酵母、真菌、原生动物、支原体、病毒、朊病毒和寄生虫。这些感染物的实例包括例如牵涉于以下的那些：(a)病毒性疾病，如由以下感染引起的疾病：腺病毒、疱疹病毒(例如HSV-I、HSV-II、CMV或VZV)、痘病毒(例如正痘病毒属，如天花或牛痘，或者触染性软疣)、小核糖核酸病毒(例如鼻病毒或者肠病毒)、正粘病毒(例如流感病毒)、副粘病毒(例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒和呼吸道融合性病毒(RSV))、冠状病毒(例如SARS)、乳多空病毒(例如乳头瘤病毒，如导致生殖疣、寻常疣或足底疣的那些)、嗜肝DNA病毒(例如乙型肝炎病毒)、黄病毒(例如丙型肝炎病毒或登革热病毒)或逆转录病毒(例如慢病毒，如HIV)；(b)细菌性疾病，如由以下细菌感染引起的疾病：例如埃希氏菌属(Escherichia)、肠杆菌属(Enterobacter)、沙门杆菌属(Salmonella)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、志贺氏菌属(Shigella)、利斯特菌属(Listeria)、气杆菌属(Aerobacter)、螺杆菌属(Helicobacter)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、链球菌属(Streptococcus)、衣原体属(Chlamydia)、支原体属(Mycoplasma)、肺炎球菌属(Pneumococcus)、奈瑟菌属

(Neisseria)、梭菌属(Clostridium)、芽孢杆菌属(Bacillus)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、分枝杆菌属(Mycobacterium)、曲杆菌属(Campylobacter)、弧菌属(Vibrio)、沙雷氏菌属(Serratia)、普罗威登斯菌属(Providencia)、色杆菌属(Chromobacterium)、布氏杆菌属(Brucella)、耶尔森菌属(Yersinia)、嗜血杆菌属(Haemophilus)或鲍特氏菌属(Bordetella)；(c)其它感染性疾病，如衣原体病；真菌病，其包括但不限于念珠菌病、曲霉病、组织胞浆菌病、隐球菌性脑膜炎；寄生虫病，其包括但不限于疟疾、卡氏肺孢子虫肺炎(pneumocystis carnii pneumonia)、利什曼病(leishmaniasis)、隐孢子虫病、弓浆虫病和锥体虫感染，以及导致以下的朊病毒：人疾病如克-雅氏病(Creutzfeldt-Jakob Disease；CJD)、变体克-雅氏病(vCJD)、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克综合征(Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome)、致命性家族性失眠症(Fatal Familial Insomnia)和库鲁病(kuru)。

[0224] “感染物抗原”在本文中意指化合物，例如肽、多肽、糖肽、糖蛋白等，或缀合物、片段或变体，所述化合物由特异性感染物表达并且所述抗原可用以引发特异性免疫反应，例如针对感染物如病毒的抗体或细胞介导性免疫反应。典型地，抗原将包含一个部分，例如在病毒或其它感染物的表面上表达的多肽或糖蛋白，如衣壳蛋白或其它膜蛋白。

[0225] 如本文所用，“炎症病状或炎症疾病”泛指慢性或急性的炎症疾病。

[0226] 如本文所用，术语“抑制信号”泛指通过免疫细胞上的抑制性受体分子发送的信号。信号通过活化性受体(例如通过TCR、CD3、BCR或Fc分子)拮抗信号并可导致例如以下方面的抑制：第二信使产生；增殖；或免疫细胞中的效应功能，例如减小吞噬作用、减少抗体产生或降低细胞毒性，或使免疫细胞无法产生介体(例如细胞因子(如IL-2)和/或变应性反应介体)；或产生无变应性。

[0227] 如本文所用，“分离的”泛指物质从其天然存在的原始环境移出，因此从其天然环境经人手而改变。分离的物质可为例如载体系统中包括的外源性核酸、宿主细胞内所含的外源性核酸，或已经从其原始环境移出并因此经人手而改变的任何物质(例如“分离的抗体”)。例如，如本文所用，“分离的”或“纯化的”泛指蛋白质、DNA、抗体、RNA或其生物活性部分，其基本上不含生物物质所来源的细胞或组织来源中的细胞物质或其它污染性蛋白质，或当通过化学方法合成时基本上不含化学前体或其它化学物质。用语“基本上不含细胞物质”包括以下VISTA(PD-L3)蛋白制剂：其中蛋白质与其从中分离的细胞的细胞组分分离或重组产生。

[0228] 如本文所用，“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如，特异性结合PD-L3或VISTA的分离的抗体基本上不含与除PD-L3或VISTA以外的抗原特异性结合的抗体)。此外，分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学物质。

[0229] 如本文所用，“K-assoc”或“Ka”泛指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率，而如本文所用，术语“Kdiss”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用，术语“KD”意指解离常数，其获自Kd与Ka的比率(即Kd/Ka)并且表示为摩尔浓度(M)。可使用本领域中公认的方法测定抗体的KD值。

[0230] 如本文所用，“标记”或“可检测部分”泛指可通过分光、光化学、生化、免疫化学、化学或其它物理手段检测的组成。

[0231] 如本文所用，“低严格度”、“中等严格度”、“高严格度”或“极高严格度条件”泛指核

酸杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指导可见于Ausubel等,(2002)Short Protocols in Molecular Biology(第5版)John Wiley&Sons,NY。示例性特异性杂交条件包括但不限于:(1)低严格度杂交条件:在6×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中在约45℃下,接着在0.2×SSC、0.1%SDS中至少在50℃下洗涤二次(对于低严格度条件,洗涤温度可提高至55℃);(2)中等严格度杂交条件:在6×SSC中在约45℃下,接着在0.2×SSC、0.1%SDS中在60℃下洗涤一次或多次;(3)高严格度杂交条件:在6×SSC中在约45℃下,接着在0.2×SSC、0.1%SDS中在65℃下洗涤一次或多次;以及(4)极高严格度杂交条件:0.5M磷酸钠、7%SDS,在65℃下,接着在0.2×SSC、1%SDS中在65℃下洗涤一次或多次。

[0232] 如本文所用,"哺乳动物"泛指哺乳纲的任何及所有温血脊椎动物(包括人),其特征在于皮肤上覆有毛发,并且雌性有滋养幼儿的产乳乳腺。哺乳动物的实例包括但不限于羊驼、犰狳、水豚、猫、骆驼、黑猩猩、灰鼠、牛、狗、山羊、大猩猩、仓鼠、马、人、狐猴、美洲驼、小鼠、非人灵长类动物、猪、大鼠、绵羊、鼩鼱、松鼠、貘和田鼠。哺乳动物包括但不限于牛科动物、犬科动物、马科动物、猫科动物、鼠科动物、绵羊(bovine)、猪科动物、灵长类动物和啮齿动物物种。哺乳动物还包括任何及所有由华盛顿哥伦比亚特区国家自然历史博物馆史密森学会(National Museum of Natural History,Smithsonian Institution in Washington DC)列在世界哺乳动物物种(Mammal Species of the World)上的那些动物。

[0233] 如本文所用,"天然存在的核酸分子"泛指具有存在于自然界中的核苷酸序列的RNA或DNA分子(例如编码天然蛋白质)。

[0234] 如本文所用,"核酸"或"核酸序列"泛指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸寡核苷酸。所述术语涵盖核酸,即寡核苷酸,其含有天然核苷酸的已知类似物。所述术语还涵盖含合成主链的核酸样结构。除非另有规定,否则特定核酸序列还含蓄地涵盖其保守修饰的变体(例如简并密码子取代)和互补序列,以及明确指示的序列。术语核酸为可与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸和多核苷酸互换使用。

[0235] 如本文所用,"寡聚化域"泛指当连接于VISTA细胞外域或其片段时有助于寡聚化的域。所述寡聚化域包含自缔合α-螺旋,例如亮氨酸拉链结构,其可通过另外的二硫键进一步稳定。将所述域设计为与跨膜的矢量折叠(vectorial folding)相容,这一过程被认为有助于多肽体内折叠成功能性结合蛋白。其实例在本领域中是已知的,并且包括例如卷曲GCN4和COMP。

[0236] α-螺旋型卷曲螺旋可能是见于蛋白中的最广泛的亚单元寡聚化。因此,卷曲螺旋发挥许多不同的功能。在转录活化子的几个家族中,例如,短亮氨酸拉链结构在DNA上定位DNA结合区中发挥着重要作用。Ellenberger等,(1992)Cell 71:1223-1237。卷曲螺旋还用于形成中间丝蛋白的寡聚物。卷曲螺旋蛋白此外似乎还在囊泡和病毒膜融合中都发挥着重要作用。Skehel和Wiley(1998)Cell 95:871-874。在两种情况中,嵌入待融合的膜中的疏水序列位于由一束长α螺旋组成的杆状复合体的同一端。这种分子排列据信会在组装复合体以进行膜融合时导致亲密的膜并列。经常将卷曲螺旋用于控制寡聚化。其见于许多类型的蛋白中,包括转录因子,包括但不限于GCN4、病毒融合肽、SNARE复合体以及某些tRNA合成酶等等。极长的卷曲螺旋见于蛋白质如原肌球蛋白、中间丝蛋白和纺锤极体组分中。卷曲螺旋涉及许多α-螺旋,它们围绕彼此以高度组织化形式(以平行或反平行取向缔合)形成超螺旋。但二聚体和三聚体是最常见的。螺旋可以来自相同的或来自不同的蛋白质。卷曲螺旋由

汇合在一起以埋藏它们的疏水缝的组分螺旋形成。由于疏水缝围绕每个螺旋扭曲，因此螺旋也绕彼此扭曲成圈，从而埋藏疏水缝并形成超螺旋。它是相邻螺旋之间侧链的特征性交错接合，称为结节入洞堆积(knobs-into-holes packing)，其将结构限定为卷曲螺旋。对于发生这种类型的相互作用，螺旋不必以相同的方向行进，但平行构象较常见。反平行构象在三聚体中非常罕见，在五聚体中未知，但在分子内二聚体中较常见，其中两个螺旋通常通过短环连接。在细胞外间隙中，异源三聚卷曲螺旋蛋白层粘蛋白在基底膜的形成中起着重要作用。其它实例为血小板反应素和软骨寡聚基质蛋白(COMP)，其中连接了三条(血小板反应蛋白1和2)或五条(血小板反应蛋白3、4和COMP)链。所述分子具有花束样外观，并且其寡聚结构的原因可能是C端域与细胞受体的多价相互作用。酵母转录活化因子GCN4是超过30种已鉴别的含碱性区亮氨酸拉链结构(bZIP)DNA结合基序的真核蛋白中的1种。Ellenberger等，(1992)Cell71:1223-1237。bZIP二聚体是一对连续的α螺旋，其在其羧基末端34个残基上方形成平行的卷曲螺旋并朝其氨基末端逐渐分开以通过DNA结合位点的大沟。卷曲螺旋二聚化接口几乎垂直于DNA轴线取向，从而使复合体具有字母T外观。bZIP含有疏水非极性残基的4-3七肽重复区域，这些残基以平行的α螺旋型卷曲螺旋堆叠在一起。Ellenberger等，(1992)Cell 71:1223-1237。二聚体的稳定性由以下方面产生：亮氨酸以及七肽重复区域a和d位的非极性残基的并列型堆积(side-by-side packing)以及有限数量的螺旋内和螺旋间盐桥，如在GCN4亮氨酸拉链肽的晶体结构中所示。Ellenberger等，(1992)Cell 71:1223-1237。另一实例为从牛气管软骨中作为Mr 52,000亚单位的同源三聚体而分离的CMP(母系蛋白-1)(Paulsson和Heinegard(1981)Biochem J.197:367-375)，其中每个亚单位由vWFA1模块、单个EGF域、vWFA2模块以及跨五个七肽的卷曲螺旋域组成。Kiss等，(1989)J.Biol.Chem.264:8126-8134；Hauser和Paulsson(1994)J.Biol.Chem.269:25747-25753。经过纯化的CMP的电子显微镜分析显示出花束样三聚体结构，其中每个亚单位形成从对应于卷曲螺旋的公共点显露出来的椭圆体。Hauser和Paulsson(1994)J.Biol.Chem.269:25747-25753。母系蛋白-1中的卷曲螺旋域已得到了广泛的研究。三聚体结构在非变性条件下完全还原链间二硫键后得以保留。Hauser和Paulsson(1994)J.Biol.Chem.269:25747-25753。又一个实例为软骨寡聚基质蛋白(COMP)。非胶原性糖蛋白COMP最初在软骨中鉴别出。Hedbom等，(1992)J.Biol.Chem.267:6132-6136。所述蛋白为524kDa的五个亚单位的同源五聚体，其由N端七肽重复区(cc)接着四个表皮生长因子(EGF)样域(EF)、七个钙结合域(T3)和C端球状域(TC)组成。根据这种域组织化，COMP属于血小板反应蛋白家族。在位置a和d具有优先疏水性残基的七肽重复区$(abcdefg)_n$形成螺旋型卷曲螺旋域。Cohen和Parry(1994)Science 263:488-489。最近，将COMP的重组型五链卷曲螺旋域(COMPcc)结晶，并以0.2nm的分辨率对其结构进行了解析。Malashkevich等，(1996)Science 274:761-765。

[0237] 如本文所用，“可操作地连接”泛指当两个DNA片段接合时使由两个DNA片段编码的氨基酸序列保持同框。

[0238] 如本文所用，“互补位(Paratope)”泛指识别抗原的抗体的部分(例如抗体的抗原结合位点)。互补位可为抗体Fv区的小区域(例如15-22个氨基酸)并且可以含有抗体重链和轻链的部分。参见Goldsby等，Antigens(Chapter3)Immunology(第5版)New York:W.H.Freeman and Company，第57-75页。

[0239] 如本文所用，“患者”泛指需要治疗以减轻疾病状态或预防疾病状态出现或复发的

任何动物。另外，如本文所用，“患者”泛指具有风险因素、疾病史、易感性、症状、体征、先前已诊断、处于疾病风险中或是疾病患者群体的成员的任何动物。患者可为临床患者，如人或兽医学患者，如伴侣动物、驯化动物、家畜动物、外来动物或动物园动物。术语“受试者”可与术语“患者”互换使用。

[0240] “多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用并且泛指氨基酸残基的聚合物。所述术语适用于以下氨基酸聚合物：其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的类似物或模拟物，以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。所述术语适用于以下氨基酸聚合物：其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人造化学模拟物，以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。可例如通过添加碳水化合物残基以形成糖蛋白来修饰多肽。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”包括糖蛋白以及非糖蛋白。

[0241] 如本文所用，“启动子”泛指引导核酸转录一系列核酸序列。如本文所用，启动子在起始转录位点附近包括必要核酸序列，如在聚合酶II型启动子的情况下是TATA元件。启动子还任选地包括远端增强子或抑制子元件，其可位于距离起始转录位点几千个碱基对之处。“组成性”启动子是在大多数环境和发育条件下具有活性的启动子。“诱导型”启动子是在环境或发育调控下具有活性的启动子。

[0242] 如本文所用，“防治上有效量”泛指化合物当施用于患者以防治疾病或预防疾病复发时足以对疾病实现这种疾病防治或复发的量。防治上有效量可为有效预防体征和/或症状出现的量。“防治上有效量”可根据待治疗患者的疾病和其严重度以及年龄、体重、病史、病状倾向性和先前存在的病状而变化。

[0243] 如本文所用，“防治”泛指疗程，其中体征和/或症状不存在于患者中、处于缓解中或先前存在于患者中。防治包括预防在治疗患者的疾病之后出现的疾病。此外，预防包括治疗可能会产生疾病的患者，尤其是对疾病易感的患者(例如，患者群体的成员、具有风险因素的那些，或处于产生疾病的风险中的那些)。

[0244] 如本文所用，“重组型”关于产品时例如泛指细胞或核酸、蛋白质或载体，其表示所述细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质或改变原生核酸或蛋白质而得到修饰，或所述细胞来源于如此修饰的细胞。因此，例如，重组型细胞表达细胞的原生(非重组型)形式中未见的基因，或者表达否则异常表达、表达不足或根本不表达的原生基因。

[0245] 如本文所用，“信号序列”或“信号肽”泛指如下肽：其含有约15个或更多个出现在分泌性和膜结合多肽的N端处的氨基酸并且含有大量的疏水性氨基酸残基。例如，信号序列含有至少约10-30个氨基酸残基、优选地约15-25个氨基酸残基、更优选地约18-20个氨基酸残基并且甚至更优选地约19个氨基酸残基，并且具有至少约35-65％、优选地约38-50％、更优选地约40-45％的疏水性氨基酸残基(如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸)。“信号序列”在本领域中也称为“信号肽”，其用以引导含有这种序列的多肽形成脂质双层，并在分泌性和膜结合多肽中裂解。

[0246] 如本文所用，“特异性(或者选择性)结合”于抗体或者“对...具有特异性(或者选择性)免疫活性”或者“与...特异性相互作用或者结合”泛指蛋白质或者肽(或其它抗原表位)，在一些实施方案中是指决定异源蛋白质群体中的蛋白质和其它生物制剂的存在的结合反应。例如，在规定的免疫分析条件下，指定的抗体结合于特定蛋白质，结合量要比背景(非特异性信号)大至少两倍，并且基本上不会与样本中存在的其它蛋白质大量结合。典型

地，特异性或选择性反应将为背景信号或噪音的至少两倍，并且较典型地，为背景的约10至100倍以上。

[0247] 如本文所用，“特异性可杂交的”和“互补的”泛指可通过传统的沃森-克里克(Watson-Crick)或者其它非传统类型与另一核酸序列形成氢键的核酸。核酸分子与其互补序列的结合自由能足以使核酸的有关功能得到发挥，例如RNAi活性。本领域熟知核酸分子的结合自由能的测定。参见例如Turner等，(1987)CSH Symp.Quant.Biol.LII:123-33；Frier等，(1986)PNAS 83:9373-77；Turner等，(1987)J.Am.Chem.Soc.109:3783-85。互补性百分比表示核酸分子中可与第二核酸序列形成氢键(例如沃森-克里克碱基配对)的邻近残基的百分比(例如，10个中约至少5、6、7、8、9、10个，即有约至少50％、60％、70％、80％、90％和100％的互补性(包括))。“完美互补性”或100％互补性泛指核酸序列的所有邻近残基都与第二核酸序列中相同数目的邻近残基氢键合。“基本互补性(Substantial complementarity)”是指排除选择为具有非互补性的多核苷酸链区域，如悬垂，多核苷酸链显示约至少90％的互补性。特异性结合需要足够程度的互补性以避免寡聚化合物与非目标序列在需要特异性结合的条件下，即在体内分析或治疗性治疗的情况下在生理条件下，或在体外分析的情况下、在进行分析的条件下发生非特异性结合。非目标序列典型地会相差至少5个核苷酸。

[0248] 如本文所用，疾病的“体征”泛指任何指示疾病、在检查患者后可发现的异常；与症状相反的客观的疾病指标，而症状是主观的疾病指标。

[0249] 如本文所用，“固体支撑物”、“支撑物”和“衬底”泛指提供固体或半固体结构的借此可连接另一材料的任何材料，其包括但不限于光滑支撑物(例如金属、玻璃、塑料、硅和陶瓷表面)以及织构化和多孔的材料。

[0250] 如本文所用，“受试者”泛指适于根据本发明进行治疗的任一个，包括但不限于鸟类和哺乳动物受试者，并且优选地为哺乳动物。需要根据本发明进行治疗的任何哺乳动物都是合适的。两种性别和在任何一个发育阶段(即新生儿、婴儿、幼儿、青少年、成年)的人受试者都可根据本发明进行治疗。也可以对动物受试者，特别是哺乳动物受试者如小鼠、大鼠、狗、猫、牛、山羊、绵羊和马实施本发明以用于兽医学目的，以及用于药物筛选和药物开发目的。“受试者”可与“患者”互换使用。

[0251] 如本文所用，“基本上不含化学前体或其它化学物质”泛指如下VISTA蛋白制剂：其中所述蛋白质与合成所述蛋白质中所涉及的化学前体或其它化学物质分离。在一个实施方案中，用语“基本上不含化学前体或其它化学物质”包括具有低于约30％(按干重计)化学前体或非VISTA化学物质、更优选地低于约20％化学前体或非VISTA化学物质、还更优选地低于约10％化学前体或非VISTA化学物质以及最优选地低于约5％化学前体或非VISTA(PD-L3)化学物质的VISTA蛋白制剂。

[0252] 如本文所用，“症状”泛指患者所经历并且指示疾病的任何病态的现象或偏离结构、功能或感觉的正常状态。

[0253] 如本文所用，“T细胞”泛指CD4+T细胞和CD8+T细胞。术语T细胞还包括T辅助1型T细胞和T辅助2型T细胞两者。

[0254] 如本文所用，“Treg细胞”(有时还称为抑制T细胞)是指T细胞亚群，其调节免疫系统并且维持对自体抗原的耐受性并且可消除自体免疫疾病。Foxp3+CD4+CD25+调控性T细胞

(Treg)在正常生理条件下维持周边耐受性方面,以及在癌症中抑制抗肿瘤免疫反应方面是重要的。

[0255] 如本文所用,“疗法”、“治疗性”或“治疗”泛指治疗疾病、停滞或减轻疾病或其临床症状的发展,和/或缓解疾病、使疾病或其临床症状消退。疗法涵盖防治、治疗、补救、减小、减轻和/或使得疾病、疾病的体征和/或症状减轻。疗法涵盖减轻有进行中疾病体征和/或症状(例如炎症、疼痛)的患者的体征和/或症状。疗法还涵盖“防治”。为了疗法的目的,术语“减小”泛指体征和/或症状的临床显著的减小。疗法包括治疗体征和/或症状(例如炎症、疼痛)的复发。疗法涵盖但不限于阻止任何时候出现体征和/或症状以及减轻现有体征和/或症状以及消除现有体征和/或症状。疗法包括治疗慢性疾病(“维持”)和急性疾病。例如,治疗包括治疗或预防体征和/或症状(例如炎症、疼痛)的复发。

[0256] 如本文所用,“跨膜域”泛指长度为约15个氨基酸残基的跨越质膜的氨基酸序列。更优选地,跨膜域包括约至少20、25、30、35、40或45个氨基酸残基并跨越质膜。跨膜域富含疏水性残基,并且典型地具有α-螺旋结构。在一实施方案中,跨膜域的氨基酸中的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多具有疏水性,例如亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸或色氨酸。跨膜域描述于例如Zagotta等,(1996)Annu.Rev.Neurosci.19:235-263中。

[0257] 如本文所用,“转基因动物”泛指非人动物,优选地为哺乳动物,更优选地为小鼠,其中动物细胞的一个或多个包括“转基因”。术语“转基因”是指整合到发育成转基因动物的细胞的基因组中并保留在成熟动物基因组中,从而例如引导转基因动物的一种或多种细胞类型或组织中编码基因产物的表达的外源性DNA。

[0258] 如本文所用,术语“肿瘤”泛指至少一个细胞或呈组织新生物形式的细胞团块,尤其是内源性组织的自发、自主和不可逆的或多或少脱抑制的过度生长形式,所述生长通常与或多或少的特定细胞和组织功能的明显丧失相关。这种细胞或细胞团块通过自体或通过宿主生物体(例如结肠直肠癌、黑素瘤或恶性肿瘤)的调控机制在其生长方面无有效抑制。肿瘤抗原不仅包括存在于恶性肿瘤细胞本身中或其上的抗原,而且包括存在于肿瘤的基质支持组织(包括内皮细胞和其它血管组分)上的抗原。

[0259] 如本文所用,术语“无响应性”泛指免疫细胞对刺激(例如,通过活化性受体或细胞因子的刺激)的折射性。无响应性可例如由于暴露于免疫抑制剂或高剂量的抗原而发生。

[0260] 如本文所用,“可变区”或“VR”泛指直接涉及抗体结合于抗原中的抗体中每一对轻链和重链内的结构域。每条重链在一端都具有可变域(V_H),接着有许多恒定域。每条轻链在一端都有可变域(V_L)并且在另一端有恒定域;轻链的恒定域与重链的第一恒定域对准,并且轻链可变域与重链的可变域对准。

[0261] 如本文所用,“载体”泛指能够转运其已经连接的另一核酸分子的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”,它是指可向其中连接另外的DNA区段的环状双链DNA环。另一种类型的载体为病毒载体,其中可将另外的DNA片段连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们所引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其它载体(例如非游离型哺乳动物载体)在引入宿主细胞中时整合到宿主细胞的基因组,并从而随宿主基因组一起复制。此外,此外,某些载体能够引导其所可操作地连接的基因的表达。在本文将载体称为“重组表达载体”或简称为“表达载体”。一般来说,在重组DNA技术中有用的表达载体经常为质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为

质粒是最常用的载体形式。然而，本发明旨在包括这些发挥等效功能的其它形式的表达载体，如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。所述技术和程序通常根据本领域熟知的常规方法并且如遍及本说明书所引用和讨论的多个一般且较特定的参考文献中所述来进行。参见例如Sambrook等，(2001)Molec.Cloning:Lab.Manual[第3版]Cold Spring Harbor Laboratory Press。可以将标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养，以及转化(例如电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书或如本领域中通常所实现或如本文所述来进行。

[0262] 与本文所述的分析化学、合成有机化学以及医药和药物化学相关所用的命名，以及本文所述的分析化学、合成有机化学以及医药和药物化学的实验程序和技术为熟知的并且常用于本领域中。可以将标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送和患者治疗。

[0263] VISTA

[0264] 本申请涉及一种新型的结构上独特的在造血细胞上选择性表达的Ig超家族抑制配体，其名为T细胞活化的含V区免疫球蛋白的抑制因子(VISTA)或PD-L3。细胞外域具有与B7家族配体PD-L1的同源性，并且如PD-L1那样，VISTA对免疫性具有深刻的影响。然而，不同于PD-L1，VISTA选择性表达于造血室内。在骨髓抗原呈递细胞(APC)上的表达最突出，但是在CD4+T细胞、$CD8^+$T细胞上的表达以及在Foxp3+调控性T细胞(Treg)子集上的较高表达也受到较大关注。在APC上的可溶性VISTA-Ig融合蛋白或VISTA表达会强力抑制体外T细胞增殖、细胞因子产生并诱导T细胞中的Foxp3表达。相反地，新开发的抗VISTA单克隆抗体通过在体外VISTA+APC干扰T细胞反应的VISTA诱导性免疫抑制。此外，体内抗VISTA加强了T细胞介导性自体免疫疾病实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)的发展，并促进保护性肿瘤特异性免疫反应的发展，继而缓解肿瘤。VISTA-/-小鼠的初步研究正在揭示自发性炎症疾病的早期指标，并将确定其最终病理学命运。不同于所有其它PD配体相关分子(例如B7-H3、H4、H6)，VISTA选择性表达于造血细胞中，与其充分的抑制活性和独特的结构特征一起说明VISTA是一种新型、功能非冗余的核心的免疫负调控因子，其表达主要限制在T细胞和骨髓中。参见WO2011/120013。

[0265] 表征最好的共同刺激配体是B7.1和B7.2，并且其属于Ig超家族，所述Ig超家族由许多重要的免疫调控剂如B7家族配体和受体组成。Ig超家族成员在专职性抗原呈递细胞(APC)上表达，并且其受体是CD28和CTLA-4。CD28由原生的并活化的T细胞表达，并且对最优的T细胞活化是重要的。相比之下，CTLA-4在T细胞活化之后诱导，并通过结合于B7.1/B7.2而抑制T细胞活化，从而削弱CD28介导性共同刺激。B7.1和B7.2敲除(KO)的小鼠的适应性免疫反应削弱，而CTLA-4 KO小鼠不能充分地控制炎症并且会产生全身性自体免疫疾病。随着时间推移，B7家族配体已扩展到包括共同刺激配体如B7-H2(ICOS配体)和B7-H3以及共同抑制性配体如B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)和B7-H6。因此，已经鉴别了另外的CD28家族受体。ICOS在活化的T细胞上表达并且结合于B7-H2。ICOS为正共同调控剂，对T-细胞活化、分化和功能是重要的。另一方面，程序化死亡1(PD-1)负调控T细胞反应。PD-1 KO小鼠产生狼疮样自体免疫疾病或T扩张型心肌病。与VISTA相反，两种抑制性B7家族配体，即PD-L1和PD-L2具有独特的表达模式。PD-L2在DC和巨噬细胞上诱导性表达，而PD-L1在造血细胞和非造血细胞类型上都广泛表达。与PD-1受体的免疫抑制作用一致，使用PD-L1-/-

和PD-L2-/-小鼠的研究已显示，两种配体在抑制T细胞增殖和细胞因子产生方面具有重叠作用。PD-L1缺乏在自体免疫性糖尿病的非肥胖型糖尿病(NOD)模型和多发性硬化症(实验性自体免疫性脑脊髓炎(EAE))的鼠类模型中都会加速疾病进展。PD-L1-/-T细胞在两种疾病模型中都产生升高的促炎性细胞因子水平。另外，NOD小鼠中的研究已经证明，PD-L1的组织表达(即，在胰腺内)对其区域性控制炎症的能力有独特的贡献。PD-L1还在胎盘合体滋养细胞上高表达，这些细胞关键性地控制对同种异体胎儿的母体免疫反应。

[0266] 抗CTLA-4抗体在黑素瘤的鼠类模型和临床试验中显示了增强的治疗益处。接种B16-GM-CSF(Gvax)的小鼠当与CTLA-4的抗体阻断组合时会促进B16黑素瘤的排斥。PD-1以及PD-L1的抗体也在多种鼠类肿瘤模型中记录到增强的抗肿瘤免疫和宿主存活率。最后，虽然CTLA-4和PD-1属于同一共同抑制性分子家族，但是有证据表明，其使用不同的非冗余机制来抑制T细胞活化，并且在抗CTLA-4和抗PD-1/L1组合使用时在鼠类黑素瘤中提高宿主存活率的能力方面有协同作用。

[0267] 免疫球蛋白(Ig)超家族由许多重要的免疫调控剂(包括B7家族配体和受体)组成。VISTA是一种新型且结构独特的Ig超家族抑制配体，其细胞外域具有与B7家族配体PD-L1的同源性。将这种分子命名为T细胞活化的V域Ig抑制因子(VISTA)。VISTA主要在造血细胞上表达，且VISTA在骨髓抗原呈递细胞(APC)和T细胞上的表达高度受调控。APC上的可溶性VISTA-Ig融合蛋白或VISTA表达会抑制体外T细胞增殖和细胞因子产生。VISTA特异性单克隆抗体通过在体外的VISTA表达APC来干扰T细胞反应的VISTA诱导性抑制。此外，抗VISTA治疗加剧了T细胞介导性自体免疫疾病，即实验性小鼠自体免疫脑脊髓炎的发展。最后，肿瘤细胞上的VISTA过表达干扰小鼠的体内保护性抗肿瘤免疫性。这些发现显示，新型免疫调控分子VISTA具有对于其它Ig超家族成员非多余的功能活性，并且可以在癌症中产生自体免疫和免疫监督方面起作用。参见Wang等，(2011)The Journal of Experimental Medicine 208(3):577-92。

[0268] 人VISTA(PD-L3)或VISTA被鉴别成T细胞转录分析筛选(profiling screen)中的上调分子。我们对从鼠类$CD4^+$T细胞cDNA文库回收的相同930bp基因产物的表征证实了尺寸和序列。硅序列和结构分析预测在成熟时的309个氨基酸的I型跨膜蛋白。其细胞外域含有136个氨基酸的单一细胞外Ig-V域，其连接于23个氨基酸的茎区、21个残基的跨膜片段，以及97个氨基酸的胞浆域。VISTA的细胞质尾部不含有任何信号传导域。用VISTA Ig-V域的BLAST序列检索鉴别B7家族的PD-L1作为最接近的进化相关蛋白质，e值评分界线显著。VISTA与B7家族成员PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4的基于结构的序列比对突出了几个在所有Ig-V域蛋白中都系统地保守的氨基酸。

[0269] VISTA表达似乎在造血室中选择性表达并且这种蛋白质在成熟骨髓细胞($CD11b^{bright}$)上高表达，在$CD4^+$T细胞、T^{reg}和$CD8^+$T细胞上的表达水平较低。APC上的可溶性VISTA蛋白，例如可溶性VISTA-Ig融合蛋白或VISTA的表达会抑制体外$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖和细胞因子产生。还观测到抗VISTA抗体，例如抗VISTA单克隆抗体(13F3)阻断了由体外$VISTA^+$APC造成的T细胞反应的VISTA诱导性抑制。另外，已经发现抗VISTA单克隆抗体会加重EAE并且提高体内致脑炎Th17的频率。更进一步地，本发明人惊讶地发现抗VISTA单克隆抗体会在多个鼠类肿瘤模型中诱导肿瘤缓解。在这些模型中骨髓源性抑制细胞(MDSC)上的VISTA表达极高，表明$VISTA^+$MDSC抑制肿瘤特异性免疫。VISTA对小鼠和人(仅体外)的体外

和体内T细胞都施加免疫抑制活性，并且在控制产生对癌症的自体免疫和免疫反应方面是一种重要的介体。具体来说，数据显示VISTA是Ig超家族的新成员，并且含有Ig-V域，所述域对PD-L1具有远的序列相似性。VISTA-Ig融合蛋白或当在人造APC VISTA上过表达时会抑制小鼠和人CD4+和CD8+T细胞增殖和细胞因子产生。此外，骨髓APC上的VISTA表达对于体外T细胞反应具有抑制性。

[0270] 在肿瘤微环境中在MDSC上的VISTA表达极高。先前表明牵涉于T细胞的MDSC介导性抑制的许多细胞表面分子的表型和功能分析：CD115、CD124、CD80、PD-L1和PD-L2由MDSC表达，但是在MDSC和来自缺乏免疫抑制活性的无肿瘤小鼠的细胞之间发现其表达水平或阳性细胞的比例没有差异。因此，VISTA是MDSC上的主要B7负调控剂。

[0271] 抗体介导性VISTA阻断会诱导对自体性肿瘤的保护性免疫。

[0272] VISTA似乎是MDSC上占优的负免疫调控分子，其会干扰保护性抗肿瘤免疫性的产生。因此，用抗VISTA抗体阻断这种分子的活性可用于在哺乳动物(例如人)体内诱导保护性抗肿瘤免疫性。

[0273] 使用可溶性VISTA蛋白，例如融合蛋白和多聚VISTA蛋白(包含VISTA细胞外域的多个复本或其片段)以及VISTA缀合剂(例如小分子和抗体或其片段，其结合VISTA或调节(激动或拮抗)VISTA活性以作为免疫调节剂并且用于治疗不同癌症，例如结肠直肠癌、膀胱癌、卵巢癌和淋巴瘤、自体免疫疾病、过敏症、感染和炎症病状，例如多发性硬化症和关节炎)的方法。

[0274] VISTA是一种新型的抑制配体，其细胞外Ig-V域对两种已知的B7家族配体，即程序化死亡配体1和2(PD-L1和PD-L2)具有同源性，并且显示独特的序列特征和独特的在APC和T细胞子集上的体外和体内表达模式(其将PD-L3或VISTA与其它B7家族配体区分开)。VISTA对$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖和分化具有功能性影响(抑制$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖以及细胞因子产生)。基于其表达模式和对T细胞的抑制影响，PD-L3或VISTA明显用作在T细胞和骨髓源性APC发生同源相互作用期间负调控T细胞反应的调控配体。

[0275] 尽管VISTA(PD-L3)似乎是B7配体家族的成员，但是不同于其它B7家族配体，这种分子仅含有Ig-V域而无Ig-C域，并且在进化史上较接近B7家族受体程序化死亡-1(PD-1)。基于此，VISTA(PD-L3)和对其具有特异性的激动剂或拮抗剂可用以调控T细胞活化和分化，并且较广泛用于调节控制免疫反应的调控网络。具体来说，VISTA(PD-L3)蛋白和VISTA(PD-L3)激动剂或拮抗剂、优选地对VISTA(PD-L3)具有特异性的抗体适用于在自体免疫、炎症反应和疾病、过敏症、癌症、传染性疾病和移植中调节免疫反应。

[0276] T细胞中的无变应性(与无响应性相对)的特征在于缺乏细胞因子的产生，如IL-2。在T细胞暴露于抗原并在不存在第二信号(共同刺激信号)下收到第一信号(T细胞受体或CD-3介导的信号)时发生T细胞无变应性。在这些条件下，再次将细胞暴露于相同的抗原(即便在存在共同刺激分子的情况下发生再次暴露)将导致不能产生细胞因子，并因此不能增殖。然而，无变应性T细胞可对不相关抗原发生反应，并且在用细胞因子(如IL-2)培养时可增殖。例如，T细胞无变应性也可通过T淋巴细胞缺乏IL-2的产生而观测到，如通过ELISA或通过使用指示细胞系进行增殖分析来测量。或者，可使用报告基因构建体。例如，无变应性T细胞不能引发由异源启动子在5'IL-2基因增强子控制下或通过可见于增强子内的API序列的多聚体诱导的IL-2基因转录。Kang等，(1992)Science 257:1134。

[0277] 基于多肽或相应核酸分子中“细胞外域”的存在来鉴别本发明的VISTA(PD-L3)分子。在另一实施方案中,基于多肽或相应核酸分子中“胞浆域”的存在来鉴别本发明的VISTA(PD-L3)分子。

[0278] 如下调节免疫细胞反应的方法:在初级信号存在下使体外或体内免疫细胞与VISTA蛋白或对其具有特异性的缀合剂接触,以调节免疫细胞的反应。(VISTA或其调节剂的相互作用向免疫细胞发送信号,从而调控免疫反应。VISTA(PD-L3)蛋白在骨髓抗原呈递细胞(包括骨髓树突细胞(DC)和巨噬细胞)上高水平表达,并且在CD4+和CD8+T细胞上以较低密度表达。在免疫活化时,骨髓APC上的VISTA(PD-L3)表达上调,而在CD4+T细胞上表达下调)。因此,本发明的VISTA(PD-L3)核酸和多肽,以及其激动剂或拮抗剂例如适用于调节免疫反应。

[0279] 如可在本文中互换使用,“VISTA(PD-L3)活性”、“生物活性的VISTA(PD-L3)”或“VISTA(PD-L3)的功能活性”是指由VISTA(PD-L3)蛋白、多肽或核酸分子对VISTA(PD-L3)反应性细胞或组织,或对VISTA(PD-L3)多肽结合伴侣施加的活性,作为根据标准技术体内或体外所测定。这些活性包括调节CD4+和CD8+T细胞增殖和细胞因子产生。在另一实施方案中,VISTA(PD-L3)活性是直接活性,如与VISTA(PD-L3)结合伴侣缔合。如本文所用,“目标分子”或“结合伴侣”是VISTA(PD-L3)多肽所结合或本质上相互作用的分子,即在T细胞上表达,以实现VISTA(PD-L3)介导性功能。或者,VISTA(PD-L3)活性是间接活性,如由VISTA(PD-L3)多肽介导的细胞信号传导活性。本文描述VISTA(PD-L3)的生物活性。例如,本发明的VISTA(PD-L3)多肽和VISTA(PD-L3)激动剂或拮抗剂可具有一种或多种下活性:(1)抑制或促进CD4+和CD8+T细胞增殖,(2)抑制或促进细胞因子产生,(3)用作在T细胞和骨髓驱动的APC之间发生同源相互作用期间负调控T细胞反应的调控配体,(4)通过抑制早期TCR活化和停滞细胞分裂,但使对凋亡的直接影响最小来负调控CD4+T细胞反应,(5)在APC和T细胞之间发生相互作用期间抑制或促进抗原特异性T细胞活化,和/或(6)抑制或促进T细胞介导性免疫反应,(7)调节免疫细胞例如T淋巴细胞的活化,以及(8)调节生物体例如小鼠或人生物体的免疫反应,例如炎症免疫反应。

[0280] 调节一种或多种VISTA(PD-L3)活性的分离的VISTA(PD-L3)蛋白和多肽。这些肽将包括具有一个或多个以下域的VISTA(PD-L3)多肽:信号肽域、IgV域、细胞外域、跨膜域和胞浆域,以及优选地,VISTA(PD-L3)活性。

[0281] 共同刺激信号的调节会导致免疫细胞效应功能的调节。因此,术语“VISTA活性”包括VISTA多肽结合其天然结合伴侣的能力、调节免疫细胞共同刺激性或抑制性信号的能力以及调节免疫反应的能力。

[0282] 免疫细胞中抑制信号的调节导致免疫细胞增殖和/或免疫细胞分泌细胞因子受到调节。例如,本发明的VISTA(PD-L3)多肽家族优选地包含至少一个“信号肽域”。如下文所述,在原生人VISTA(PD-L3)中的氨基酸序列中而且在原生小鼠VISTA(PD-L3)的氨基酸序列中鉴别出信号序列。

[0283] 在VISTA(PD-L3)异常下调和/或增大的VISTA(PD-L3)活性可能具有有利作用的情况下,需要刺激VISTA(PD-L3)活性。同样地,在VISTA(PD-L3)异常上调和/或减小的VISTA(PD-L3)活性可能具有有利作用的情况下,需要抑制VISTA(PD-L3)活性。用于下调VISTA(PD-L3)的示例性试剂(即VISTA(PD-L3)拮抗剂)包括例如反义核酸分子、识别并阻断VISTA

(PD-L3)的抗体、识别并阻断VISTA(PD-L3)的抗体与识别并阻断VISTA(PD-L3)反受体的组合、以及阻断VISTA(PD-L3)与其天然存在的结合伴侣在免疫细胞(例如可溶性单价VISTA(PD-L3)分子)上的相互作用化合物;不结合抗原呈递细胞上的Fc受体的可溶形式VISTA(PD-L3)分子;可溶形式VISTA(PD-L3)结合伴侣;以及在主题筛选分析中鉴别出的化合物)。用于上调VISTA(PD-L3)的示例性试剂(即VISTA(PD-L3)激动剂)包括例如编码VISTA(PD-L3)多肽的核酸分子、多价形式的VISTA(PD-L3)、增大VISTA(PD-L3)表达的化合物、增强VISTA(PD-L3)与其天然存在的结合伴侣的相互作用的化合物,以及表达VISTA(PD-L3)的细胞。

[0284] 根据结合于受体的VISTA(PD-L3)分子的形式,可例如通过与结合于受体的VISTA(PD-L3)分子的活化性形式竞争来发送(例如引起受体交联的VISTA(PD-L3)分子形式,或通过结合于抗原呈递细胞上的Fc受体的可溶形式VISTA(PD-L3))或抑制(例如通过可溶性单价形式的VISTA(PD-L3)分子,或者使用本领域已知方法改变以使其不结合于抗原呈递细胞上的Fc受体的可溶形式的VISTA(PD-L3))信号。然而,存在可溶性分子可具有刺激性的情况。可使用如本文所述的常规筛选分析容易地证明各种调节剂的作用。

[0285] 下调免疫反应

[0286] 上调VISTA(PD-L3)多肽的抑制性功能可用于下调免疫反应。下调可呈抑制或阻断进展中免疫反应的形式,或者可以涉及防止免疫反应的诱导。可通过下调免疫细胞反应或者通过诱导免疫细胞的特异性无变应性或者这两种方法来抑制活化的免疫细胞的功能。例如,VISTA(PD-L3)可以结合于抑制受体、结合于抑制受体的VISTA(PD-L3)形式,例如细胞表面上的多价VISTA(PD-L3),可用以下调免疫反应。活化性抗体可用于刺激VISTA(PD-L3)活性,是双特异性抗体。例如,这种抗体可包含VISTA(PD-L3)结合位点,以及靶向免疫细胞例如T细胞、B细胞或骨髓细胞上的细胞表面受体的结合位点。这种抗体除包含VISTA(PD-L3)结合位点以外还可包含结合于B细胞抗原受体、T细胞抗原受体或Fc受体的结合位点,以使分子靶向特定细胞群体。选择双特异性抗体的这种第二抗原在选择待靶向以进行抑制的细胞群体方面提供灵活性。可通过抑制免疫细胞增殖和/或效应功能或当添加到体外分析中时诱导无变应性的能力来鉴别促进VISTA(PD-L3)活性或增强VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣(例如VISTA(PD-L3)活化性抗体或VISTA(PD-L3)活化性小分子)的相互作用的试剂。例如,可在刺激通过活化性受体进行信号转导的试剂存在下培养细胞。细胞活化的许多本领域公认的读数可用于测量例如在活化剂存在下的细胞增殖或效应功能(例如抗体产生、细胞因子产生、吞噬作用)。可通过测量试剂实现所测量的增殖或效应功能的减小的能力来容易地测定测试试剂阻断这种活化的能力。在一个实施方案中,在低抗原浓度下,VISTA(PD-L3)免疫细胞相互作用会抑制强的B7-CD28信号。在另一实施方案中,在高抗原浓度下,VISTA(PD-L3)免疫细胞相互作用可以减少细胞因子产生而不抑制T细胞增殖。因此,测试化合物阻断活化的能力可通过测量在不同抗原浓度下的细胞因子产生和/或增殖来测定。

[0287] 可以通过共同施用抗原与VISTA(PD-L3)激动剂来针对特异性抗原诱导耐受性。例如,可以对特异性多肽诱导耐受性。可抑制对不需要免疫反应的过敏原或外来多肽的免疫反应。例如,接受因子VIII的患者经常产生针对这种凝血因子的抗体。共同施用刺激VISTA(PD-L3)活性或与其天然结合伴侣相互作用的试剂与重组型因子VIII(或将VISTA(PD-L3)物理连接于因子VIII,例如通过交联来实现)可引起免疫反应下调。

[0288] VISTA(PD-L3)激动剂和可阻断免疫细胞上共同刺激受体的活性的另一试剂可用以下调免疫反应。示例性分子包括:激动剂形式的其它PD配体、可溶形式的CTLA-4、抗B7-1抗体、抗B7-2抗体或其组合。或者,可将两种单独的肽(例如VISTA(PD-L3)多肽与阻断形式的B7-2和/或B7-1多肽),或抗体组合(例如针对VISTA(PD-L3)多肽的活化性抗体与阻断性抗B7-2和/或抗B7-1单克隆抗体)组合成单一组合物或分别施用(同时或依次)以下调受试者的免疫细胞介导性免疫反应。此外,一定治疗活性量的一种或多种具有VISTA(PD-L3)多肽活性的肽,以及一种或多种具有B7-1和/或B7-1活性的多肽可与其它下调试剂组合使用以影响免疫反应。其它免疫调节试剂的实例包括阻断共同刺激信号(例如针对CD28或ICOS)的抗体、通过CTLA4活化抑制信号的抗体,和/或针对其它免疫细胞标记(例如针对CD40、CD40配体或细胞因子)的抗体、融合蛋白(例如CTLA4-Fc或PD-1-Fc)以及免疫抑制药物(例如雷帕霉素(rapamycin)、环孢菌素A或FK506)。VISTA(PD-L3)多肽也可以适用于构建通过破坏细胞来阻断免疫细胞功能的治疗剂。例如,VISTA(PD-L3)多肽的部分可连接于毒素以产生能够触发其所结合的细胞的破坏的细胞毒性剂。

[0289] 尤其鉴于表达较高量VISTA(PD-L3)结合伴侣的活化的免疫细胞的事实,向患者输注这些细胞毒性剂(例如VISTA(PD-L3)篦麻毒素(单独或与PD-L1-篦麻毒素组合))中的一种或组合会引起免疫细胞死亡。例如,因为PD-1在活化的淋巴细胞表面上诱导,所以VISTA(PD-L3)多肽可用于通过Fc-R依赖性机制或通过将细胞毒性药物(例如篦麻毒素、肥皂草素(saporin)或卡奇霉素(calicheamicin))缀合到VISTA(PD-L3)多肽的消融(ablation)而杀死表达VISTA受体的细胞。可将毒素结合到抗VISTA(PD-L3)抗体以达到表达VISTA(PD-L3)的抗原呈递细胞死亡的目的。在另一实施方案中,VISTA(PD-L3)-抗体-毒素可以是双特异性抗体。这些双特异性抗体适用于靶向特定细胞群体,例如使用仅见于某一类型的细胞,例如B淋巴细胞、单核细胞、树突细胞或兰格罕氏细胞上的标记来实现。通过活化VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)与免疫细胞的相互作用(并因而刺激VISTA(PD-L3)的负信号传导功能)来下调免疫反应适用于下调例如组织、皮肤和器官移植情况下、移植物抗宿主疾病(GVHD)或过敏症中或诸如全身性红斑狼疮和多发性硬化的自体免疫疾病中的免疫反应。例如,阻断免疫细胞功能使得组织移植中组织破坏减少。典型地,在组织移植物中,移植物的排斥通过免疫细胞将其识别为外来物而引发,接着发生破坏移植物的免疫反应。在移植前或移植时单独地或结合另一种下调剂来施用促进免疫细胞上VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣的相互作用的分子(如可溶性多聚物形式的VISTA(PD-L3)多肽)可抑制共同刺激信号的产生。此外,促进VISTA(PD-L3)活性还可以足以使免疫细胞无变应性,从而诱导受试者的耐受性。

[0290] 为了在受试者实现足够的免疫抑制或耐受性,还可能需要阻断其它分子的共同刺激功能。例如,可能需要通过在移植前或移植时施用可溶形式的具有这些抗原每一者的活性的肽的组合或针对这些抗原的阻断性抗体(单独地或合在单一组合物中)来阻断B7-1和B7-2的功能。或者,可能需要促进VISTA(PD-L3)的抑制活性并抑制B7-1和/或B7-2的共同刺激活性。可结合本发明的下调方法使用的其它下调剂包括例如:通过CTLA4发送抑制信号的试剂、可溶形式的CTLA4、通过CTLA4活化抑制信号的抗体、针对其它免疫细胞标记的阻断性抗体,或可溶形式的其它受体配体对(例如,破坏CD40与CD40配体之间相互作用的试剂(例如,抗CD40配体抗体))、针对细胞因子的抗体或免疫抑制药物。例如,活化VISTA(PD-L3)活

性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用适用于治疗自体免疫疾病。许多自体免疫疾病是不当的免疫细胞活化的后果,这些免疫细胞对自体组织具有反应性,并促进疾病病理学中涉及到的细胞因子和自体抗体的产生。防止自体反应性免疫细胞的活化可减轻或消除疾病症状。施用促进VISTA(PD-L3)的活性或(PD-L3)或VISTA与其天然结合伴侣的相互作用的试剂可诱导能导致疾病长期缓解的自体反应性免疫细胞的抗原特异性耐受性。另外,共同施用通过破坏B7分子与共同刺激受体的受体-配体相互作用而阻断免疫细胞共同刺激的试剂可适用于抑制免疫细胞活化,以防止疾病过程中可能涉及到的自体抗体或细胞因子的产生。试剂在预防或减自体免疫病症方面的功效可使用人自体免疫疾病的多种研究透彻的动物模型来测定。实例包括鼠实验性自体免疫性脑炎、MRL/lpr/lpr小鼠或NZB杂交小鼠中的全身性红斑狼疮、鼠类自体免疫胶原性关节炎、NOD小鼠和BB大鼠中的糖尿病以及鼠类实验性重症肌无力。参见Paul编,Fundamental Immunology,Raven Press,New York,1989,第840-856页。

[0291] 抑制免疫细胞活化在治疗学上适用于治疗过敏症和过敏反应,例如通过抑制IgE产生来实现。促进VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂可施用给过敏受试者,以抑制受试者的免疫细胞介导的过敏反应。刺激VISTA(PD-L3)活性或与其天然结合伴侣间的相互作用可伴随暴露于结合适当MHC分子的过敏原。过敏反应在本质上可以是全身性的或局部的,这取决于过敏原的进入途径以及IgE在肥大细胞或嗜碱性粒细胞上的沉积模式。因此,免疫细胞介导的过敏反应可通过施用促进VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与免疫细胞相互作用的试剂而局部地或全身性地抑制。

[0292] 通过刺激VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用来下调免疫反应也可以适用于治疗对自体组织的自体免疫攻击。因自体免疫攻击而导致的或加重的病状(例如,心脏病、心肌梗塞或动脉粥样硬化)可通过增强VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣的结合而改善或改进。因此,通过刺激VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其反受体间的相互作用而调节自体免疫攻击所加重的病状,如自体免疫疾病(以及如心脏病、心肌梗塞和动脉粥样硬化的病状)也在本发明的范围内。

[0293] 上调免疫反应

[0294] 抑制VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用作为上调免疫反应的手段也适用于疗法中。上调免疫反应可呈增强现有免疫反应或引发初始免疫反应的形式。例如,通过抑制VISTA(PD-L3)活性而增强免疫反应适用于微生物(如细菌、病毒或寄生虫)感染的情况或适用于免疫抑制的情况。例如,在一个实施方案中,抑制VISTA(PD-L3)活性的试剂,例如针对VISTA(PD-L3)的非活化性抗体(即,阻断性抗体)或可溶形式的VISTA(PD-L3)在治疗学上适用于上调抗体和细胞介导性反应(从而导致更快或更彻底的病毒、细菌或寄生虫清除)将是有利的情形。这些病状包括病毒性皮肤疾病,如疱疹或带状疱疹,在这种情况下,这种试剂可递送于皮肤表面。另外,全身性病毒疾病,如流感、普通感冒和脑炎可通过全身性施用这些试剂而得到减轻。在某些情况下,可能所需的是进一步使用上调免疫反应的其它试剂,例如通过共同刺激受体转导信号的B7家族成员的形式,以进一步增强免疫反应。

[0295] 可以如下增强受感染患者的免疫反应:从患者移出免疫细胞、使免疫细胞与抑制VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣的相互作用的试剂体外接触,以及将

受到体外刺激的免疫细胞再引入患者体内。在另一实施方案中，增强免疫反应的方法包括从患者分离受感染细胞，例如受病毒感染的细胞、用编码不能结合其天然结合伴侣的VISTA(PD-L3)形式的核酸分子对其进行转染，以使细胞在其表面上表达全部或一部分的VISTA(PD-L3)，以及将转染的细胞再引入患者体内。转染的细胞可以能够防止抑制信号传到体内免疫细胞并从而活化体内免疫细胞。

[0296] 抑制VISTA(PD-L3)活性或VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣的相互作用的试剂可用防治方式用于针对各种多肽例如来源于病原体的多肽的疫苗。针对病原体例如病毒的免疫性可通过接种在适当佐剂中的病毒多肽以及抑制VISTA(PD-L3)活性的试剂来诱导。或者，包含编码病原性抗原与阻断VISTA(PD-L3)与免疫细胞相互作用的VISTA(PD-L3)形式两者的基因的载体可用于接种。核酸疫苗可通过多种手段施用，例如通过注射(例如肌内注射、皮内注射，或通过使用粒子加速器或压缩气体将粒子注入皮肤的基因枪将涂布DNA的金粒子生物弹射(biolistic injection)进表皮。Haynes等，(1996)J.Biotechnol.44:37。或者，核酸疫苗可通过非侵入性手段施用。例如，可将纯的或脂质配制的DNA递送到呼吸系统或靶向别的地方，例如，经口递送DNA到派氏集结(Peyers patch)。Schubbert(1997)Proc Natl.Acad.Sci.USA 94:961。减毒微生物可用于递送到粘膜表面。Sizemore等，(1995)Science 270:29。

[0297] 疫苗中的抗原可为自体抗原。这种疫苗适用于调节生物体中的耐受性。用自体抗原和阻断VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂进行免疫会破坏耐受性(即，干扰自体抗原的耐受性)。这种疫苗还可以包括佐剂，如明矾或细胞因子(如GM-CSF、IL-12、B7-1或B7-2)。在一个实施方案中，抑制VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂可与I类MHC多肽一起施用，例如通过经转染以共同表达VISTA(PD-L3)多肽或阻断性抗体的细胞以及MHC I类α链多肽和β2小球蛋白来实现，从而导致T细胞活化并提供对感染的免疫。例如，疫苗适用的病毒性病原体包括：乙型肝炎、丙型肝炎、艾伯斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、巨细胞病毒、HIV-1、HIV-2、结核、疟疾和血吸虫病。

[0298] 抑制VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其结合伴侣间的相互作用可用于治疗肿瘤免疫。肿瘤细胞(例如结肠直肠癌、肉瘤、黑素瘤、淋巴瘤、白血病、神经母细胞瘤或恶性肿瘤)可用抑制VISTA(PD-L3)活性的核酸分子转染。这些分子可为例如与VISTA(PD-L3)反义的核酸分子，或可编码非活化性抗VISTA(PD-L3)抗体。这些分子还可为抗VISTA(PD-L3)抗体的可变区。如果需要，那么肿瘤细胞也可用活化共同刺激的其它多肽(如B7-1或B7-2)转染。将转染的肿瘤细胞返回患者，其导致VISTA(PD-L3)活性受到抑制(例如，局部抑制)。或者，基因治疗技术可用于靶向用于体内转染的肿瘤细胞。

[0299] 刺激对肿瘤细胞的免疫反应还可如下实现：通过用抑制VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂治疗受试者来抑制VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用。这些试剂的优选实例包括例如反义核酸分子、识别并阻断VISTA(PD-L3)的抗体，以及阻断免疫细胞上VISTA(PD-L3)与其天然存在的结合伴侣间的相互作用的化合物(例如，可溶性、单价VISTA(PD-L3)分子；不结合于抗原呈递细胞上Fc受体的可溶形式的VISTA(PD-L3)分子；可溶形式的VISTA(PD-L3)结合伴侣；以及在受试者筛选分析中鉴别的化合物)。另外，不含MHC I类或MHC II类分子或不能表

达足量MHC I类或MHC II类分子的肿瘤细胞可用编码MHC I类α链多肽和β2小球蛋白多肽或MHC II类α链多肽和MHC II类β链多肽的全部或一部分(例如,胞浆域截短部分)的核酸转染,从而在细胞表面上表达MHC I类或MHC II类多肽。结合VISTA(PD-L3)抑制性多肽或反义核酸而表达适当的I类或II类MHC会诱导针对转染肿瘤细胞的T细胞介导的免疫反应。任选地,编码阻断MHC II类相关多肽(诸如恒定链)表达的反义构建体的基因也可用编码VISTA(PD-L3)抑制性多肽或反义核酸的DNA共转染,以促进肿瘤相关抗原的呈递并诱导肿瘤特异性免疫。已显示通过B7阴性鼠肿瘤细胞表达B7-1可诱导T细胞介导的特异性免疫,其伴随肿瘤排斥以及对小鼠肿瘤激发的长久保护。Chen等,(1992)Cell 71:1093-1102;Townsend和Allison(1993)Science 259:368-370;Baskar等,(1993)Proc Natl.Acad.Sci.90:5687-5690。因此,诱导人体受试者中免疫细胞介导性疫反应可足以克服受试者的肿瘤特异性耐受性。在另一个实施方案中,免疫反应可通过抑制VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用而刺激,使得克服预先存在的耐受性。例如,针对受试者无法对其发生显著免疫反应的抗原(例如,肿瘤特异性抗原)的免疫反应可如下诱导:施用抑制VISTA(PD-L3)的活性或者VISTA(PD-L3)结合到其天然结合伴侣的能力的试剂,可用作佐剂以在主动免疫过程中加强对外来抗原的反应。

[0300] 从受试者获取免疫细胞,并在抑制VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂存在下进行离体培养,以扩增免疫细胞群体。在另一个实施方案中,则将免疫细胞施用给受试者。可通过例如为免疫细胞提供初级活化信号和共同刺激信号而刺激免疫细胞体外增殖,如本领域已知。各种形式的抑制VISTA(PD-L3)活性的VISTA(PD-L3)多肽或试剂也可用于共同刺激免疫细胞增殖。在一个实施方案中,将免疫细胞根据WO 94/29436中所述的方法离体培养。共同刺激分子可为可溶的,连接到细胞膜或连接到固体表面,诸如珠粒。

[0301] 在执行本文所述的任何方法时,通过施用一种或多种另外的试剂来上调免疫反应也在本发明的范围内。例如,使用已知刺激免疫反应的其它试剂,如细胞因子、佐剂或刺激性形式的共同刺激分子或其配体可与抑制VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用的试剂组合使用。

[0302] 因T细胞上VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其反受体间相互作用的调节而受到调节的细胞因子的鉴别

[0303] 本文所述的VISTA(PD-L3)分子可用于鉴别以下细胞因子:其由免疫细胞产生或其产生情况会在免疫细胞中响应于VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣间的相互作用的调节而被增强或抑制。免疫细胞可在体外通过初级活化信号非最优地受刺激,例如,T细胞可通过佛波酯、抗CD3抗体或优选地抗原与MHC II类分子联合进行刺激,并给予共同刺激信号,例如通过刺激形式的B7家族抗原,例如通过用编码B7多肽的核酸转染并在其表面上表达肽的细胞,或通过可溶性刺激形式的肽。然后,可使细胞与表达VISTA(PD-L3)(例如,针对VISTA(PD-L3)的抗体)的细胞接触。已知的释放到培养基中的细胞因子可通过ELISA或通过阻断细胞因子以抑制免疫细胞增殖或抑制由细胞因子诱导的其它细胞类型增殖的抗体的能力来鉴别。例如,IL-4ELISA试剂盒可作为IL-7阻断性抗体而获自Genzyme(Cambridge,MA.)。针对IL-9和IL-12的阻断性抗体可获自Genetics Institute(Cambridge,MA.)。然后可确定刺激或阻断VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其结合

伴侣间的相互作用对细胞因子谱的作用。如上文所述并如实施例中所示，VISTA(PD-L3)明显抑制免疫细胞对IL-2和γ干扰素的表达。

[0304] 如上所述的体外免疫细胞共同刺激分析还可用于鉴别新型细胞因子的方法中，所述新型细胞因子可通过调节VISTA(PD-L3)活性而得到调节。例如，当CD28/CTLA4的刺激似乎增强IL-2分泌时，ICOS通路的刺激似乎增强IL-10分泌。Hutloff等，(1999)Nature 397:263。如果在共同刺激时诱导的特定活性(例如免疫细胞增殖)不能通过添加已知细胞因子的阻断性抗体而抑制，那么活性可能由未知细胞因子的作用而产生。在共同刺激后，这种细胞因子可通过常规方法从培养基中纯化，并且通过其诱导免疫细胞增殖的能力来测量其活性。

[0305] 为了鉴别可能在耐受性诱导中发挥作用的细胞因子，可使用如上所述的体外T细胞共同刺激分析。在这种情况下，将给予T细胞以初级活化信号，并将其与所选的细胞因子接触，但不给予共同刺激信号。在洗涤并静置免疫细胞后，将细胞用初级活化信号和共同刺激信号两者进行再攻毒。如果免疫细胞没反应(例如增殖或产生细胞因子)，那么它们已变得耐受，并且细胞因子未阻止耐受性的诱导。然而，如果免疫细胞有反应，那么细胞因子已阻止了耐受性的诱导。可结合以阻断B淋巴细胞抗原的试剂来体内靶向能够阻止耐受性诱导的那些细胞因子以进行阻断，以之作为更有效的手段来诱导移植接受者或患有自体免疫疾病的受试者中的耐受性。例如，可与促进VISTA(PD-L3)活性或者VISTA(PD-L3)与其结合伴侣间的相互作用的试剂一起向受试者施用细胞因子阻断性抗体。

[0306] 因此，总而言之，现在已鉴别了由Treg细胞表达的程序化死亡配体(PDL)家族的新成员。已将这种新型蛋白质命名为VISTA(PD-L3)。这个PD-L家族的受体是含有单个IgV域的I型跨膜蛋白，而配体为表达IgV和IgC细胞外域两者的I型跨膜蛋白。像其它PDL家族成员一样，VISTA(PD-L3)也在体外共同刺激T细胞的αCD3增殖。另外，VISTA(PD-L3)的表达在αCD3活化的Treg中增大并且在αGITR存在下减小。

[0307] 还已经鉴别出第二TNF样蛋白质在受到αCD3/αGITR刺激时会上调。已将这种蛋白质命名为Treg-sTNF。这些蛋白质可能牵涉于免疫性的接触依赖性和旁分泌抑制中，因此适用于调节(例如，抑制或刺激)免疫反应以及治疗涉及Treg信号传导的疾病和病状。例如，VISTA(PD-L3)蛋白可用作共同刺激信号以刺激或增强免疫细胞活化。VISTA(PD-L3)蛋白和VISTA(PD-L3)缀合剂和VISTA(PD-L3)激动剂以及拮抗剂尤其适用于治疗免疫病症，其中需要T细胞免疫性的调节，例如，调节T细胞活化、分化和增殖，并且具体来说是调节CD4+和CD8+T细胞增殖、细胞因子产生以及在T细胞与骨髓源性APC之间的同源相互作用期间的T细胞反应。

[0308] VISTA和VISTA缀合物多肽

[0309] 本发明提供VISTA和VISTA缀合物多肽。本发明人令人惊讶地发现VISTA和VISTA缀合物多肽充当负免疫调节剂。示例性VISTA多肽提供于SEQ ID NO:2、4和5中。本发明的VISTA(PD-L3)分子包括以下至少一个或多个以下域:信号肽域、IgV域、细胞外域、跨膜域或胞浆域。本发明的分离多肽、优选地VISTA(PD-L3)多肽可以包含与SEQ ID NO:2或4或5的氨基酸序列具有足够同一性的氨基酸序列，或由与SEQ ID NO:1或3，或其片段或互补序列具有足够同一性的核苷酸序列编码。如本文中使用，术语“具有足够同一性(sufficiently identical)”是指第一氨基酸或核苷酸序列与第二氨基酸或核苷酸序列含有足够或最小数

目的相同或等效(例如具有类似侧链的氨基酸残基)的氨基酸残基或核苷酸,以使第一和第二氨基酸或核苷酸序列共有共同的结构域或基序和/或共同的功能活性。例如,在本文中将共有共同结构域的氨基酸序列间具有至少30%、40%或50%同源性、优选地60%同源性、更优选地70-80%且甚至更优选地90-95%同源性的共同结构域,并且含有至少一个且优选地两个结构域或基序的氨基酸或核苷酸序列在本文定义为具有足够同一性。此外,共有至少30%、40%或50%、优选地60%、更优选地70-80%或90-95%同源性并且共有共同功能活性的氨基酸或核苷酸序列在本文中定义为具有足够同一性。VISTA多肽的细胞外域可以包含IgV域并且可以包括信号肽域。参见图1和图23。

[0310] VISTA(PD-L3)多肽可以具有至少一个细胞外域,以及以下一个或多个:信号肽域、IgV域、跨膜域和胞浆域,并且优选地由具有在严格杂交条件下与包含本文SEQ ID NO:1或3的核苷酸序列的互补序列的核酸分子杂交的核苷酸序列的核酸分子编码。本文序列表中含有示例的分离的人和鼠类VISTA(PD-L3)cDNA的核苷酸和氨基酸序列以及预测的人VISTA(PD-L3)多肽的氨基酸序列。

[0311] 可以基于“跨膜域”的存在来鉴别本发明的VISTA(PD-L3)多肽。在本文中鉴别了PDL3的跨膜域区域。参见例如图1和图23。可以基于多肽或相应核酸分子中“IgC域”的不存在和“IgV域”的存在来鉴别本发明的VISTA(PD-L3)分子。图1和图23中可见构成IgV域的原生人和鼠类VISTA(PD-L3)多肽的氨基酸残基。VISTA(PD-L3)结合于其天然结合伴侣可能需要存在IgV域。

[0312] 可以使用标准分子生物技术来修饰编码VISTA多肽的核酸,以得到包含至少一种在氨基酸序列中包括但不限于缺失、添加和取代、保留VISTA和VISTA缀合物的特异抗原性(例如VISTA多肽由抗VISTA抗体结合)的VISTA和VISTA缀合物的变体多肽。另外,包含的至少一种VISTA多肽的变体多肽也可以保留VISTA多肽的抗原性(例如,在受试者中进行免疫时,分别针对VISTA多肽和变体VISTA多肽产生特异性免疫反应)。可以用药用载体配制VISTA和VISTA缀合物多肽以制造适用作“癌症疫苗”的抗原组合物(例如针对VISTA和VISTA缀合物引发特异性免疫反应的药物组合物,其在免疫之后在受试者中产生抗肿瘤抗体)。本文所述的VISTA多肽和VISTA缀合物可用于治疗自体免疫病症和炎症疾病。

[0313] 多肽衍生物和类似物

[0314] 应了解,本文所述的多肽可为降解产物、合成肽或重组肽以及肽模拟物、合成肽、类肽和半类肽(例如肽类似物,其可以具有例如使得肽在体内时更稳定或更能够渗入细胞中的修饰)。本文所述的VISTA和VISTA缀合物多肽的修饰包括但不限于N端修饰、C端修饰、肽键修饰(例如CH_2-NH、CH_2-S、CH_2-S=O、O=C-NH、CH_2-O、CH_2-CH_2、S=C-NH、CH=CH或CF=CH),主链修饰和残基修饰。本领域熟知制备肽模拟物化合物的方法。Martin,(2010)Quantitative Drug Design:A Critical Introduction[第2版]CRC Press。

[0315] 肽内的肽键(-CO-NH-)可被取代,例如由以下取代:N-甲基化键(-N(CH_3)-CO-)、酯键(-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-)、酮亚甲基键(-CO-CH2-)、α-氮杂键(-NH-N(R)-CO-),其中R是任何烷基,例如甲基、卡巴键(-CH_2-NH-)、羟基亚乙基键(-CH(OH)-CH_2-)、硫代酰胺键(-CS-NH-)、烯系双键(-CH=CH-)、反向酰胺键(-NH-CO-)、肽衍生物(-N(R)-CH_2-CO-),其中R是天然地呈现在碳原子上的“正”侧链。这些修饰可出现在沿着肽链的任一键处以及甚至同时在几个(2-3)处。

[0316] 天然芳族氨基酸Trp、Tyr和Phe可以被合成的非天然酸如苯基甘氨酸、TIC、萘基丙氨酸(Nol)、苯基丙氨酸的环甲基化衍生物、苯基丙氨酸或邻甲基-酪氨酸的卤代衍生物取代。除上述的以外，本发明的多肽还可以包括一个或多个修饰的氨基酸或一个或多个非氨基酸单体(例如，脂肪酸、复杂碳水化合物)，例如羟脯氨酸、磷酸丝氨酸和二氧膦基苏氨酸；和其它不常见的氨基酸，包括但不限于2-氨基己二酸、羟基赖氨酸、异锁链素、正缬氨酸、正白氨酸和鸟氨酸。此外，术语“氨基酸”包括D-氨基酸与L-氨基酸两者。

[0317] 因为本发明的多肽优选地用于需要肽呈可溶形式的治疗剂中，所以本发明的多肽可以包含一种或多种非天然或天然的极性氨基酸，包括但不限于丝氨酸和苏氨酸，其因含羟基的侧链而能够提高肽的溶解度。

[0318] 本发明的多肽可以呈线性形式，但应了解在情况下也可以利用。

[0319] 本文所述的VISTA和VISTA缀合物多肽可以从已被改变来表达其(例如重组型)的细胞中提纯。可以将编码VISTA和VISTA缀合物多肽的DNA序列插入表达载体中，然后在适当的宿主细胞中转化(或转染)和/或在转基因动物体内表达。然后可以通过本领域已知的方法分离如此表达的VISTA和VISTA缀合物多肽。参见例如Maniatis等,(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[第3版]Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0320] 可以如通过使用标准固相技术以生物化学方式合成本发明的多肽。这些方法包括专用的固相合成、部分固相合成法、片段组合(fragment condensation)、经典的溶液合成。当肽相对短(即10kDa)时和/或当其不能通过重组技术制备(即未由核酸序列编码)并因此涉及不同化学时优选地使用这些方法。固相肽合成程序为本领域所熟知并且由以下文献进一步描述:Stewart(1984)Solid Phase Peptide Syntheses[第2版]Pierce Chemical Company and Benoiton(2005)Chemistry of Peptide Synthesis CRC Pres。可以通过制备型高效液相色谱纯化合成肽，并且可以通过氨基酸测序来证实其组成。参见Creighton(1992)[第2版]Proteins,Structures and Molecular Principles W.H.Freeman and Company;Aguilar(2004)[编]HPLC of Peptides and Proteins:Methods and Protocols Humana Press;Simpson(2002)Protein Sequencing Protocols[第2版]Humana Press。

[0321] 在需要大量本发明的多肽的情况下，可以使用重组技术如以下文献所述的技术来产生本发明的多肽:Invitrogen(2002)“Guide to Baculovirus Expression Vector Systems(BEVs)and Insect Culture Techniques”Instruction Manual;Hatti-Kaul和Mattiasson(2003)[编]Isolation and Purification of Proteins;Ahmed(2004)Principles and Reactions of Protein Extraction,Purification and Characterization CRCPress。另外的重组技术如由以下描述:Bitter等,(1987)Methods in Enzymol.153:516-544;Studier等,(1990)Methods in Enzymol.185:60-89;Brisson等,(1984)Nature 310:511-514;Takamatsu等,(1987)EMBO J.6:307-311;Coruzzi等,(1984)EMBO J.3:1671-1680和Brogli等,(1984)Science 224:838-843;Gurley等,(1986)Mol.Cell.Biol.6:559-565和Weissbach和Weissbach(1988)Methods for Plant Molecular Biology,Academic Press,NY,第VIII部分,第421-463页。

[0322] 多肽序列变体

[0323] 对于本文所述的任何VISTA和VISTA缀合物序列，进一步表征或最优化可以通过系统地添加或移出氨基酸残基以产生较长或较短的肽，以及测试那些序列和通过将较长或较

短尺寸的窗在抗原上从所述点向上或向下移动所产生的序列来实现。如在本领域中已知或如本文所述，将这种产生新候选目标的方法与在免疫原性分析中基于那些序列测试抗原分子的效力结合可以引起对抗原的进一步操纵。又进一步地，可以通过例如在本领域中已知和/或本文所讨论的添加、缺失或其它突变来调节这些优化的序列，以进一步优化VISTA和VISTA缀合物(例如增大血清稳定性或增加循环半衰期、提高热稳定性、增强递送性、增强免疫原性、提高溶解度、靶向特定体内位置或细胞类型)。

[0324] 本文所述的VISTA和VISTA缀合物多肽可以包含保守性取代突变(即一个或多个氨基酸由类似的氨基酸取代)。例如，保守性取代是指用同一大类的另一氨基酸取代一个氨基酸，例如用另一酸性氨基酸取代一个酸性氨基酸、用另一碱性氨基酸取代一个碱性氨基酸，或用另一中性氨基酸取代一个中性氨基酸。

[0325] VISTA和VISTA缀合物多肽序列可以对SEQ ID NO:2、4或5的多肽序列中的任何一个或多个具有至少约60、65、70、75、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％序列同源性。更优选地，本发明涵盖对SEQ ID NO:2、4或5的VISTA和VISTA缀合物多肽序列中的任何一个或多个多肽序列具有至少约95％序列同源性、甚至更优选地至少约98％序列同源性且更优选地至少约99％序列同源性的多肽序列。本领域的普通技术人员熟知测定氨基酸序列以及核酸序列之间的同源性的方法。参见例如Nedelkov和Nelson(2006)New and Emerging Proteomic Techniques Humana Press。

[0326] 因此，VISTA和VISTA缀合物多肽可以与多肽序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的序列同源性。例如，VISTA和VISTA缀合物多肽可以与SEQ ID NO:2、4或5具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的序列同源性。

[0327] 将术语同源性或同一性理解成意指与其它蛋白质一致的氨基酸的数目(同一性)，以百分比表述。优选地借助于计算机程序，通过比较给定序列与其它蛋白质来测定同一性。如果相互比较的序列具有不同长度，那么将以短序列与较长序列共有的氨基酸的数目决定同一性百分比的方式测定同一性。可借助于公开可用的已知计算机程序如ClustalW来常规地测定同一性。Thompson等，(1994)Nucleic Acids Research 22:4673-4680。ClustalW可公开获自欧洲分子生物学实验室(European Molecular Biology Laboratory)，并且可以从多个因特网页面，尤其是IGBMC(Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire)以及EBI和全镜像EBI因特网页面(欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute))下载。如果将1.8版ClustalW计算机程序用于测定例如本申请的参考蛋白与其它蛋白质之间的同一性，那么应设置以下参数:KTUPLE＝1、TOPDIAG＝5、WINDOW＝5、PAIRGAP＝3、GAPOPEN＝10、GAPEXTEND＝0.05、GAPDIST＝8、MAXDIV＝40、MATRIX＝GONNET、ENDGAPS(OFF)、NOPGAP、NOHGAP。也参见在线可得的欧洲生物信息学研究所(EBI)工具箱以及Smith(2002)Protein Sequencing Protocols[第2版]Humana Press。

[0328] 发现类似序列的一种可能性在于进行序列数据库研究。在本文中，一个或多个序列可以作为称为查询项的条项而输入。然后使用统计计算机程序将这个查询序列与所选数据库中存在的序列相比。这些数据库查询(blast搜索)为熟练工人已知并且可以在不同供应商处进行。如果例如在NCBI(国家生物技术信息中心;National Center for

Biotechnology Information)进行这种数据库查询,那么应使用各自比较查询的标准设置。对于蛋白质序列比较(blastp),这些设置是:Limit entrez＝未活化;Filter＝活化的低复杂性;预期值＝10;字号＝3;基质＝BLOSUM62;间隙代价:存在＝11,延伸＝1。除其它参数以外,这种查询的结果是在查询序列与数据库中所见的类似序列之间的同一性程度。

[0329] VISTA和VISTA缀合物包括所述多肽的功能片段。所述多肽的“功能片段”包括编码所述VISTA和VISTA缀合物的基因或cDNA的片段,所述片段能够引发免疫反应(例如体液或细胞免疫反应。)因此,例如,对应于有助于抗原和所述片段的免疫原性的氨基酸残基的根据本发明的VISTA和VISTA缀合物的片段可以用以用作抗原以引发免疫反应(例如体液或细胞免疫反应)。本发明的这个方面还包括根据本发明的多肽的差异性剪接的同种型和转录起始物。根据本发明的多肽还可以包含VISTA和VISTA缀合物的片段、衍生物和等位变体。本领域熟知制备VISTA和VISTA缀合物多肽的片段的方法和材料。参见例如Maniatis等,(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[第3版]Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0330] 变体型VISTA和VISTA缀合物多肽可以保留其抗原特异性以结合其各自抗体(例如变体型VISTA多肽将由抗VISTA抗体结合。)完全抗原变体可以仅含有保守性变异或在非重要残基中或在非重要区域中含有变异。抗原变体也可以含有类似氨基酸的取代,其不会引起抗原性变化或引起不重要的抗原性变化。或者,这些取代可以在某种程度上正面或负面影响抗原性。非抗原性变体典型地在抗原表位的重要残基或重要区域中含有一个或多个非保守性氨基酸取代、缺失、插入、反转或截短,或者取代、插入、反转或缺失。本领域熟知用于修饰VISTA和VISTA缀合物多肽,同时保持多肽对其各自抗体的特异抗原性的分子生物学和生物化学技术。参见例如Ho等,(1989)Gene77(1):51-59;Landt等,(1990)Gene 96(1):125-128;Hopp和Woods(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78(6):3824-3828;Kolaskar和Tongaonkar(1990)FEBS Letters 276(1-2):172-174;和Welling等,(1985)FEBS Letters 188(2):215-218。

[0331] 用作VISTA激动剂(模拟物)或用作VISTA拮抗剂的VISTA多肽的变体。可通过诱变,例如VISTA多肽的不连续点突变或截短来产生VISTA多肽的变体。VISTA多肽的激动剂可基本上保留VISTA多肽的天然存在形式的生物活性或其子集。VISTA多肽的拮抗剂可通过例如竞争性调节VISTA多肽的VISTA介导性活性来抑制VISTA多肽的天然存在形式的一种或多种活性。因此,可通过用功能有限的变体进行治疗来引发特定生物作用。例如,可以用具有多肽的天然存在形式的生物活性的子集的变体治疗受试者,相对于用VISTA多肽的天然存在形式的治疗,所述变体在受试者有较少的副作用。

[0332] 可以通过针对VISTA多肽激动剂或拮抗剂的活性对VISTA多肽的突变体例如截短突变体的组合文库进行筛选来鉴别用作VISTA激动剂(模拟物)或用作VISTA拮抗剂的VISTA多肽的变体。可用主题VISTA(PD-L3)缀合剂治疗的疾病先前已得到鉴别并且包括多种炎症病症、自体免疫病症、癌症、过敏性病症和感染性病症。特别优选的适应症是多发性硬化症。

[0333] 肽模拟物

[0334] 除仅由天然存在的氨基酸组成的VISTA多肽以外,还提供了VISTA肽模拟物。肽类似物在制药行业中常用作性质类似于模板肽的性质的非肽药物。将这些类型的非肽化合物称为“肽模拟物(peptide mimetic)”或“肽模拟物(Peptidomimetic)”(Fauchere(1986)

Adv.Drug Res.15:29;Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics(第2卷)Andrew Abell(编)(1999)JAI Press,Inc.和Evans等,(1987)J.Med.Chem 30:1229)并且通常借助于计算机化分子模型化来开发。在结构上类似于治疗上适用的肽的肽模拟物可用以产生等效的治疗或防治效果。通常,肽模拟物在结构上类似于范例多肽(即,具有生物或药理活性的多肽),如人或小鼠VISTA,但是一个或多个肽键任选地被选自以下项的键置换的肽模拟物:-CH_2NH-、-CH_2S-、-CH_2-CH_2-、-CH=CH-(顺式和反式)、-$COCH_2$-、-CH(OH)CH_2-和-CH_2SO-,所述置换通过本领域已知的方法来实现并且进一步描述于以下参考文献中:Spatola in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids,Peptides,and Proteins Weinstein,B.编,Marcel Dekker,New York,第267(1983)页;Spatola,Vega Data(1983年3月),第1卷,第3号,“Peptide Backbone Modifications”;Morley(1980)Trends.Pharm.Sci.第463-468页;Hudson等,(1979)Int.J.Pept.Prot.Res.14:177-185(-CH_2NH-、CH_2CH_2-);Spatola等,(1986)Life.Sci.38:1243-1249(-CH2-S);Hann,(1982)J.Chem.SoCPerkin.Trans.I 307-314(-CH-CH-,顺式和反式);Almquist等,(1980)J.Med.Chem.23:1392-1398(-$COCH_2$-);Jennings-White等,(1982)Tetrahedron Lett.23:2533(-$COCH_2$-);(-CH(OH)CH_2-);Holladay等,(1983)Tetrahedron.Lett.24:4401-4404(-C(OH)CH_2-);和Hruby(1982)Life Sci.31:189-199(-CH_2-S-)。特别优选的非肽键是-CH_2NH-。这些肽模拟物可以具有优于多肽实施方案的明显优势,包括例如:更经济的制造、更大的化学稳定性、增强的药理性质(半衰期、吸收性、效力、功效)、改变的特异性(例如广谱的生物活性)、减小的抗原性,等等。肽模拟物的标记通常涉及将一个或多个标记直接地或通过间隔子(例如酰胺基)连接于肽模拟物上通过定量结构-活性数据和/或分子模型化所预测的非干扰性位置。这些非干扰性位置通常是不与肽模拟物所结合以产生治疗效果的大分子直接接触的位置。肽模拟物的衍生化(例如标记)基本上不应干扰肽模拟物的所需生物或药理活性。

[0335] 用相同类型的D-氨基酸系统性取代VISTA氨基酸序列的一个或多个氨基酸(例如以D-赖氨酸置换L-赖氨酸)可用以产生较稳定的肽。另外,可通过本领域已知方法产生包含VISTA氨基酸序列或基本上同一的序列变异的限制肽(Rizo和Gierasch(1992)Annu.Rev.Biochem.61:387);例如通过添加能够形成环化所述肽的分子内二硫桥的内部半胱氨酸残基来实现。本文鉴别的VISTA多肽的氨基酸序列将使本领域技术人员能够制得对应于VISTA肽序列和其序列变体的多肽。这些多肽可通过编码VISTA肽序列的多核苷酸的表达在原核或真核宿主细胞中,经常作为较大多肽的部分而制得。或者,可通过化学方法合成这些肽。本领域熟知在重组型宿主中表达异源多肽、化学合成多肽和体外翻译的方法。某些氨基末端和/或羧基末端修饰和/或肽延伸至核心序列可提供有利的物理、化学、生化和药理性质,如:增强的稳定性、增大的效力和/或功效、对血清蛋白酶的抗性、所需的药物动力学性质,等等。可例如通过改变患者的共同刺激来使用肽以治疗上治疗疾病。

[0336] 可以通过本领域已知方法鉴别对于功能必需的氨基酸,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变。Cunningham等,(1989)Sci.244:1081-85。后一程序在分子中的每一残基处引入单一丙氨酸突变。然后测试所得突变型分子的生物活性,如抗原表位结合或体外ADCC活性。对于配体-受体结合重要的位点也可以通过结构分析如结晶学、核磁共振或光亲和标记来测定。Smith等,(1992)J.Mol.Biol.224:899-904;de Vos等,(1992)Sci.255:306-12。

[0337] 例如，一类取代是保守的氨基酸取代。这些取代是用具有类似特征的另一氨基酸取代VISTA和VISTA缀合物多肽中的给定氨基酸的取代。典型地被看做保守性取代的是在脂族氨基酸Ala、Val、Leu和Ile中一个置换另一个；羟基残基Ser和Thr互换、酸性残基Asp和Glu交换、在酰胺残基Asn和Gln之间的取代、碱性残基Lys和Arg的交换、在芳族残基Phe、Tyr中的置换。涉及改变哪个氨基酸可能是表型沉默的指导见于例如Bowie等，(1990)Sci.247:1306-10。因此，本领域的普通技术人员具有没有所有特异性变体的轮廓的肽变体。关于氨基酸序列，技术人员将认识到向核酸、肽、多肽或蛋白质序列中个别地取代、缺失或添加(其会改变、增加或缺失编码序列中的单个氨基酸或较小百分比的氨基酸)是“保守修饰的变体”，其中所述改变引起以化学上类似的氨基酸取代氨基酸。本领域熟知提供功能上类似的氨基酸的保守性取代表。这些保守修饰的变体等位基因附加于并且不排除本发明的多态变体、种间同系物和等位基因。参见例如Creighton(1992)Proteins:Structures and Molecular Properties[第2版]W.H.Freeman。

[0338] 此外，多肽经常含有除二十种“天然存在的”氨基酸以外的氨基酸。此外，许多氨基酸(包括末端氨基酸)可以通过自然方法，如处理和其它翻译后修饰，或通过本领域熟知的化学修饰技术来修饰。已知修饰包括但不限于乙酰化、酰基化、ADP核糖基化、酰胺化、共价连接黄素、共价连接血红素部分、共价连接核苷酸或核苷酸衍生物、共价连接脂质或脂质衍生物、共价连接磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、脱甲基、形成共价交联、形成胱氨酸、形成焦谷氨酸盐、甲酰化、g-羧基化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、解蛋白处理、磷酸化、异戊烯化、外消旋作用、硒化、硫酸化、向蛋白质转移-RNA介导性添加氨基酸如精氨酰化，以及泛素化。参见Creighton(1992)Proteins:Structure and Molecular Properties[第2版]和Lundblad(1995)Techniques in Protein Modification[第1版]。关于这个主题可有许多详细综述。参见例如Wold(1983)Posttranslational Covalent Modification of Proteins Acad.Press,NY;Seifter等，(1990)Meth.Enzymol.182:626-46;和Rattan等，(1992)Ann.NY Acad.Sci.663:48-62。

[0339] 片段

[0340] VISTA多肽的生物活性部分包括参与VISTA分子和非VISTA分子例如VISTA的天然配体之间的相互作用的VISTA多肽的片段。VISTA多肽的生物活性部分包括包含与VISTA多肽的氨基酸序列具有足够同一性或来源于VISTA多肽的氨基酸序列的氨基酸序列的肽，所述VISTA多肽的氨基酸序列例如是SEQ ID NO:2、4或5中所示的氨基酸序列，其包括的氨基酸少于全长VISTA多肽，并且显示VISTA多肽的至少一种活性。典型地，生物活性部分包含具有VISTA多肽的至少一种活性的域或基序，所述活性例如是调节(抑制)CD4 T细胞对抗CD3的增殖性反应、以抗原特异性方式抑制同源CD4 T细胞的增殖反应、对特异性细胞因子的表达的作用。VISTA多肽的生物活性部分可为长度是例如25、50、75、100、125、150、175、200、225个或更多个氨基酸的多肽。可将VISTA多肽的生物活性部分用作显影剂的目标，其会调节VISTA介导性活性，例如免疫细胞活化。

[0341] VISTA多肽的生物活性部分可以包含细胞外域的至少一部分。VISTA多肽的生物活性部分可以含有细胞外域的至少一部分(例如包含IgV)，以及以下域中一个或多个：信号肽域、跨膜域或胞浆域。此外，可通过重组技术制备缺失多肽的其它区的其它生物活性部分并且评价原生VISTA多肽的一种或多种功能活性。

[0342] VISTA多肽可以具有SEQ ID NO:2、4或5中所示的氨基酸序列。VISTA多肽可以与SEQ ID NO:2、4或5具有基本同一性，并且保留SEQ ID NO:2、4或5的多肽的功能活性，但是氨基酸序列因如本文所述的天然等位变异或诱变而仍不同。

[0343] 融合蛋白

[0344] 包含VISTA和VISTA缀合物多肽的融合物也在本发明的范围内。例如，可以使融合蛋白连接于GST融合蛋白，其中VISTA和VISTA缀合物多肽序列与GST序列的C端融合。这些融合蛋白可以有助于重组型VISTA和VISTA缀合物多肽的纯化。或者，可以使VISTA和VISTA缀合物多肽与结合B细胞小囊的蛋白质融合，因此引发体液免疫反应和T细胞活化两者。Berney等，(1999)J.Exp.Med.190:851-60。或者，例如，VISTA和VISTA缀合物多肽可以与抗树突细胞抗体基因偶联以将抗原递送到免疫系统并且刺激细胞免疫反应。He等，(2004)Clin.Cancer Res.10:1920-27。可以通过标准重组DNA技术来制得本发明的嵌合或融合蛋白。例如，根据常规技术，例如通过采用用于接合的平头或交错头端、提供适当末端的限制酶消化、适当时粘聚末端填充、避免不合需要的接合的碱性磷酸酶处理和酶促接合将编码不同多肽序列的DNA片段框内接合在一起。可以通过常规技术，包括自动DNA合成仪来合成融合基因。

[0345] 融合蛋白可以包括C端或N端移位序列。此外，融合蛋白可包含例如用于蛋白质检测、纯化或其它应用的其它元件。有助于探测和纯化的域包括但不限于金属螯合肽如多组氨酸道、组氨酸-色氨酸模块或允许在固定金属上纯化的其它域；麦芽糖结合蛋白；允许在固定免疫球蛋白上纯化的蛋白质A域；或用于FLAG延伸/亲和纯化体系的域(Immunex Corp，Seattle WA.)。

[0346] 可以通过与包含免疫球蛋白恒定区的免疫球蛋白的一部分融合而从本发明的蛋白质制备融合蛋白。更优选地，免疫球蛋白的部分包含重链恒定区，任选地且更优选地，其包含人重链恒定区。重链恒定区最优选地是IgG重链恒定区，并且任选地且最优选地是Fc链，最优选地是包含CH2和CH3域的IgGFc片段。虽然可以任选地使用任何IgG亚型，但是优选IgG1亚型。Fc链可以任选地是已知的或“野生型”Fc链，或可选地可以突变。参见例如美国专利申请公布号2006/0034852。术语“Fc链”还任选地包含任何类型的Fc片段。已经鉴别出涉及IgG子类中抗体恒定区介导性活性的特异性氨基酸残基中的一些。总之，取代或排除这些特异性氨基酸因此允许包括或排除特异性免疫球蛋白恒定区介导性活性。此外，特定变化可以引起Fc链的例如无糖基化和/或其它所需的变化。可以任选地产生至少一些变化以阻断Fc的被认为不合需要的功能，如不合需要的免疫系统作用。参见McCafferty等，(2002)Antibody Engineering:A Practical Approach(编)Oxford University Press。

[0347] 在移位域(用于有效质膜表达)和新翻译的多肽的其余部分之间包括可裂解连接子序列如因子Xa(参见例如Ottavi，(1998)Biochimie80:289-93)、枯草杆菌蛋白酶识别基序(参见例如Polyak(1997)ProteinEng.10:615-19)；肠激酶(Invitrogen，San Diego，CA.)可适用于帮助纯化。例如，一个构建体可包括编码依次连接于六个组氨酸残基和硫氧还原蛋白、肠激酶裂解位点(参见例如Williams(1995)Biochemistry 34:1787-97)和C端移位域的核酸序列的多肽。组氨酸残基有助于检测和纯化，而肠激酶裂解位点提供从融合蛋白的其余部分纯化所需蛋白质的手段。关于编码融合蛋白的载体和应用融合蛋白的技术充分描述于科学和专利文献中。参见例如Kroll(1993)DNA Cell.Biol.12:441-53。

[0348] 融合蛋白可为GST-VISTA融合蛋白，其中VISTA序列与GST序列的C端融合。这些融合蛋白可有助于重组型VISTA的纯化。在另一实施方案中，融合蛋白为在其N端含有异源信号序列的VISTA多肽。在某些宿主细胞(哺乳动物宿主细胞)中，VISTA的表达和/或分泌可通过使用异源信号序列来增大。在一个实施方案中，融合蛋白是Ig-VISTA融合蛋白，其中VISTA序列与Ig分子的一部分融合。融合蛋白的Ig部分可包括免疫球蛋白恒定区，例如人Cγ1域或Cγ4域(例如人IgCγ1或人IgCγ4的铰链、CH2和CH3区(参见例如美国专利5,116,964;5,580,756;5,844,095)。所得融合蛋白可以具有改变的VISTA溶解度、结合亲和力、稳定性和/或原子价(即，每个分子的结合位点数目)并且可增大蛋白质纯化的效率。

[0349] 特别优选的VISTA Ig融合蛋白包括与免疫球蛋白恒定区(例如Fc区)偶联的VISTA的细胞外域部分。免疫球蛋白恒定区可以含有基因修饰，所述基因修饰会减少或消除免疫球蛋白结构中内在的效应物活性。例如，编码VISTA多肽的细胞外部分的DNA可接合于编码通过定点诱变修饰的人IgGγ1和/或IgGγ4的铰链、CH2和CH3区的DNA，例如WO 97/28267中所教导。可将本发明的VISTA融合蛋白并入药物组合物中并且对受试者施用。VISTA融合蛋白可用以影响VISTA结合伴侣的生物利用率。使用VISTA融合蛋白可以在治疗上适用于治疗将受益于免疫反应调节的病状或病症。此外，本发明的VISTA融合蛋白可用作免疫原以在受试者中产生抗VISTA抗体、以纯化VISTA结合蛋白，并且可用于鉴别抑制VISTA与其天然结合伴侣的相互作用的分子的筛选分析中。

[0350] 缀合物

[0351] VISTA和VISTA缀合物、结合VISTA和VISTA缀合物的抗体和其片段可以结合于其它部分。这些缀合物经常用于疫苗制备。VISTA和VISTA缀合物多肽可以结合于碳水化合物(例如甘露糖、海藻糖、葡萄糖GlcNA、麦芽糖)，其由存在于树突细胞和巨噬细胞上的甘露糖受体识别。接着发生的结合、聚集和受体介导性内吞和吞噬功能提供增强的先天性和适应性免疫。参见Mahnke等，(2000)J.Cell Biol.151:673-84;Dong等，(1999)J.Immonol.163:5427-34。

[0352] 适于结合以引发免疫反应的其它部分包括但不限于钥孔戚血兰蛋白(KLH)、白喉类毒素、霍乱类毒素、假单胞菌属胞外蛋白A和微生物外膜蛋白(OMPS)。

[0353] 多肽分离

[0354] 本发明还提供用于分离VISTA和VISTA缀合物多肽的方法。例如，有关细胞系或肿瘤样本可以获自癌症患者。在洗涤剂中均化和溶解之后，用色谱纯化抗原。尺寸排除或亲和色谱可以用于此，并且可以与抗VISTA和抗VISTA-Ig缀合物抗体组合使用。例如，可以将抗VISTA或抗VISTA-Ig缀合物抗体固定在固体支撑物上(例如与树脂、磁性珠粒偶联)以进行简单的抗原吸附、洗涤和从固体支撑物洗脱。然后进一步研究洗脱的蛋白质的抗原存在、进行表征和鉴别。参见Walker(2002)Protein Protocols Handbook[第2版]Humana Press and Culture(2003)[编]Protein Purification Protocols Humana Press。

[0355] 可以使用常规的药用赋形剂和载体物质将这样分离的抗原用于制备药物。例如，以生理NaCl溶液形式体内施用纯化抗原。

[0356] 另外，根据本发明的VISTA和VISTA缀合物多肽可以在鉴别活性(作为高产量筛选的部分)中充当抗原。本领域技术人员已知高产量筛选法。Wells(2002)High Throughout Bioanalytical Sample Preparation Elsevier Health Sciences。

[0357] 编码VISTA和VISTA缀合物的多核苷酸

[0358] 本发明还提供编码VISTA和VISTA缀合物的核苷酸。本发明还提供包含编码VISTA多肽的SEQ ID NO:1和3的核酸序列的多核苷酸。本发明还提供可与本文所述的多核苷酸序列杂交的片段、序列以及与本文所述的多核苷酸序列至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同系的序列。

[0359] 本发明还提供包含编码类似多肽的至少一个VISTA和VISTA缀合物序列的多核苷酸，所述类似多肽具有不同的密码子使用、特征在于突变如缺失、插入或取代一个或多个核苷酸的改变的序列，是天然存在的或人为的、随机的或呈靶向方式的。本发明还涵盖同系核酸序列(例如其形成本发明的多核苷酸序列的一部分)，其包括对于本发明的多核苷酸独特的序列区域。

[0360] 本发明还涵盖编码VISTA和VISTA缀合物多肽的同系物的核酸，这些同系物可与本文所述氨基酸序列具有至少约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性同系，如可使用国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastP软件使用缺省参数来测定。本发明还涵盖具有突变如缺失、插入或取代一个或多个核酸的上述多核苷酸和多肽的片段，其为天然存在的或人为的、随机的或呈靶向方式的。

[0361] 核酸分子可编码VISTA和VISTA缀合物，或所述核酸分子的功能片段。所述核酸的“功能片段”包括编码所述VISTA和VISTA缀合物的基因或cDNA的片段，所述片段能够表达以产生能够引发免疫反应的VISTA和VISTA缀合物(例如选择性结合VISTA和VISTA缀合物的抗体)。因此，例如，对应于有助于抗原免疫原性的氨基酸残基的根据本发明的VISTA和VISTA缀合物以及所述片段可用做引发免疫反应(例如体液或细胞免疫反应)的抗原。本发明的这个方面还包括根据本发明的核酸的差异性剪接的同种型和转录起始物。根据本发明的核酸分子还包含根据本发明的编码VISTA和VISTA缀合物的上述的核酸分子的片段、衍生物和等位变体。本领域熟知用于制备编码VISTA和VISTA缀合物多肽的片段的核酸的方法和材料。参见例如Maniatis等，(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[第3版]Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0362] 涵盖SEQ ID NO:1、3的全部或一部分的核酸分子，或直系同源体或变体可通过聚合酶链反应(PCR)使用基于SEQ ID NO:1、2、3、4或5的序列设计的合成寡核苷酸引物来分离。

[0363] 可根据标准PCR扩增技术，使用cDNA、mRNA或可选地基因组DNA作为模板和适当寡核苷酸引物来扩增本发明的核酸分子。可将如此扩增的核酸分子克隆到适当载体中并且通过DNA序列分析来表征。此外，可通过标准合成技术，例如使用自动DNA合成仪来制备对应于VISTA(PD-L3)核苷酸序列的寡核苷酸。

[0364] 在一个实施方案中，编码本发明的核酸分子的分离VISTA包含SEQ ID NO:1或3中所示的核苷酸序列或其片段。在另一实施方案中，本发明的核酸分子包含核酸分子，其为SEQ ID NO:1或3中所示的核苷酸序列的互补序列，或这些核苷酸序列中的任一个的一部分。与SEQ ID NO:1或3中所示的核苷酸序列互补的核酸分子是与SEQ ID NO:1或3中所示的核苷酸序列足够互补以使其可与SEQ ID NO:1或3中所示的核苷酸序列分别杂交，从而形成

稳定双链体的核酸分子。

[0365] 在另一实施方案中，本发明的分离的核酸分子包含与SEQ ID NO:1或3中所示的核苷酸序列的全长或这些核苷酸序列中的任一个的一部分具有至少约70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或99.5％同一性的核苷酸序列。

[0366] 此外，本发明的核酸分子可仅包含SEQ ID NO:1或3的核酸序列的一部分，例如可用作探针或引物的片段，或编码VISTA多肽的一部分，例如VISTA多肽的生物活性部分的片段。从人PD-L2基因的克隆测定的核苷酸序列允许产生设计以用于鉴别和/或克隆其它PD-L2家族成员，以及来自其它物种的VISTA同系物的探针和引物。探针/引物典型地包含基本上纯化的寡核苷酸。寡核苷酸典型地包含在严格条件下与SEQ ID NO:1或3的有义序列；SEQ ID NO:1、3的反义序列；或SEQ ID NO:1或3的天然存在的等位变体或突变体的至少约12或15、优选地约20或25、更优选约30、35、40、45、50、55、60、65或75个连续核苷酸杂交的核苷酸序列区。

[0367] 在一个实施方案中，本发明的核酸分子包含长度大于约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个或更多个核苷酸的核苷酸序列，并在严格杂交条件下与SEQ ID NO:1或3或其互补序列的核酸分子杂交。在另一实施方案中，本发明的核酸分子包含长度大于约880-900、900-950、950-1000、1000-1050、1050-1100、1100-1150个或更多个核苷酸的核苷酸序列，并在严格杂交条件下与SEQ IDNO:1或3或其互补序列杂交的核酸分子。在又一个实施方案中，本发明的核酸分子包含长度大于约50-100、100-150、150-200、200-250、250-300个或更多个核苷酸的核苷酸序列，并在严格杂交条件下与包含SEQ ID NO:1或3或其互补序列中的编码区杂交的核酸分子。在又一个的实施方案中，本发明的核酸分子包含长度大于约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个或更多个核苷酸的核苷酸序列，包括构成SEQ ID NO:1或3的编码区的序列或其互补序列的至少约15个(即，15个邻近的)核苷酸，并在严格杂交条件下与包含SEQ ID NO:1或3所示的核苷酸序列或其互补序列杂交的核酸分子。

[0368] 基于VISTA核苷酸序列的探针可用于检测转录物或编码相同或同系多肽的基因组序列。在实施方案中，探针进一步包含连接于其上的标签组，例如，标记组可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。这些探针可用作诊断测试试剂盒的一部分，以鉴别误表达VISTA多肽的细胞或组织，如通过测量受试者细胞样本中编码VISTA的核酸的水平，例如检测VISTA mRNA水平或确定基因组VISTA基因是否已突变或缺失。

[0369] 除SEQ ID NO:1和3的VISTA核苷酸序列以外，本领域技术人员应了解引起VISTA多肽的氨基酸序列发生变化的DNA序列多态性可存在于群体(例如人群)中。在VISTA基因中的这种遗传多态性可因天然等位变异而存在于群体的个体中。如本文所用，术语“基因”和“重组基因”是指包括编码VISTA多肽、优选地哺乳动物VISTA多肽的开放阅读框的核酸分子，并且可进一步包含非编码调控序列和内含子。

[0370] 人或小鼠VISTA的等位变体包括功能性和非功能性VISTA多肽两者。功能性等位变体是人或小鼠VISTA多肽的天然存在的氨基酸序列变体，其维持结合天然VISTA结合伴侣

和/或调节CD4+和CD8+T细胞增殖和细胞因子产生以及淋巴细胞活化的能力。功能性等位变体将典型地只含SEQ IDNO:2、4或5的一个或多个氨基酸的保守取代,或多肽非重要区域中非重要残基的取代、缺失或插入。

[0371] 非功能性等位变体是人或小鼠VISTA多肽的天然存在的氨基酸序列变体,其不具有结合天然VISTA结合伴侣和/或调节本文所述的任何VISTA活性的能力。非功能性等位变体将典型地含有SEQ ID NO:2、4或5的氨基酸序列的非保守取代、缺失或插入或过早截短,或多肽的重要残基或重要区域(例如在IgV域中)的取代、插入或缺失。

[0372] 本本发明进一步提供人或小鼠VISTA多肽的非人、非小鼠直系同源体。人或小鼠VISTA多肽的直系同源体是从非人非小鼠生物体中分离而得并具有与本文所公开的人和鼠类VISTA多肽相同的结合活性和/或淋巴细胞活化调节活性以及调节CD4+和CD8+T细胞增殖和细胞因子产生的能力的多肽。人或小鼠PD-L3多肽的直系同源体可作为包含与SEQ ID NO:2、4或5具有基本同一性的氨基酸序列而容易地鉴别。

[0373] 可以分析突变型VISTA多肽结合于和/或调节天然VISTA结合伴侣、调节细胞内或细胞间信号传导、调节T淋巴细胞活化和/或调节生物体免疫反应的能力。

[0374] 编码VISTA或VISTA融合蛋白的分离的核酸分子。可通过标准的重组DNA技术制备这些核酸分子,这些核酸分子至少包含可操作地连接于编码非VISTA蛋白、多肽或肽的第二核苷酸序列的编码VISTA或VISTA蛋白的第一核苷酸序列。

[0375] 此外,同一性泛指在所涉及核酸分子或其所编码的蛋白质之间存在的功能和/或结构等效性。与上述分子同系并且构成这些分子的衍生物的核酸分子通常是这些分子的变体,其构成修饰,而所述修饰执行相同的生物功能。同时,变体可以天然存在,例如其可为来自其它物种的序列,或其可为突变体,其中这些突变体可能已经以天然方式出现或者已经通过目标诱变来引入。变体也可以是合成制造的序列。等位变体可以是天然存在的变体以及合成制造的变体或通过重组DNA技术制得的变体。因遗传密码的简并而偏离根据本发明的核酸分子的核酸分子构成衍生物的特别形式。

[0376] 还包括在本发明的范围内的是编码其VISTA和VISTA缀合物的氨基酸序列的任何核苷酸序列。因为遗传密码是简并的,所以一个以上的密码子可用于编码特定氨基酸。可以使用遗传密码来鉴别一种或多种不同的核苷酸,所述核苷酸各自将能够编码氨基酸。可以如下估算特定核苷酸将实际上构成实际密码子编码序列的概率:考虑异常碱基配对关系和特定密码子在表达其VISTA和VISTA缀合物的真核细胞或原核细胞中实际使用(用于编码特定氨基酸)的频率。Lathe等,(1985)J.Molec.Biol.183:1-12公开了这些“密码子使用规则”。

[0377] 经过修饰的VISTA和VISTA缀合物多核苷酸

[0378] 本发明的核苷酸可为经过修饰的多核苷酸。未经过修饰的核苷酸在一些应用中经常不太好,例如倾向于被细胞核酸酶降解。对一个或多个寡核苷酸亚单元的化学修饰可赋予改进的性质,例如可使多核苷酸对核酸酶更稳定。典型的寡核苷酸修饰在本领域中是熟知的并且可以包括以下一个或多个:(i)改变,例如置换磷酸二酯糖间键中的非连接性磷酸酯氧中的一或两个和/或连接性磷酸酯氧中的一个或多个;(ii)改变,例如置换核糖的成分,例如修饰或置换核糖上的2’羟基;(iii)批量置换磷酸酯部分;(iv)用非天然的碱修饰或置换天然存在碱;(v)例如用肽核酸(PNA)置换或修饰核糖-磷酸酯主链;(vi)修饰寡核苷

酸的3'端或5'端;以及(vii)修饰糖,例如六元环。根据本发明使用的多核苷酸可以通过任何数目的在本领域中熟知的手段合成,或从多个商业供应商(LC Sciences,Houston,TX;Promega,Madison,WI;Invitrogen,Carlsbad,CA)购买。

[0379] 反义

[0380] 除编码上述VISTA多肽的核酸分子以外,本发明的另一实施方案涉及对其反义的分离核酸分子。"反义"核酸包含与编码多肽的"有义"核酸互补,例如与双链cDNA分子的编码链互补或与mRNA序列互补的核苷酸序列。因此,反义核酸可氢键合于有义核酸。反义核酸可与整个VISTA编码链或仅与其部分互补。在一个实施方案中,反义核酸分子与编码VISTA的核苷酸序列的编码链"编码区"反义。术语"编码区"是指包含密码子的核苷酸序列的翻译到氨基酸残基中的区域。在另一实施方案中,反义核酸分子与编码PD-L的核苷酸序列的编码链的"非编码区"反义。术语"非编码区"是指其没有翻译到氨基酸中的侧接编码区的5'和3'序列(还称为5'和3'未翻译区)。给定编码人或小鼠VISTA或本文公开的VISTA的编码链序列,可根据沃森和克里克碱基配对规则来设计本发明的反义核酸。反义核酸分子可与VISTA mRNA的整个编码区互补,但是更优选的是与VISTA mRNA的编码区或非编码区的仅一部分反义的寡核苷酸。例如,反义寡核苷酸可与围绕VISTA或VISTA mRNA的翻译起始位点的区域互补。反义寡核苷酸的长度可为例如约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个核苷酸。可使用在本领域中已知的程序,使用化学合成和酶促接合反应来构建本发明的反义核酸分子。例如,可使用天然存在的核苷酸或不同地修饰的设计以增大分子的生物稳定性或增大在反义核酸和有义核酸之间形成的双链体的物理稳定性的核苷酸来化学合成反义核酸分子(例如反义寡核苷酸),例如可使用硫代磷酸酯衍生物和吖啶取代的核苷酸。可用以产生反义核酸的经过修饰的核苷酸的实例包括5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞密啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧基甲氨基甲基-2-硫尿核苷、5-羧基甲氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖Q核苷、肌苷、N6-异戊烯基腺苷、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基Q核苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、怀丁苷、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶、(acp3)w和2,6-二氨基嘌呤。或者,可使用已经以反义取向亚克隆有核酸的表达载体(即,从插入核酸转录的RNA将具有与相关目标核酸反义的取向,这在以下分段中进一步描述),以生物学方式制备反义核酸。

[0381] 本发明的反义核酸分子典型地施用于受试者或原位产生以使其与编码VISTA或VISTA多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA杂交或结合,从而抑制多肽表达,例如通过抑制转录和/或翻译来实现。杂交可通过常规的核苷酸互补性来实现以形成稳定的双链体,或例如在结合于DNA双链体的反义核酸分子的情况下,通过双螺旋大沟中的特异性相互作用来实现。本发明的反义核酸分子的施用途径的一个实例包括在组织部位处直接注射。或者,可修饰反义核酸分子以靶向所选细胞,然后全身性施用。例如,对于全身性施用,可对反义分子进行修饰,使得其特异性结合于在所选细胞表面表达的受体或抗原,例如通过将反义核酸分子连接到结合到细胞表面受体或抗原的肽或抗体。反义核酸分子还可使用本文所述的载体

递送到细胞。为了实现反义分子足够的细胞内浓度，在强pol II或pol III启动子的控制下放置反义核酸分子的载体构建体是优选的。

[0382] VISTA反义核酸分子可为α-异头核酸分子。α-异头核酸分子与互补性RNA形成特异性双链杂交体，其中与通常的β单元相反，链的走向彼此平行。Gaultier等，(1987)Nucleic Acids Res.15:6625-6641。反义核酸分子还可以包含2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue等，(1987)Nucleic Acids Res.15:6131-6148)或嵌合RNA-DNA类似物(Inoue等，(1987)FEBS Lett.215:327-330)。

[0383] VISTA反义核酸可为核糖酶。核糖酶是具有核糖核酸酶活性的催化性RNA分子，其能够裂解与其具有互补区的单链核酸，如mRNA。因此，核糖酶(例如锤头核糖酶(在Haseloff和Gerlach(1988)Nature334:585-591中有所描述))可用于催化裂解VISTA mRNA转录物从而抑制VISTA mRNA的翻译。对编码VISTA编码核酸具有特异性的核糖酶可基于本文所公开的VISTA cDNA的核苷酸序列(即SEQ ID NO:1或3)而设计。例如，可构建四膜虫L-19 IVS RNA的衍生物，其中活性位点的核苷酸序列与VISTA编码mRNA中待裂解的核苷酸序列互补。参见例如美国专利4,987,071和美国专利5,116,742。或者，VISTA mRNA可用于从RNA分子库中选择具有特定核糖核酸酶活性的催化性RNA。参见例如Bartel和Szostak(1993)Science 261:1411-1418。

[0384] 或者，可如下抑制VISTA基因表达：靶向与VISTA的调节区(例如VISTA启动子和/或增强子)互补的核苷酸序列以形成防止目标细胞中PD-L3基因转录的三螺旋结构。通常参见Helene(1991)Anticancer Drug Des.6(6):569-84；Helene等，(1992)Ann.N.Y.Acad.Sci.660:27-36；和Maher,L.J.(1992)Bioessays 14(12):807-15。

[0385] 肽核酸

[0386] 在又一个实施方案中，可修饰本发明的VISTA核酸分子的碱基部分、糖部分或磷酸酯主链以提高例如分子的稳定性、杂交或溶解度。例如，可修饰核酸分子的脱氧核糖磷酸主链以产生肽核酸。参见Hyrup和Nielsen(1996)Bioorg.Med.Chem.4(1):5-23。如本文所用，术语"肽核酸"或"PNA"是指核酸模拟物，如DNA模拟物，其中脱氧核糖磷酸主链被伪肽主链置换，并且只有四个天然核碱基得以保留。已显示PNA的中性主链允许在低离子强度条件下与DNA和RNA特异性杂交。PNA寡聚物的合成可使用标准固相肽合成方案进行，如在前述Hyrup和Nielsen(1996)以及Perry-O'Keefe等，(1996)Proc Natl.Acad.Sci.USA 93:14670-675中所述。

[0387] VISTA核酸分子的PNA可用于治疗和诊断应用。例如，PNA可用作反义或有义剂用于基因表达的序列特异性调节，通过例如诱导转录或翻译停滞或通过抑制复制来实现。VISTA核酸分子的PNA还可用于对基因中单一碱基对突变进行分析(例如，通过PNA指导的PCR发夹技术来实现)；作为与其它酶组合使用时的'人工限制酶'(例如，S1核酸酶(Hyrup和Nielsen(1996)同上))；或作为探针或引物用于DNA测序或杂交(Hyrup和Nielsen(1996)同上；Perry-O'Keefe等(1996)同上)。

[0388] 可修饰VISTA的PNA(例如以增强其稳定性或细胞摄取)，通过将亲脂性或其它辅助基团连接到PNA，通过形成PNA-DNA嵌合体或通过使用脂质体，或本领域已知的其它药物递送技术来实现。例如，能产生可组合PNA和DNA的有利性质的VISTA核酸分子的PNA-DNA嵌合体。这些嵌合体允许DNA识别酶(如RNA酶H和DNA聚合酶)与DNA部分相互作用，同时PNA部分

将提供高结合亲和力和特异性。PNA-DNA嵌合体可使用根据碱基堆积、核碱基之间的键数以及取向选择的适当长度的连接子连接(Hyrup和Nielsen(1996)同上)。PNA-DNA嵌合体的合成可如Hyrup和Nielsen(1996)同上,和Finn P.J.等(1996)Nucleic Acids Res.24(17):3357-63中所述进行。例如,DNA链可在固体支撑物上使用标准亚磷酰胺偶联化学来合成,而修饰的核苷类似物,如5'-(4-甲氧基三苯甲基)氨基-5'-脱氧胸苷亚磷酰胺可用作PNA与DNA的5'末端之间的桥(Mag,M.等,(1989)Nucleic Acids Res.17:5973-88)。然后按逐步方式偶联PNA单体,以与5'PNA片段和3'DNA片段产生嵌合分子(Finn P.J.等,(1996)同上)。或者,嵌合分子可用5'DNA片段和3'PNA片段合成(Peterser等,(1975)Bioorganic Med.Chem.Lett.5:1119-11124)。

[0389] 寡核苷酸

[0390] 寡核苷酸可以包括其它附加基团,如肽(例如用于体内靶向宿主细胞受体)或利于跨细胞膜(参见例如Letsinger等,(1989)Proc Natl.Acad.Sci.USA 86:6553-6556;Lemaitre等,(1987)Proc Natl.Acad.Sci.USA 84:648-652;PCT公开号WO 88/09810)或血脑屏障(参见例如PCT公开号WO 89/10134)转运的试剂。另外,寡核苷酸可用杂交触发裂解剂(参见例如Krol等,(1988)Biotechniques 6:958-976)或嵌入剂(参见例如Zon(1988)Pharm.Res.5:539-549)进行修饰。为此,可将寡核苷酸结合于另一分子(例如肽、杂交触发交联剂、转运剂或杂交触发的裂解剂)。

[0391] siRNA

[0392] 小干扰性RNA(siRNA)是一类长度通常为约20-25个核苷酸的双链RNA分子,其结合于特异性mRNA并且引导其发生mRNA降解,因此抑制基因转录(例如表达)。参见Hamilton和Baulcombe(1999)Science 286(5441):950-2和Elbashir等,(2001)Nature 411(6836):494-8。还可能利用核糖酶或RNA干扰(siRNA)技术,其通过破坏信使RNA来防止基因产生功能蛋白。siRNA分子可以结合于从包含SEQ ID NO:1或3的核酸序列的VISTA DNA转录的VISTA mRNA。siRNA分子可以结合于从编码SEQ ID NO:2、4或5中所述的氨基酸序列的VISTA DNA转录的VISTA mRNA。

[0393] 靶向从VISTA DNA转录的VISTA mRNA的siRNA分子可以包含SEQ ID NO:1或3的核酸序列。靶向从VISTA DNA转录的VISTA mRNA的siRNA分子编码SEQ ID NO:2、4或5中所述的氨基酸序列。靶向VISTA的siRNA分子可以包含由SEQ ID NO:38-67中任一个的核酸序列。靶向VISTA的ORF或UTR区的siRNA分子可以包含SEQ ID NO:38-47中任一个的氨基酸序列。仅靶向VISTA的UTR区的siRNA分子可以包含SEQ ID NO:48-57中任一个的氨基酸序列。仅靶向VISTA的ORF区的siRNA分子可以包含SEQ ID NO:58-67中任一个的氨基酸序列。靶向VISTA的siRNA分子可以由SEQ ID NO:38-67中任一个的核酸序列组成。靶向VISTA的ORF或UTR区的siRNA分子可以由SEQ ID NO:38-47中任一个的氨基酸序列组成。仅靶向VISTA的UTR区的siRNA分子可以由SEQ ID NO:48-57中任一个的氨基酸序列组成。仅靶向VISTA的ORF区的siRNA分子可以由SEQ ID NO:58-67中任一个的氨基酸序列组成。

[0394] 表1:人VISTA的siRNA

[0395]

siRNA序列	VISTA的目标区域	SEQ ID NO:
GGGCACGATGTGACCTTCTACAAGA	ORF	38

CAGATGCCAAATGACTTACATCTTA	UTR3	39
GAGATGGATTGTAAGAGCCAGTTTA	UTR3	40
GGGCTTTGAGGAGAGGGTAAACATA	UTR3	41
CCTATCTCCTGACATTCACAGTTTA	UTR3	42
CAGTTTAATAGAGACTTCCTGCCTT	UTR3	43
CAGGGAGAGGCTGAAGGAATGGAAT	UTR3	44
GGAATGTGTTGAGAGGGATTCTGAA	UTR3	45
GAGAGGGATTCTGAATGATCAATAT	UTR3	46
CACAGAGGGCAATAGAGGTTCTGAA	UTR3	47
CAGATGCCAAATGACTTACATCTTA	UTR3	48
GAGATGGATTGTAAGAGCCAGTTTA	UTR3	49
GGTGAGTCCTCTGTGGAATTGTGAT	UTR3	50
GGGCTTTGAGGAGAGGGTAAACATA	UTR3	51
CCTATCTCCTGACATTCACAGTTTA	UTR3	52

[0396]

CAGTTTAATAGAGACTTCCTGCCTT	UTR3	53
CAGGGAGAGGCTGAAGGAATGGAAT	UTR3	54
GGAATGTGTTGAGAGGGATTCTGAA	UTR3	55
GAGAGGGATTCTGAATGATCAATAT	UTR3	56
CACAGAGGGCAATAGAGGTTCTGAA	UTR3	57
ACAAAGGGCACGATGTGACCTTCTA	ORF	58
GGGCACGATGTGACCTTCTACAAGA	ORF	59
GACCACCATGGCAACTTCTCCATCA	ORF	60
CAGACAGGCAAAGATGCACCATCCA	ORF	61
GGCAAAGATGCACCATCCAACTGTG	ORF	62
CCATCCAACTGTGTGGTGTACCCAT	ORF	63
GGATGGACAGCAACATTCAAGGGAT	ORF	64
GACAGCAACATTCAAGGGATTGAAA	ORF	65
CCCTGTCCCTGACTCTCCAAACTTT	ORF	66
CCTGACTCTCCAAACTTTGAGGTCA	ORF	67

[0397] 表达

[0398] 本发明的VISTA和VISTA缀合物的分离和表达可以通过公认的克隆程序来实现，所述克隆程序使用基于本申请中公开的VISTA和VISTA缀合物核酸序列来构建的探针或引物。也可以使用本文公开的序列和已知的基于计算机的搜索技术例如BLAST序列检索从人或其它物种基因组数据库中鉴别出相关VISTA和VISTA缀合物序列。本文公开的假基因可用于鉴别功能性等位基因或相关基因。

[0399] 然后可使用表达载体以感染或转染宿主细胞以对这些序列进行功能性表达。这些

基因和载体可在体外或体内产生和表达。本领域技术人员将认识到，可通过调节本发明的载体内的基因和核酸(例如启动子、增强子)的表达或活性来获得用于改变和控制核酸表达的所需表型。可使用针对增大或减小表达或活性所述的任何已知方法。

[0400] 在另一实施方案中，重组型哺乳动物表达载体能够引导核酸优先地在特定细胞类型(例如将组织特异性调控元件用于表达核酸)中表达。在本领域中已知组织特异性调控元件。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝特异性;Pinkert等,(1987)Genes Dev.1:268-277)、淋巴特异性启动子(Calame和Eaton(1988)Adv.Immunol.43:235-275)、T细胞受体的特定启动子(Winoto和Baltimore(1989)EMBO J.8:729-733)和免疫球蛋白(Banerji等,(1983)Cell33:729-740;Queen和Baltimore(1983)Cell 33:741-748)、神经元特异性启动子(神经丝启动子;Byrne和Ruddle(1989)Proc Natl.Acad.Sci.USA 86:5473-5477)、胰腺特异性启动子(Edlund等,(1985)Science230:912-916)，和乳腺特异性启动子(例如奶乳清启动子;美国专利4,873,316和欧洲申请公布号264,166)。还涵盖发育调控的启动子，例如通过hox启动子(Kessel和Gruss(1990)Science 249:374-379)和α-甲胎蛋白启动子(Campes和Tilghman(1989)Genes Dev.3:537-546)来实现。

[0401] 可以根据在本领域中已知的任何寡核苷酸合成法如酶促合成或固相合成来产生本文提供的多核苷酸序列。用于执行固相合成的设备和试剂可自例如Applied Biosystems商购获得。也可以采用用于这种合成的任何其它手段;多核苷酸的实际合成充分在本领域技术人员的能力范围内。参见例如Maniatis等,(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[第3版]Cold Spring Harbor Laboratory Press;Swamy(2008)Laboratory Manual on Biotechnology Rastogi Publications;Herdewijn(2005)[编]Methods in Molecular Biolog:Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications第288卷Humana Press;以及Rapley(2000)[编]The Nucleic Acid Protocols Handbook Humana Press。然后可以通过合成互补链并将所述链在适当条件下一起退火，或者通过使用具有适当引物序列的DNA聚合酶来添加互补链以获得双链DNA片段。

[0402] 用于操纵核酸的技术如用于产生序列突变、亚克隆、标记探针、测序、杂交的技术充分描述于科学和专利文献中。参见例如Sambrook等,(2001)(编)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版)Cold Spring Harbor Laboratory;Ausubel等,(2011)编,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,New York;Tijssen(1993)[编]Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology:Hybridization With Nucleic Acid Probes,PartI,Theory and Nucleic Acid Preparation,Elsevier,NY。

[0403] 杂交和杂交强度(例如多核苷酸之间的缔合强度)受许多在本领域熟知的因素的影响，包括多核苷酸之间的互补程度，以及所涉及条件的严格度，而所涉及条件的严格度受诸如盐浓度、其它组分的存在(例如聚乙二醇存在与否)、杂交链的摩尔浓度和多核苷酸链的G+C含量的条件的影响，其所有都会使所形成的杂交体具有特征性熔化温度(T_m)。以下文献公开了核酸杂交技术:Sambrook等,(2001)(编)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[第3版]Cold Spring Harbor Laboratory和Hayrnes等,(1985)NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION,A PRACTICAL APPROACH(IRL Press,DC)。杂交洗涤条件可以包括0.2×

SSC/0.1％SDS的洗涤溶液和在室温下旋转孵育10分钟(低严格度洗涤)、预温热(42℃)的0.2×SSC/0.1％SDS的洗涤溶液和在42℃下旋转孵育15分钟(中严格度洗涤),以及预温热(68℃)0.1×SSC/0.1％SDS的洗涤溶液和在68℃下旋转孵育15分钟(高严格度洗涤)。参见Ausubel等,(2011)[编]Current Protocols in Molecular Biology John Wiley&Sons,Inc。

[0404] 寡核苷酸引物可用于扩增编码VISTA和VISTA缀合物的核酸。也可使用扩增技术来定量克隆或测量本文所述的核酸。扩增方法也是本领域熟知的,并且包括例如聚合酶链反应(PCR)(Innis(1990)[编]PCR Protocols,a Guide to Methods and Applications,Academic Press,NY.;Innis(1995)[编]PCR Strategies,Academic Press,Inc.,NY.);连接酶链反应(LCR)(Wu(1989)Genomics 4:560;Landegren(1988)Science241:1077;Barringer(1990)Gene 89:117);转录扩增(Kwoh(1989)PNAS 86:1173);自给型序列复制(Guatelli(1990)PNAS 87:1874);Qβ复制酶扩增(Smith(1997)J.Clin.Microbiol.35:1477-91));自动Q-β复制酶扩增分析(Burg(1996)Mol.Cell.Probes 10:257-71);和其它RNA聚合酶介导技术(例如NASBA,Cangene,Mississauga,Ontario)。也参看Berger(1987)Methods Enzymol.152:307-16;Sambrook等,(2001)(编)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版)Cold Spring Harbor Laboratory;Ausubel等,(2011)[编]Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,New York;Maniatis等,(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[第3版]Cold Spring Harbor Laboratory Press;美国专利4,683,195和4,683,202;Sooknanan(1995)Biotechnology 13:563-64。

[0405] 本领域熟知设计简并引物对的范例。例如,共同-简并杂交寡核苷酸引物(CODEHOP)策略计算机程序是容易可得的,并且从用于杂交引物预测的BlockMaker多重序列比对位点直接连接,所述杂交引物预测以一组相关蛋白质序列如本文提供的VISTA和VISTA缀合物序列开始。参见例如Rose(1998)Nucleic Acids Res.26:1628-35;Singh(1998)Biotechniques 24:318-19。

[0406] 可以使用上述核酸探针来分离与本文公开的VISTA和VISTA缀合物具有基本同一性的多态变体、等位基因和种间同系物。或者,通过检测用针对VISTA和VISTA缀合物产生的抗血清或纯化抗体而免疫表达的同系物,表达文库可用以克隆VISTA和VISTA缀合物和其多态变体、等位基因和种间同系物,其还识别和与VISTA和VISTA缀合物同系物。

[0407] 可以通过使用适当(完整或简并)的引物对来扩增(例如PCR)适当核酸序列以产生编码VISTA和VISTA缀合物的核酸。扩增的核酸可为来自任何细胞或组织,或者来源于VISTA或VISTA缀合物表达细胞的mRNA或cDNA的基因组DNA。本领域熟知在宿主细胞中表达异源序列的方法。参见例如Maniatis等,(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[第3版]Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0408] 包含VISTA和VISTA缀合物的融合蛋白

[0409] 可以构建包含编码与移位序列融合的VISTA和VISTA缀合物的核酸的杂交蛋白编码序列。还提供包含基序和抗原区域的杂交VISTA和VISTA缀合物。可以将这些核酸序列可操作地连接于转录或翻译控制元件,例如转录和翻译引发序列、启动子和增强子、转录和翻译终止子、聚腺苷酸化序列和其它适用于将DNA转录到RNA中的序列。在构建重组表达盒、载

体和转基因中，可采用启动子片段以引导所需核酸在所有所需细胞或组织中的表达。

[0410] 融合蛋白可以包含C端或N端移位序列。此外，融合蛋白可包含例如用于蛋白质检测、纯化或其它应用的其它元件。有助于探测和纯化的域包括例如金属螯合肽如多组氨酸道、组氨酸-色氨酸模块或允许在固定金属上纯化的其它域；麦芽糖结合蛋白；允许在固定免疫球蛋白上纯化的蛋白质A域；或用于FLAG延伸/亲和纯化体系的域(Immunex Corp，Seattle WA.)。

[0411] 在移位域(用于有效质膜表达)和新翻译的多肽的其余部分之间包括可裂解连接子序列如因子Xa(参见例如Ottavi，(1998)Biochimie80:289-93)、枯草杆菌蛋白酶识别基序(参见例如Polyak(1997)Protein Eng.10:615-19)；肠激酶(Invitrogen,San Diego，CA.)可适用于帮助纯化。例如，一个构建体可包括编码依次连接于六个组氨酸残基和硫氧还原蛋白、肠激酶裂解位点核酸序列(参见例如Williams(1995)Biochemistry 34:1787-97)和C端移位域的多肽。组氨酸残基有助于检测和纯化，而肠激酶裂解位点提供从融合蛋白的其余部分纯化所需蛋白质的手段。关于编码融合蛋白的载体和应用融合蛋白的技术充分描述于科学和专利文献中。参见例如Kroll(1993)DNA Cell.Biol.12:441-53。

[0412] 重组表达VISTA和VISTA缀合物的系统

[0413] 可以将作为个别表达载体或作为表达载体文库的包含配体结合区编码序列的表达载体引入基因组或引入细胞质或细胞核中，并且通过多种充分描述于科学和专利文献中的常规技术进行表达。参见例如Sambrook等，(2001)[编]Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版)Cold Spring Harbor Laboratory;Ausubel等，(2011)[编]Current Protocols in Molecular Biology John Wiley&Sons,Inc。

[0414] 核酸可在稳定地或短暂地表达于细胞(例如游离型表达系统)中的表达盒、载体或病毒中表达。可将选择标记并入表达盒和载体中以对转化的细胞和序列赋予可选的表型。例如，选择标记可编码游离型维持和复制，以不需要整合到宿主基因组中。例如，标记可以编码抗生素抗性(例如氯霉素、卡那霉素、G418、博莱霉素、潮霉素)或除草剂抗性(例如氯磺酮或Basta)以允许选择用所需DNA序列转化的那些细胞。参见例如Ausubel等，(2011)[编]Current Protocols in Molecular Biology John Wiley&Sons,Inc.；以及Walker和Papley(2009)Molecular Biology and Biotechnology[第5版]Royal Society of Chemistry。因为赋予对底物如新霉素或潮霉素的抗性的可选标记基因只能用于组织培养中，所以还将化学抗性基因用作体外和体内可选标记。

[0415] 为了使本发明的多核苷酸能够进行细胞表达，可以使用根据本发明的核酸构建体，其包括上述核酸序列之一的至少一个编码区，并且进一步包括至少一个顺式作用调控元件。优选地，由本发明的核酸构建体利用的启动子在转化的特定细胞群体中具有活性。在本领域中熟知细胞类型特异性和/或组织特异性启动子的实例。参见Bernardi(2003)[编]Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells第38卷Elsevier Science B.V。本发明的核酸构建体可进一步包括增强子，所述增强子可与启动子序列相邻或相隔，并且可在上调由此的转录中起作用。

[0416] 本发明的核酸构建体优选地进一步包括适当的可选标记和/或复制起点。优选地，所用核酸构建体是穿梭载体，其在大肠杆菌(其中构建体包含适当的可选标记和复制起点)中都可增殖，并且可与细胞中增殖或整合于所选基因和组织中相容。根据本发明的构建体

可为例如质粒、杆粒、噬菌粒、粘粒、噬菌体、病毒或人造染色体。

[0417] 合适构建体的的实例包括但不限于pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、PzeoSV2(+/-)、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto,其各自可自Invitrogen Co.(Carlsbad,CA.)商购获得。反转录病毒载体和包装系统的实例是由Clontech(San Diego,CA.)出售的那些,包括Retro-X载体pLNCX和pLXSN,其允许克隆到多个克隆位点,并且从CMV启动子转录转基因。来源于Mo-MuLV的载体还包括如pBabe,其中转基因将从5'LTR启动子转录。

[0418] 本发明的重组表达载体包含呈适于在宿主细胞中表达核酸的形式的本发明的核酸,这意指所述重组表达载体包括一个或多个基于待用于表达的宿主细胞所选的可操作地连接于待表达核酸序列的调控序列。在重组表达载体内,"可操作地连接"旨在意指目标核苷酸序列以允许核苷酸序列表达(例如在体外转录/翻译系统中或当将载体引入宿主细胞中时是在宿主细胞中)的方式连接于调控序列。

[0419] 术语"调控序列"旨在包括启动子、增强子和其它表达控制元件(例如聚腺苷酸化信号)。这些调控序列描述于例如Goeddel(1990)Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,CA中。调控序列包括引导核苷酸序列在许多类型的宿主细胞中的组成性表达的那些,以及引导核苷酸序列仅在某些宿主细胞(例如组织特异性调控序列)中表达的那些。本领域技术人员应了解,表达载体的设计可取决于诸如待转化宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平的因素。可将本发明的表达载体引入宿主细胞,从而产生由如本文所述的核酸编码的蛋白质或肽,包括融合蛋白或肽。

[0420] 可以设计本发明的重组表达载体以在原核或真核细胞中产生变体型蛋白质。例如,可在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞(例如使用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达本发明的蛋白质。合适的宿主细胞进一步讨论于Goeddel(1990)Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,CA中。或者,可例如使用T7启动子调控序列和T7聚合酶来体外转录和翻译重组表达载体。

[0421] 原核生物中的蛋白质表达最经常在具有含有引导融合或非融合蛋白的表达的组成性或诱导性启动子的载体的大肠杆菌中进行。融合载体向其中编码的蛋白质、向重组蛋白的氨基或C端添加许多氨基酸。这些融合载体典型地用于以下三个目的:(i)增大重组蛋白的表达;(ii)提高重组蛋白的溶解度;以及(iii)通过在亲和纯化中充当配体来有助于重组蛋白的纯化。经常地,在融合表达载体中,在融合部分与重组蛋白的接合处引入解蛋白性裂解位点,以在将融合蛋白纯化之后使重组蛋白能够从融合部分分离。这些酶和其同源识别序列包括因子Xa、凝血酶、PreScission、TEV和肠激酶。典型的融合表达载体包括pGEX(Pharmacia Biotech Inc;Smith和Johnson(1988)Gene 67:31-40)、pMAL(New England Biolabs,Beverly,MA.)和pRIT5(Pharmacia,Piscataway,N.J.),其会使谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋白质A分别与目标重组蛋白融合。

[0422] 重组型哺乳动物表达载体能够引导核酸可以在特定细胞类型(例如将组织特异性调控元件用于表达核酸)中表达。在本领域中已知组织特异性调控元件。为了有效地产生蛋白质,优选将编码本发明蛋白质的核苷酸序列置于针对所需宿主中的表达优化的表达控制序列的控制下。例如,序列可以包括优化的转录和/或翻译调控序列(例如改变的Kozak序列)。

[0423] 最大化大肠杆菌中的重组蛋白表达的一个策略为解蛋白性裂解重组蛋白的能力

削弱的细菌寄主中表达蛋白质。参见例如Gottesman(1990)Gene Expression Technology: Methods in Enzymology Academic Press,San Diego,CA.185:119-128。另一策略为改变待插入表达载体中的核酸的核酸序列,以使每一氨基酸的个别密码子优先地为大肠杆菌中所用的那些。参见例如Wada等,(1992)Nucl.AcidsRes.20:2111-2118。本发明的核酸序列的这种改变可通过标准的DNA合成技术来执行。解决密码子偏好的另一策略是使用BL21-密码子加上菌株(Invitrogen)或Rosetta菌株(Novagen),这些菌株含有罕见大肠杆菌tRNA基因的额外复本。

[0424] 编码本发明蛋白质的表达载体可为酵母表达载体。酵母啤酒酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)中表达的载体的实例包括pYepSec1(Bal dari等,(1987)EMBO J.6:229-234)、pMFa(Kurjan和Herskowitz(1982)Cell 30:933-943)、pJRY88(Schultz等,(1987)Gene 54:113-123)、pYES2(Invitrogen Corporation,San Diego,CA.)和picZ(Invitrogen Corp,San Diego,CA.)。

[0425] 或者,可使用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中制得本发明的多肽。可用于在培养的昆虫细胞(例如SF9细胞)中表达蛋白质的杆状病毒载体包括pAc系列(Smith等,(1983)Mol.Cell.Biol.3:2156-2165)和pVL系列(Lucklow和Summers(1989)Virology 170:31-39)。在又一个实施方案中,使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达本发明的核酸。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8(Seed(1987)Nature 329:840)和pMT2PC(Kaufman等,(1987)EMBO J.6:187-195)、pIRESpuro(Clontech)、pUB6(Invitrogen)、pCEP4(Invitrogen)、pREP4(Invitrogen)、pcDNA3(Invitrogen)。当用于哺乳动物细胞中时,表达载体的控制功能经常由病毒调控元件提供。例如,常用的启动子来源于多瘤病毒、2型腺病毒、巨细胞病毒、劳氏肉瘤病毒(劳氏肉瘤病毒)和猿猴病毒40。关于原核和真核细胞两者的其它合适表达系统,请参见例如Sambrook等,(2001)(编)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版)Cold Spring Harbor Laboratory。

[0426] 宿主细胞可为任何原核或真核细胞。例如,可在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞、酵母、植物或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、COS、HEK293细胞)中制得本发明的蛋白质。本领域技术人员已知其它合适的宿主细胞。

[0427] 可通过常规的转化或转染技术将载体DNA引入原核或真核细胞中。如本文中使用,术语“转化”和“转染”意指多种针对将外来核酸(例如DNA)引入宿主细胞中的本领域公认的技术,包括磷酸钙或氯化钙共同沉淀、DEAE-葡聚糖介导性转染、脂转染或电穿孔。适用于对宿主细胞进行转化或转染的方法可见于Sambrook等,(2001)[编]Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版)Cold Spring Harbor Laboratory和其它实验室手册中。

[0428] 可以使用任何用于将外来核苷酸序列引入宿主细胞中的熟知程序。其包括使用磷酸钙转染、聚凝胺、原生质体融合、电穿孔、脂质体、显微注射、血浆载体、病毒载体和用于将克隆的基因组DNA、cDNA、合成DNA或其它外来遗传物质引入宿主细胞中的其它熟知方法中的任一个。参见例如Sambrook等,(2001)(编)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版)Cold Spring Harbor Laboratory以及Walker和Papley(2009)Molecular Biology and Biotechnology[第5版]Royal Society of Chemistry。仅有必要使所用特定基因工程程序能够成功地将至少一种核酸分子引入能够表达VISTA和VISTA缀合物、片段或目标变体的宿主细胞中。

[0429] 关于哺乳动物细胞的稳定转染，已知根据所用表达载体和转染技术，细胞的仅一小部分可以将外来DNA整合到其基因组中。为了鉴别并选择这些构成要素，通常将编码可选标记(例如对抗生素的抵抗性)的基因引入宿主细胞以及相关基因中。多种可选标记包括赋予对药物(如G418、潮霉素、嘌呤霉素、灭瘟素和甲氨喋呤)的抗性的那些。可将编码可选标记的核酸引入与编码本发明蛋白质的载体相同的载体上的宿主细胞中或者可引入单独载体中。可通过药物选择(例如已经并入可选标记基因中的细胞将存活，而其它细胞死亡)来鉴别用所引入的核酸稳定转染的细胞。

[0430] 培养物中的本发明的宿主细胞，如原核或真核宿主细胞可用以产生(即表达)本发明的蛋白质。因此，本发明进一步提供使用本发明的宿主细胞来产生本发明的蛋白质的方法。在一个实施方案中，所述方法包括在合适培养基中培养本发明的宿主细胞(其中已经引入编码本发明的蛋白质的重组表达载体)。在另一实施方案中，方法进一步包括从培养基或宿主细胞分离本发明的蛋白质。

[0431] 在将表达载体引入细胞中之后，在有利于然后使用标准技术从培养物回收的受体、片段或目标变体的表达的条件下培养所转染的细胞。本领域熟知这些技术的实例。参见例如WO 00/06593。

[0432] 结合VISTA或VISTA缀合物的抗体

[0433] 本发明还提供选择性结合VISTA和VISTA缀合物的抗体，包括但不限于单克隆和人源化单克隆抗体。选择性结合VISTA和VISTA缀合物的抗体可以在组合物中与药用载体和其它抗体(例如抗PD-L1、PD-L2或CTLA-4抗体)混合。

[0434] 可使用用于多克隆和单克隆抗体制备的标准技术将分离的VISTA多肽或其部分或片段用作产生结合VISTA的抗体的免疫原。可使用全长VISTA多肽，或者可选地，本发明提供适用作免疫原的VISTA抗原肽片段。在一个实施方案中，VISTA的抗原肽包含SEQ ID NO:2、4或5中所示的氨基酸序列的至少8个氨基酸残基，并且涵盖VISTA的抗原表位以使针对肽产生的抗体与VISTA多肽形成特异性免疫复合物。优选地，抗原肽包含至少10个氨基酸残基、更优选地至少15个氨基酸残基、甚至更优选地至少20个氨基酸残基且最优选地至少30个氨基酸残基。抗原肽所涵盖的优选抗原表位是位于多肽的细胞外域中的VISTA区域，例如亲水性区域以及具有高抗原性的区域。

[0435] 典型地通过用免疫原使合适受试者(例如兔、山羊、小鼠或其它哺乳动物)免疫以将VISTA免疫原用于制备抗体。适当的免疫原性制剂可含有例如重组表达的VISTA多肽或化学合成的VISTA多肽。所述制剂可进一步包括佐剂，如弗氏完全或不完全佐剂，或者类似的免疫刺激剂。用免疫原性VISTA制剂使合适受试者免疫会诱导多克隆抗VISTA抗体反应。

[0436] 抗体可以包括两条相同的分子量为约23,000道尔顿的多肽轻链(“轻链”)，以及两条相同的分子量为53,000-70,000的重链(“重链”)。参见Edelman(1971) Ann.NY.Acad.Sci.190:5。通过呈“Y”构造的二硫键接合四条链，其中轻链将起始于“Y”构造的嘴部的重链括在一起。将“Y”构造的“支”部命名为F_{ab}区；将“Y”构造的干部部命名为Fc区。氨基酸序列取向从“Y”构造的顶部N端运行至在每条链底部的C端。N端具有对引发其的抗原具有特异性的可变区，并且长度为约100个氨基酸，在轻链和重链之间以及在抗体之间有微小的变化。

[0437] 可变区在每条链中连接于在其余链长度上延伸的恒定区，并且在特定类别的抗体

内不随抗体的特异性(即,引发其的抗原)而变化。存在决定免疫球蛋白分子的类别(例如对应于γ、μ、α、δ和ε的IgG、IgM、IgA、IgD和IgE)的已知的五大类恒定区。恒定区或者类别决定了抗体的后续效应功能,包括互补体活化(Kabat(1976)Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry[第2版]第413-436页;Holt,Rinehart,Winston)和其它细胞反应(Andrews等,(1980)Clinical Immunobiology 1-18;Kohl等,(1983)Immunology 48:187),而可变区决定了将与其反应的抗原。将轻链分类为κ(kappa)或λ(lambda)。可以用κ或λ轻链制备每一重链类别。轻链和重链相互共价结合,并且当由杂交瘤或由B细胞产生免疫球蛋白时,两条重链的"尾"部通过共价二硫键彼此键合。

[0438] 在这些条件下特异性结合于抗体可能需要针对其对特定蛋白质的特异性选择的抗体。例如,可选择针对来自特定物种如大鼠、小鼠或人的精液碱性蛋白产生的多克隆抗体以仅获得对精液碱性蛋白而非其它蛋白质(除精液碱性蛋白的多态变体和等位基因以外)具有特异免疫活性的那些多克隆抗体。这种选择可以通过除去与来自其它物种的精液碱性蛋白交叉反应的抗体来实现。多种免疫分析形式可用于选择对特定蛋白质具有特异免疫活性的抗体。例如,常规地将固相ELISA免疫分析用于选择对蛋白质具有特异免疫活性的抗体。参见例如Harlow和Lane(1998)USING ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory中关于可用于测定特异免疫反应性的免疫分析形式和条件的描述。典型地,特异性或选择性反应将为背景信号或噪音的至少两倍,并且较典型地,为背景的约10至100倍以上。

[0439] 可以筛选抗体以鉴别结合于例如在IgV域或其它特异性域中的VISTA的特异性抗原表位的那些,和/或以选择对VISTA蛋白具有高亲和力和亲合力的抗体。另外,筛选这些抗体以鉴别调节VISTA对体外和体内免疫性和免疫细胞的特定功能和作用的那些。例如,可进行分析以确定特定抗VISTA抗体对受VISTA负调控的免疫功能的调节作用(有的话),包括CD4+或CD8+T细胞的细胞因子产生、CD28共同刺激、CD4+T细胞增殖以及原生和记忆CD4+T细胞的增殖等。在一个实施方案中,当VISTA-Ig的存在增强VISTA-Ig所致的抑制(因为这些抗VISTA抗体体内相反表达,即其具有免疫抑制性)时,进行分析以鉴别可能的治疗性抗VISTA抗体。本发明涵盖特异性结合于136个氨基酸细胞外域例如特异性结合于氨基酸1-50、50-100、100-136的抗VISTA抗体和其用途、特异性结合IgV的抗体、特异性结合茎区的抗体、特异性结合跨膜区的抗体以及特异性结合VISTA的细胞质区的抗体。在本申请中鉴别出这些特定区域。

[0440] 在另一实施方案中,重组型哺乳动物表达载体能够引导核酸优先地在特定细胞类型(例如将组织特异性调控元件用于表达核酸)中表达。在本领域中已知组织特异性调控元件。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝特异性;Pinkert等,(1987)Genes Dev.1:268-277)、淋巴特异性启动子(Calame and Eaton(1988)Adv.Immunol.43:235-275)、T细胞受体的特定启动子(Winoto和Baltimore(1989)EMBO J.8:729-733)和免疫球蛋白(Banerji等,(1983)Cell 33:729-740;Queen和Baltimore(1983)Cell 33:741-748)、神经元特异性启动子(例如神经丝启动子;Byrne和Ruddle(1989)Proc Natl.Acad.Sci.USA 86:5473-5477)、胰腺特异性启动子(Edlund等,(1985)Science 230:912-916)以及乳腺特异性启动子(例如奶乳清启动子;美国专利4,873,316和欧洲申请公布号264,166)。还涵盖发育调控的启动子,例如通过hox启动子(Kessel和Gruss

(1990)Science 249:374-379)和α-甲胎蛋白启动子(Campes和Tilghman(1989)Genes Dev.3:537-546)来实现。

[0441] 多克隆抗体

[0442] 多克隆抗体是来源于用抗原免疫的动物的血清的抗体分子的异源群体。可以通过在本领域中熟知的方法制备选择性结合VISTA和VISTA缀合物的多克隆抗体。参见例如Howard和Kaser(2007)Making and Using Antibodies:A Practical Handbook CRC Press。

[0443] 单克隆抗体

[0444] 单克隆抗体含有对抗原具有特异性的抗体的基本上均质群体,所述群体含有基本上类似的抗原表位结合位点。可以通过本领域技术人员已知的方法获得单克隆抗体。参见例如Kohler和Milstein(1975)Nature 256:495-497;美国专利4,376,110;Ausubel等,[编](2011)CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,Greene Publishing Assoc.and Wiley Interscience,NY.;以及Harlow和Lane(1998)USING ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory;Colligan等,(2005)[编]Current Protocols in Immunology Greene Publishing Assoc.and Wiley Interscience,NY。这些抗体可以具有任何免疫球蛋白类别,包括IgG、IgM、IgE、IgA、GILD和其任何子类。可以体外、原位或体内培养产生本发明的抗体的杂交瘤。

[0445] 嵌合抗体

[0446] 嵌合抗体是不同部分来源于不同的动物物种的分子,如具有来源于鼠类抗体的可变区以及人免疫球蛋白恒定区的那些,其主要用于减小应用中的免疫原性和提高制造产率,例如当鼠类单克隆抗体从杂交瘤具有较高产率但是在人体内的免疫原性较高时,以使用人-鼠类嵌合单克隆抗体。在本领域中已知用于其制造的嵌合抗体和方法。参见Cabilly等,(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:3273-3277;Morrison等,(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855,Boulianne等,(1984)Nature 312:643-646;Neuberger等,(1985)Nature 314:268-270;欧洲专利申请173494(1986);WO 86/01533(1986);欧洲专利申请184187(1986);欧洲专利申请73494(1986);Sahagan等,(1986)J.Immunol.137:1066-1074;Liu等,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:3439-3443;Sun等,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:214-218;Better等,(1988)Science 240:1041-1043;以及Harlow和Lane(1998)USING ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory;美国专利5,624,659。

[0447] 人源化抗体

[0448] 将人源化抗体工程化以使其含有甚至较多的人样免疫球蛋白域,并且仅并入动物源性抗体的互补性决定区。这可以通过考查单克隆抗体可变区高变环的序列以及将其装配于人抗体链的结构来实现。参见例如美国专利6,187,287。同样地,本领域现在熟知产生人源化抗体的其它方法。参见例如美国专利5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,693,762;6,054,297;6,180,370;6,407,213;6,548,640;6,632,927;和6,639,055;Jones等,(1986)Nature 321:522-525;Reichmann等,(1988)Nature 332:323-327;Verhoeyen等,(1988)Science 239:1534-36;以及Zhiqiang An(2009)[编]Therapeutic Monoclonal Antibodies:From Bench to Clinic John Wiley&Sons,Inc。

[0449] 抗体片段

[0450] 除整个免疫球蛋白(或其重组对应物)以外,还可以合成包含抗原表位结合位点(例如Fab'、F(ab')$_2$或其它片段)的免疫球蛋白片段。可以利用重组免疫球蛋白技术来设计"片段"或最小免疫球蛋白。例如,可以通过合成融合的可变轻链区和可变重链区来制备用于本发明的"Fv"免疫球蛋白。还关注抗体组合,例如包含两种独特Fv特异性的双链抗体。免疫球蛋白的抗原结合片段包括但不限于SMIP(小分子免疫药物)、骆驼抗体、纳米抗体和IgNAR。

[0451] 抗独特型抗体

[0452] 抗独特型(抗Id)抗体是识别通常与抗体的抗原结合位点相关的独特决定子的抗体。可以通过用正在被制备抗Id的抗体将作为抗体来源的相同物种和基因类型的动物(例如小鼠品系)免疫来制备Id抗体。免疫的动物将通过产生这些独特型决定子的抗体(抗Id抗体)来识别并且响应于免疫抗体的独特型决定子。参见例如美国专利4,699,880。抗Id抗体也可以用作"免疫原"以在又一种动物中诱导免疫反应,从而产生所谓的抗-抗Id抗体。抗-抗Id可以与诱导抗Id的原始抗体具有表位同一性。因此,通过使用抗体的独特型决定子的抗体,可能鉴别表达具有相同特异性的抗体的其它克隆。

[0453] 经过工程化并修饰的抗体

[0454] 进一步可以使用具有来源于抗体起始物质的VH和/或VL序列中的一个或多个的抗体以工程化经过修饰的抗体来制备本发明的抗体,所述经过修饰的抗体相对于起始抗体可以具有改变的性质。可以通过修饰一个或多个在一或两个可变区(即VH和/或VL)内,例如在一个或多个CDR区内和/或在一个或多个构架区内的残基来工程化抗体。另外地或可选地,可以通过修饰恒定区内的残基,例如以改变抗体的效应功能来工程化抗体。

[0455] 可以进行的可变区工程化的一种类型是CDR接枝。抗体与目标抗原主要通过位于六个重链及轻链互补判定区(CDR)的氨基酸残基来相互作用。因此,CDR内的氨基酸序列在个别抗体之间比CDR外的序列更不同。因为CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,所以可能通过构建包括来自移植到来自性质不同的不同抗体的构架序列中的天然存在特异性抗体的CDR序列的表达载体来表达模拟天然存在的特异性抗体的性质的重组型抗体。参见例如Riechmann等,(1998)Nature 332:323-327;Jones等,(1986)Nature 321:522-525;Queen等,(1989)Proc.Natl.Acad.U.S.A.86:10029-10033;美国专利5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,693,762;和6,180,370。

[0456] 合适的构架序列可以获自公共DNA数据库或包括种系抗体基因序列的公开参考文献。例如,人重链及轻链可变区基因的种系DNA序列可以见于"VBase"人种系序列数据库(可得自因特网)以及见于Kabat,E.A.等,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest[第5版]美国卫生与人力资源服务部,NIH公布号91-3242;Tomlinson等,(1992)"The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops"J.Mol.Biol.227:776-798;以及Cox等,(1994)Eur.J Immunol.24:827-836。

[0457] 另一类型的可变区修饰为使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基突变,从而改善目标抗体的一种或多种结合性质(例如亲和力)。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变,并且可以在适当的体外或体内分析中评价对抗体结合的作用,或者

其它目标功能性质。优选地，可以引入保守性修饰(如本文所讨论)。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失，但是优选地是取代。此外，改变CDR区内的典型地不超过一、二、三、四或五种残基。

[0458] 本发明的工程化的抗体包括其中已经对VH和/或VL内的构架残基产生修饰例如以改善抗体性质的那些。典型地，进行构架修饰以减小抗体的免疫原性。例如，一种方法是使一个或多个构架残基“回突变(backmutate)”至相应种系序列。更具体地，已经经历体细胞突变的抗体可以含有不同于产生抗体的种系序列的构架残基。这些残基可以通过将抗体构架序列与产生抗体的种系序列相比而得以鉴别。

[0459] 附加于或代替构架或CDR区内进行的修饰，可以将本发明的抗体工程化以在Fc区内包括修饰，典型地以改变抗体的一种或多种功能性质，如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外，可以对本发明的抗体进行化学修饰(例如可以使一个或多个化学部分连接于抗体)或者进行修饰以改变其糖基化，其又会改变抗体的一种或多种功能性质。下文进一步描述这些实施方案。Fc区中的残基的编号是Kabat的EU指数。

[0460] 可以修饰CH1的铰链区以改变例如增大或减小铰链区中半胱氨酸残基的编号。参见美国专利5,677,425。CH1铰链区中半胱氨酸残基的数目可以改变，以例如帮助组装轻链和重链，或者以提高或降低抗体的稳定性。

[0461] 抗体的Fc铰链区可以突变以缩短抗体的生物半衰期。更具体地，可以将一个或多个氨基酸突变引入Fc铰链片段的CH2-CH3域界面区，以使抗体具有相对于原生Fc铰链域SpA结合削弱的葡萄球菌属蛋白A(Staphylococcyl protein A;SpA)结合。参见例如美国专利6,165,745。

[0462] 可以修饰抗体以增加其生物半衰期。多种方法具有可能。例如，可以引入以下突变中的一个或多个：T252L、T254S、T256F。参见美国专利6,277,375。或者，为了增加生物半衰期，可以改变抗体的CH1或CL区以使其含有取自IgG的Fc区的CH2域的两个环的挽救受体结合抗原表位。参见美国专利5,869,046和6,121,022。

[0463] 可以通过用不同氨基酸残基置换至少一个氨基酸残基来改变Fc区以改变抗体的效应功能。例如，一个或多个选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320和322的氨基酸可以被不同的氨基酸残基置换，以使抗体对效应物配体的亲和力改变，除了保留了亲本抗体的抗原-结合能力。受到的亲和力可以改变的效应物配体可为例如互补体的Fc受体或C1组分。参见美国专利5,624,821和5,648,260。

[0464] 可以修饰抗体的糖基化。例如，可以制备无糖基化抗体(即抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如提高抗体对抗原的亲和力。这些碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如，可以产生一个或多个氨基酸取代，所述取代会引起一个或多个可变区构架糖基化位点被消除，从而消除了所述位点的糖基化。这种无糖基化可以提高抗体对抗原的亲和力。参见例如美国专利5,714,350和6,350,861。

[0465] 另外地或可选地，可以制备糖基化类型改变的抗体，如岩藻糖基残基的量减少的低岩藻糖基化抗体，或者二等分GlcNac结构增加的抗体。已经证明这些改变的糖基化模式会提高抗体的ADCC能力。这些碳水化合物修饰可以通过例如在糖基化机制改变的宿主细胞中表达抗体来实现。糖基化机制改变的细胞已经描述于本领域中并且可以用作宿主细胞，其中表达本发明的重组型抗体，从而产生糖基化改变的抗体。参见美国专利申请公布号

2004/0110704和Yamane-Ohnuki等,(2004)Biotechnol Bioeng.87:614-22;EP 1,176,195;WO2003/035835;Shields等,(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740;WO99/54342;Umana等,(1999)Nat.Biotech.17:176-180;以及Tarentino等,(1975)Biochem.14:5516-23。

[0466] 可以将抗体聚乙二醇化,以例如增加抗体的生物(例如血清)半衰期。为了将抗体聚乙二醇化,典型地使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)如PEG的反应性酯或醛衍生物在一个或多个PEG基团变得连接于抗体或抗体片段的条件下反应。优选地,通过用反应性PEG分子(或者类似的反应性水溶性聚合物)进行酰基化反应或烷基化反应来进行聚乙二醇化。

[0467] 本发明还提供与以下各物基本上同系的变体和等效体:本文所述的抗体片段、双链抗体、SMIP、骆驼抗体、纳米抗体、IgNAR、多肽、可变区和CDR。其可以含有例如保守性取代突变(即,由类似的氨基酸取代一个或多个氨基酸)。例如,保守性取代是指用同一大类的另一氨基酸取代一个氨基酸,例如用另一酸性氨基酸取代一个酸性氨基酸、用另一碱性氨基酸取代一个碱性氨基酸,或用另一中性氨基酸取代一个中性氨基酸。

[0468] 抗体缀合物

[0469] 此外,可以使抗体(或其片段)结合于治疗部分如细胞毒素、治疗剂或放射性金属离子。细胞毒素或细胞毒性剂包括不利于细胞的任何试剂。实例包括紫杉酚、细胞分裂抑素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、米拉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾固酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素以及其类似物或同系物。治疗剂包括但不限于抗代谢物(例如,甲氨喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(decarbazine))、烷化剂(例如,二氯甲基二乙胺、噻替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露糖醇、链唑霉素、丝裂霉素C和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(例如,柔红霉素(以前称为道诺霉素)和阿霉素)、抗生素类(例如,更生霉素(以前称为放线菌素)、博来霉素、米拉霉素和安曲霉素(AMC)),以及抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。

[0470] 工程化抗体的方法

[0471] 具有本文公开的VH和VL序列的抗体可用于通过修饰VH和/或VL序列或与其连接的恒定区来产生新的变体型抗体。因此,将本发明的变体型抗体的结构特征用于产生结构上相关的保留本发明抗体的至少一种功能性质,如结合于VISTA和VISTA缀合物的变体型抗体。例如,一种抗VISTA变体型抗体或抗VISTA缀合物变体型抗体或其突变体的一个或多个CDR区可以与已知构架区和/或其它CDR重组性组合以产生本发明的另外的重组工程化的抗VISTA或抗VISTA缀合物抗体(例如结合VISTA和VISTA缀合物的抗体),如本文所讨论。用于工程化方法的起始物质可为本文提供的VH和/或VK序列中的一个或多个,或其一个或多个CDR区。为了产生工程化的抗体,没有必要实际上制备(即表达为蛋白质)具有本文提供的VH和/或VK序列中的一个或多个或其一个或多个CDR区的抗体。实际上,将序列中所含的信息用作起始物质以产生来源于原始序列的“第二代”序列,然后制备“第二代”序列并且将其表达为蛋白质。可将标准的分子生物学技术用于制备和表达改变的抗体序列。

[0472] 由改变的抗体序列编码的抗体可保留通过本文提供的方法和序列制得的抗VISTA或抗VISTA缀合物抗体的功能性质中的一种、一些或全部,所述功能性质包括以特异性KD水平或更低结合于变体型VISTA或变体型VISTA缀合物,和/或调节免疫细胞活性,和/或选择

性结合于所需目标细胞，如结肠直肠癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、卵巢癌、胃癌和肝癌。可以使用本领域中可用和/或本文描述的标准分析来评估改变的抗体的功能性质。

[0473] 可以顺着抗VISTA或抗VISTA缀合物抗体编码序列的全部或部分来随机或选择性引入突变，并且可以针对结合活性和/或其它所需的功能性质来筛选所得的经过修饰的抗VISTA或抗VISTA缀合物抗体。参见WO 2011/120013。

[0474] 编码选择性结合VISTA或VISTA缀合物的抗体的核酸

[0475] 本发明的另一个实施方案涉及编码本发明的抗体的结合VISTA和VISTA缀合物的核酸分子。所述核酸可以存在于全细胞中、细胞溶解产物中，或者以部分纯化或基本上纯的形式存在。可以通过纯化从其它细胞组分或其它污染物(例如其它细胞核酸或蛋白质)通过标准技术(包括本领域熟知的碱/SDS处理、CsCl纯化(banding)、柱色谱法、琼脂糖凝胶电泳等等)分离出核酸。参见Ausubel等，(2011)Current Protocols in Molecular Biology John Wiley&Sons，Inc。本发明的核酸可为例如DNA或RNA并且可能含有或不含有内含子序列。核酸可为cDNA分子。

[0476] 可以使用标准的分子生物学技术获得本发明的核酸。对于由杂交瘤(例如，如下文进一步所述的从携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤)表达的抗体、编码由杂交瘤产生的抗体的轻链和重链的cDNA可以通过标准PCR扩增或cDNA克隆技术而获得。对于获自免疫球蛋白基因文库(例如使用噬菌体展示技术)的抗体，可以从文库回收编码抗体的核酸。

[0477] 具体来说，可以通过产生例如一个或多个所选密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现简并密码子取代。Batzer等，(1991)Nucleic Acid Res.19:5081；Ohtsuka等，(1985)J.Biol.Chem.260:2605-08；Rossolini等，(1994)Mol.Cell.Probes 8:91-98。

[0478] 一旦获得编码VH和VL片段的DNA片段，这些DNA片段可以由标准的重组DNA技术进一步操纵，例如以将可变区基因转化成全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操纵中，将编码VL或VH的DNA片段可操作地连接于编码另一种蛋白质的另一DNA片段，如抗体恒定区或柔性连接子。

[0479] 编码VH区的分离的DNA可以通过将VH编码DNA可操作地连接于编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的另一DNA分子来转化成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域中已知的(参见例如Kabat等，(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，美国卫生与人力资源服务部，NIH公布号91-3242)，并且涵盖这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增来获得。重链恒定区可为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区，但是最优选的是IgG1或IgG4恒定区。对于Fab片段重链基因，可以将VH编码DNA可操作地连接于仅编码重链CH1恒定区的另一DNA分子。

[0480] 编码VL区的分离的DNA可以通过将VL编码DNA可操作地连接于编码轻链恒定区CL的另一DNA分子来转化成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。在本领域中已知人轻链恒定区基因的序列(参见例如Kabat等，(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest第5版，美国卫生与人力资源服务部，NIH公布号91-3242)并且涵盖这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增来获得。轻链恒定区可为κ或λ恒定区，但是最优选的是κ恒定区。

[0481] 为了产生scFv基因，将VH和VL编码DNA片段可操作地连接于编码柔性连接子例如

编码氨基酸序列(Gly4-Ser)$_3$的另一片段,以使VH和VL序列可表达为邻近的单链蛋白,其VL和VH区由柔性连接子来接合。参见例如Bird等,(1988)Science 242:423-426;Huston等,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty等,(1990)Nature 348:552-554。

[0482] 产生抗体和其片段的方法

[0483] 本发明还提供产生抗体和其片段的方法。本领域的普通技术人员熟知产生抗体的方法。例如,本领域现在熟知产生嵌合抗体的方法。参见例如美国专利4,816,567;Morrison等,(1984)PNAS USA 81:8651-55;Neuberger等,(1985)Nature 314:268-270;Boulianne等,(1984)Nature 312:643-46。

[0484] 例如,可通过基因工程化来产生抗体或抗原结合片段。在这种技术中,如同其它方法一样,使产生抗体的细胞对所需抗原或免疫原敏化。将从抗体产生细胞分离的信使RNA用作模板以使用PCR扩增来制备cDNA。通过将扩增的免疫球蛋白cDNA的适当部分插入表达载体中来产生载体文库,所述载体文库的载体各自含有保留初始抗原特异性的一个重链基因和一个轻链基因。通过组合重链基因文库与轻链基因文库来构建组合文库。这产生共同表达重链和轻链(类似于抗体分子的Fab片段或抗原结合片段)的克隆文库。将携带这些基因的载体共同转染到宿主细胞中。当在转染的宿主中诱导抗体基因合成时,重链和轻链蛋白自组装以产生可以通过抗原或免疫原筛选进行检测的活性抗体。

[0485] 也可以如下产生本发明的抗体和其片段:使用本领域的普通技术人员熟知的常规技术来构建含有操纵子和编码抗体重链的DNA序列的表达载体,其中抗体特异性所需的编码CDR的DNA序列来源于非人细胞来源,而编码抗体链的其余部分的DNA序列来源于人细胞来源。此外,本发明涉及载体,尤其涉及质粒、粘粒、病毒、噬菌体和在基因工程化中常见的其它载体,其含有本发明的上述核酸分子。可以将载体中所含的核酸分子连接于确保原核和真核细胞中的转录的调控元件。

[0486] 载体含有有助于操纵以便在目标宿主细胞内表达外源蛋白的元件。方便地,首先在细菌性宿主(例如大肠杆菌)中进行序列操纵和DNA产生以便转化,并且载体通常将包括有助于这些操纵的序列,包括细菌性复制起点和适当的细菌性选择标记。选择标记编码在选择性培养基中生长的转化宿主细胞的存活或生长所必需的蛋白质。没有用含有选择基因的载体转化的宿主细胞将不会在培养基中存活。典型的选择基因编码赋予对抗生素或其它毒素、互补营养缺陷型缺陷的抗性,或提供从复合培养基不可得的重要营养素。本领域描述了用于酵母转化的示例性载体和方法。参见例如Burke等,(2000)Methods in Yeast Genetics Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0487] 可以将目标多肽编码序列可操作地连接于使多肽在酵母细胞中表达的转录性和翻译性调控序列。这些载体装配体可以包括但不限于以下一个或多个:增强子元件、启动子和转录结束序列。也可以包括用于分泌多肽的序列(例如信号序列)。

[0488] 当将核酸置为与另一核酸序列具有功能关系时,所述核酸便被“可操作地连接”。例如,如果信号序列的DNA表达为参与多肽分泌的前体蛋白,那么将所述信号序列的DNA可操作地连接于多肽的DNA;如果启动子或增强子影响序列转录,那么将所述启动子或增强子可操作地连接于编码序列。通常,“可操作地连接”泛指邻近的连接的DNA序列,并且在分泌性前导序列的情况下泛指邻近的并且在阅读框架中的。然而,增强子不必是邻近的。

[0489] 启动子是位于控制其可操作地连接的特定核酸序列的转录和翻译的结构基因(通常在约100bp至1000bp内)的起始密码子的上游(5')的未翻译序列。这些启动子属于几种类别:诱导性、组成性和可抑制性启动子(例如其会响应于抑制子的不存在而提高转录水平)。诱导性启动子可以在响应于培养条件的一些变化(例如营养素存在与否或者温度变化)而其控制下引发从DNA提高的转录水平。

[0490] 可以使用本领域的普通技术人员熟知的相同常规手段来产生第二表达载体,所述表达载体含有操纵子和编码抗体轻链的DNA序列,其中抗体特异性所需的编码CDR的DNA序列来源于非人细胞来源,优选地是兔B细胞来源,而编码抗体链的其余部分的DNA序列来源于人细胞来源。

[0491] 通过本领域的普通技术人员熟知的常规技术将表达载体转染到宿主细胞中,以产生转染的宿主细胞,通过本领域的普通技术人员熟知的常规技术培养所转染的宿主细胞以产生所述抗体多肽。

[0492] 可以用上述两种表达载体共同转染宿主细胞,第一表达载体含有编码操纵子和轻链源性多肽的DNA,并且第二载体含有编码操纵子和重链源性多肽的DNA。两种载体含有不同的可选标记,但是优选地实现基本上同样的重链和轻链多肽表达。或者,可以使用单个载体,所述载体包括编码重链和轻链多肽两者的DNA。重链和轻链的编码序列可以包含cDNA、基因组DNA或两者。

[0493] 用于表达抗体和其片段的宿主细胞可为细菌细胞如大肠杆菌或真核细胞。可以使用用于这个目的的定义明确的类型的哺乳动物细胞如骨髓瘤细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)、NSO或HEK293细胞系。

[0494] 从所述宿主细胞可构建载体的通用方法、产生宿主细胞所需的转染方法以及产生抗体和其片段所需的培养方法包括常规技术。虽然优选地用于产生抗体的细胞系是哺乳动物细胞系,但是也可以使用任何其它合适的细胞系,如细菌细胞系如大肠杆菌源性菌株,或者酵母细胞系。

[0495] 类似地,一旦产生,所述抗体便可根据本领域中的标准程序如交叉流过滤、硫酸铵沉淀和亲和柱色谱来纯化。

[0496] 使用动物来产生结合VISTA或VISTA缀合物的抗体

[0497] 选择性结合VISTA和VISTA缀合物的本发明的抗体可为人单克隆抗体。这些针对VISTA和VISTA缀合物的人单克隆抗体可以使用携带人免疫系统而非小鼠系统的部分的转基因或转染色体小鼠来产生。这些转基因和转染色体小鼠包括在本文分别称为HuMAb Mouse®和KM Mouse®并且在本文统称"人Ig小鼠"的小鼠。HuMAb Mouse®(Medarex,Inc.)含有编码未重新排列的人重链(μ和γ)和κ轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微基因座,以及使内源性μ和κ链基因座失活的目标突变。参见例如Lonberg等,(1994)Nature368(6474):856-859。因此,小鼠显示小鼠IgM或κ的表达减少,并且响应于免疫,所引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和力人IgGκ单克隆。Lonberg(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg和Huszar(1995)Intern.Rev.Immunol.13:65-93;以及Harding和Lonberg(1995)Ann.NY.Acad.Sci.764:536-546。HuMab Mouse®和这些小鼠携带的基因组修饰的制备和使用进一步描述于Taylor等,(1992)Nucleic Acids Research 20:6287-6295;Chen等,

(1993)International Immunology5:647-656;Tuaillon等,(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:3720-3724;Choi等,(1993)Nature Genetics 4:117-123;Chen等,(1993)EMBO J.12:821-830;Tuaillon等,(1994)J.Immunol.152:2912-2920;Taylor等,(1994)International Immunology6:579-591;以及Fishwild等,(1996)Nature Biotechnology14:845-851中。进一步参见美国专利5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299;5,770,429;和5,545,807;WO 92/03918、WO93/12227、WO 94/25585;WO 97/13852;WO 98/24884;WO 99/45962;和WO 01/14424。

[0498] 可以使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠,如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠来产生本发明的人抗VISTA和抗VISTA-Ig缀合物抗体(例如选择性结合VISTA和VISTA缀合物的抗体)。这些在本文中称为“KM mice®”的小鼠详述于WO02/43478中。

[0499] 更进一步地,表达人免疫球蛋白基因的替代性转基因动物系统在本领域中可得,并且可用于产生本发明的抗VISTA和抗VISTA-Ig缀合物抗体。例如,可以使用称为Xenomouse(Abgenix,Inc.)的替代性转基因系统;这些小鼠描述例如于美国专利5,939,598;6,075,181;6,114,598;6,150,584和6,162,963中。

[0500] 此外,表达人免疫球蛋白基因的替代性转染色体动物系统在本领域中可得,并且可用于产生本发明的抗VISTA和抗VISTA-Ig缀合物抗体。例如,可以使用称为“TC小鼠”的携带人重链转染色体和人轻链转染色体两者的小鼠。参见Tomizuka等,(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA97:722-727。此外,携带人重链和轻链转染色体的奶牛已经描述于本领域中(Kuroiwa等,(2002)Nature Biotechnology20:889-894)并且可用于产生本发明的抗VISTA和抗VISTA-Ig缀合物抗体。

[0501] 也可以使用用于筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法来制备本发明的人单克隆抗体。这些用于分离人抗体的噬菌体展示方法在本领域中是确立的。参见例如美国专利5,223,409;5,403,484;5,571,698;5,427,9085,580,717;5,969,108;6,172,197;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081。

[0502] 本发明的人单克隆抗体也可以使用SCID小鼠来制备,在所述SCID小鼠中,人免疫细胞已经复原以在免疫时可以产生人抗体反应。参见例如美国专利5,476,996和5,698,767。

[0503] 当人Ig小鼠用于产生本发明的人抗体时,可以用纯化或富集的VISTA和VISTA缀合物多肽制剂使这些小鼠免疫,如由以下所述:Lonberg等,(1994)Nature 368(6474):856-859;Fishwild等,(1996)Nature Biotechnology14:845-851;WO 98/24884和WO 01/14424。优选地,在第一次输注时,小鼠将为6-16周龄。例如,纯化或重组的制剂(5-50μg)VISTA和VISTA缀合物可用于使人Ig小鼠腹膜内免疫。

[0504] 其它人用多种抗原的先前经历已经显示,当起初用完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内(IP)免疫,接着每隔一周用不完全弗氏佐剂中的抗原进行IP免疫(多达总共6次)时,转基因小鼠有反应。然而,还发现除弗氏佐剂以外的佐剂是有效的。另外,发现在不存在佐剂时的全细胞具有高度免疫原性。可以在用获自后眼窝出血的血浆样本的免疫方案的过程期间监测免疫反应。可以通过ELISA(如下所述)筛选血浆,并且可以将具有抗VISTA或抗VISTA-Ig

人免疫球蛋白的足够效价的小鼠用于融合。可以用抗原对小鼠静脉内加强3天，随后处死并移出脾。预期每次免疫可能需要进行2-3次融合。典型地对于每一抗原都在6和24只之间的小鼠进行免疫。通常使用HCo7和HCo12品系两者。另外，可以将HCo7和HCo12转基因两者一起繁育到具有两种不同人重链转基因(HCo7/HCo12)的单个小鼠中。可选地或另外地，可以使用KMMouse®品系。

[0505] 产生制得本发明的人单克隆抗体的杂交瘤

[0506] 为了产生制得本发明的人单克隆抗体的杂交瘤，可以分离来自受免疫小鼠的脾细胞和/或淋巴结细胞并且使其与适当的永生化细胞系如小鼠骨髓瘤细胞系融合。可以针对抗原特异性抗体的产生来筛选所得杂交瘤。例如，来自受免疫小鼠的脾脏淋巴细胞的单一细胞悬浮液可以与六分之一数目的含50％PEG的P3X63-Ag8.653非分泌性小鼠骨髓瘤细胞(ATCC，CRL 1580)融合。可以在约2×10^{-5}下将细胞涂铺在平底微量滴定板中，接着在含有20％胎儿克隆血清、18％“653”改良性培养基、5％origen(IGEN)、4mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50单元/毫升青霉素、50mg/ml链霉素、50mg/ml庆大霉素和1X HAT(Sigma；在融合之后24小时添加HAT)的选择培养基中孵育两星期。在约两周之后，可以在HAT被HT置换的培养基中培养细胞。然后可以针对人单克隆IgM和IgG抗体通过ELISA筛选个别孔。一旦出现广泛的杂交瘤生长，通常可以在10-14天之后观测培养基。可以重新涂铺分泌抗体的杂交瘤，再次筛选，并且如果对于人IgG仍为阳性，那么可以通过限制性稀释将单克隆抗体亚克隆至少两次。然后可以体外培养稳定的亚克隆以在组织培养基中产生少量抗体以便表征。

[0507] 为了纯化人单克隆抗体，可以使所选杂交瘤在2升转瓶中生长以进行单克隆抗体纯化。可以过滤上清液并浓缩，随后进行蛋白质A-琼脂糖亲和力色谱(Pharmacia，Piscataway，N.J.)。可以通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的IgG以确保纯度。可以将缓冲溶液更换到PBS中，并且可以通过OD280使用1.43消光系数来测定浓度。可以将单克隆抗体等分并且存储在-80℃下。

[0508] 转基因动物

[0509] 本发明的宿主细胞也可以用于产生非人转基因动物。例如，在一个实施方案中，本发明的宿主细胞是受精的卵母细胞或胚性干细胞，其中已经引入VISTA编码序列。然后可将这些宿主细胞用于产生非人转基因动物，其中外源性VISTA序列已经引入其基因组中，或者同系重组型动物，其中内源性VISTA序列已经改变。这些动物适用于研究VISTA的功能和/或活性并且适用于鉴别和/或评价VISTA活性的调节剂。如本文中使用，“转基因动物”是非人动物、优选地是哺乳动物、更优选地是啮齿动物如大鼠或小鼠，其中动物的一个或多个细胞包括转基因。转基因动物的其它实例包括非人灵长类动物、绵羊、狗、奶牛、山羊、鸡、两栖动物等。转基因是整合到发育成转基因动物的细胞的基因组中并保留在成熟动物基因组中，从而引导转基因动物的一种或多种细胞类型或组织中编码基因产物的表达的外源性DNA。如本文中使用，“同系重组型动物”是非人动物、优选地是哺乳动物、更优选地是小鼠，其中内源性VISTA基因已经通过内源性基因和引入动物细胞如动物胚细胞中的外源性DNA分子之间的同源重组而改变，随后发育成动物。可如下产生本发明的转基因动物：例如通过显微注射、反转录病毒感染将VISTA编码核酸引入受精卵母细胞的雄原核中，并使所述卵母细胞在假孕雌性抚育动物中发育。可将SEQ ID NO:1或4的VISTA cDNA序列作为转基因引入非人

动物的基因组中。或者，可将人VISTA基因如猴或大鼠VISTA基因的非人同系物用作转基因。或者，可基于与SEQ ID NO:1或3的VISTA cDNA序列的杂交来分离VISTA基因同系物如另一VISTA家族成员，并且将其用作转基因。内含子序列和聚腺苷酸化信号也可以包括于转基因中以提高转基因的表达效率。可将组织特异性调控序列可操作地连接于VISTA转基因以引导VISTA多肽表达于特定细胞。通过胚胎操纵和显微注射产生转基因动物尤其是诸如小鼠的动物的方法已经在本领域中变得常规并且描述于例如Leder等的美国专利4,736,866与4,870,009、Wagner等的美国专利4,873,191以及Hogan,B.,Manipulating the Mouse Embryo,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1986)中。将类似的方法用于产生其它转基因动物。可基于其基因组中VISTA转基因的存在和/或动物组织或细胞中VISTA mRNA的表达来鉴别转基因创立动物。然后可将转基因创立动物用于繁育携带转基因的另外的动物。此外，可使携带编码VISTA多肽的转基因的转基因动物进一步繁育到携带其它转基因的其它转基因动物中。

[0510] 为了产生同系重组型动物，制备含有VISTA基因的其中已经引入缺失、添加或取代从而改变，例如在功能上破坏VISTA基因的至少一部分的载体。VISTA基因可为人或鼠类基因(例如SEQ ID NO:1或3的cDNA)

[0511] 在另一实施方案中，可产生转基因非人动物，其含有允许转基因受调控表达的所选系统。这种系统的一个实例为噬菌体P1的cre/loxP重组酶系统。关于cre/loxP重组酶系统的描述，参见例如Lakso等，(1992)Proc Natl.Acad.Sci.USA 89:6232-6236。重组酶系统的另一实例为酿酒酵母(S.cerevisiae)的FLP重组酶系统(O'Gorman等，(1991)Science 251:1351-1355)。如果将cre/loxP重组酶系统用于调控转基因的表达，那么需要含有编码Cre重组酶与所选多肽两者的转基因的动物。可通过构建“双重”转基因动物，例如通过使两种转基因动物交配来提供这些动物，所述两种转基因动物中的一种含有编码所选多肽的转基因并且另一种含有编码重组酶的转基因。

[0512] 本文所述的非人转基因动物的克隆也可以根据以下中所述的方法产生：Wilmut等，(1997)Nature 385:810-813;WO 97/07668;和WO 97/07669。简单地说，可分离来自转基因动物的细胞例如体细胞并且诱导其离开生长周期并进入G0期。然后可例如通过使用电脉冲来融合休眠细胞，以从分离出休眠细胞的相同物种的动物剜出卵母细胞。然后培养重构的卵母细胞，以使其发育成桑椹胚或胚泡期，然后将其转移到假孕雌性抚育动物中。出身于这种雌性抚育动物的后代将为分离出细胞例如体细胞的动物的克隆。

[0513] 标记

[0514] 可以翻译后修饰本文所述的多肽、缀合物和抗体以添加效应物部分如化学连接子、可检测部分如荧光染料、酶、底物、生物发光物质、放射性物质、化学发光部分、细胞毒性剂、放射性物质或功能部分。

[0515] 如在本领域中已知，多种实体例如配体可以与寡核苷酸偶联。配体可以包括天然存在的分子，或重组型分子或合成分子。示例性配体包括但不限于抗生物素蛋白(avadin)、生物素、肽、肽模拟物、聚赖氨酸(PLL)、聚乙二醇(PEG)、mPEG、阳离子基团、精胺、亚精胺、多胺、促甲状腺激素、促黑激素、凝集素、糖蛋白、表面活性剂蛋白质A、粘蛋白、糖基化聚氨基酸、转铁蛋白、适体、免疫球蛋白(例如抗体)、胰岛素、转铁蛋白、白蛋白、糖、亲脂性分子(例如类固醇、胆酸、胆固醇、胆酸和脂肪酸)、维生素A、维生素E、维生素K、维生素B、叶酸、B12、

核黄素、生物素、吡哆醛、维生素辅因子、脂多醣、激素和激素受体、凝集素、碳水化合物、多价碳水化合物、放射性标记的标记、荧光染料和其衍生物。参见例如美国专利6,153,737;6,172,208;6,300,319;6,335,434;6,335,437;6,395,437;6,444,806;6,486,308;6,525,031;6,528,631;和6,559,279。

[0516] 另外,可以将部分添加到抗原或抗原表位以增加体内半衰期(例如通过延长从血流清除的时间来实现)。这些技术包括例如添加PEG部分(还称为聚乙二醇化),并且在本领域中是熟知的。参见美国专利申请公布号2003/0031671。

[0517] 本文所述的抗原、抗体或抗原结合片段当与固体标记通过非随机的化学或物理相互作用而缔合时可以"连接"于底物。所述连接可以通过共价键来实现。然而,连接无需是共价或永久的。物质可以通过"间隔分子"或"连接基团"连接于标记。这些间隔分子是第一部分连接于生物材料并且第二部分连接于标记的分子。因此,当连接于标记时,间隔分子将标记和生物材料分隔,但是连接于两者。使生物材料(例如标记)连接于标记的方法是本领域熟知的,并且包括但不限于化学偶联。

[0518] 可检测标记

[0519] 可以翻译后修饰本文所述的VISTA和VISTA缀合物以添加效应物标记如化学连接子、可检测标记如荧光染料、酶、底物、生物发光物质、放射性物质和化学发光标记,或功能标记如链霉亲和素、抗生物素蛋白、生物素、细胞毒素、细胞毒性剂和放射性物质。其它示例性酶包括但不限于辣根过氧化酶、乙酰胆碱酯酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶和荧光素酶。其它示例性荧光物质包括但不限于若丹明(rhodamine)、荧光素(fluorescein)、异硫氰酸荧光素、伞形酮(umbelliferone)、二氯三嗪基胺、藻红素(phycoerythrin)和丹磺酰氯(dansyl chloride)。其它示例性化学发光标记包括但不限于鲁米诺(luminol)。其它示例性生物发光物质包括但不限于荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白。其它示例性放射性物质包括但不限于铋213(^{213}Bs)、碳14(^{14}C)、碳11(^{11}C)、氯18(Cl^{18})、铬51(^{51}Cr)、钴57(^{57}Co)、钴60(^{60}Co)、铜64(^{64}Cu)、铜67(^{67}Cu)、镝165(^{165}Dy)、铒169(^{169}Er)、氟18(^{18}F)、镓67(^{67}Ga)、镓68(^{68}Ga)、锗68(^{68}Ge)、钬166(^{166}Ho)、铟111(^{111}In)、碘125(^{125}I)、碘123(^{124}I)、碘124(^{124}I)、碘131(^{131}I)、铱192(^{192}Ir)、铁59(^{59}Fe)、氪81(^{81}Kr)、铅212(^{212}Pb)、镥177(^{177}Lu)、钼99(^{99}Mo)、氮13(^{13}N)、氧15(^{15}O)、钯103(^{103}Pd)、磷32(^{32}P)、钾42(^{42}K)、铼186(^{186}Re)、铼188(^{188}Re)、铷81(^{81}Rb)、铷82(^{82}Rb)、钐153(^{153}Sm)、硒75(^{75}Se)、钠24(^{24}Na)、锶82(^{82}Sr)、锶89(^{89}Sr)、硫35(^{35}S)、锝99m(^{99}Tc)、铊201(^{201}Tl)、氚(^{3}H)、氙133(^{133}Xe)、镱169(^{169}Yb)、镱177(^{177}Yb)和钇90(^{90}Y)。

[0520] 细胞毒性剂

[0521] 为了制备细胞毒性剂,可以使用本领域中已知的技术将本发明的VISTA多肽和VISTA缀合物连接或可操作地连接于毒素。已知多种可以结合于本发明的多肽或抗体的毒素。实例包括:众多适用的植物源性、真菌源性或甚至细菌源性毒素,其例如包括:多种A链毒素,尤其是篦麻毒素A链;使蛋白质如肥皂草素或白树毒素失活的核糖体;α-帚曲菌素;曲霉素;局限曲菌素;和核糖核酸酶如胎盘核糖核酸酶、血管生成、白喉毒素或假单胞菌外毒素。与本发明相关使用的优选的毒素部分是毒素A链,其已经得到处理以修饰或除去碳水化合物残基,去糖基化A链。美国专利5,776,427。

[0522] 本文所述的VISTA和VISTA缀合物可以结合于细胞毒性剂,其包括但不限于甲氨喋

呤、氨基喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪;烷化剂如二氯甲基二乙胺、噻替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、丝裂霉素C、洛莫司汀(CCNU)、1-甲基亚硝基脲、环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、白消安、二溴甘露糖醇、链唑霉素、丝裂霉素C、顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺钼和卡铂(paraplatin);蒽环霉素,包括柔红霉素(以前称为道诺霉素)和阿霉素(亚德里亚霉素(adriamycin))、地托比星(detorubicin)、洋红霉素(carminomycin)、伊达比星(idarubicin)、表柔比星(epirubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)和比生群(bisantrene);抗生素类,包括更生霉素(放线菌素D)、博来霉素、卡奇霉素、米拉霉素和安曲霉素(AMC));以及抗有丝分裂剂,如长春花碱、长春新碱和长春碱。其它细胞毒性剂包括紫杉醇(TAXOL®)、篦麻毒素、假单胞菌外毒素、吉西他滨、细胞分裂抑素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、依托泊苷、替尼泊苷、秋水仙碱、二羟基炭疽菌素二酮、1-脱氢睾固酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、丙卡巴肼、羟基脲、天冬酰胺酶、皮质类固醇、米托坦(mytotane)(O,P'-(DDD))、干扰素以及这些细胞毒性剂的混合物。

[0523] 其它细胞毒性剂包括但不限于化学治疗剂如卡铂、顺铂、紫杉醇、吉西他滨、卡奇霉素、阿霉素、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素C、放线菌素D、环磷酰胺、长春新碱、博莱霉素、VEGF拮抗剂、EGFR拮抗剂、铂、紫杉酚、伊立替康、5-氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcytabine)、亚叶酸(leucovorine)、类固醇、环磷酰胺、美法仑、长春花碱(例如长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨)、氮芥、酪氨酸激酶抑制剂、放射疗剂、性激素拮抗剂、选择性雄激素受体调节剂、选择性雌激素受体调节剂、PDGF拮抗剂、TNF拮抗剂、IL-1拮抗剂、介白素(例如IL-12或IL-2)、IL-12R拮抗剂、结合毒素的单克隆抗体、肿瘤抗原特异性单克隆抗体、Erbitux®、Avastin®、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、抗CD20抗体、Rituxan®、罗氏单抗(ocrelizumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、DXL625、Herceptin®或其任何组合。来自植物和细菌的毒性酶如篦麻毒素、白喉毒素和假单胞菌属毒素可以结合于人源化抗体或其结合片段,以产生细胞型特异性杀死试剂。Youle等,(1980)Proc.Nat'lAcad.Sci.USA 77:5483;Gilliland等,(1980)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:4539;Krolick等,(1980)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 77:5419。其它细胞毒性剂包括细胞毒性核糖核酸酶。参见美国专利6,653,104。

[0524] 本文所述的VISTA蛋白可以结合于发出α或β粒子的放射性核素(例如放射免疫缀合物)。这些放射性同位素包括但不限于β-发射体如磷32(^{32}P)、钪47(^{47}Sc)、铜67(^{67}Cu)、镓67(^{67}Ga)、钇88(^{88}Y)、钇90(^{90}Y)、碘125(^{125}I)、碘131(^{131}I)、钐153(^{153}Sm)、镥177(^{177}Lu)、铼186(^{186}Re)、铼188(^{188}Re)和α发射体如砹211(^{211}At)、铅212(^{212}Pb)、铋212(^{212}Bi)、铋213(^{213}Bi)或锕225(^{225}Ac)。

[0525] 本领域中已知使本文所述的VISTA和VISTA缀合物结合于标记的方法,如以下所述的那些方法:Hunter等,(1962)Nature 144:945;David等,(1974)Biochemistry 13:1014;Pain等,(1981)J.Immunol.Meth.40:219;以及Nygren(1982)Histochem and Cytochem,30:407。

[0526] 基底

[0527] 本文所述的VISTA和VISTA缀合物可以连接于基底。本领域中已知的许多基底(例

如固体支撑物)适于与本文所述的VISTA和VISTA缀合物一起使用。可以修饰基底以使其含有通道或其它构造。参见Fung(2004)[编]Protein Arrays:Methods and Protocols Humana Press and Kambhampati(2004)[编]Protein Microarray Technology John Wiley&Sons。

[0528] 基底材料包括但不限于丙烯酸聚合物、琼脂糖、硼硅酸盐玻璃、碳(例如碳纳米纤维薄片或丸粒)、乙酸纤维素、纤维素、陶瓷、凝胶剂、玻璃(例如无机、受控孔、经过修饰的碱石灰或官能化玻璃)、乳胶、磁性珠粒、膜、金属、非金属、硝化纤维素、NYLON®、光纤束、有机聚合物、纸、塑料、聚丙烯酰基酰吗啉、聚(4-甲基丁烷)、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)、聚(丁酸乙烯酯)、聚丙烯酰胺、聚丁烯、聚碳酸酯、聚乙烯、聚乙二醇对苯二甲酸酯、聚甲醛、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯、多糖、聚苯乙烯、聚氨酯、聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚乙烯吡咯烷酮、人造丝、树脂、橡胶、半导体材料、SEPHAROSE®、二氧化硅、硅、苯乙烯共聚物、TEFLON®以及各种其它聚合物。

[0529] 基底无需平坦并且可包括任何类型的形状,包括球形(例如珠粒)或圆柱形(例如纤维)。可以将连接于固体支撑物的材料连接于固体支撑物的任何部分(例如可以连接于多孔固体支撑材料的内部)。

[0530] 基底主体的形式可为珠粒、盒子、柱子、圆柱、圆盘、皿(例如玻璃皿、皮氏培养皿)、纤维、膜、过滤器、微量滴定板(例如96孔微量滴定板)、多刃棍、网、丸粒、板、环、杆、辊、薄片、切片、棍、托盘、管子或小瓶。基底可为单个分立主体(例如单根管、单粒珠粒)、多个基底主体中的任意几个(例如一排10根管子、几粒珠粒),或其组合(例如,托盘包含多个微量滴定板、填充有珠粒的柱子、填充有珠粒的微量滴定板)。

[0531] VISTA和VISTA缀合物当与固体基底通过非随机的化学或物理相互作用而缔合时可以“附接”于基底。所述附接可以通过共价键来实现。然而,附接无需是共价或永久的。物质可以通过“间隔分子”或“连接基团”附接于基底。这些间隔分子是第一部分附接于生物材料并且第二部分附接于基底的分子。因此,当附接于基底时,间隔分子将基底和生物材料分隔,但是附接于两者。使生物材料(例如标记)附接于基底的方法是本领域熟知的,并且包括但不限于化学偶联。

[0532] 可以使用板如微量滴定板,其支撑并含有用于固相合成反应的固相。微量滴定板可以安放用作固相的珠粒。“颗粒”或“微粒”或“纳米颗粒”或“珠粒”或“微珠粒”或“微球体”在本文中意指具有多种形状或尺寸中的任一种的微粒物质。形状可以通常为球形,但是未必为球形,例如为圆柱形或多面体。本领域技术人员应了解,颗粒根据其用途可以包含多种材料,包括但不限于交联淀粉、葡聚糖、纤维素、蛋白质、有机聚合物(包括聚苯乙烯如聚苯乙烯和甲基苯乙烯以及其它苯乙烯共聚物)、塑料、玻璃、陶瓷、丙烯酸聚合物、磁反应性材料、胶体、梭立亚索(thoriasol)、碳石墨、二氧化钛、尼龙、乳胶,以及TEFLON®。参见例如来自Bangs Laboratories,Fishers,IN的“微球体检测指导”。

[0533] 本文所述的VISTA和VISTA缀合物可以附接于本文所述的基底的任何形式(例如珠粒、盒子、柱子、圆柱、圆盘、皿(例如玻璃皿、皮氏培养皿)、纤维、膜、过滤器、微量滴定板(例如96孔微量滴定板)、多刃棍、网、丸粒、板、环、杆、辊、薄片、切片、棍、托盘、管子或小瓶)。具体来说,颗粒或珠粒可为凝胶材料组分,或可以为单独组分如由多种合成塑料(例如聚苯乙

烯)制成的乳胶珠粒。标记(链霉亲和素)可结合于基底(例如珠粒)。

[0534] 药物组合物

[0535] “药物组合物”是指适于向哺乳动物施用的化学或生物组合物。这些组合物可以具体地配制用于通过许多途径中的一种或多种来施用,所述途径包括但不限于经颊、经表皮、硬膜外、吸入、动脉内、心内、脑室内、皮内、肌内、鼻内、眼内、腹膜内、脊柱内、鞘内、静脉内、口腔、胃肠外、通过灌肠剂或栓剂而经直肠、皮下(subcutaneous)、真皮下(subdermal)、舌下、透皮和经粘膜。另外,施用可以借助于注射液、散剂、液体、凝胶、滴剂或其它施用手段来发生。

[0536] 如所注意到,这些组合物可以另外包含所需抗原,例如肿瘤抗原或另一免疫调节化合物如Toll样受体激动剂、1型干扰素如α和β干扰素,和CD40激动剂如激动性CD40抗体和抗体片段,优选地是抗人CD40激动抗体和抗体片段或其它免疫增强子或抑制因子如PD-L1、PD-L2、CTLA4融合蛋白和对其具有特异性的抗体。

[0537] 在一个实施方案中,抗原可为癌症抗原或肿瘤抗原。术语癌症抗原和肿瘤抗原可互换使用,并且是指由癌细胞区别地表达的抗原。因此,癌症抗原可用于区别地靶向免疫反应抗癌细胞。癌症抗原因此会可能刺激肿瘤特异性免疫反应。某些癌症抗原尽管未必得到表达但由正常细胞编码。这些抗原中的一些的特征可在于在正常细胞中通常是沉默的(即不表达),即仅在某些分化阶段表达的那些,以及暂时表达的那些(例如胚性和胚胎性抗原)。其它癌症抗原可由突变型细胞基因如致癌基因(例如活化的ras致癌基因)、抑制基因(例如突变型p53)或由内部缺失或染色体易位引起的融合蛋白编码。其它癌症抗原可由病毒基因如由RNA和DNA肿瘤病毒携带的那些编码。

[0538] 肿瘤抗原的实例包括MAGE、MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV(DPPUV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、亲环素b、结肠直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)和其抗原抗原表位CAP-1和CAP-2、etv6、aml1、前列腺特异性抗原(PSA)和其抗原性抗原表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T细胞受体/CD3-.ζ.链、肿瘤抗原的MAGE家族(例如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)、肿瘤抗原的GAGE家族(例如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、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、α-胎蛋白、ε-钙粘素、α-连环蛋白、β-连环蛋白、γ-连环蛋白、p120ctn、gp10.sup.Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤息肉病大肠杆菌蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig-独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产品如人乳头状瘤病毒蛋白、肿瘤抗原的Smad家族、Imp-1、PIA、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-3、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7,以及c-erbB-2。

[0539] 癌症或肿瘤和与这些肿瘤相关(而非仅仅)的特异性肿瘤抗原包括急性淋巴母细胞性白血病(etv6、aml1、亲环素b)、B细胞淋巴瘤(Ig-独特型)、神经胶质瘤(E-钙粘素、α-连环蛋白、β-羧戊二酸、γ-连环蛋白、p120ctn)、膀胱癌(p21ras)、胆癌(p21ras)、乳癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、宫颈癌(p53、p21ras)、结肠恶性肿瘤(p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUC家族)、结肠直肠癌(结肠直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、APC)、绒毛膜癌(CEA)、

上皮细胞癌(亲环素b)、胃癌(HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肝细胞癌(α-胎蛋白)、霍奇金氏淋巴瘤(Imp-1、EBNA-1)、肺癌(CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、淋巴细胞源性白血病(亲环素b)、黑素瘤(p5蛋白、gp75、癌胚抗原、GM2和GD2神经节苷脂、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100.sup.Pmel117)、骨髓瘤(MUC家族、p21ras)、非小细胞肺恶性肿瘤(HER2/neu、c-erbB-2)、鼻咽癌(Imp-1、EBNA-1)、卵巢癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、前列腺癌(前列腺特异性抗原(PSA)和其抗原性抗原表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肾癌(HER2/neu、c-erbB-2)、子宫颈和食道的鳞状细胞癌(病毒产品如人乳头状瘤病毒蛋白)、睾丸癌(NY-ESO-1)和T细胞白血病(HTLV-1抗原表位)。

[0540] “药物赋形剂”或“药学上可接受的赋形剂”是载体,通常是液体,于所述载体中配制活性治疗剂。在本发明的一个实施方案中,活性治疗剂是本文所述的人源化抗体,或其一个或多个片段。赋形剂通常不向制剂提供任何药理活性,但其可以提供化学和/或生物稳定性,以及释放特征。示例性制剂可以见于例如Grennaro(2005)[编]Remington:The Science and Practice of Pharmacy[第21版]中。

[0541] 药物组合物典型地必须是无菌的并且在制造和存储条件下稳定。本发明设想药物组合物以冻干形式存在。可以将组合物配制成溶液、微乳液、脂质体或适于高药物浓度的其它有序结构。载体可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)和其合适的混合物的溶剂或分散介质。本发明进一步涵盖在药物组合物中包括稳定剂。

[0542] 可以将本文所述的多肽、缀合物和抗体配制成具有多种剂型的药物组合物。为了制备本发明的药物组合物,可以根据药物配制领域技术人员熟知的技术将至少一种作为活性成分的VISTA和VISTA缀合物与适当的载体和添加剂充分混合。参见Grennaro(2005)[编]Remington:The Science and Practice of Pharmacy[第21版]。例如,本文所述的抗体可以配制在pH 7.2磷酸盐缓冲盐水中,并且作为5.0mg/mL透明的无色液体溶液提供。

[0543] 类似地,液体制剂的组合物包括含有合适的载体和添加剂的溶液、乳液、分散液、悬浮液、糖浆和酏剂,所述载体和添加剂包括但不限于水、醇、油、二醇、防腐剂、矫味剂、着色剂和悬浮剂。用于胃肠外施用的典型制剂包含活性成分与载体如无菌水或胃肠外可接受的油,所述油包括但不限于聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、卵磷脂、花生油或芝麻油,也可以包括用于帮助溶解或防腐的其它添加剂。在溶液的情况下,其可以冻干成散剂并然后在使用之前即刻复原。对于分散液和悬浮液,适当的载体和添加剂包括水性胶、纤维素、硅酸盐或油。

[0544] 对于所述实施方案中的每一个,可以通过多种剂型施用VISTA和VISTA缀合物。设想了本领域普通技术人员已知的任何生物学上可接受的剂型和其组合。这些剂型的实例包括不限于可复原的散剂、酏剂、液体、溶液、悬浮液、乳液、散剂、粒子、颗粒、微粒、可分散粒子、扁囊剂、吸入剂、气雾吸入剂、贴片、颗粒吸入剂、植入物、储库植入物、注射剂(包括皮下、肌内、静脉内和皮内)、输注和其组合。

[0545] 在许多情况下,组合物中优选包括等张剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可注射组合物的长久吸收可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来实现。此外,本文所述的化合物可以配制于时间释放制剂中,例如配制于包括缓慢释放聚合物的组合物中。可以用载体制备VISTA和VISTA缀合物,所述载体将保护化合物避免快速释放,如控制释放制剂,其包括植入物及微封装递送系统。可以使用可生物降解的

生物相容性聚合物，如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯、聚乳酸以及聚乳酸、聚乙醇酸共聚物(PLG)。本领域技术人员已知许多制备这些制剂的方法。

[0546] 也可以将补充性活性化合物并入组合物中。

[0547] 例如，组合物可以进一步包含所需抗原，例如肿瘤抗原或另一免疫调节化合物如Toll样受体激动剂、1型干扰素如α和β干扰素，和CD40激动剂如激动性CD40抗体和抗体片段，优选地是抗人CD40激动抗体和抗体片段或其它免疫增强子或抑制因子如PD-L1、PD-L2、CTLA4融合蛋白和对其具有特异性的抗体。

[0548] 包含VISTA的组合物可以进一步包含抗原或其它免疫激动剂。与组合的其它组分组合，抗原的施用量可以针对抗原有效产生免疫反应。例如，抗原的施用量可为约100μg/kg至约100mg/kg。在一些实施方案中，抗原的施用量可为约10μg/kg至约10mg/kg。在一些实施方案中，抗原的施用量可为约1mg/kg至约5mg/kg。然而，构成有效产生免疫反应的量的抗原的特定量在一定程度上取决于某些因素，如所施用的具体抗原；所施用的具体激动剂和其量；所施用的具体激动剂和其量；免疫系统的状态；施用激动剂和抗原的方法和顺序；被施用所述制剂的物种；以及所需治疗结果。因此，阐述通常构成抗原的有效量的量是不实际的。然而，本领域的普通技术人员可在考虑这些因素后容易地确定适当量。

[0549] 抗原可为能够产生Th1免疫反应的任何物质，所述Th1免疫反应可以包括例如CD8+ T细胞反应、NK T细胞反应、γ/δT细胞反应或Th1抗体反应中的一种或多种。合适的抗原包括但不限于肽；多肽；脂质；糖脂；多糖；碳水化合物；多核苷酸；肮病毒；活的或失活的细菌、病毒或真菌；和细菌、病毒、真菌、原生动物、肿瘤源性或生物体源性抗原、毒素或类毒素。

[0550] 此外，某些目前实验性的抗原、尤其是不产生强免疫反应的如重组蛋白、糖蛋白和肽的物质可与本发明的佐剂组合关联使用。示例性实验性亚单元抗原包括与病毒性疾病有关的那些，所述病毒性疾病如为腺病毒、AIDS、水痘、巨细胞病毒、登革热、猫科动物白血病、鸡瘟、甲型肝炎、乙型肝炎、HSV-1、HSV-2、猪霍乱、甲型流感、乙型流感、日本脑炎、麻疹、副流行性感冒、狂犬病、呼吸道融合性病毒、轮状病毒属、疣和黄热病。

[0551] 抗原可为癌症抗原或肿瘤抗原。术语癌症抗原和肿瘤抗原可互换使用，并且是指由癌细胞区别地表达的抗原。因此，癌症抗原可用于区别地靶向免疫反应抗癌细胞。癌症抗原因此会可能刺激肿瘤特异性免疫反应。某些癌症抗原尽管未必得到表达但由正常细胞编码。这些抗原中的一些的特征可在于在正常细胞中通常是沉默的(即不表达)，即仅在某些分化阶段表达的那些，以及暂时表达的那些(例如胚性和胚胎性抗原)。其它癌症抗原可由突变型细胞基因如致癌基因(例如活化的ras致癌基因)、抑制基因(例如突变型p53)或由内部缺失或染色体易位引起的融合蛋白编码。其它癌症抗原可由病毒基因如由RNA和DNA肿瘤病毒携带的那些编码。

[0552] 肿瘤抗原的实例包括MAGE、MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV(DPPUV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、亲环素b、结肠直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)和其抗原抗原表位CAP-1和CAP-2、etv6、aml1、前列腺特异性抗原(PSA)和其抗原性抗原表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T细胞受体/CD3-ζ链、肿瘤抗原的MAGE家族(例如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)、肿瘤抗原的GAGE家族

(例如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、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、α-胎蛋白、ε-钙粘素、α-连环蛋白、β-连环蛋白、γ-连环蛋白、p120ctn、gp10.sup.Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤息肉病大肠杆菌蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig-独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产品如人乳头状瘤病毒蛋白、肿瘤抗原的Smad家族、Imp-1、PIA、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-3、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7,以及c-erbB-2。

[0553] 癌症或肿瘤和与这些肿瘤相关(而非排他性的)的特异性肿瘤抗原包括急性淋巴母细胞性白血病(etv6、aml1、亲环素b)、B细胞淋巴瘤(Ig-独特型)、神经胶质瘤(E-钙粘素、α-连环蛋白、β-羧戊二酸、γ-连环蛋白、p120ctn)、膀胱癌(p21ras)、胆癌(p21ras)、乳癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、宫颈癌(p53、p21ras)、结肠恶性肿瘤(p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUC家族)、结肠直肠癌(结肠直肠相关抗原(CRC)-CO17-1A/GA733、APC)、绒毛膜癌(CEA)、上皮细胞癌(亲环素b)、胃癌(HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肝细胞癌(α-胎蛋白)、霍奇金氏淋巴瘤(Imp-1、EBNA-1)、肺癌(CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、淋巴细胞源性白血病(亲环素b)、黑素瘤(p5蛋白、gp75、癌胚抗原、GM2和GD2神经节苷脂、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100.sup.Pmel117)、骨髓瘤(MUC家族、p21ras)、非小细胞肺恶性肿瘤(HER2/neu、c-erbB-2)、鼻咽癌(Imp-1、EBNA-1)、卵巢癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、前列腺癌(前列腺特异性抗原(PSA)和其抗原性抗原表位PSA-1、PSA-2和PSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肾癌(HER2/neu、c-erbB-2)、子宫颈和食道的鳞状细胞癌(病毒产品如人乳头状瘤病毒蛋白)、睾丸癌(NY-ESO-1)和T细胞白血病(HTLV-1抗原表位)。

[0554] 本领域技术人员将能够通过常规实验,例如在本文的公开内容和以下文献中教义的指导下确定有效的施用剂量和频率:Goodman等,(2011)Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics[第12版];Howland等,(2005)Lippincott's Illustrated Reviews:Pharmacology[第2版];以及Golan,(2008)Principles of Pharmacology:The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy[第2版]。还参见Grennaro(2005)[编]Remington:The Science and Practice of Pharmacy[第21版]。

[0555] 施用途径

[0556] 本文所述的组合物可以用以下途径中的任一个来施用:经颊、经表皮、硬膜外、输注、吸入、动脉内、心内、脑室内、皮内、肌内、鼻内、眼内、腹膜内、脊柱内、鞘内、静脉内、口腔、胃肠外、经肺、通过灌肠剂或栓剂而经直肠、皮下、真皮下、舌下、透皮和经粘膜。优选的施用途径是静脉内注射或输注。施用可为局部的,其中直接在疾病(例如肿瘤)部位、接近于疾病(例如肿瘤)部位、在疾病(例如肿瘤)部位的位置、在疾病(例如肿瘤)部位的附近、在疾病(例如肿瘤)部位、在疾病(例如肿瘤)部位周围,或在疾病(例如肿瘤)部位邻近施用组合物,或全身性施用,其中给予患者所述组合物并使其广泛穿过身体,从而达到疾病部位。局部施用(例如注射)可以通过施用于涵盖疾病和/或受疾病影响的细胞、组织、器官和/或器官系统来实现,和/或其中疾病体征和/或症状是活跃的或可能发生的(例如肿瘤部位)。施用可为表面的,具有局部效应,当需要其作用时直接施加组合物(例如肿瘤部位)。

[0557] 对于所述实施方案中的每一个,可以通过多种本领域中已知的剂型施用化合物。

涵盖本领域普通技术人员已知的任何生物学上可接受的剂型和其组合。这些剂型的实例包括不限于可嚼片剂、快速溶解片剂、泡腾片剂、可复原的散剂、酏剂、液体、溶液、悬浮液、乳液、片剂、多层片剂、二层片剂、胶囊、软明胶胶囊、硬明胶胶囊、囊片、锭剂、可咀嚼口锭剂、珠粒、散剂、胶、粒子、颗粒、微粒、可分散粒子、扁囊剂、灌注剂、栓剂、乳膏、表面剂、吸入剂、气雾吸入剂、贴片、颗粒吸入剂、植入物、储库植入物、可摄取剂、注射剂(包括皮下、肌内、静脉内和真皮内)、输注剂和其组合。

[0558] 混合物可包括的其它化合物例如为医学上惰性的成分(例如固体和液体稀释剂),如乳糖、葡萄糖、蔗醣、纤维素、淀粉或磷酸钙(用于片剂或胶囊)、橄榄油或油酸乙酯(用于软胶囊)和水或植物油(用于悬浮液或乳液);润滑剂如二氧化硅、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁或硬脂酸钙和/或聚乙二醇;胶凝剂如胶态粘土;增稠剂如黄芪胶或藻酸钠、结合剂如淀粉、阿拉伯胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮;崩解剂如淀粉、藻酸、藻酸钠或羧基乙酸淀粉钠;泡腾混合物;染料;甜味剂;润湿剂如卵磷脂、聚山梨酯或月桂基硫酸盐;和其它治疗上可接受的附属成分如保湿剂、防腐剂、缓冲剂和抗氧化剂,其为用于这些制剂的已知添加剂。

[0559] 用于口服施用的分散液可为糖浆、乳液、溶液或悬浮液。糖浆可含有例如蔗醣或蔗醣与甘油和/或甘露醇和/或山梨醇作为载体。悬浮液和所述乳液可含有载体,例如天然胶、琼脂、藻酸钠、果胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯醇。

[0560] 在其它实施方案中,本发明提供试剂盒,所述试剂盒包括一个或多个包含药物剂量单位的容器,所述药物剂量单位包含有效量的本发明的一种或多种抗体和其片段。试剂盒可以包括说明书、指南、标记、销售信息、警告或信息小册子。

[0561] 剂量

[0562] 根据本发明的任何实施方案的治疗性组合物中VISTA或VISTA缀合物的量可以根据以下因素而变:如个体的疾病状态、年龄、性别、体重、患者病史、风险因素、疾病倾向性、施用途径、先前存在的治疗方案(例如可能与其它药物相互作用)和体重。可以调整给药方案以提供最优的治疗反应。例如,可以施用单次推注,可随时间流逝施用若干分次剂量,或可以如治疗情况的急迫性所示而按比例减小或增大剂量。

[0563] 以剂量单位形式配制胃肠外组合物是尤其有利的以便于剂量的施用和均匀性。如本文中使用的剂量单位形式是指作为整体剂量适用于待治疗哺乳动物受试者的物理分立单元;每一单元含有预定量的抗体和其片段,所述预定量计算以产生与所需的药用载体相关的所需治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格是由以下规定并且直接取决于以下:抗体和其片段的独特特征和待实现的具体治疗效果,以及混配这种抗体和其片段的领域中固有的限制,以便治疗个体的敏感性。在用于治疗哺乳动物(例如人)的病状(本发明的抗体和其片段或其适当的药物组合物对所述病状有效)的治疗用途中,可以施用有效量的本发明的抗体和其片段。如适于本发明的剂量可为本文所述的组合物、药物组合物或任何其它组合物。

[0564] 剂量可以作为单一剂量、二倍剂量、三倍剂量、四倍剂量和/或五倍剂量来施用。可以单独、同时以及依次施用所述剂量。

[0565] 剂型可以呈本领域普通技术人员已知的任何释放形式。本发明的组合物可以配制为提供活性成分的即刻释放或者活性成分的持续或控制释放。在持续释放或控制释放制剂

中，可以在使得血液水平长期(例如4至24小时)维持在治疗范围内但是低于毒性水平的速率下发生活性成分的释放。优选的剂型包括即刻释放、延长释放、脉冲释放、可变释放、控制释放、延时释放、持续释放、延迟释放、持续释放和其组合，并且为本领域中已知。

[0566] 如本文所定义，蛋白质或多肽的治疗有效量(即有效剂量)在每公斤体重约0.001mg至30mg、优选地在每公斤体重约0.01mg至25mg、更优选地在每公斤体重约0.1mg至20mg，且甚至更优选地在每公斤体重约1mg至10mg、2mg至9mg、3mg至8mg、4mg至7mg，或5mg至6mg的范围内。熟练技术人员将了解，某些因素会影响有效治疗受试者所需的剂量，所述因素包括但不限于疾病或病症的严重度、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄，和存在的其它疾病。此外，用治疗有效量的蛋白质、多肽或抗体治疗受试者可包括单次治疗或优选地可包括一系列治疗。

[0567] 在优选的实例中，用在每公斤体重约0.1mg至20mg的范围内的抗体、蛋白质或多肽治疗受试者，每周一次持续约1周至10周、优选地2周至8周、更优选地约3周至7周且甚至更优选地约4周、5周或6周。还应了解，在具体治疗的过程期间，用于治疗的抗体、蛋白质或多肽的有效剂量可以增大或减小。剂量变化会发生并且会变得根据如本文所述的诊断分析的结果而显而易见。

[0568] 应了解可以使用本领域中已知的标准药理模型来监测组合物的药理活性。此外，应了解，可以将包含VISTA和VISTA缀合物、抗体或其抗原结合片段的组合物并入或封装于合适的聚合物基质或膜中以进行部位特异性递送，或者可以用能够实现部位特异性递送的特异性靶向剂官能化。本领域熟知这些技术以及其它药物递送技术。测定用于具体情况的最优剂量在本领域技术人员的能力范围内。参见例如Grennaro(2005)[编]Remington:The Science and Practice of Pharmacy[第21版]。

[0569] 治疗方法

[0570] 本文所述的VISTA和VISTA缀合物可以用于治疗炎症病症、自体免疫疾病、抑制$CD4^+$T细胞增殖、抑制$CD8^+$T细胞增殖、抑制$CD4^+$T细胞的细胞因子产生并且抑制$CD8^+$T细胞的细胞因子产生的方法中，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的VISTA和VISTA缀合物。此外，本文所述的VISTA和VISTA缀合物可以用于制造用于治疗自体免疫疾病、抑制$CD4^+$T细胞增殖、抑制$CD8^+$T细胞增殖、抑制$CD4^+$T细胞的细胞因子产生并且抑制$CD8^+$T细胞的细胞因子产生的药物中，所述药物包含有效量的本文所述的VISTA和VISTA缀合物。本文所述的VISTA和VISTA缀合物可以与药学上可接受的载体混合以制造用于治疗自体免疫疾病、抑制$CD4^+$T细胞增殖、抑制$CD8^+$T细胞增殖、抑制$CD4^+$T细胞的细胞因子产生并且抑制$CD8^+$T细胞的细胞因子产生的组合物中，所述组合物包含有效量的本文所述的VISTA或VISTA缀合物。

[0571] 本文所述的治疗方法可以包括施用PD-L3或VISTA，所述PD-L3或VISTA是一种新型并且结构上独特的Ig超家族抑制配体，其细胞外域对B7家族配体PD-L1有同源性。这种分子在本文中可互换称为PD-L3或VISTA或T细胞活化的V域免疫球蛋白抑制因子(VISTA)。VISTA主要在造血室内表达并且在骨髓APC和T细胞上受高度调控。VISTA抑制通路的治疗性介入提出一种调节T细胞介导性免疫性以治疗多种癌症的新型方法。VISTA多肽、缀合物、核酸、配体和其调节剂可适用于调控免疫性，尤其是T细胞免疫性，以便治疗自体免疫病症和炎症病症。

[0572] 使用VISTA、VISTA缀合物(VISTA-Ig)和抗VISTA抗体以治疗癌症，包括但不限于结

肠直肠癌、膀胱癌、卵巢癌和黑素瘤、自体免疫病症和炎症病症。另外，本发明具体地涉及VISTA蛋白、尤其多聚VISTA蛋白和表达其的病毒载体(例如腺病毒)治疗治疗上需要免疫抑制的病状如过敏症、自体免疫病症和炎症病状的用途。

[0573] 患者可以表达自体免疫疾病的症状或者没有症状的患者。本文所述的方法可以用于体外或离体细胞，例如人细胞。或者，可以对受试者存在的细胞实施方法以作为体内(例如治疗)方案的部分。

[0574] 本发明提供治疗处于特征在于以下的病症的风险中(或对所述病症易感)的受试者的防治和治疗方法：VISTA(PD-L3)蛋白产生不足或过量，或产生与VISTA(PD-L3)野生型蛋白质相比活性降低或异常的VISTA(PD-L3)蛋白形式。此外，本发明的抗VISTA(PD-L3)抗体可用以例如通过调节VISTA(PD-L3)与其对抗受体的相互作用来检测和分离VISTA(PD-L3)蛋白、调控VISTA(PD-L3)蛋白的生物利用率并且调节VISTA(PD-L3)活性。

[0575] 本发明的用途和方法

[0576] 本文所述的VISTA分子，例如VISTA核酸分子、多肽、多肽同系物以及抗体和抗体片段可用于一种或多种以下方法中：a)筛选分析；b)预测医学(例如诊断分析、预后分析和监测临床试验)；以及c)治疗方法(例如治疗和防治方法，例如通过上调或下调免疫反应来实现)。如本文所述，本发明的VISTA(PD-L3)多肽具有一种或多种以下活性：1)结合于和/或调节其天然结合伴侣的活性，2)调节细胞内或细胞间信号，3)调节T淋巴细胞的活化，4)调节生物体例如哺乳动物生物体如小鼠或人的免疫反应。可使用本发明的分离的核酸分子，例如以表达VISTA(PD-L3)多肽(例如在基因疗法应用中通过宿主细胞中的重组表达载体来实现)、检测VISTA(PD-L3)mRNA(例如在生物样本中)或VISTA(PD-L3)基因的基因改变以及调节VISTA(PD-L3)活性，如下文进一步描述。VISTA(PD-L3)多肽可用以治疗特征在于VISTA(PD-L3)多肽产生不足或过量或产生VISTA(PD-L3)抑制剂的病状或病症。另外，VISTA(PD-L3)多肽可用以筛选天然存在的VISTA(PD-L3)结合伴侣、筛选调节VISTA(PD-L3)活性的药物或化合物以及治疗特征在于VISTA(PD-L3)多肽产生不足或过量或产生与VISTA(PD-L3)野生型多肽相比活性降低、异常或不受期望的VISTA(PD-L3)多肽形式的病状或病症(例如免疫系统病症，如重症综合性免疫缺陷、多发性硬化症、全身性红斑狼疮、I型糖尿病、淋巴组织增殖性综合征、炎症性肠病、过敏、哮喘、移植物抗宿主疾病和移植排斥反应；对感染性病原体如细菌和病毒的免疫反应；以及免疫系统癌症如淋巴瘤和白血病)。此外，本发明的抗VISTA(PD-L3)抗体可用以例如通过调节VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣之间的相互作用来检测和分离VISTA(PD-L3)多肽、调控VISTA(PD-L3)多肽的生物利用率并且调节VISTA(PD-L3)活性。

[0577] 可以基于以下事实来选择用作治疗剂的抗VISTA(PD-L3)抗体：在可溶性VISTA(PD-L3)蛋白(例如VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白)存在下，抗VISTA抗体会增强VISTA(PD-L3)对VISTA(PD-L3)相关免疫功能的抑制作用。这是相当意外的，因为这些抗VISTA抗体的体内表达与将从其对免疫性的体外作用所预期的相反(即这些抗VISTA单克隆抗体具有免疫抑制性)。

[0578] 本发明的一个重要方面涉及调节VISTA(PD-L3)表达或活性或与其天然结合伴侣的相互作用的方法。关于疗法，已经证明VISTA(PD-L3)会抑制CD28共同刺激、抑制免疫细胞的TCR活化、抑制活化免疫细胞(CD4+和CD8+T细胞)的增殖、抑制T细胞的细胞因子产生(IL-

2、γ干扰素)和向免疫细胞发送抑制信号。因此,可调节VISTA(PD-L3)的活性和/或表达以及在VISTA(PD-L3)和其结合伴侣之间在T细胞上的相互作用以调节免疫反应。因为VISTA(PD-L3)结合于抑制受体(在T细胞上),所以VISTA(PD-L3)活性上调应引起免疫反应下调,而VISTA(PD-L3)活性下调应引起免疫反应上调。在一个实施方案中,VISTA(PD-L3)结合于抑制受体。如之前指出,反直觉地,由申请人产生的VISTA(PD-L3)特异性抗体(其体外(在VISTA(PD-L3)-Ig存在下)会增强VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白的抑制活性(即,这些抗体增强VISTA(PD-L3)相关活性的抑制,所述活性如为VISTA(PD-L3)对细胞因子产生、T细胞增殖、分化或活化和之前指出的其它功能的影响))的表达与对体内所预期的相反,即已经发现这些抗体在体内有免疫抑制性。

[0579] 本发明的调节方法涉及使细胞与VISTA(PD-L3)多肽或调节与细胞相关的VISTA(PD-L3)多肽活性的一种或多种活性的试剂,例如调节VISTA(PD-L3)的表达或活性和/或调节VISTA(PD-L3)与其天然结合伴侣的相互作用的试剂接触。调节VISTA(PD-L3)多肽活性的试剂可为如本文所述的试剂,如核酸或多肽、VISTA(PD-L3)多肽的天然存在的结合伴侣、VISTA(PD-L3)抗体、VISTA(PD-L3)激动剂或拮抗剂、VISTA(PD-L3)激动剂或拮抗剂的肽模拟物、VISTA(PD-L3)肽模拟物或其它小分子。VISTA(PD-L3)的可溶形式也可以用于干扰VISTA(PD-L3)与任一其天然结合伴侣或配体的结合。

[0580] 调节VISTA(PD-L3)的表达的试剂为例如用于表达VISTA(PD-L3)多肽的反义核酸分子、三链体寡核苷酸、核糖酶或重组型载体。例如,可合成与在VISTA(PD-L3)多肽翻译起始位点周围的区域互补的寡核苷酸。可将一种或多种反义寡核苷酸添加到细胞培养基中,典型地在200μg/ml下添加,或施用于患者以防止VISTA(PD-L3)多肽的合成。反义寡核苷酸由细胞吸收并且与VISTA(PD-L3)mRNA杂交以防止翻译。或者,可使用结合双链DNA以形成三链体构建体以防止DNA解旋和转录的寡核苷酸。作为任一个的结果,阻断了VISTA(PD-L3)多肽的合成。当调节VISTA(PD-L3)表达时,优选地,这种调节通过除敲除VISTA(PD-L3)基因以外的手段来发生。

[0581] 借助于控制细胞中VISTA(PD-L3)的量来调节表达的试剂还会调节细胞中VISTA(PD-L3)活性的总量。在一个实施方案中,调节VISTA(PD-L3)的试剂刺激一种或多种VISTA(PD-L3)活性。这些抑制性试剂的实例包括已经引入细胞中的活性VISTA(PD-L3)多肽和编码VISTA(PD-L3)的核酸分子。在另一实施方案中,所述试剂抑制一种或多种VISTA(PD-L3)活性。这种抑制性试剂的实例包括反义VISTA(PD-L3)核酸分子、抗VISTA(PD-L3)抗体、VISTA(PD-L3)抑制剂和在主题筛选分析中鉴别的化合物。在另一实施方案中,抑制性试剂是抗VISTA(PD-L3)抗体与抗PD-L1或抗PD-L2抗体的组合。这些调节方法可体外进行(例如通过使细胞与试剂接触)或者可选地通过使试剂与细胞体内接触(例如通过向受试者施用试剂)来进行。因此,本发明提供治疗受折磨于将受益于上调或下调VISTA(PD-L3)多肽的病状或病症,例如特征在于VISTA(PD-L3)多肽或核酸分子的表达或活性不受期望、不足或异常的病症的个体的方法。在一个实施方案中,所述方法涉及施用试剂(例如通过本文所述的筛选分析鉴别的试剂)或调节(例如上调或下调)VISTA(PD-L3)表达或活性的试剂的组合。在另一实施方案中,所述方法涉及施用VISTA(PD-L3)或核酸分子以作为疗法补偿降低、异常或不期望的VISTA(PD-L3)表达或活性的疗法。

[0582] 本发明提供通过向受试者施用VISTA(PD-L3)多肽或调节VISTA(PD-L3)表达或至

少一种VISTA(PD-L3)活性的试剂来预防受试者的与异常或不期望的VISTA(PD-L3)表达或活性相关的疾病或病状的方法。可通过例如如本文所述的诊断或预后分析中的任一种或组合来鉴别处于由异常或不期望的VISTA(PD-L3)表达或活性导致或促进的疾病或病症的风险中的受试者。施用防治剂可在具有VISTA(PD-L3)反常特征的症状表现之前进行,以预防疾病或病症或者可选地延迟其进展。根据VISTA(PD-L3)反常的类型,例如VISTA(PD-L3)多肽、VISTA(PD-L3)激动剂或VISTA(PD-L3)拮抗剂(例如抗VISTA(PD-L3)抗体)可用于治疗受试者。可基于本文所述的筛选分析来确定适当试剂。

[0583] VISTA和VISTA缀合物可以与另外的化学治疗剂、细胞毒性剂、抗体(例如抗PD-L1、PD-L2或CTLA-4抗体)、淋巴因子或造血生长因子混合。VISTA和VISTA缀合物也可以与以下组合施用:另一抗体、淋巴因子、细胞毒性剂(例如抑制DNA、RNA或蛋白质合成的部分、放射性核素或核蛋白体的抑制蛋白、例如^{212}Bi、^{131}I、^{188}Re、^{90}Y、长春地辛、甲氨喋呤、亚德里亚霉素、顺铂、美洲商陆抗病毒蛋白、假单胞菌外毒素A、篦麻毒素、白喉毒素、篦麻毒素A链或细胞毒性磷脂酶)、免疫抑制剂(例如环孢菌素、来氟米特、甲氨喋呤、咪唑硫嘌呤(azothiprine)、巯嘌呤、更生霉素、他克莫司(tacrolimus)或西罗莫司(sirolimus))或造血生长因子。VISTA和VISTA缀合物可以用化学发光标记、顺磁标记(例如铝、锰、铂、氧、镧、镥、钪、钇或镓)、MRI对比剂、荧光标记、生物发光标记或放射性标记进行标记。在本文所述的方法中,第二试剂可以与抗体同时或依次施用。例如,第二试剂可为下调免疫反应(例如PD-L1、PD-L2或CTLA-4融合蛋白或对其具有特异性的抗体)的试剂。

[0584] 在一个实施方案中,治疗患有自体免疫疾病的受试者的方法包括向可能在接受二次疗法的受试者施用VISTA和VISTA缀合物。次级疗法的实例包括化学疗法、放射疗法、免疫疗法、光疗法、冷冻疗法、毒素疗法、激素疗法或手术。因此,本发明设想了所述方法和组合物结合标准抗癌疗法的用途。待治疗患者可以具有任何年龄。本领域技术人员将认识到可以结合VISTA或VISTA缀合物使用的其它抗癌疗法的存在和发展。

[0585] 剂量确定在本领域普通技术人员的水平内。可以施用VISTA和VISTA缀合物以进行短期治疗(历经一星期或更短、经常历经一至三天的期间)或者可以用于长期治疗(历经几个月或几年)。一般来说,VISTA和VISTA缀合物的治疗有效量是足以在自体免疫疾病中产生临床上明显变化的量。

[0586] 即使在免疫细胞上不存在共同刺激受体(例如CD28或ICOS),仍可出现如由抑制受体转导的抑制信号,因此其不是简单地在抑制受体与共同刺激受体之间的针对结合共同刺激分子的竞争的功能(Fallarino等,(1998)J.Exp.Med.188:205)。抑制信号发送到免疫细胞可引起免疫细胞的无响应性、无变应性或程序化细胞死亡。优选地,抑制信号的发送是通过不涉及调亡的机制来操作。

[0587] 自体免疫疾病

[0588] 本文所述的VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA融合蛋白(例如VISTA-Ig)和抗VISTA抗体可以用于治疗自体免疫疾病的组合物、用途和方法中。

[0589] 含有T细胞活化的抑制因子的V域免疫球蛋白(V-domain Immunoglobulin containing Suppressor of T cell Activation;VISTA)是与免疫球蛋白(Ig)超家族有关的家族的成员,其对免疫系统有着深远的影响。Ig超家族由许多重要的免疫调控剂如B7家族配体和受体组成。表征最好的共同刺激性配体是B7.1和B7.2,它们属于Ig超家族并且在

专职性APC上表达，并且其受体是CD28和CTLA-4。

[0590] B7家族配体已扩展到包括共同刺激性B7-H2(ICOS配体)和B7-H3，以及共同抑制性B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H4(B7S1或B7x)和B7-H6。Brandt等，(2009)J Exp Med 206,1495-1503;Greenwald等，(2005)Annu Rev Immunol 23:515-548。因此，已经鉴别了另外的CD28家族受体。ICOS在活化的T细胞上表达并且结合于B7-H2。ICOS为正共同调控剂，对T-细胞活化、分化和功能是重要的。Dong等，(2001)Nature 409,97-101。另一方面，程序化死亡1(PD-1)负调控T细胞反应。PD-$1^{-/-}$小鼠产生狼疮样自体免疫疾病或自体免疫扩张型心肌病。Nishimura等，(2001)Science 291:319-322。最近，CD80已被鉴别为将抑制性信号转导至T细胞中的PD-L1的第二受体。Butte等，(2007)Immunity 27,111-122。两种抑制性B7家族配体PD-L1和PD-L2具有不同的表达模式。PD-L2诱导式表达在DC和巨噬细胞上，而PD-L1广泛地表达在造血细胞和非造血细胞类型两者上。与PD-1受体的免疫抑制作用一致，使用PD-$L1^{-/-}$和PD-$L2^{-/-}$小鼠的研究已显示，两种配体在抑制T细胞增殖和细胞因子产生方面具有重叠作用。此时，VISTA似乎选择性表达造血细胞，这将其与PD-L1在分布方面区分开，并且可能在负调控自体免疫疾病的发展方面起到重要作用。

[0591] VISTA是一种新型且结构独特的Ig超家族抑制配体，其细胞外域具有与B7家族配体PD-L1的最高同源性。虽然在进化史上其最接近的相关物是PD-L1，但是因其适度的相似水平(20％)而没有将其命名为PD-L名称。其具有93个aa胞浆域，除了可能的蛋白激酶C结合位点以外没有明显的信号转导基序。参见图4。VISTA是负调控配体并且基于以下事实：

[0592] 可溶性VISTA-Ig融合蛋白抑制体外$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖和细胞因子产生。在PD-$1^{-/-}$T细胞中观测到抑制，表明PD-1不是VISTA受体。

[0593] VISTA在APC上的过表达会抑制体外$CD4^+$和$CD8^+$T细胞增殖。

[0594] 肿瘤细胞上的VISTA过表达会削弱肿瘤接种宿主中的保护性抗肿瘤免疫性。

[0595] VISTA$^{-/-}$小鼠产生炎症表型，从而确立VISTA具有免疫抑制功能。VISTA$^{-/-}$DC刺激更多的T细胞增殖，然后WT DC。

[0596] 抗VISTA单克隆抗体(13F3)在体外通过VISTA$^+$APC阻断T细胞反应的VISTA诱导性抑制以增强T细胞活化。

[0597] 抗VISTA单克隆抗体会加重EAE并且提高体内致脑炎Th17的频率。

[0598] 在多个(6个)鼠类肿瘤模型中抗VISTA单克隆抗体诱导肿瘤缓解，并且在这些模型中骨髓源性抑制细胞(MDSC)上的VISTA表达极高，表明VISTA$^+$MDSC抑制肿瘤特异性免疫。

[0599] 癌症治疗

[0600] VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA融合蛋白(例如VISTA-Ig)、由SEQ ID NO:38-67的核酸序列中任一个组成的siRNA分子以及本文所述的抗VISTA抗体可以用于治疗癌症(例如肿瘤)的组合物、用途和方法中。

[0601] 癌症的实例包括但不限于恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。这些癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫恶性肿瘤、唾液腺恶性肿瘤、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌瘤和各种类型的头颈癌，以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴细胞(SL)NHL；中级/滤泡性NHL；中级弥漫性

NHL;高级免疫母细胞性NHL;高级淋巴母细胞NHL;高级小无核裂细胞NHL;肿块性疾病NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia));慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性淋巴母细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性骨髓母细胞白血病;多发性骨髓瘤和移植后淋巴组织增殖性病症(PTLD)。

[0602] 依从本发明的治疗的术语癌症包括但不限于结肠直肠癌、恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴恶性疾病。这些癌症的更具体实例包括膀胱癌、卵巢癌、黑素瘤、鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫恶性肿瘤、唾液腺恶性肿瘤、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌瘤和各种类型的头颈癌、以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级免疫母细胞性NHL;高级淋巴母细胞NHL;高级小无核裂细胞NHL;肿块性疾病NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症);慢性淋巴细胞性白血病(CLL);急性淋巴母细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性骨髓母细胞白血病;和移植后淋巴组织增殖性病症(PTLD)以及与瘢痣病相关的异常血管增殖、水肿(如与脑肿瘤相关的水肿)和梅格斯氏综合征(Meigs' syndrome)。优选地,癌症选自结肠直肠癌、乳癌、结肠直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西氏肉瘤(kaposi's sarcoma)、类癌瘤恶性肿瘤、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤。癌症可为早期或晚期(包括转移性)结肠直肠癌癌、膀胱癌、卵巢癌或黑素瘤。癌症可为结肠直肠癌。依从本发明的治疗的癌性病状包括转移性癌症,其中骨髓源性抑制细胞对VISTA的表达会抑制抗肿瘤反应和抗侵袭性免疫反应。本发明的方法特别适用于治疗血管化肿瘤。

[0603] 本发明还适用于与化学疗法或放射疗法或其它生物制剂组合治疗癌症并且适用于增强其活性,即在骨髓源性抑制细胞对VISTA的表达会抑制抗肿瘤反应和化学疗法或放射疗法的功效或生物剂功效的个体体内增强其活性。可根据本发明使用显示抗癌活性的任何化学治疗剂。优选地,化学治疗剂可选自烷化剂、抗代谢物、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物及相关抑制剂、长春花生物碱、表鬼臼毒素、抗生素、L-天冬酰胺酶、拓扑异构酶抑制剂、干扰素、铂配位复合物、蒽二酮取代的脲、甲肼衍生物、肾上腺皮质抑制剂、肾上腺皮质激素、孕酮、雌激素、抗雌激素、雄激素、抗雄激素和促性腺素释放激素类似物。更优选地,化学治疗剂可选自5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸(LV)、伊立替康(irenotecan)、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡培他滨(capecitabine)、紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛(doxetaxel)。两种或更多种化学治疗剂可以与抗VEGF抗体的施用组合施用的混合物形式使用。一种优选的组合化学疗法基于氟尿嘧啶,其包含5-FU和一种或多种其它化学治疗剂。在本领域中已知组合化学疗法的合适给药方案并且将其描述于例如Saltz等,(1999)Proc ASCO 18:233a和Douillard等,(2000)Lancet355:1041-7中。生物剂可为另一免疫增效剂,如PD-L1、PD-L2、CTLA-4和PD-L1、PD-L2、CTLA-4融合蛋白的抗体,以及细胞因子、生长因子拮抗剂和激动剂、激素和抗细胞因子抗体。

[0604] 移植物抗宿主疾病

[0605] VISTA多肽、多聚VISTA多肽、VISTA融合蛋白(例如VISTA-Ig)、由SEQ ID NO:38-67

的核酸序列中任一个组成的siRNA分子以及本文所述的抗VISTA抗体可以用于治疗移植物抗宿主疾病(GVHD)的组合物、用途和方法中。

[0606] 本发明还提供一种治疗移植物抗宿主疾病(GVHD)的方法，其包括施用有效量的VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白，或多聚VISTA蛋白。治疗移植物抗宿主疾病(GVHD)、急性移植物抗宿主疾病、慢性移植物抗宿主疾病、与干细胞移植相关的急性移植物抗宿主疾病、与干细胞移植相关的慢性移植物抗宿主疾病、与骨髓移植相关的急性移植物抗宿主疾病、与同种异体造血干细胞移植(HSCT)相关的急性移植物抗宿主疾病，或与骨髓移植相关的慢性移植物抗宿主疾病的方法可以包括施用有效量的VISTA融合蛋白、任选地VISTA-Ig融合蛋白或多聚VISTA蛋白。

[0607] 移植物抗宿主疾病(GVHD)可为移植物抗宿主疾病(GVHD)、急性移植物抗宿主疾病、慢性移植物抗宿主疾病、与干细胞移植相关的急性移植物抗宿主疾病、与干细胞移植相关的慢性移植物抗宿主疾病、与骨髓移植相关的急性移植物抗宿主疾病、与同种异体造血干细胞移植(HSCT)相关的急性移植物抗宿主疾病，或与骨髓移植相关的慢性移植物抗宿主疾病。待治疗的患者可具有移植物抗宿主疾病(GVHD)的至少一种症状，任选地其中患者显示急性GVHD，包括但不限于腹痛、腹部月经痛、腹泻、发烧、黄疸、皮疹、呕吐和体重减轻。患者可以具有慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)的至少一种症状，包括但不限于干眼症、口干、脱发、肝炎、肺病、胃肠道病症、皮疹和皮肤增厚。患者可能已经或可能将要接受同种异体干细胞或骨髓移植。患者可能已经或可能将要接受自体性干细胞或骨髓移植。

[0608] 诊断方法

[0609] 选择性结合VISTA和VISTA缀合物的抗VISTA和抗VISTA缀合物抗体、由SEQ ID NO:38-67的核酸序列中任一个组成的siRNA分子，以及其抗原结合片段可以用于检测存在或不存在VISTA和VISTA缀合物的诊断方法。抗VISTA和抗VISTA缀合物抗体可以用于包括以下的方法中：(a)使测试样本与结合VISTA或VISTA缀合物的抗体或其片段接触，以及(b)分析抗体-抗原表位复合物。抗体-抗原表位复合物可以通过Western印迹法、放射免疫分析、ELISA(酶联免疫吸附分析)、“夹心结构”免疫分析、免疫沉淀法分析、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散分析、凝集分析、互补体固定分析、免疫组织化学分析、荧光免疫分析和蛋白质A免疫分析进行检测。样本可为组织活检物、淋巴、尿、脑脊液、羊水、炎症渗出液、血液、血清、粪便或从结肠直肠道收集的液体。

[0610] 选择性结合VISTA和VISTA缀合物的抗体可为重组型。选择性结合VISTA和VISTA缀合物的抗体的片段可为Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv、CDR、互补位，或能够结合抗原的抗体。选择性结合VISTA和VISTA缀合物的抗体可为嵌合的、人源化的、抗独特型的、单链的、双官能的或共特异性的。选择性结合VISTA和VISTA缀合物的抗体可为结合于标记的片段，所述标记包括但不限于化学发光标记、顺磁标记(例如铝、锰、铂、氧、镧、镥、钪、钇或镓)、MRI对比剂、荧光标记、生物发光标记或放射性标记。

[0611] 另外，VISTA和VISTA缀合物、选择性VISTA和VISTA缀合物的抗体，和其抗原结合片段可连接于固体支撑物(例如珠粒、试管、薄片、培养皿或测试条)如阵列。

[0612] 所述方法可以包括通过正电子发射断层摄影术(PET)、CCD低照度监测系统、x射线、CT扫描、闪烁扫描术、光声成像、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、磁共振成像(MRI)、超声波、顺磁成像和内窥镜光学相干断层扫描术对VISTA多肽或VISTA缀合物进行成

像。

[0613] 筛选分析

[0614] 本发明提供一种鉴别调节剂(“筛选分析”),即结合于VISTA多肽、对例如VISTA表达或VISTA活性具有刺激或抑制作用,或对VISTA和其天然结合伴侣之间的相互作用具有刺激或抑制作用的候选物或测试化合物或试剂(例如肽、肽模拟物、小分子或其它药物)的方法。

[0615] 用于筛选结合于VISTA多肽或其生物活性部分,例如调节VISTA多肽与其天然结合伴侣相互作用的能力的候选物或测试化合物的分析可以包括使候选化合物与VISTA多肽接触并测试对VISTA多肽与其天然结合伴侣相互作用的能力的调节。用于筛选结合于VISTA蛋白或多肽或其生物活性部分或调节其活性的候选物或测试化合物的分析可以包括接触VISTA多肽并测试VISTA多肽与候选试剂之间的结合。用于筛选对由VISTA负调控的免疫功能具有刺激或抑制作用的候选物或测试化合物的分析如在本文鉴别出或基于其对VISTA和其天然结合伴侣之间的相互作用的影响。这些VISTA相关功能包括例如抑制细胞因子产生(例如由T细胞产生Il-2、T细胞的γ干扰素、抑制适度的CD28共同刺激、抑制CD4+和CD8+T细胞增殖、抑制原生和记忆CD4+T细胞的增殖,以及抑制TCR活化而不诱导调亡)。本发明的测试化合物可使用本领域已知的组合文库方法中众多方法中的任一种来获得,所述方法包括:生物文库;空间可寻址的平行固相或液相文库;需要去卷积的合成文库方法;“一珠粒一化合物”文库方法;以及使用亲和力色谱选择的合成文库方法。生物文库方法限于肽文库,而其它四种方法适用于肽、非肽寡聚物或化合物的小分子文库。Lam(1997)Anticancer Drug Des.12:145。

[0616] 分析可为基于细胞的分析,其中细胞表达VISTA多肽或其生物活性部分,所述分析包括使VISTA多肽或其生物活性部分与测试化合物接触,以及测定测试化合物调节VISTA活性的能力。测定测试化合物调节VISTA活性的能力可通过监测例如VISTA结合于其天然结合伴侣和调节免疫细胞活性的能力来实现。免疫细胞可为T细胞、B细胞或骨髓细胞。例如可如下测定测试化合物调节VISTA结合于其反受体的能力:使VISTA与放射性同位素或酶促标记偶联,以监测测试化合物调节VISTA结合于表达VISTA对抗受体的T细胞的能力。例如可如下测定测试化合物结合VISTA的能力:使化合物与放射性同位素或酶促标记偶联,以可通过检测复合物中的标记VISTA化合物来测定化合物对VISTA的结合。

[0617] 分析可用于在没有标记任一反应物的情况下测定化合物与VISTA相互作用的能力。例如,可使用微生理计以检测化合物与VISTA的相互作用,而不用标记化合物或VISTA。McConnell,H.M.等,(1992)Science 257:1906-1912。微生理计(例如Cytosensor)是使用光寻址电位传感器(LAPS)来测量细胞酸化其环境的速率的分析仪。可将酸化速率的变化用作化合物与VISTA之间的相互作用的指标。

[0618] 分析可为基于细胞的分析,其包括使表达VISTA结合伴侣的T细胞与测试化合物接触,以及测定测试化合物调节(例如刺激或抑制)VISTA结合伴侣的活性的能力。例如可通过测定VISTA多肽结合于VISTA结合伴侣或与VISTA结合伴侣相互作用的能力来测定测试化合物调节VISTA结合伴侣的活性的能力。

[0619] 可通过上述用于测定直接结合的方法之一来测定VISTA多肽或其生物学上活性片段结合于VISTA结合伴侣或与VISTA结合伴侣相互作用的能力。在一个实施方案中,可通过

测定结合伴侣活性来测定VISTA多肽结合于VISTA结合伴侣或与VISTA结合伴侣相互作用的能力。例如,可通过检测细胞第二信使的诱导(例如酪氨酸激酶或磷酸酶活性)、检测适当底物的催化/酶活性、检测报告基因(包含可操作地连接于编码可检测标记例如荧光素酶的核酸的目标反应性调控元件)的诱导或检测目标调控细胞反应来测定结合伴侣的活性。例如,测定VISTA多肽结合于天然VISTA结合伴侣或与天然VISTA结合伴侣相互作用的能力可通过如下来实现:测量化合物调节增殖分析中免疫细胞共同刺激或抑制的能力,或干扰VISTA多肽结合于识别VISTA多肽的一部分的抗体的能力。在一个实施方案中,调节T细胞活化的化合物可通过测定化合物调节T细胞增殖或细胞因子产生的能力来鉴别。在一个实施方案中,调节T细胞活化的化合物可通过测定化合物在一种以上抗原浓度下调节T细胞增殖或细胞因子产生的能力来鉴别。

[0620] 分析可为无细胞分析,其中使VISTA多肽或其生物活性部分与测试化合物接触,以及测定测试化合物结合于VISTA多肽或其生物活性部分的能力。用于本发明的分析中的VISTA多肽的优选的生物活性部分包括参与与非VISTA分子的相互作用的片段,例如结合于VISTA结合伴侣的细胞外域的至少一部分。可如上述直接或间接地测定测试化合物对VISTA多肽的结合。

[0621] 分析可为无细胞分析,其中使VISTA多肽或其生物活性部分与测试化合物接触,以及测定测试化合物调节(例如刺激或抑制)VISTA多肽或其生物活性部分的活性的能力。例如可通过用上述用于测定直接结合的方法之一测定VISTA多肽结合于VISTA结合伴侣的能力来测定测试化合物调节VISTA多肽的活性的能力。本发明的无细胞分析适用于多肽(例如VISTA多肽或其生物活性部分,或VISTA所结合的结合伴侣)的可溶形式和/或膜结合形式。在使用多肽的膜结合形式(例如细胞表面VISTA)的无细胞分析的情况下,可能需要利用增溶剂以使多肽的膜结合形式保持在溶液中。这些增溶剂的实例包括非离子型洗涤剂如正辛基糖苷、正十二烷基糖苷、正十二烷基麦芽糖苷、辛酸-N-甲基葡糖酰胺、癸酰基N-甲基葡糖酰胺、Triton®X-100、Triton®X-114、Thesit、异三癸基聚(乙二醇醚)n、3-[(3-氯氨基丙基)二甲铵基]-1-丙烷磺酸酯(CHAPS)、3-[(3-氯氨基丙基)二甲铵基]-2-羟基-1-丙烷磺酸酯(CHAPSO)或N-十二烷基.dbd.N,N-二甲基-3-铵基-1-丙烷磺酸酯。

[0622] 在分析方法中,可能需要固定VISTA或其结合伴侣以有助于从所述多肽中的一或两个的非复合形式分离复合形式,以及适应分析的自动化。在候选化合物存在和不存在下,测试化合物结合于VISTA多肽或VISTA多肽与其结合伴侣的相互作用可在适于含有反应物的任何容器中实现。这些容器的实例包括微量滴定板、试管和微离心管。在一个实施方案中,可提供增加使多肽中的一或两个结合于基质的域的融合蛋白。例如,谷胱甘肽-S-转移酶/VISTA融合蛋白或谷胱甘肽-S-转移酶/结合伴侣融合蛋白可吸附于谷胱甘肽SEPHAROSE®珠粒(Sigma Chemical,St.Louis,Mo.)或产生谷胱甘肽的微量滴定板上,其然后与测试化合物或测试化合物和未吸附的结合伴侣多肽或VISTA多肽组合,并且在有益于复合物形成的条件下(例如关于盐和pH值在生理条件下)孵育混合物。在孵育之后,洗涤珠粒或微量滴定板的孔以除去任何未结合的组分,在珠粒的情况下固定基质,并且直接或间接地测定复合物形成,例如上文所述。或者,复合物可从基质解离,并且使用标准技术测定VISTA结合或活性的水平。用于将多肽固定在基质上的其它技术也可以用于本发明的筛选分析。测定测试化合物调节VISTA多肽的活性的能力可以通过如下实现:测定测试化

合物调节在VISTA下游起作用的分子的活性的能力，例如通过与VISTA结合伴侣的胞浆域相互作用。例如，可如先前所述来测定第二信使的水平、适当目标上相互作用分子的活性或相互作用子对适当目标的结合。

[0623] 可以在使细胞与候选化合接触并且测定细胞中VISTA mRNA或多肽的表达的方法中鉴别VISTA表达的调节剂。将在候选化合物存在下VISTA mRNA或多肽的表达水平与在无候选化合物存在下VISTA mRNA或多肽的表达水平相比。然后如果变化是统计上显著的，那么可基于这个比较将候选化合物鉴别成VISTA表达的调节剂。

[0624] 可以在双杂交分析或三杂交分析中将VISTA多肽用作“诱饵蛋白”(参见例如美国专利5,283,317;Zervos等,(1993)Cell 72:223-232;Madura等,(1993)J.Biol.Chem.268:12046-12054;Bartel等,(1993)Biotechniques 14:920-924;Iwabuchi等,(1993)Oncogene 8:1693-1696;和WO 94/10300)，以鉴别结合于VISTA(“VISTA结合蛋白”、“VISTA结合伴侣”或“VISTA-bp”)或与其相互作用的其它多肽)并且牵涉于VISTA活性中。这些VISTA结合蛋白还可能牵涉于作为例如VISTA介导性信号传导通路的下游元件的VISTA多肽或VISTA目标所产生的信号的传播。或者，这些VISTA结合多肽可为VISTA抑制剂。双杂交系统基于大多数转录因子的模块化性质，所述转录因子由可分离的DNA结合域和活化域组成。简言之，所述分析利用两种不同的DNA构建体。在一种构建体中，使编码VISTA多肽的基因与编码已知转录因子(例如GAL-4)的DNA结合域的基因融合。在其它构建体中，使来自DNA序列文库的编码未鉴别的多肽(“饵料(prey)”或“样本”)的DNA序列与编码已知转录因子的活化域的基因融合。如果“诱饵”和“饵料”多肽能够体内相互作用从而形成VISTA依赖性复合物，那么转录因子的DNA结合域和活化域就会靠近。这种靠近允许可操作地连接于对转录因子有反应的转录调控位点的报告基因(例如LacZ)的转录。可检测报告基因的表达并且含有功能性转录因子的细胞群落可被分离并用于获得编码与VISTA多肽相互作用的多肽的克隆基因。

[0625] 两种或两种以上本文所述的分析的组合。例如，可使用基于细胞的分析或无细胞分析来鉴别调节剂，并且试剂调节VISTA多肽活性的能力可在体内例如在动物如用于细胞转化和/或肿瘤形成的动物模型中确定。

[0626] 本发明进一步涉及由上述筛选分析鉴别的新型试剂。如在本文所述的方法中在适当动物模型中鉴别的试剂。例如，如本文所述鉴别的试剂(例如VISTA调节剂、反义VISTA核酸分子、VISTA特异性抗体或VISTA结合伴侣)可用于动物模型中以测定这种试剂的治疗功效、毒性或副作用。或者，如本文所述鉴别的试剂可用于动物模型中以测定这种试剂的作用机制。此外，本发明涉及由上述筛选分析鉴别的新型试剂用于如本文所述的治疗的用途。

[0627] 检测分析

[0628] 本文鉴别的cDNA序列的部分或片段(以及相应的完整基因序列)可按多种方式用作多核苷酸试剂。例如，这些序列可用于：(i)在染色体上绘制其各自的基因；并因此找到与遗传疾病相关的基因区域；(ii)根据微量的生物样本鉴别个体(组织分型)；以及(iii)帮助生物样本的法医学鉴别。这些应用将在下面的小节中描述。

[0629] 染色体作图

[0630] 一旦基因序列(或序列一部分)已经分离后，可将这个序列用于为基因在染色体上的位置作图。这个过程称为染色体作图。因此，本文所述的VISTA核苷酸序列的部分或片段可用于为VISTA基因在染色体上的位置作图。VISTA序列对染色体的作图是将这些序列与疾

病相关基因相联系的重要的第一步。简而言之，可通过由VISTA核苷酸序列制备PCR引物(优选长15-25bp)而将VISTA基因对染色体作图。VISTA序列的计算机分析可用于预测在基因组DNA中跨度不超过一个外显子从而使扩增过程复杂化的引物。这些引物然后可用于含单独人染色体的体细胞杂种的PCR筛选。只有含有对应于VISTA序列的人基因的那些杂交体才会产生扩增片段。体细胞杂交体通过融合来自不同哺乳动物的体细胞(例如人和小鼠细胞)而制备。随着人和小鼠细胞杂种的生长和分裂，其逐渐以随机顺序丢失人染色体，但保留小鼠染色体。通过使用小鼠细胞无法生长(由于它们缺乏特定的酶)而人细胞可以生长的培养基，将保留一个含有编码所需酶的基因的人染色体。通过使用各种培养基，可建立起多组杂交细胞系。一组中的每个细胞系含有单个人染色体或少量人染色体以及全套小鼠染色体，从而允许容易地将各个基因对特定的人染色体作图。D'Eustachio等,(1983)Science 220:919-924。只含人染色体片段的体细胞杂交体还可通过使用具有易位和缺失的人染色体而产生。

[0631] 体细胞杂交体的PCR作图是将特定序列分配到特定染色体的快速程序。使用单台热循环仪每天可以分配三个或更多个序列。使用VISTA核苷酸序列设计寡核苷酸引物时，通过得自特定染色体的多组片段可以实现亚定位。可类似地用于将VISTA序列对其染色体作图的其它作图策略包括原位杂交(描述于Fan等,(1990)ProcNatl.Acad.Sci.USA 87:6223-27)中)、通过带标记的流式分选染色体进行预筛选以及通过与染色体特异性cDNA文库杂交而预选。

[0632] DNA序列与中期染色体涂片的荧光原位杂交(FISH)可进一步用于单步提供精确的染色体位置。染色体涂片可使用其分裂已在中期通过破坏有丝分裂纺锤体的化学试剂如秋水仙碱而阻断的细胞来制备。染色体可用胰蛋白酶简略处理，并用Giemsa染色。浅暗条带的图案在每个染色体上显现，使得可单独地鉴别染色体。FISH技术可用在短至500或600个碱基的DNA序列。然而，大于1,000个碱基的克隆具有较高的结合于独特染色体位置的可能性，并有足够的信号强度以便容易地检测。优选地1,000个碱基并更优选地2,000个碱基将足够以合理的时长获得良好的结果。对于这种技术的综述，参见Verma等,Human Chromosomes:AManual of basic Techniques(Pergamon Press,New York 1988)。染色体作图的试剂可单独使用以标记单个染色体或该染色体上的单个位点，或者多组试剂可用于标记多个位点和/或多个染色体。实际上，对应于基因非编码区的试剂对作图目的是优选的。编码序列在基因家族内更可能是保守的，从而增加染色体作图期间交叉杂交的机会。

[0633] 一旦已经将序列作图到精确的染色体位置，可将染色体上序列的物理位置与遗传图谱数据相关联。最终，可进行得自多个个体的基因的完整测序，以确认突变的存在性以及将突变与多态性区分开。

[0634] 组织分型

[0635] 本发明的VISTA序列还可用于从微量的生物样本鉴别个体。此外，本发明的序列可用于提供确定个体基因组中所选部分的实际碱基并碱基(base-by-base)DNA序列的替代技术。因此，本文所述VISTA核苷酸序列可用于从序列的5'端和3'端制备两个PCR引物。这些引物然后可用于扩增个体DNA，并随后对其测序。

[0636] 以这种方式制备的得自个体的多组相应的DNA序列可提供独特的个体鉴别，因为每个个体将由于等位差异而具有一组独特的这些DNA序列。本发明的序列可用于从个体以

及从组织获得这些鉴别序列。本发明的VISTA核苷酸序列独特地代表人基因组的部分。等位变异在这些序列的编码区中以一定程度上出现，而在非编码区以更大的程度上出现。据估计，各个人之间的等位变异以每500个碱基大约1次的频率发生。本文所述的序列的每一个可在一定程度上用作标准，而得自个体的DNA可与之比较以用于鉴别目的。因为在非编码区存在较大数量的多态性，所以需要较少的序列来区分个体。SEQ ID NO:1或4的非编码区可容易地用一组可能为10至1,000个的引物来提供阳性个体鉴别，所述每个引物产生100个碱基的非编码扩增序列。如果使用预测的编码序列，如SEQ ID NO:3或6中的那些，那么对于阳性个体鉴别更合适的引物数量将为500-2000个。

[0637] 如果将来自本文所述的VISTA核苷酸序列的一组试剂用于生成个体的独特鉴别数据库，那么那些相同的试剂随后可用于鉴别该个体的组织。使用该独特识别数据库，活的个体或死亡个体的阳性鉴别可通过极少的组织样本而实现。

[0638] VISTA序列在法医生物学中的用途

[0639] 基于DNA的鉴别技术还可用在法医生物学中。本发明的序列可用于提供靶向人基因组中特定基因座的多核苷酸试剂，如PCR引物，其可通过例如提供另一“鉴别标记”(即，对特定个体独特的另一DNA序列)而提高基于DNA的法医学鉴别的可靠性。如上所述，实际的碱基序列信息可用于鉴别，作为限制性酶生成的片段所形成的模式的准确替代。靶向SEQ ID NO:1或3非编码区的序列尤其适于这个用途，因为在非编码区存在较大数量的多态性，使得更易于使用这种技术来区分个体。多核苷酸试剂的实例包括VISTA核苷酸序列或其部分，例如，来源于SEQ ID NO:1或3的非编码区的长度为至少20个碱基、优选地至少30个碱基的片段。本文所述的VISTA核苷酸序列可进一步用于提供多核苷酸试剂，例如可用于例如原位杂交技术的标记探针或可标记探针，以鉴别特定的组织，如淋巴细胞。这在法医病理学家面临未知来源的组织时会非常有用。多组这些VISTA探针可用于按物种和/或按器官类型鉴别组织。以类似的方式，这些试剂例如VISTA引物或探针可用于针对污染来筛选组织培养物(即，针对培养物中不同类型细胞的混合物的存在进行筛选)。

[0640] 诊断分析

[0641] 用于检测生物样本中VISTA多肽或核酸的存在或不存在的示例性方法包括从测试受试者获得生物样本并使生物样本与能够检测VISTA多肽或编码VISTA多肽的核酸(例如mRNA或基因组DNA)的化合物或试剂接触，以在生物样本中检测到VISTA多肽或核酸的存在。用于检测VISTA mRNA或基因组DNA的优选试剂是能够与VISTA mRNA或基因组DNA杂交的标记的核酸探针。核酸探针可以为例如SEQID NO:1或3中所述的VISTA核酸或其部分，如长度为至少15、30、50、100、250或500个核苷酸并足以在严格条件下与VISTA mRNA或基因组DNA特异性杂交的寡核苷酸。本文描述了其它适用于本发明的诊断分析的探针。用于检测VISTA多肽的优选试剂为能够结合于VISTA多肽的抗体，优选地为带有可检测的标记的抗体。抗体可以是多克隆抗体，或更优选地为单克隆抗体。可以使用完整的抗体或其片段(如Fab或F(ab')$_2$)。关于探针或抗体，术语“标记的”旨在涵盖通过将可检测的物质偶联(即，物理连接)到探针或抗体而直接标记探针或抗体，以及通过与直接标记的另一试剂的反应性而间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的二次抗体检测一次抗体以及用生物素末端标记DNA探针使得其可通过荧光标记的链霉亲和素检测到。术语“生物样本”旨在包括从受试者中分离的组织、细胞和生物流体，以及存在于受试者的组织、细胞和流体。也

就是说，本发明的检测方法可用于在体外以及体内检测生物样本中的VISTA mRNA、多肽或基因组DNA。例如，体外检测PD-L2 mRNA的技术包括Northern杂交和原位杂交。体外检测VISTA多肽的技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹法、免疫沉淀和免疫荧光。用于体外检测VISTA基因组DNA的技术包括Southern杂交。此外，用于体内检测VISTA多肽的技术包括向受试者引入标记的抗VISTA抗体。例如，抗体可用放射性标记物进行标记，其在受试者中的存在及位置可通过标准成像技术检测。在一个实施方案中，生物样本包含来自测试受试者的多肽分子。或者，生物样本可包含来自测试受试者的mRNA分子或来自测试受试者的基因组DNA分子。优选的生物样本为通过常规方法从受试者中分离的血清样本。在另一个实施方案中，所述方法进一步包括从对照受试者获得对照生物样本，使对照样本与能够检测VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的化合物或试剂接触，以检测生物样本中VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的存在，以及将对照样本中VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的存在与测试样本中VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的存在进行比较。

[0642] 本发明还涵盖用于检测生物样本中VISTA的存在的试剂盒。例如，试剂盒可包含能够检测生物样本中VISTA多肽或mRNA的标记化合物或试剂；测定样本中VISTA的量的构件；以及比较样本与标准品中VISTA的量的构件。该化合物或试剂可包装在合适的容器中。试剂盒可进一步包括使用试剂盒来检测VISTA多肽或核酸的说明书。

[0643] 预后分析

[0644] 本文所述的诊断方法另外可用于鉴别这样的受试者，其患有与异常的或不期望的VISTA表达或活性相关的疾病或病症或存在发展所述疾病或病症的风险。如本文所用，术语“异常的”包括偏离野生型VISTA表达或活性的VISTA表达或活性。异常的表达或活性包括增大或减小的表达或活性，以及不遵循表达的野生型发展模式或亚细胞表达模式的表达或活性。例如，异常的VISTA表达或活性旨在包括其中VISTA基因的突变导致VISTA基因表达不足或过表达的情况，以及其中此类突变导致非功能性VISTA多肽或不以野生型方式发挥功能的多肽的情形，例如，不与VISTA结合伴侣相互作用的多肽，或与非VISTA结合伴侣相互作用的多肽。如本文所用，术语“不期望的”包括生物反应如免疫细胞活化中涉及到的不期望的现象。例如，术语“不期望的”包括受试者中不合需要的VISTA表达或活性。

[0645] 本文所述的分析，如前述诊断分析或以下分析，可用于鉴别这样的受试者，其患有与VISTA多肽活性或核酸表达误调节相关的疾病或存在发展所述疾病的风险，如自体免疫疾病、免疫缺乏症、免疫系统疾病如自体免疫、过敏或炎症疾病或癌症。因此，本发明提供一种鉴别与异常的或不期望的VISTA表达或活性相关的疾病或病症的方法，其中从受试者获得试样，并检测VISTA多肽或核酸(例如mRNA或基因组DNA)，其中VISTA多肽或核酸的存在对于患有与异常的或不期望的VISTA表达或活性相关的疾病或病症或存在发展所述疾病或病症的风险的受试者具有诊断性。如本文所用，“测试样本”是指从相关受试者获得的生物样本。例如，测试样本可以是生物流体(例如脑脊液或血清)、细胞样本或组织。

[0646] 此外，本文所述的预后分析可用于确定是否可向受试者施用试剂(例如激动剂、拮抗剂、肽模拟物、多肽、肽、核酸、小分子或其它候选物)以治疗与异常的或不期望的VISTA表达或活性相关的疾病或病症。例如，这些方法可用于确定用试剂是否能有效治疗受试者的自体免疫疾病、免疫缺乏症、免疫系统癌症或过敏性或炎症病症。因此，本发明提供确定用试剂是否能有效治疗受试者的与异常的或不期望的VISTA表达或活性相关的疾病或病症的

方法，其中获得测试样本，并检测VISTA多肽或核酸表达或活性(例如，其中VISTA多肽或核酸表达或活性的丰度对可向受试者施用试剂以治疗与异常的或不期望的VISTA表达或活性相关的疾病具有诊断性)。本发明的方法还可用于检测VISTA基因中的基因改变，从而确定具有改变的基因的受试者是否存在特征在于VISTA多肽活性或核酸表达误调节的疾病的风险，如自体免疫疾病、免疫缺乏症、免疫系统癌症、过敏性疾病或炎症疾病。本文所述的方法可例如通过利用预先包装好的诊断试剂盒进行，所述试剂盒包含本文所述的至少一种探针核酸或抗体试剂，其可例如在临床环境中便利地使用，以诊断显示包括VISTA基因的疾病或病情的症状或家族史的患者。此外，其中表达VISTA的任何细胞类型或组织都可用于本文所述的预后检测分析。

[0647] 免疫分析

[0648] VISTA和VISTA缀合物、结合VISTA和VISTA缀合物的抗体和抗原结合片段可以用于免疫分析以定性地或定量地检测并分析样本中的标记。这种方法包括提供特异性结合于VISTA或VISTA缀合物的抗体；使样本与抗体接触；以及检测样本中结合于标记的抗体的复合物的存在。

[0649] 可以使用许多公认的免疫学结合分析中的任一种来检测和/或定量VISTA和VISTA缀合物。适用的分析包括例如酶免疫分析(EIA)如酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、Western印迹法分析或狭线印迹分析。参见例如美国专利4,366,241；4,376,110；4,517,288；和4,837,168。通常，可使获自受试者的样本与特异性结合VISTA或VISTA缀合物的抗体接触。

[0650] 任选地，可将抗体固定于固体支撑物以有助于在使抗体与样本接触之前复合物的洗涤和后续分离。固体支撑物的实例包括但不限于呈例如微量滴定板、棍、珠粒或微珠粒形式的玻璃或塑料。可以使抗体连接于固体支撑物。

[0651] 在孵育样本与抗体之后，洗涤混合物并且可以检测所形成的抗体-标记复合物。这可通过孵育经过洗涤的混合物与检测试剂来实现。或者，可使用间接分析来检测样本中的标记，其中例如将第二标记的抗体用于检测所结合的标记特异性抗体，和/或用于竞争或抑制分析中，其中例如将结合于标记的独特抗原表位的单克隆抗体与混合物同时孵育。

[0652] 贯穿分析，在每次组合试剂之后可能需要孵育和/或洗涤步骤。培育步骤可从约5秒变至几小时，优选地约5分钟变至约24小时。然而，孵育时间将取决于分析形式、标记、溶液体积、浓度。通常将在环境温度下进行所述分析，但是其可在一定的温度范围内(例如10℃-40℃)进行。

[0653] 可使用免疫分析以测定来自受试者的样本中标记的测试量。首先，可以使用上述免疫分析方法来检测样本中标记的测试量。如果样本中存在标记，那么其将形成具有在上述合适的孵育条件下特异性结合标记的抗体的抗体-标记复合物。任选地可通过与标准相比来测定抗体-标记复合物的量。如上所指出，无需以绝对单位测量标记的测试量，只要测量单位可与对照量和/或信号相比即可。本领域中已知的几种免疫分析，并且本文所述的VISTA多肽或VISTA缀合物可以用于这些免疫分析，其包括但不限于放射免疫分析(RIA)、酶联免疫吸附分析(ELISA)、磁性免疫分析、免疫印迹法、Western印迹法、免疫沉淀分析、免疫组织化学分析和荧光活化细胞分选(FACS)。参见Wild,(2008)[编]The Immunoassay Handbook[第3版]Elsevier。

[0654] 放射成像方法

[0655] VISTA和VISTA缀合物可以用于放射成像方法以诊断癌症,包括胰腺癌和结肠直肠癌,或监测肿瘤进展。这些方法包括但不限于正电子发射断层摄影术(PET)、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)。这两种技术都具有非侵入性,并且可用以检测和/或测量多种组织事件和/或功能,例如检测癌细胞。SPECT可以任选地同时用于两种标记。参见美国专利6,696,686。

[0656] 商业应用和方法

[0657] 本发明进一步提供VISTA和VISTA缀合物的产生以达到商业量。可以大规模产生VISTA和VISTA缀合物,必要时存储并且供应至医院、临床医师或其它保健机构。

[0658] 可以通过本文公开的方法产生制造、存储和配送VISTA和VISTA缀合物的方法。在制造之后,可以在患者的治疗之前收集、纯化和任选地存储VISTA和VISTA缀合物。例如,一旦患者呈现适应症如癌症、自体免疫疾病或炎症病状,VISTA和VISTA缀合物便可以排序并且以及时的方式提供。因此,本发明涉及制造VISTA和VISTA缀合物以用工业规模得到抗体、包含选择性结合于VISTA和VISTA缀合物的抗体和其抗原结合片段的药物组合物的方法,以及向医院和临床医师提供(即制造,任选地存储和出售)VISTA和VISTA缀合物的方法。可以将VISTA和VISTA缀合物的制造放大规模以用于商业用途。

[0659] 本发明还提供开展药物事业的方法,其包括建立用于配送所述制剂进行销售的配送系统或者可以包括建立销售团体来销售药物制剂。

[0660] 核酸文库

[0661] VISTA(PD-L3)变体的多样化文库可以通过以核酸水平进行组合诱变来产生,并且由多样化基因文库编码。VISTA(PD-L3)变体的多样化文库可如下产生:例如将合成寡核苷酸的混合物酶促接合到基因序列中,使得潜在VISTA(PD-L3)序列的简并组可作为单独的多肽表达,或可选地作为在其中含有VISTA(PD-L3)序列组的一组较大融合蛋白(例如对于噬菌体呈现而言)表达。有多种方法可用于由简并寡核苷酸序列产生潜在VISTA(PD-L3)变体的文库。简并基因序列的化学合成可在自动DNA合成仪中进行,并且合成基因然后连接到适当的表达载体中。使用基因的简并组允许在一种混合物中提供编码所需的潜在VISTA(PD-L3)序列组的所有序列。用于合成简并寡核苷酸的方法在本领域中是已知的。参见例如Narang(1983)Tetrahedron39:3;Itakura等,(1984)Annu.Rev.Biochem.53:323;Itakura等,(1984)Science 198:1056;Ike等,(1983)Nucleic Acids Res.11:477。

[0662] 另外,VISTA(PD-L3)多肽编码序列的片段的文库可用于产生VISTA(PD-L3)片段的多样化群体,以筛选并随后选择VISTA(PD-L3)多肽的变体。可如下产生编码序列片段的文库:用核酸酶在其中每个分子只出现大约一次切口的条件下处理VISTA(PD-L3)编码序列的双链PCR片段,使双链DNA变性,使DNA复性以形成可包含来自不同的带切口产物的有义/反义对的双链DNA,通过S1核酸酶从重新形成的双链体中除去单链部分,以及将所得的片段文库接合到表达载体中。通过这种方法,可得到编码VISTA(PD-L3)多肽的各种尺寸的N端、C端和内部片段的表达文库。

[0663] 用于筛选通过点突变或截短产生的组合文库的基因产物以及用于筛选cDNA文库中具有所选性质的基因产物的几种技术在本领域中是已知的。这些技术适于快速筛选通过VISTA(PD-L3)多肽的组合诱变所产生的基因文库。适于高通量分析的用于筛选大型基因文

库的最广泛使用的技术通常包括将基因文库克隆进可复制的表达载体，将适当的细胞用所得的载体文库转化，以及在下述条件下表达组合基因，其中检测所需的活性有利于分离编码检测其产物的基因的载体。递归总体诱变(Recursive ensemble mutagenesis;REM)是一种提高文库中功能性突变体频率的新技术，可与筛选分析组合用以鉴别VISTA(PD-L3)突变体。Arkin和Youvan(1992)Proc Natl.Acad.Sci.USA 89:7811-7815;Delagrave等,(1993)Protein Eng.6(3):327-331。

[0664] 预测医学

[0665] 本发明还涉及预测医学领域，其中将诊断分析、预后分析和监测性临床试验用于预后(预测)目的，从而防治性治疗个体。因此，本发明的一个方面涉及用于在生物样本(例如血液、血清、细胞或组织)的情况下测定VISTA多肽和/或核酸表达以及VISTA活性的诊断分析，从而确定个体是否受疾病或病症折磨或处于产生与异常或不期望的VISTA表达或活性相关的病症的风险中。本发明还提供用于确定个体是否处于产生与VISTA多肽、核酸表达或活性相关的病症的风险中的预后(或预测)分析。例如，可在生物样本中分析VISTA基因的突变。这些分析可用于预后或预测目的，从而在特征在于VISTA多肽、核酸表达或活性或与VISTA多肽、核酸表达或活性相关的的病症发作之前防治性治疗个体。

[0666] 本发明的另一实施方案涉及监测试剂(例如药物、化合物)在临床试验中对VISTA表达或活性的影响。在以下章节中进一步详述这些试剂和其它试剂。

[0667] 在临床试验期间监测效果

[0668] 对试剂(例如药物)对VISTA多肽表达或活性(例如调节细胞增殖和/或偏移)的影响的监测不仅可适用于基本药物筛选中，而且可适用于临床试验中。例如，可在显示降低的VISTA基因表达、多肽水平或下调的VISTA活性的受试者中监测通过如本文所述的筛选分析测定的试剂提高VISTA基因表达、多肽水平或上调VISTA活性的效力。或者，可在显示提高的VISTA基因表达、多肽水平或VISTA活性的受试者中监测通过筛选分析测定的试剂降低VISTA基因表达、多肽水平或下调VISTA活性的效力。如所指出，VISTA在许多造血细胞类型(包括APC(巨噬细胞和骨髓树突细胞)和CD4+T细胞)上表达，并且更具体地在$CD11c^{+}$DC、$CD4^{+}$T细胞(包括$Foxp3^{-}$效应物T细胞和$Foxp3^{+}$nTreg两者)、$CD8^{+}$T细胞和$Gr1^{+}$粒细胞上表达，并且在B细胞和NK细胞上低水平表达。在这些临床试验中，VISTA基因和优选地已经牵涉于例如VISTA相关病症的其它基因表达或活性可用作具体细胞的表型的“读出”或标记。

[0669] 举例并且不加限制，可鉴别在细胞中通过用调节VISTA活性(例如在如本文所述的筛选分析中鉴别)的试剂(例如化合物、药物或小分子)处理而调节的基因，包括VISTA。因此，为了研究例如在临床试验中试剂对VISTA相关病症的作用，可分离细胞并且制备RNA，并且分别分析VISTA和牵涉于VISTA相关病症的其它基因的表达水平。基因表达(例如基因表达模式)水平可通过如本文所述的Northern印迹分析或RT-PCR，或可选地通过测量多肽的产生量、通过如本文所述的方法之一，或通过测量VISTA或其它基因的活性水平来定量。用这种方式，基因表达模式可充当指示细胞对试剂的生理反应的标记。因此，这种反应状态可以在用试剂治疗个体之前，以及在用试剂治疗个体期间多个点测定。在一个实施方案中，本发明提供一种用于监测用试剂(例如通过本文所述的筛选分析鉴别的激动剂、拮抗剂、肽模拟物、多肽、肽、核酸、小分子或其它药物候选物)治疗受试者的效力的方法，其包括以下步骤：(i)在施用试剂之前从受试者获得施用前样本；(ii)检测施用前样本中VISTA多肽、mRNA

基因组DNA的表达水平;(iii)从受试者获得一种或多种施用后样本;(iv)检测施用后样本中VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的表达水平或活性;(v)将施用前样本中VISTA多肽、mRNA或基因组DNA的表达水平或活性与施用后样本中VISTA多肽、mRNA或基因组DNA相比;以及(vi)因此改变对受试者的试剂施用。例如,可能需要增加试剂施用量以将VISTA表达或活性提高至高于检测的水平,即提高试剂效力。或者,可能需要缩小试剂施用量以将VISTA表达或活性降低至低于检测的水平,即降低试剂效力。根据这个实施方案,甚至在不存在可观测的表型反应时,也可以将VISTA表达或活性用作试剂效力的指标。

[0670] 说明书中提及的所有出版物(例如非专利出版物)、专利、专利申请公布和专利申请都指示本发明所属领域技术人员的技能水平。所有这些出版物(例如非专利文献)、专利、专利申请公布和专利申请都以引用的方式并入本文中,其引用程度如同明确地并个别地表明每一个别出版物、专利或专利申请公布或专利申请以引用的方式被并入一样。

[0671] 为了使本文所述的发明可被完全理解,对前述详细描述进行阐述。详细描述了本发明的各个实施方案并且其可以由所提供的实施例进一步说明。

实施例

[0672] 现在大体描述本发明,其将通过参考以下实施例得到更容易的理解,包括以下实施例仅为了说明本发明的某些方面和实施方案的目的,而不旨在限制本发明。

[0673] 实施例1

[0674] VISTA(PD-L3)的克隆和序列分析

[0675] 通过静息Treg、αCD3活化的Treg和αCD3/αGITR活化的Treg的整体转录谱分析鉴别了VISTA(PD-L3)和Treg-sTNF。选择了αGITR用于这个分析,因为Treg上GITR的触发已显示会压制其接触依赖性抑制活性(Shimizu等,(2002)同上)。在AFFIMETRIX®DNA阵列上基于VISTA(PD-L3)和Treg-sTNF的独特表达模式对其进行了鉴别(表2)。VISTA(PD-L3)在αCD3活化的Treg中显示表达增强,在存在αGITR时表达降低;以及Treg-sTNF显示表达的αCD3/αGITR依赖性提高。

[0676] 通过无、αCD3或αCD3/αGITR在过夜培养中刺激了纯化的CD4+CD25+T细胞,并分离了用于实时PCR分析的RNA。相对于肌动蛋白列出表达。

[0677] 表2

[0678]

mRNA	相对表达		
	无	αCD3	αCD3/αGITR
VISTA (PD-L3)	6	10	7
T^{reg}-sTNF	0.2	0.3	1.5

[0679] 活化的相对于静息的CD25+CD4+nTreg的AFFIMETRIX®分析揭示,基因产物(RIKEN cDNA 4632428N05或4632428N05Rik)的表达具有未知的功能,但与Ig超家族具有序列同源性。

[0680] 更具体地讲,从CD4+T细胞cDNA文库克隆了930bp基因产物,其匹配预测的尺寸和序列。电子延伸序列(Silico-sequence)和结构分析预测成熟时309个氨基酸的跨膜蛋白,其具有159个氨基酸的细胞外域、22个氨基酸的跨膜域以及95个氨基酸的细胞质尾部(图1A)。氨基酸序列比对揭示了与B7家族配体如PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4以及B7家族受体(即,PD-1、CTLA-4、CD28、BTLA、ICOS)同源的细胞外免疫球蛋白(Ig)-V样域(图1B-C)。虽然

B7家族配体与受体之间Ig-V域的序列同一性通常不是非常高(<40%),但是4632428N05Rik的Ig-V域具有与B7家族配体PD-L1和PD-L2的最高同源性。序列比对还揭示出几个高度保守的半胱氨酸(图1B),其对于链内二硫键的形成是重要的,而链内二硫键形成为B7家族配体所特有。也参见图23;Sica等,(2003)Immunity 18:849-861。

[0681] 4632428N05Rik的细胞外域仅含有Ig-V域而无Ig-C域(图1B-C)。这个独特特征为B7家族受体所特有,并将4632428N05Rik与所有其它B7家族配体区分开来,后者既包含Ig-V也包含Ig-C域。Freeman(2008)Proc Natl Acad Sci USA 105:10275-10276;Lazar-Molnar等,(2008)Proc Natl Acad Sci USA 105:10483-10488;Lin等,(2008)Proc Natl Acad Sci USA 105:3011-3016;Schwartz等,(2001)Nature 410:604-608;Stamper等,(2001)Nature 410:608-61。一致地,使用PhyML算法(系统发生最大似然)的系统发生分析将4632428N05Rik放在了与B7家族受体,尤其是与PD-1,比与B7家族配体更近的进化距离(图2)。Guindon和Gascuel(2003)Syst Biol 52:696-704。然而,VISTA(PD-L3)的细胞质尾部不含任何信号传导域(例如ITIM、ITAM或ITSM),其为B7家族受体的签名域(signature domain)。Sharpe和Freeman(2002)Nat Rev Immunol.2:116-126。虽然其与抑制性受体PD-1的亲密进化关系,4632428N05Rik代表了B7配体家族的新成员。基于这些结构和系统发生特征,将这个分子命名为PD-1-eXpressed as Ligand(VISTA(PD-L3))。VISTA(PD-L3)在小鼠与人直系同源体之间也高度保守,共有77%的序列同一性(图1D)。

[0682] 编码小鼠VISTA(PD-L3)的核酸序列在本文如SEQ ID NO:1所示,并且小鼠VISTA(PD-L3)蛋白序列如SEQ ID NO:2所示。

[0683] VISTA(PD-L3)的人同源物位于10号染色体上(72.9Mb),并由6个外显子构成,从而产生编码311个残基蛋白质的长度为4689个碱基的转录物。人同源物mRNA编码序列以GENBANK登录号NM_022153提供,蛋白序列作为NP_071436给出。编码人VISTA(PD-L3)的核酸序列在本文如SEQ ID NO:3所示,并且人VISTA(PD-L3)蛋白序列如SEQ ID NO:4所示。小鼠和人基因共有74%的同源性并且在蛋白水平上68%相同。还在褐家鼠第20号染色体(27.7Mb;GENBANK登录号BC098723)以及红鳍东方豚和斑马鱼中鉴别了同源物。在一个实施方案中,本发明的VISTA(PD-L3)蛋白共有由SEQ ID NO:5所示的共同氨基酸序列。VISTA的另外的直系同源已经鉴别并且示于图23D中,例如(SEQ ID NO:17)、人(SEQ ID NO:16)、袋鼠(SEQ ID NO:18)、海豚(SEQ ID NO:19)、鸡(SEQ ID NO:20)、爪蟾(SEQ ID NO:21)、斑胸草雀(SEQ ID NO:22)、斑马鱼和河豚(SEQ ID NO:23)。

[0684] 实施例2

[0685] 通过RT-PCR分析和流式细胞术进行的VISTA(PD-L3)表达研究

[0686] 使用RT-PCR分析以确定小鼠组织中VISTA(PD-L3)的mRNA表达模式(图3A)。VISTA(PD-L3)主要在造血组织(脾脏、胸腺、骨髓)或具有丰富淋巴细胞浸润的组织(即,肺)上表达。在非造血组织(即,心脏、肾脏、脑和卵巢)中也检测到了弱表达。几种造血细胞类型的分析揭示了VISTA(PD-L3)在腹腔巨噬细胞、脾CD11b+单核细胞、CD11c+DC、CD4+T细胞和CD8+T细胞上表达,但在B细胞上表达水平较低(图3B)。这个表达模式还与GNF(Genomics Institute of Novartis Research Foundation)基因阵列以及NCBI GEO(geneexpression omnibus)数据库在很大程度上一致(图4A-D)。参见Su等,(2002)Proc Natl Acad Sci USA 99:4465-4470。

[0687] 为了研究蛋白质表达，产生了VISTA(PD-L3)特异性仓鼠8D8和6E7单克隆抗体。通过过表达VISTA(PD-L3)的鼠类EL4T细胞上的阳性染色但在过表达PD-L1的EL4的细胞上的负性染色证实了特异性(图5)。

[0688] 针对VISTA(PD-L3)产生多克隆和单克隆抗体。使用兔抗VISTA(PD-L3)抗体，将VISTA(PD-L3)蛋白定位到淋巴器官并显著见于脑组织中。在所述鉴别的单克隆抗体中，进一步评价了αVISTA(PD-L3)克隆8D8的特异性。在这个分析中，测试了克隆8D8针对一组PD-L样Ig融合蛋白分子(包括CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-1、B7-2、VISTA(PD-L3)和hIg)的结合。这个分析的结果表明，8D8αPDL-3对VISTA(PD-L3)具有高度特异性。

[0689] 具体地讲，使用抗VISTA(PD-L3)单克隆抗体克隆8D8，通过流式细胞术分析了造血细胞上的VISTA(PD-L3)表达。Foxp3GFP敲除的报告小鼠用于区分CD4+nTreg。在外周淋巴器官(脾脏和淋巴结)中，在所有CD4+T细胞子集中都看到明显的表达(参见总CD4+T细胞，或Foxp3原生T细胞和Foxp3+nTreg细胞，以及记忆CD4+T细胞)，而CD8+T细胞表达明显低的表面VISTA(PD-L3)的量(图3C)。在胸腺中，VISTA(PD-L3)表达在CD4+CD8+双阳性胸腺细胞上为阴性，在CD4单阳性细胞上较低，在CD8单阳性细胞上可检测。接下来，对于脾和腹膜细胞(包括F4/80巨噬细胞和骨髓CD11c+DC两者)都可看到高VISTA(PD-L3)表达与CD11b标记的强关联(图3D-E)。另一方面，B细胞和NK细胞对VISTA(PD-L3)表达主要为阴性。小百分比的Gr-1+粒细胞也表达VISTA(PD-L3)(图3F)。

[0690] 在来自不同淋巴器官的相同细胞谱系上示出差异表达模式(图3G)。对于CD4+T细胞和CD11b中间单核细胞，表达水平遵循肠系膜淋巴结>周边LN和脾脏>腹腔和血液的模式。这个模式对于CD11bhi细胞不太明显。这个数据表明，某些细胞类型上VISTA(PD-L3)表达可能受细胞成熟度和/或组织微环境的调控。

[0691] 除了新分离的细胞外，还在进行活化和无活化的体外培养后分析了脾CD4+T细胞、CD11bhi单核细胞和CD11c+DC细胞上的VISTA(PD-L3)表达(图6)。将脾细胞用培养基或用抗CD3(用于活化T细胞)或用IFNγ和LPS(用于活化单核细胞和DC)培养24小时后，分析VISTA(PD-L3)和其它B7家族配体(例如PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4)的表达。这个比较揭示了这些分子之间独特的表达模式。VISTA(PD-L3)表达在体外培养时在所有细胞类型上都迅速丧失，而无论活化状态如何。相比之下，PD-L1表达在刺激时在CD4+T细胞上、在仅培养基中培养时在CD11bhi单核细胞和CD11c+DC上上调，并在面对刺激时进一步增强。PD-L2、B7-H3和B7-H4的表达在所用培养条件下不突出。VISTA(PD-L3)表达在体外的丧失与其它B7家族配体相比是独特的，但可能反映了未能模拟组织微环境的非最优培养条件。

[0692] 为了弄清可如何在体内调控VISTA(PD-L3)表达，将CD4TCR转基因小鼠DO11.10用在完全弗氏佐剂(CFA)中乳化的同源抗原鸡卵白蛋白(OVA)免疫。免疫后24小时，分析引流淋巴结中的细胞的VISTA(PD-L3)表达(图7A)。仅用抗原(CFA/OVA)而无佐剂免疫大幅增加了CD11b+VISTA(PD-L3)+骨髓细胞群体，其含有F4/80+巨噬细胞与CD11c+DC的混合群体。与PD-L1和PD-L2的进一步比较揭示，虽然PD-L1具有最高的组成型表达水平，但VISTA(PD-L3)在这样的炎症免疫反应期间受到了最高的上调(图7B)。总而言之，这些数据强烈表明，骨髓APC上VISTA(PD-L3)的表达由免疫系统严格调控，这可能有助于其在控制免疫反应和调控T细胞免疫性中的作用。

[0693] 与其在APC增加的表达相比，VISTA(PD-L3)表达在活化的DO11.10 CD4+T细胞上在

免疫后较晚的时间点减小(即,在48小时而非24小时时)(图8)。这个结果表明,体内CD4T细胞上的VISTA(PD-L3)表达可由其活化状态以及活性免疫反应期间的细胞因子微环境来调控。

[0694] 实施例3

[0695] VISTA(PD-L3)信号传导对CD4+和CD8+T细胞反应的功能性影响

[0696] 产生了VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白以考查VISTA(PD-L3)对CD4+T细胞反应的调控作用。VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白包含与人IgG1 Fc区融合的VISTA(PD-L3)的细胞外域。当固定在微板上时,VISTA(PD-L3)-Ig而非对照Ig抑制了粗纯化的CD4+和CD8+T细胞响应于与板结合的抗CD3刺激而发生的增殖,如通过停滞的细胞分裂而确定(图9A-B)。VISTA(PD-L3)Ig融合蛋白不影响抗CD3抗体吸收到塑料孔,如通过ELISA测定,因此排除了非特异性抑制作用的可能性。PD-1 KO CD4+T细胞也受到抑制(图9C),表明PD-1不是VISTA(PD-L3)的受体。还直接比较了PD-L1-Ig和VISTA(PD-L3)-Ig的抑制作用(图10)。当使滴定量的Ig融合蛋白与αCD3一起吸附到微板以刺激CD4+T细胞时,VISTA(PD-L3)-Ig示出与PD-L1-Ig融合蛋白相似的抑制功效。

[0697] 因为主题纯化的CD4+T细胞含有多个子集,所以评价了VISTA(PD-L3)-Ig对分选的原生(CD25-CD44低CD62Lhi)和记忆(CD25-CD44hiCD62L低)CD4+T细胞子集的影响(图11)。VISTA(PD-L3)可抑制两种子集的增殖,但对记忆细胞的功效要弱得多。

[0698] 为了进一步理解VISTA(PD-L3)介导的抑制的机制,在VISTA(PD-L3)-Ig存在或不存在下在T细胞活化后测量了早期TCR活化标记的表达以及细胞凋亡。与对细胞增殖的负影响一致,存在对早期活化标记CD69、CD44和CD62L表达的全局性抑制(补充性图12A)。另一方面,VISTA(PD-L3)-Ig融合蛋白未诱导细胞凋亡。相反,在VISTA(PD-L3)或者VISTA-Ig存在下,在TCR活化的早期(24小时)和晚期(48小时)都看到比对照Ig低的细胞凋亡(如通过膜联蛋白V+7AAD-细胞的百分比来确定)(图12B)。例如,在24小时的时间点,在总“非分类”细胞群中,约27%的细胞在VISTA(PD-L3)或者VISTA-Ig存在下凋亡,而对照细胞则有约39%凋亡。当在活细胞R1分类中考查细胞时,显而易见的是,VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig强烈抑制了活化诱导的细胞死亡(ACID),因为当用VISTA(PD-L3)或者VISTA-Ig处理时约72.6%的对照细胞变为凋亡,而实验细胞只有43.5%凋亡。对于48小时的时间点也看到了相似的结果。因此,看来VISTA(PD-L3)或者VISTA通过抑制早期TCR活化以及停滞细胞分裂来负调节CD4+T细胞反应,但对细胞凋亡的直接影响极小。此抑制机制与B7-H4的类似。Sica等,(2003)Immunity 18:849-861。

[0699] 开发了两步分析,以确定VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig能否抑制预活化的CD4T细胞以及其抑制作用的持久性如何。据显示,VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig融合蛋白的抑制作用持续到其撤去后24小时后活化(图9D)。此外,原生和预活化的CD4+T细胞都能被VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig抑制(参见图9D(i)、9D(iii)和9D(iv))。

[0700] 接下来,分析了VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig对CD4+T细胞细胞因子产生的影响。VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig抑制了从粗纯化的CD4+T细胞培养物产生Th1细胞因子IL-2和IFNα(图13A-B)。VISTA(PD-L3)或VISTA的影响在单独的原生(CD25-CD44低CD62Lhi)和记忆(CD25-CD44hiCD62L低)CD4+T细胞群中进行了进一步测试。据显示,记忆CD4+T细胞是CD4+T细胞小室内细胞因子产生的主要来源,而VISTA(PD-L3)或VISTA可抑制这种产生(图13C-

D)。还显示了VISTA(PD-L3)或VISTA对CD8+T细胞中IFNα产生具有类似的抑制作用(图13E)。VISTA(PD-L3)或VISTA对CD4+和CD8+T细胞产生细胞因子的这种抑制作用与VISTA(PD-L3)或VISTA是下调免疫反应的抑制性配体的假设一致。

[0701] 接下来,设计了多项研究以确定能够克服VISTA(PD-L3)或VISTA的抑制作用的因子。鉴于VISTA(PD-L3)或VISTA抑制了IL-2产生,并且IL-2对T细胞存活和增殖至关重要,IL-2可能避开VISTA(PD-L3)或VISTA的抑制活性。如在图14A中所示,外源性IL-2而非IL-15、IL-7或IL-23部分逆转了VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig对细胞增殖的抑制作用。高水平IL-2的不完全救援表明,VISTA(PD-L3)或VISTA信号传导比单纯的IL-2产生靶向了更宽的T细胞活化通路。另一方面,通过抗CD28激动性抗体提供的强力共同刺激信号完全逆转了VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig介导的抑制(图14B),而中等水平的共同刺激仍受到VISTA(PD-L3)或VISTA信号传导的抑制(图14C)。这个结果表明,VISTA(PD-L3)或VISTA介导的免疫抑制将在较弱的炎症条件下更有效,但不可避免地会被强烈的正共同刺激信号克服。就这来说,VISTA(PD-L3)或VISTA与其它抑制性B7家族配体如PD-L1和B7-H4图都有这一特征。Sica等,(2003)Immunity 18:849-861;Carter等,(2002)Eur J Immunol.32:634-643。

[0702] 除了VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig融合蛋白以外,还有必要确定在APC上表达的VISTA(PD-L3)或VISTA可抑制APC与T细胞之间同源相互作用期间的抗原特异性T细胞活化。为此目的,通过在稳定表达MHC II和B7-2分子的人工抗原呈递细胞系(CHO-APC)中的逆转录病毒转导过表达了VISTA(PD-L3)或VISTA-RFP或RFP对照蛋白(Latchman等,(2001)Nat Immunol 2:261-268)。在CHO中表达VISTA(PD-L3)或VISTA的一个问题在于,大部分VISTA(PD-L3)或VISTA未能定位到细胞表面,这可能是由于对VISTA(PD-L3)或VISTA表面定位缺乏支持的陌生环境所致。虽然在VISTA(PD-L3)或VISTA的胞质尾部上不存在表明调控模式的明确基序,但该尾部可能在其细胞内定位中发挥作用。因此,设计了无尾的VISTA(PD-L3)或VISTA突变体,并发现其成功定位到CHO细胞表面。

[0703] 为了刺激T细胞反应,将CHO-VISTA(PD-L3)或VISTA或CHO-RFP细胞与DO11.10 CD4+T细胞在存在抗原性OVA肽下一起孵育。如图15A-C所示,CHO-VISTA(PD-L3)或VISTA比CHO-RFP细胞诱导了更少的DO11.10细胞增殖。这种抑制作用在较低的肽浓度下更加显著,这与较强的刺激信号将会克服VISTA(PD-L3)或VISTA的抑制影响的观念一致。

[0704] 另外,确认了全长VISTA(PD-L3)或VISTA对天然APC的抑制作用。体外培养的骨髓源性树突状细胞(BMDC)不会表达高水平的VISTA(PD-L3)或VISTA(图16)。通过在10天培养期中的逆转录病毒转导在BMDC中表达了VISTA(PD-L3)或VISTA-RFP或RFP。将转导的细胞基于RFP表达分选均匀。VISTA(PD-L3)或VISTA在转导DC上的表达水平通过用抗VISTA(PD-L3)或VISTA单克隆抗体染色而进行了估计,并发现与新分离的腹腔巨噬细胞上的水平相似,因此在生理表达范围内(图16)。然后将分选的BMDC在存在OVA肽的情况下用于刺激OVA特异性转基因CD4+T细胞(OTII)(图15D)。VISTA(PD-L3)或VISTA对BMDC的表达抑制了同源CD4+T细胞增殖反应。这个结果与之前使用VISTA(PD-L3)或VISTA-Ig融合蛋白以及CHO-APC细胞的结果一致,从而表明VISTA(PD-L3)或VISTA可抑制T细胞介导的免疫反应。

[0705] 实施例4

[0706] VISTA(PD-L3)或VISTA转基因和基因敲除小鼠

[0707] 使用胚胎的慢病毒感染,已经产生了四种泛表达VISTA(PD-L3)或VISTA的转基因

小鼠。这些小鼠在人延伸因子1启动子的控制下表达全长VISTA(PD-L3)或VISTA。使用慢病毒载体pWPT产生这些小鼠。类似于其它PD-L1家族成员(Appay等,(2002)J.Immunol.168:5954-8),设想了VISTA(PD-L3)或VISTA将用作体内负调控剂,同时用于共同刺激αCD3T细胞体外增殖。就此而言,预期这些小鼠自发地产生自体免疫,并且评价在VISTA(PD-L3)或VISTA转基因小鼠(即体液免疫反应、T细胞致敏)中的体内免疫反应以评估全身性自体免疫疾病的发展。

[0708] 对于基因敲除小鼠,通过同源重组使VISTA(PD-L3)或VISTA失活。从INVITROGEN®(Carlsbad,CA)购得含有全长VISTA(PD-L3)或VISTA序列的BAC克隆。通过插入位于新霉素基因上游的VISTA(PD-L3)或VISTA基因的第二外显子的5'侧的1.6kb片段以及于新霉素基因下游的VISTA(PD-L3)或VISTA基因的第三外显子的3'侧的5kb片段来产生VISTA(PD-L3)或VISTA目标载体。用VISTA(PD-L3)或VISTA目标载体对B6源性胚性干(ES)细胞进行电穿孔并且选择重组克隆。然后将所选克隆注射到C57BL/6胚泡中,并且使所得嵌合雄性后代与FLP敲除小鼠交配以除去新霉素盒。通过来自基因组DNA的PCR确定目标等位基因在后代中的传播。第二和第三外显子含有VISTA(PD-L3)或VISTA域,因此所得小鼠仅具有VISTA(PD-L3)或VISTA分子的失活形式。

[0709] 如同其它PD-L-/-小鼠一样来测定VISTA(PD-L3)或VISTA缺陷型小鼠的总体免疫能力,包括评估T细胞对抗原的反应、体液免疫反应、明显的自体免疫(例如全身性红斑狼疮、炎症性肠病)和对诱导型自体免疫疾病(实验性自体免疫脑脊髓炎)增加的易感性(Chen(2004),前述)。

[0710] 实施例6

[0711] 特异性VISTA单克隆抗体对VISTA的阻断会增强体外T细胞反应。

[0712] 鉴别出VISTA特异性单克隆抗体(13F3),其会中和VISTA介导性抑制(图18)。从原生小鼠纯化$CD11b^{hi}$骨髓APC以在存在或不存在13F3下刺激OT-II转基因$CD4^{+}$T细胞。与其中和效应一致,13F3增强了由$CD11b^{hi}$骨髓细胞刺激的T细胞增殖,其显示会表达高水平VISTA。

[0713] 实施例7

[0714] 抗VISTA会增强抗肿瘤免疫性

[0715] 因为抗VISTA增强T细胞活化的能力,所以评估抗VISTA是否将增强对免疫原性肿瘤的保护性免疫反应。我们具有许多经验的模型是膀胱恶性肿瘤MB49。MB49表达雄性抗原,因此其在雌性小鼠中具有适度免疫原性,但是如果没有免疫介入,那么其将长出并杀死雌性小鼠。为了测试αVISTA疗法的功效,对皮下施用MB49肿瘤细胞(sq)并用αVISTA处理。几天后,测量肿瘤尺寸直到小鼠必须安乐死为止。图19示出抗VISTA疗法会极大地削弱肿瘤生长。这归因于抗VISTA增强细胞介导性免疫(CMI)反应的能力。

[0716] 实施例8

[0717] 在4个鼠类肿瘤模型中ΑVISTA对肿瘤消退的作用

[0718] 在免疫原性膀胱恶性肿瘤MB49中进行的实验已经显示,使用单克隆抗体13F3中和VISTA会保护宿主以免肿瘤生长。数据表明VISTA在肿瘤微环境中因其极高的MDSC表达而具有可观的负免疫调控作用。考查抗小鼠VISTA对免疫原性(MB49)生长和高度非免疫原性(B16)肿瘤模型的作用的研究进一步证实了αVISTA疗法的功效,阐明了作用机制,并且提供了选择最优剂量和时序的基础。下文详述每一肿瘤模型的基本原理。

[0719] 表3

[0720]

肿瘤名称	肿瘤类型	宿主	组	分析
MB49	膀胱恶性肿瘤	B6雌性	αVISTA 对照Ig	肿瘤生长 存活 免疫/自体免疫分析
MB49	膀胱恶性肿瘤	B6雄性		
B16.F10	黑色素瘤	B6雄性或雌性		
ID8	卵巢癌	B6雌性		

[0721] 雌性小鼠中的MB49:已经证明了这个鼠类模型中的功效。这个模型中的MDSC还表达升高的VISTA水平。在这个模型中,由于存在H-Y抗原,因此MB49肿瘤具有适度免疫原性。因为我们知道抗VISTA疗法是有效的,所以这个模型将充当"阳性"对照以确定抗VISTA疗法的给药量(1-100μg/小鼠);和时序(肿瘤接种天数,或在之后4、7、10天;治疗介入)。

[0722] 雄性小鼠中的MB49:使用在雌性小鼠中有效的剂量和时序来测定抗VISTA疗法在雄性小鼠(其中肿瘤的免疫原性较小)中的功效。

[0723] B16黑素瘤:显示抗CTLA-4单克隆抗体在这个模型中很有效,并且呈现非免疫原性肿瘤,其中小鼠模型对预测人的成功性有价值。给药方案和时序类似于在MB49模型中显示有效的那些。

[0724] ID8卵巢癌:就是在这个模型中,已经显示在MDSC上的VISTA表达极高。在肿瘤接种时或在孵育后第5、15、25天用αVISTA处理带有ID8肿瘤的小鼠。

[0725] 方法。使用B6 WT小鼠以确定用于缓解所有指出的鼠类肿瘤模型的抗VISTA治疗的最优剂量和时序。将待用模型列于表3中。

[0726] 这个剂量和时序分析的读数是肿瘤生长动力学。对于MB49和B16研究,所有肿瘤研究都通过真皮内(同上)接种来进行,因此可容易地测量肿瘤尺寸。每2-3天使用卡尺来收集肿瘤测量值。在这些模型中的每一个中,将针对其减缓肿瘤生长或帮助肿瘤消退的能力来测试抗VISTA或对照抗体的影响。将使用荧光素酶转导的ID8和使用IVIS工作站的整体成像来追踪ID8的生长。另外,还将测定宿主存活率。

[0727] 将肿瘤生长数据表示为平均肿瘤体积±SEM,并且通过双尾ANOVA分析各组之间的差异。将小于0.05的概率(p)值视为统计上显著。使用Kaplan-Meier方法,用Wilcoxon秩检验和对数秩检验(用于验证各组之间的存活差异的显著性)来分析存活数据。在B16模型中,测定产生白癜风的小鼠的频率。

[0728] 使用这些方法,在几个非免疫原性肿瘤模型中,与用对照ab处理的小鼠相比,获得用抗VISTA单克隆抗体处理的小鼠中的减缓的肿瘤生长和/或肿瘤消退。已经显示,抗VISTA治疗会延迟免疫原性肿瘤模型中的肿瘤生长。因为这些肿瘤模型中的每一个都具有其自己的特定生长动力学和预期的对VISTA的依赖性,以赋予肿瘤生长和抑制免疫性,所以在肿瘤接种时或者在此后的时间向小鼠施用单克隆抗体。另外,测试抗VISTA单克隆抗体的至少3个不同浓度以确定用于治疗益处的最优剂量。

[0729] 如图20A-E中所示,在所有4个这些肿瘤模型中,VISTA单克隆抗体治疗都会减小肿瘤生长,其中对用(A)MB49、(B)MCA105、(C)EG7肿瘤细胞进行皮下(sq)接种,或者用ID8荧光素酶肿瘤细胞(D)进行腹膜内(ip)接种,并且从第+1天开始每隔一天用VISTA单克隆抗体13F3(300μg)处理。监测皮下肿瘤生长。对于ID8荧光素酶肿瘤,在第30天使用Xenogen IVIS对小鼠成像。(E)还测定了带有肿瘤的小鼠的骨髓白血球上的VISTA表达。分析了引流LN和

肿瘤组织(腹水)的VISTA表达。这些发现显示MDSC上表达的VISTA是干扰保护性抗肿瘤免疫性的发展的主要抑制分子,并且αVISTA会缓解这种抑制活性,从而允许免疫介入和肿瘤生长减缓。这些发现还支持以下结论:在自体免疫疾病中,骨髓细胞上的VISTA在调控炎症程度中发挥关键的功能。

[0730] 实施例9

[0731] 合成寡聚VISTA和VISTA融合蛋白

[0732] 体外可溶性VISTA-Ig没有抑制性,也不能容易地检测其对细胞的结合。相反地,这种结合于塑料的分子具有大的抑制性。另外,使用体内VISTA-Ig的研究未示出明显的活性。关于这些研究,所产生的VISTA-Ig在CH2-CH3域中具有突变,从而阻止FcR结合,因此体内不具有嗜细胞性。最近的研究已经显示,四聚PD-L1对PD-1的结合比单体PD-L126高100倍(K_d 6×10^{-8}M),并且可容易地检测对细胞的结合。不在体内测试四聚PD-L1,但是在体外显示,其会阻断原生PD-L1所致的功能性抑制。使用类似的方法来产生将靶向VISTA通路并且引发强力的体外和体内免疫抑制活性的寡聚物。

[0733] 使用例如至少50、75、100、125、150、175或200个氨基酸长的VISTA单体细胞外域或其片段来构建这些寡聚物,将所述细胞外域或其部分用作寡聚物的建筑单元。在这些方法中,本发明人利用公认的MHC四聚体技术。在这些方法中,将VISTA胞外域构建体或片段连接于多种寡聚化域(本文所鉴别)的N端,以产生一系列原子价从二价跨越到七价的VISTA复合物。

[0734] 从而基于引导二聚、三聚、四聚、五聚和七聚装配体的稳定形成的高亲和卷曲螺旋域来产生一系列非共价寡聚物。这些寡聚构建体在宿主细胞(例如大肠杆菌)中表达。当在大肠杆菌中实现表达时,所表达的寡聚物然后会再折叠并且使用标准的实验室方案将其从内含体纯化。这种方法已经常规地制得用于生物和结构分析的高质量物质,其包括MHC-肽复合物和三聚GITRL66。然后通过SDS-PAGE、分析性凝胶过滤、分析性超离心和质谱来评估分离的寡聚蛋白质。这些质量控制措施确保了用于体外和体内研究的均质的充分表征的物质的可用性。这些构建体的并行组织产生以下分子:其中原子价等于寡聚状态,因为每一个别VISTA复合物被定位以与细胞表面结合的VISTA受体高效地相互作用。上述构建体具有非常的稳定性和寡聚状态同源性。(除显示95℃的熔化温度的七聚物序列以外,非共价卷曲螺旋寡聚化域典型地显示超过100℃的熔化温度。)

[0735] 另外,二聚VISTA-Ig被四聚化,其具有嗜细胞性或不具有嗜细胞性。用N端BirA位点修饰在含IgG1 Fc(野生型IgG1和现有非FcR结合性IgG1两者)的框架中VISTA的Fc融合构建体,以进行酶促生物素化,并且克隆到pIRES2-EGFP载体中。在抗生物素蛋白多聚化时,酶促生物素化将允许特定的单个残基修饰和取向。这种方法已经用于产生众多的Ig融合蛋白,包括B7-1、PD-L1、PD-L2和TIM-3。然后将表达的蛋白质体外酶促生物素化,通过尺寸排阻HPLC纯化,并且使用PE-抗生物素蛋白进行四聚化。体内评估具有或不具有嗜细胞性的所得四聚体。

[0736] 这些工程化的多聚VISTA蛋白适用于治疗自体免疫性和其它病状,其中VISTA通路和免疫抑制的介入在治疗上得到批准。

[0737] 实施例10

[0738] 用于诱导免疫抑制的VISTA腺病毒载体

[0739] 使用重组型腺相关病毒(AAV)的基因转移在基因疗法、特别是PD-L1基因的AAV介导性基因递送方面已有巨大的技术发展,或CTLA4-Ig和CD40-Ig已经在狼疮(Kyttaris等,2005)和心脏移植的自体免疫疾病模型中实现了治疗功效。这些方法将用于递送全长VISTA或者寡聚VISTA胞外域,并且在EAE模型中评估其治疗效果。使用Adeno-XTM表达系统(Clontech)根据制造商说明书来产生表达全长鼠类VISTA或者寡聚VISTA胞外域的重组型腺病毒载体。简言之,在人巨细胞病毒(CMV)启动子的控制下将VISTA克隆到缺失E1和E3、基于pAdDEST的表达载体中。从细胞溶解产物纯化表达腺病毒的VISTA和对照lacZ。为了全身性过表达VISTA,在通过免疫诱导疾病之前或在通过免疫诱导疾病之后不久,或者在疾病发作之后,通过静脉内尾部静脉注射(1×10^9个血小板形成单元[Pfu])向小鼠施用腺病毒。对照小鼠将接受100μl PBS。在SJL小鼠和C57BL/6小鼠两者中都监测疾病发展和改变,所述小鼠显示不同的疾病进展模式,并且呈现两种独特形式的人MS患者的临床表现。

[0740] 实施例11

[0741] 关于VISTA的结构研究并且测定VISTA功能的分子决定子

[0742] 组织的信号转导复合物的亲和力、特异性、寡聚状态和形成以及定位是免疫功能的重要贡献者。所有这些特征都影响信号转导和免疫调控,因为受体-配体胞外域的组织直接控制非共价缔合的细胞质信号转导和搭架分子的募集、组织和功能。使用包括细菌、昆虫和哺乳动物表达系统的技术以及高通量结晶和结构测定方法来测定VISTA的高分辨率晶体结构。为了验证晶体学观察到的二硫键模式,将使用高分辨率质谱,其使用的方法已成功支持TIM-3和人DcR359研究。基于这些结构结果,设计了一系列具有改变的寡聚物性质的突变体,以及在VISTA IgV域的任何扰动区附近的突变体。这些突变型蛋白质将提供研究VISTA功能的另外直接机制,并且应当可用于治疗学,其中免疫抑制是所需的,如本文鉴别的自体免疫性、过敏性和炎症性疾病。这些突变体,尤其是寡聚物在体外系统中进行测试,并在动物自体免疫和炎症疾病模型中进行评估,以评价对疾病进展、疾病缓解或在避免动物发展自体免疫或炎性病状中的免疫抑制作用。

[0743] 这些寡聚VISTA蛋白将活化VISTA通路并用作自体免疫中免疫干预的目标。这种介入将抑制免疫,并对自体免疫疾病以及需要自体免疫抑制的其它病状发挥治疗益处。这通过在不同的自体免疫和炎症模型如EAE和胶原诱导型关节炎动物模型中施用寡聚化VISTA蛋白而实现。此外,如上所讨论,构建了过表达全长VISTA或VISTA寡聚物的腺病毒载体,并在体内进行了测试。这些研究将证实VISTA寡聚物的免疫抑制作用。

[0744] 实施例12

[0745] 使用条件性过表达VISTA转基因小鼠品系(VISTA转基因小鼠品系:R26STOPFLVISTA(VISTA))的实验

[0746] 已使在loxP侧接STOP盒之后含有VISTA的全长cDNA的目标构建体靶向了泛表达的ROSA26基因座。生出多只被正确靶向的R26StopFL/-VISTA幼崽,并繁殖为CMV-Cre敲除品系60。VISTA xCMV-cre中的初步数据证实GFP和提高的VISTA表达。关于这些小鼠免疫状态(T细胞对抗原的反应、抗体效价等)的研究将证实受抑制的表型。将VISTA品系与CD4-cre、CD11c-cre和Lys-Cre杂交以确定VISTA表达的谱系位置是否会影响抑制。还确定了T细胞的表型和功能,以及确定VISTA的过表达是否会导致Treg的产生。在这些研究中,将来自OVA免疫cre x VISTA品系的Treg过继转移到WT宿主,以确定在存在过表达的VISTA时抗原免疫是

否诱导抗原特异性Treg。这应当验证VISTA会影响Treg分化。

[0747] 另外，在EAE模型中进行了研究，借此评价在疾病发展方面VISTA蛋白□对不同谱系(通过与CD4-、CD11c-、Lys-cre杂交)的影响。假设疾病可通过VISTA突变体的谱系限制性过表达而抑制，或在CMVx VISTA突变体□中，疾病发展的暂时控制还使用Cre-ERT2x VISTA η。通过施用他莫昔芬，我们可在疾病开始前、疾病开始时或疾病最严重时诱导VISTA的表达，以确定VISTA是否可影响免疫的诱导和/或效应期。使用BM嵌合小鼠，可将VISTA的临时限制性过表达限制到造血室。为了认识对过表达VISTA的时间窗口的控制，从遗传学上打开VISTA，然后通过施用抗VISTA单克隆抗体从血清学上关闭。这些研究将确定VISTA必须发挥控制自体免疫疾病发展和进展的作用的位置和时间。

[0748] 实施例13

[0749] 抗VISTA抗体对CD40/TLR激动剂疫苗的功效的影响

[0750] 如图21中所示，进行实验以分析抗VISTA抗体对疫苗疗效的影响。这些结果表明抗VISTA增强了CD40/TLR疫苗的治疗功效。将C57BL/6小鼠用1X105个转移性B16.F10黑素瘤细胞激发。4天后，用100μg肿瘤相关抗原ΔV、100μg αCD40 FGK45(CD40激动性抗体)和100μg S-27609(TLR7激动剂)在有或无抗VISTA(200μg×3/周)的情况下对小鼠进行接种。通过卡尺测量来监测肿瘤生长。

[0751] 实施例14

[0752] 表达谱

[0753] 为了有助于与Treg细胞的确立的表达谱进行比较，采用标准的生长和活化条件(McHugh等，(2002)同上)。简言之，将新鲜分离的Treg细胞(约96％阳性)以106个/mL、于补充有10％胎牛血清和100单元IL-2的完全RPMI培养基接种到预涂有含或不含抗GITR(DTA-1)的抗CD3的24孔板中(Shimizu等，(2002)同上)。在37℃下培养细胞0小时和12小时，纯化RNA并随后使用AFFYMETRIX®小鼠基因组A430寡核苷酸阵列进行分析。

[0754] 通过比较来自静息或活化CD4+CD25+T细胞组的数据，发现基因表达模式与本领域中确立的那些相似(Gavin等，(2002)同上;McHugh等，(2002)同上)。为了鉴别由GIRT信号传导调控的基因，在具有或不具有抗GITR处理的不同细胞群之间比较了基因表达谱。编辑了已知以及未知基因的列表，包括以前未表征的VISTA和Treg-sTNF。

[0755] 实施例15

[0756] 细胞的VISTA分子克隆、逆转录病毒产生和反转录病毒转导

[0757] 从纯化的鼠类CD4+T细胞克隆全长VISTA。使用Qiagen RNAmini试剂盒从CD4+T细胞分离总RNA。使用Bio-Rad iScriptTM cDNA合成试剂盒产生cDNA。将全长VISTA扩增并克隆到反转录病毒载体pMSCV-IRES-GFP的ECorI-XhoI位点(Zhang和Ren(1998)Blood 92:3829-3840)，其中IRES-GFP片段被RFP置换，因此产生与RFP的N端融合的VISTA融合蛋白。通过VISTA-RFP反转录病毒载体以及生态营养包装载体pCL-Eco(IMGENEX Corp.)的短暂转染而在HEK293T细胞中产生辅助游离逆转录病毒。通过在2000rpm下在室温下在8μg/ml聚凝胺(polybrene)(Sigma)存在下旋转感染45分钟，进行鼠类T细胞系EL4细胞或骨髓源性DC的反转录病毒转导。

[0758] 实施例16

[0759] 产生VISTA-IG融合蛋白

[0760] 将VISTA的细胞外域(氨基酸32-190)扩增并克隆到亲本载体CDM7B的SpeI-BamHI位点。Hollenbaugh等,(1995)J Immunol Methods 188:1-7。这个载体含有人IgG1的恒定区和铰链区的突变形式,其对Fc受体的结合减小很多。将所得载体CDM7B-VISTA与DHFR表达载体pSV-dhfr共同转染(McIvor和Simonsen(1990)Nucleic Acids Res 18:7025-7032)到CHO(dhfr-)细胞系(ATCC#CRL-9096)中。在没有核苷酸的培养基MEM-α(INVITROGEN®)中选择表达VISTA-Ig的稳定的CHO细胞克隆。用0.5-1μM甲氨喋呤(SIGMA®M9929)进一步扩增得到表达高水平的可溶性VISTA-Ig融合蛋白的克隆。使用标准的蛋白质-G柱亲和色谱从培养物上清液中进一步纯化融合蛋白。

[0761] 实施例17

[0762] 产生VISTA单克隆抗体

[0763] 每周用过表达VISTA-RFP的EL4细胞将亚美尼亚仓鼠免疫4次,然后用在CFA中乳化的VISTA-Ig融合蛋白加强。在加强之后4周,用可溶性VISTA-Ig融合蛋白再次加强仓鼠。在最后一次加强之后4天,收集仓鼠脾脏细胞并且使用标准的杂交瘤融合技术使其与骨髓瘤细胞系SP2/0-Ag14(ATCC#CRL-1581)融合。Shulman等,(1978)Nature276:269-270。在限制性稀释之后选择分泌VISTA特异性抗体的杂交瘤克隆,并且通过ELISA和流式细胞方法进行筛选。

[0764] 实施例18

[0765] VISTA的抑制活性

[0766] 通过使用体外过表达PD-L1并具有CD4+和CD8+T细胞抗原受体转基因T细胞和抗原刺激的抗原呈递细胞来揭示PD-L1的抑制活性(Carter等,(2002)Eur.J.Immunol.32:634-43)。类似地,将本文公开的表达全长VISTA的慢病毒载体转导到表达II类主要组织相容性复合体(MHC)和I类MHC的细胞系中。根据公认的方法测定TEa Tg或2C转基因T细胞对由空载体转导或VISTA转导的抗原呈递细胞呈递的抗原的反应。

[0767] 实施例19

[0768] 单克隆抗体产生

[0769] 在鼠类B细胞系A20中过表达VISTA,并且将重组型细胞系用于使亚美尼亚仓鼠免疫。在5次细胞免疫之后,用在CFA中乳化的纯化的VISTA-Ig融合蛋白加强仓鼠。4周后,用可溶性VISTA-Ig提供最终的加强。随后,在第4天进行仓鼠脾细胞与SP2/0细胞的融合。通过ELISA以及染色的VISTA而非在鼠类T细胞系EL4上过表达的PD-L1鉴别出16种识别VISTA-Ig融合蛋白的不同克隆。11种克隆被成功地亚克隆并且制备来评价其对细胞和组织上的内源性VISTA染色以及阻断VISTA功能的能力。

[0770] 实施例20

[0771] VISTA-IG缀合物负调控T细胞反应

[0772] 免疫球蛋白(Ig)超家族由许多重要的免疫调控剂(包括B7家族配体和受体)组成。VISTA是一种新型且结构独特的Ig超家族抑制配体,其细胞外域具有与B7家族配体PD-L1的同源性。将这种分子命名为T细胞活化的V域Ig抑制因子(VISTA)。VISTA主要在造血细胞上表达,且VISTA在骨髓抗原呈递细胞(APC)和T细胞上的表达高度受调控。APC上的可溶性VISTA-Ig融合蛋白或VISTA表达会抑制体外T细胞增殖和细胞因子产生。VISTA特异性单克隆抗体通过在体外的VISTA表达APC来干扰T细胞反应的VISTA诱导性抑制。此外,抗VISTA治

疗加剧了T细胞介导性自体免疫疾病，即实验性小鼠自体免疫脑脊髓炎的发展。最后，肿瘤细胞上的VISTA过表达干扰小鼠的体内保护性抗肿瘤免疫性。这些发现显示，新型免疫调控分子VISTA具有对于其它Ig超家族成员非多余的功能活性，并且可以在癌症中产生自体免疫和免疫监督方面起作用。参见Wang等，(2011)The Journal of Experimental Medicine 208(3):577-592。在这个实施例中，还可以将VISTA称为“PD-XL”。

[0773] 材料和方法

[0774] 小鼠。从Jackson Laboratory购得C57BL/6小鼠、OT-II CD4转基因小鼠，和SJL/J小鼠。FoxP3-GFP报导小鼠如先前所述(Fontenot等，2005)并且由A.Rudensky(University of Washington School of Medicine，Seattle，WA)提供。PD-1 KO小鼠由T.Honjo(Kyoto University，Kyoto，Japan；Nishimura等，1999，2001)提供。将所有动物都保持在Dartmouth Medical School的无病原体的机构。所有动物方案都由达特茅斯学院机构实验动物护理与使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee of Dartmouth College)批准。

[0775] 抗体、细胞系和试剂。抗体α-CD3(2C11)、α-CD28(PV-1)、α-CD4(GK1.5)、α-CD8(53-6.7)、α-CD11b(M1/70)、α-F4/80(BM8)、α-CD11c(N418)、α-NK1.1(PK136)、α-Gr1(RB6-8C5)、α-PD-L1(MIN5)、α-PD-L2(TY25)、α-B7-H3(M3.2D7)和α-B7-H4(188)购自eBioscience。在指定浓度下使用LPS(Sigma-Aldrich)、重组型小鼠IFN-γ(PeproTech)、人IL-2(PeproTech)和可溶性PD-L1-Ig融合蛋白(R&D Systems)。CFA和鸡OVA购自Sigma-Aldrich。B细胞淋巴瘤细胞系A20(BALB/c来源)获自美国典型培养物保藏中心。

[0776] 细胞的VISTA分子克隆、逆转录病毒产生和反转录病毒转导。全长VISTA从纯化的小鼠$CD4^+$T细胞克隆。使用RNAmini试剂盒(QIAGEN)从$CD4^+$T细胞分离总RNA。使用iScript cDNA合成试剂盒(Bio-Rad Laboratories)产生cDNA。将全长VISTA扩增并克隆到反转录病毒载体pMSCV-IRES-GFP的ECORI-XhoI位点(Zhang和Ren，1998)，其中IRES-GFP片段被RFP置换，因此产生与RFP的N端融合的VISTA融合蛋白。通过VISTA-RFP反转录病毒载体以及生态营养包装载体pCL-Eco(Imgenex Corp.)的短暂转染而在HEK293T细胞中产生辅助游离逆转录病毒。通过在2,000rpm下在室温下在8μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich)存在下旋转感染45分钟，进行小鼠T细胞系EL4细胞或BMDC的反转录病毒转导。

[0777] VISTA的生物信息学分析。通过BLAST算法(Altschul等，1990)来鉴别与VISTA Ig-V序列进化有关的蛋白质。用mGenTHREADER算法鉴别大多数来自蛋白质数据库(Berman等，2000)的合适的结构模板(Lobley等，2009)。将PD-L1(蛋白质数据库登录号3BIS)(即最高评分获得者之一)选为用于比较性蛋白质结构模型化的模板。用MMM服务器，使用两种比对方法MUSCLE和HHalign(Rai和Fiser，2006；Rai等，2006)的优化组合来构建VISTA的结构模型。从ENSEMBL数据库(Flicek等，2008)收集到36种VISTA直系同源蛋白。分别用DALI(Holm和Park，2000)和Clustalw(Larkin等，2007)计算结构和序列比对，并且使用ESPript 2.2服务器(Gouet等，1999)呈现。如先前所述(Atkinson等，2009)来构建BLAST成对比较网络，并且使用Cytoscape(Shannon等，2003)进行分析。

[0778] 产生VISTA-Ig融合蛋白。将VISTA的细胞外域(aa 32-190)扩增并克隆到亲本载体CDM7B的SpeI-BamHI位点(Hollenbaugh等，1995)。这个载体含有人IgG1的恒定区和铰链区的突变形式，其对Fc受体的结合减少很多。将所得载体CDM7B-VISTA用二氢叶酸还原酶表达

载体pSV-dhfr共转染(McIvor和Simonsen,1990)到中国仓鼠卵巢(dhfr$^-$)细胞系(#CRL-9096;美国典型培养物保藏中心)中。在没有核苷酸的培养基MEM-α(Invitrogen)中选择表达VISTA-Ig的稳定的中国仓鼠卵巢细胞克隆。用0.5-1μM甲氨喋呤(M9929;Sigma-Aldrich)进一步扩增得到表达高水平的可溶性VISTA-Ig融合蛋白的克隆。使用标准的蛋白质-G柱亲和色谱从培养物上清液中进一步纯化融合蛋白。

[0779] 产生VISTA单克隆抗体(mAb)。每周用过表达VISTA-RFP的EL4细胞将亚美尼亚仓鼠免疫,然后用在CFA中乳化的VISTA-Ig融合蛋白加强。在加强之后4周,用可溶性VISTA-Ig融合蛋白再次加强仓鼠。在最后一次加强之后4天,收集仓鼠脾脏细胞并且使用标准的杂交瘤融合技术使其与骨髓瘤细胞系SP2/0-Ag14(#CRL-1581;美国典型培养物保藏中心)融合(Shulman等,1978)。在限制性稀释之后选择分泌VISTA特异性抗体的杂交瘤,并且通过ELISA和流式细胞术方法进行筛选。

[0780] RNA和RT-PCR。通过使用TRIZOL®(Invitrogen)根据公司说明书来收集来自多个小鼠组织样本或纯化造血细胞类型的总RNA。使用iScript cDNA合成试剂盒(Bio-Rad Laboratories)来制备cDNA。将等量组织cDNA(10ng)用于RT-PCR反应以扩增全长VISTA。在通过1%琼脂糖凝胶之后观察PCR产物。

[0781] 流式细胞术和分析。在FACScan上使用CellQuest软件(BD)进行流式细胞术分析。使用FlowJo软件(Tree Star,Inc.)进行数据分析。为了对细胞增殖进行定量,分析了CFSE分裂的直方图谱,并且使用Prism 4(GraphPad Software,Inc.)对增殖性CFSE^{低}细胞的百分比进行作图。

[0782] 细胞制备。使用总CD4$^+$T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)从原生小鼠分离总CD4$^+$T细胞。当指示时,将富集的CD4$^+$T细胞流式分选到原生(CD44^{低}CD25$^-$CD62L^{hi})和记忆(CD44^{hi}CD25$^-$CD62L^{低})群体中。对于体外增殖分析,在37℃下用5μM CFSE(Invitrogen)标记CD4$^+$T细胞10分钟,并且洗涤两次,随后进行刺激。

[0783] 对于A20分析,用100μg/ml丝裂霉素C预处理A20-RFP或A20-PD-XL细胞(20,000个)(1小时),然后用CFSE标记的DO11.10CD4$^+$T细胞(100,000个)在OVA肽存在下培育。如所示来添加对照Ig或13F3单克隆抗体。在72小时通过CFSE稀释来分析细胞增殖。为了分选CD11b^{hi}骨髓APC,使用CD11b磁性珠粒(Miltenyi Biotec)从原生脾细胞富集的CD11b$^+$单核细胞。将总CD11b^{hi}骨髓APC或CD11b^{hi}CD11c$^-$单核细胞和CD11b^{hi}CD11c$^+$骨髓DC分选、辐射(2,500拉德),并且用于在OVA肽存在下刺激OT-II转基因CD4$^+$T细胞。如所示来添加对照Ig或13F3单克隆抗体。在72小时分析的最后8h期间通过并入氚来测量细胞增殖。

[0784] 体外板结合T细胞活化分析。在处于指定浓度比率下的抗CD3(克隆2C11)和VISTA-Ig或者对照Ig存在下,将纯化的CD4$^+$T细胞(100,000个细胞/孔)培养在96孔平底板中。例如,对于完整范围的滴定,用2.5μg/mlα-CD3与1.25μg/ml(比率2:1)、2.5μg/ml(比率1:1)、5μg/ml(比率1:2),或10μg/ml(比率1:4)VISTA-Ig或对照Ig蛋白在PBS中的混合物在4℃下涂布96孔板过夜。将孔用PBS洗涤三次,随后添加CD4$^+$T细胞。复制培养物处于补充有10%FBS、10mM Hepes、50μMβ-ME和青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺的完全RPMI 1640培养基中。当指定时,连同α-CD3一起涂布100U/ml人IL-2(PeproTech)或滴定量的α-CD28(克隆PV-1;Bio XCell)以救援VISTA-Ig的抑制作用。在第3天针对CFSE谱或根据如所示的时程来分析培养物。

[0785] BMDC培养物、反转录病毒转导和转基因$CD4^+$T细胞的刺激。如先前所述(Lutz等,1999;Son等,2002)产生BMDC,但做了一些修改。简言之,在第0天,通过用27号针头冲洗从胫骨和股骨分离了BM细胞。红细胞裂解后,将1-2×10^6个BM细胞重悬在1ml含20ng/ml GM-CSF(Pepro Tech)的完全RPMI 1640培养基中。在8μg/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich)存在下用RFP或VISTA-RFP逆转录病毒感染细胞。通过在室温下将板以2,000rpm旋转45分钟进行感染。然后,将细胞再培养2小时,随后添加新鲜培养基。在第1天、第3天和第5天重复类似的感染程序。在第10天收集松散的贴壁细胞(90%是$CD11c^+$),分选$CD11c^+RFP^+$-双阳性细胞并用于刺激转基因OT-II $CD4^+$T细胞。对于OT-II T细胞增殖分析,在存在滴定量的合成$OVA_{323-339}$肽(AnaSpec)的情况下,将100,000个CFSE标记的OT-II $CD4^+$T细胞在具有30,000个分选的RFP^+或VISTA-RFP^+BMDC的96孔圆底板中培养。通过考查CFSE谱在72小时时分析了OT-II T细胞的增殖。

[0786] 肿瘤实验。用VISTA-RFP或RFP对照逆转录病毒转导亲本MCA105肿瘤细胞,并且将其基于RFP表达而分选均匀。为了进行肿瘤接种,用1,000,000个经过辐射的MCA105(10,000拉德)细胞,皮下接种到左侧腹而使原生C57BL/6小鼠免疫。在第14天,用皮下接种到右侧腹的活MCA105肿瘤细胞来激发接种的小鼠。每2天监测肿瘤生长。当肿瘤尺寸达到150mm^2时使小鼠安乐死。为了T细胞耗尽,在活肿瘤细胞激发之前2天用对$CD4^+$T细胞(克隆GK1.5)和$CD8^+$T细胞(克隆53.6.72)具有特异性的单克隆抗体腹膜内预处理(250μg)接种的小鼠,并且每3至4天重复所述处理直到实验结束为止。当肿瘤尺寸达到160mm^2时使小鼠安乐死。

[0787] EAE的被动诱导以及中枢神经系统浸润性$CD4^+$T细胞的表征。为了进行被动转移EAE,用200μl含有400μg结核分枝杆菌H37Ra和100μg PLP肽的乳液使雌性SJL小鼠(6周龄)皮下免疫。在第10天收集引流LN细胞以便体外刺激。将红血球溶解。在含10%FBS、50μM2-ME、1mM谷氨酰胺、1%青霉素/链霉亲和素、1mM非必需氨基酸、20ng/ml IL-23、10ng/ml IL-6、10ng/ml IL-1β、20μg/ml抗IFN-γ和20μg/ml PLP的完全IMDM培养基中培养单个细胞悬浮液(10,000,000个/微升)。在第4天,收集细胞,并且使用CD4磁性珠粒(Miltenyi Biotec)纯化CD4T细胞。将1,500,000至2,000,000个纯化的活CD4T细胞继承性转移到原生SJL小鼠中以诱导EAE。每3天用非特异性仓鼠对照Ig或者400μgVISTA特异性单克隆抗体处理小鼠。如下对疾病评分:0,无疾病;1,后肢虚弱或丧失尾调;2,尾无力和后肢轻瘫;2.5,后肢麻痹;3,双后肢麻痹;4,前肢虚弱;5,垂死。评分达到4时将小鼠安乐死。

[0788] VISTA的克隆和序列以及结构分析

[0789] 活化的相对于静息的小鼠$CD25^+CD4^+$天然T_{reg}细胞(nT_{reg}细胞)的Affymetrix®分析揭示,基因产物(RIKEN cDNA4632428N05或4632428N05Rik)的表达具有未知的功能,但与Ig超家族具有序列同源性。从小鼠$CD4^+$T细胞cDNA文库克隆930bp基因产物,其匹配预测的尺寸和序列。硅序列和结构分析预测在成熟时的309个aa的I型跨膜蛋白。其细胞外域含有136个aa的单一细胞外Ig-V域,其连接于23个aa的茎区、21个残基的跨膜片段,以及97个aa的胞浆域(图23A)。4632428N05Rik的细胞质尾部不含有任何信号传导域。基于本文所示的Ig-V域的结构特征和其免疫抑制性功能,将这个分子命名为VISTA。

[0790] 用VISTA Ig-V域的BLAST(Altschul等,1990)序列检索鉴别出B7家族的PD-L1,作为进化最接近的相关蛋白质,其具有界线明显的e值评分10^{-4}并且序列同一性为24%。

[0791] VISTA与B7家族成员PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4的基于结构的序列比对突出几个

已知在所有Ig-V域蛋白中都系统地保守并且被认为对于Ig-V折叠的稳定性重要的氨基酸(图23C)。实施例包括在两个β折叠之间形成二硫键的B和Fβ链中的两个半胱氨酸,其为Ig超家族蛋白质的标志性特征(图23C)。这种多重序列比对还揭示对VISTA独特的另外的序列特征。

[0792] 通过RT-PCR分析和流式细胞术进行的VISTA表达实验。使用RT-PCR分析以测定小鼠组织中VISTA的信使RNA表达模式(图3A)。VISTA主要在造血组织(脾脏、胸腺和BM)上或具有丰富的白血球浸润的组织(即肺)表达。还在非造血细胞组织(即心脏、肾、脑和卵巢)中检测到弱表达。对几种造血细胞类型的分析揭示在腹膜巨噬细胞、脾脏$CD11b^+$单核细胞、$CD11c^+$DC、$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞上有VISTA表达,但是在B细胞上的表达水平较低(图3B)。这个表达模式还在很大程度上与GNF(Genomics Institute of the Novartis Research Foundation)基因阵列数据库(符号4632428N05Rik;Su等,2002)以及National Center for Biotechnology Information GEO(Gene Expression Omnibus)数据库(登录号GDS868)一致。

[0793] 为了研究蛋白质表达,产生VISTA特异性仓鼠单克隆抗体。通过过表达VISTA的小鼠EL4T细胞上的阳性染色,而在过表达PD-L1的EL4细胞上的阴性染色来证明特异性。

[0794] 使用α-VISTA单克隆抗体克隆8D8,通过流式细胞术分析造血细胞上的VISTA表达。将Foxp3-GFP敲进报导小鼠用于区分$CD4^+nT_{reg}$细胞(Fontenot等,2005)。在外周淋巴器官(脾脏和LN)中,在所有$CD4^+$T细胞子集上都看到明显的表达(见总$CD4^+$T细胞或$Foxp3^-$原生T细胞和$Foxp3^+nT_{reg}$细胞和记忆$CD4^+$T细胞),而$CD8^+$T细胞表达明显较低量的表面VISTA(3C)。在胸腺中,$CD4^+CD8^+$双阳性胸腺细胞上的VISTA表达是阴性的,在CD4单阳性细胞上的VISTA表达是低的,并且在CD8单阳性细胞上可检测到。接着,脾脏和腹膜细胞两者(包括在F4/80巨噬细胞和骨髓$CD11c^+$DC)中都看到高VISTA表达与CD11b标记的强相关性(图3D和3E)。相比之下,B细胞和NK细胞对于VISTA表达主要是阴性的。小百分比的$Gr\text{-}1^+$粒细胞还表达VISTA(图3F)。

[0795] 在来自不同淋巴器官的相同谱系的细胞上示出差异表达模式(图3G)。对于$CD4^+$T细胞和$CD11b^{中间}$单核细胞,表达水平沿用肠系膜LN>周边LN和脾脏>腹膜腔和血液。这个模式对于$CD11b^{hi}$细胞不太明显。这些数据表明在某些细胞类型上的VISTA表达可以由细胞成熟和/或组织微环境调控。

[0796] 除新鲜分离的细胞以外,在有和没有活化的情况下体外培养时,分析脾脏$CD4^+$T细胞、$CD11b^{hi}$单核细胞和$CD11c^+$DC上的VISTA表达(图6)。将脾脏细胞与培养基、与α-CD3(用于活化T细胞)或与IFN-γ和LPS(用于活化单核细胞和DC)一起培养24小时,随后对VISTA和其它B7家族配体(例如PD-L1、PD-L2、B7-H3和B7-H4)进行表达分析。这个比较揭示在这些分子之间独特的表达模式。在体外培养时在所有细胞类型上都快速损失VISTA表达,而不论活化状态如何。相比之下,在培养基中单独培养并且在刺激时进一步增强之后,在活化的$CD4^+$T细胞上或在$CD11b^{hi}$单核细胞和$CD11c^+$DC上的PD-L1表达上调。在所用培养条件下,PD-L2、B7-H3和B7-H4的表达并不突出。当与其它B7家族配体相比时,体外VISTA表达的损失是独特的,但是可以反映不能模拟组织微环境的非最优的培养条件。

[0797] 为了弄清楚可以如何体内调控VISTA表达,用在CFA中乳化的同源抗原鸡OVA使CD4TCR转基因小鼠DO11.10免疫。在免疫之后24小时,分析来自引流LN的细胞的VISTA表达

(图7A)。用抗原(CFA/OVA)而非仅用佐剂免疫会大幅增大CD11b^{+}VISTA^{+}骨髓细胞群体,其含有F4/80^{+}巨噬细胞和CD11c^{+}DC的混合群体。与PD-L1和PD-L2进一步比较揭示,即使PD-L1具有最高的组成性表达水平,但是在这个炎症免疫反应期间VISTA得到最高的上调(图7B)。总体来说,这些数据强烈表明在骨髓APC上的VISTA表达受到免疫系统的严格调控,这可以促进其在控制免疫反应方面的作用。与其在APC上增大的表达相反,在免疫后的稍晚时间点(即在48小时而非在24小时),在活化的DO11.10 CD4^{+}T细胞上的VISTA表达减少。

[0798] VISTA信号传导对CD4^{+}和CD8^{+}T细胞体外反应的功能性影响。产生VISTA Ig融合蛋白(VISTA-Ig)以考查VISTA对CD4^{+}T细胞反应的调控作用。VISTA-Ig含有与人IgG$_1$ Fc区融合的VISTA的细胞外域。当固定于微板时,VISTA-Ig而非对照Ig会抑制粗纯化的CD4^{+}和CD8^{+}T细胞响应于α-CD3刺激的增殖(图9A和9B)。VISTA-Ig不影响抗CD3抗体吸收到塑料孔,如通过ELISA测定,因此排除了非特异性抑制作用的可能性。直接比较PD-L1-Ig和VISTA-Ig的抑制作用。当滴定量的Ig融合蛋白连同α-CD3一起吸附到微板以刺激CD4^{+}T细胞时,VISTA-Ig示出类似于PD-L1-Ig融合蛋白的强力抑制功效。还抑制了PD-1 KO CD4^{+}T细胞(图9C),表明PD-1不是VISTA的受体。

[0799] 因为粗纯化的CD4^{+}T细胞含有多个子集,所以评价VISTA-Ig对分选的原生(CD25^{-}CD44^{低}CD62L^{hi})和记忆(CD25^{-}CD44^{hi}CD62L^{低})CD4^{+}T细胞子集的影响。VISTA抑制两个子集的增殖,但对记忆细胞的功效较小。

[0800] 为了进一步理解VISTA介导性抑制的机制,在T细胞活化之后测量早期TCR活化标记的表达和细胞凋亡。与对细胞增殖的负作用一致,存在对早期活化标记CD69、CD44和CD62L的表达的全局抑制(图12A)。相比之下,VISTA-Ig不诱导细胞凋亡。在TCR活化的早期(24小时)和稍晚(48小时)阶段,在VISTA-Ig存在下看到小于对照Ig的细胞凋亡(如由膜联蛋白V^{+}7AAD^{-}细胞的百分比测定)(图12B)。例如,在24小时,在总"非分类"群体中,约27%的细胞在VISTA-Ig存在下凋亡,而在对照Ig存在下细胞则有约39%凋亡。类似地,在活细胞R1类别内的细胞中,在对照Ig存在下约72.6%的细胞变为凋亡,而在VISTA-Ig存在下细胞只有43.5%凋亡。在48小时的时间点看到类似的结果。因此,VISTA似乎通过抑制早期TCR活化和停滞细胞分裂,但使对凋亡的直接影响最小来负调控CD4^{+}T细胞反应。这个抑制机制类似于B7-H4的机制(Sica等,2003)。

[0801] 开发了两步分析,以确定VISTA-Ig能否抑制预活化的CD4T细胞以及其抑制作用的持久性如何。VISTA-Ig融合蛋白的抑制作用持续到其撤去后24小时后活化(图9D,ii)。另外,原生和预活化的CD4^{+}T细胞都被VISTA-Ig抑制(图9D,i、iii和iv)。

[0802] 接着,分析VISTA-Ig对CD4^{+}T细胞细胞因子产生的影响。VISTA-Ig抑制Th1细胞因子IL-2和IFN-γ从粗纯化的CD4^{+}T细胞培养物的产生(图13A和13B)。进一步测试VISTA对单独的原生(CD25^{-}CD44^{低}CD62Lhi)和记忆(CD25^{-}CD44^{hi}CD62L^{低})CD4^{+}T细胞群体的影响。记忆CD4^{+}T细胞是CD4^{+}T细胞小室内细胞因子产生的主要来源,而VISTA抑制了这种产生(图13C和13D)。CD8^{+}T细胞的IFN-γ产生还受VISTA-Ig的抑制(图13E)。VISTA对CD4^{+}和CD8^{+}T细胞产生细胞因子的这种抑制作用与VISTA是下调T细胞介导的免疫反应的抑制性配体的假设一致。

[0803] 设计了进一步的实验以确定能够克服VISTA的抑制作用的因子。鉴于VISTA抑制了IL-2产生,并且IL-2对T细胞存活和增殖至关重要,我们假设IL-2可能避开VISTA的抑制活性。如在图14A中所示,外源性IL-2而非IL-15、IL-7或IL-23部分逆转了VISTA-Ig对细胞增

殖的抑制作用。由高水平IL-2的不完全救援表明,VISTA信号传导比单纯的IL-2产生靶向了更宽的T细胞活化通路。相比之下,由α-CD28激动性抗体提供的强力共同刺激信号完全逆转了VISTA-Ig介导的抑制(图14B),而中等水平的共同刺激仍受到VISTA信号传导的抑制(图14C)。就这来说,VISTA与其它抑制性B7家族配体如PD-L1和B7-H4都有这一特征(Carter等,2002;Sica等,2003)。

[0804] 除VISTA-Ig融合蛋白以外,有必要证实在APC上表达的VISTA也可在APC和T细胞之间发生同源相互作用期间抑制抗原特异性T细胞活化。我们已经所用两种独立的细胞系统以解决这个问题。首先,VISTA-RFP或RFP对照蛋白通过B细胞系A20中的反转录病毒转导而过表达。通过荧光显微术证实VISTA-RFP融合蛋白的正确的细胞表面定位。为了刺激T细胞反应,将A20-VISTA或A20-RFP细胞与DO11.10 $CD4^+$T细胞在抗原OVA肽存在下一起孵育。如图15A和C中所示,A20-VISTA诱导的DO11.10细胞的增殖少于A20-RFP细胞。这种抑制作用在较低的肽浓度下更加显著,这与较强的刺激信号将会克服VISTA的抑制影响的观念一致。

[0805] 第二,证实了全长VISTA对天然APC的抑制作用。体外培养的BM源性DC(BMDC)不会表达高水平的VISTA(图16)。VISTA-RFP或RFP通过在10天培养期期间的反转录病毒转导而在BMDC中表达。基于RFP表达将转导的细胞分选均匀。通过用α-VISTA单克隆抗体染色来估算在转导的DC上的VISTA表达水平,并且发现其类似于新鲜分离的腹膜巨噬细胞上的水平,因此在生理表达范围内(图16)。然后将分选的BMDC用于在OVA肽存在下刺激OVA特异性转基因$CD4^+$T细胞(OT-II)。BMDC上的VISTA表达会抑制同源$CD4^+$T细胞增殖(图15D)。这个结果与使用VISTA-Ig融合蛋白或表达VISTA的A20细胞的数据(图5)一致,表明在APC上表达的VISTA可抑制T细胞介导性免疫反应。

[0806] 为了验证体内VISTA表达的影响,考查肿瘤细胞上的VISTA过表达是否可削弱抗肿瘤免疫反应。MCA105(甲基胆蒽105)纤维肉瘤不表达VISTA。通过用VISTA-RFP或RFP对照病毒进行反转录病毒转导来确立两种MCA105肿瘤系。因为MCA105肿瘤具有免疫原性并且可在用受到辐射的MCA105细胞预免疫的宿主中容易地控制(Mackey等,1997),所以我们考查了肿瘤VISTA表达对这种保护性免疫的作用。如图26A中所示,表达VISTA的MCA105在接种的宿主中急剧生长,而对照肿瘤不能勃发。为了证实在无T细胞介导性抗肿瘤免疫性存在下肿瘤生长速率没有本质的差异,将肿瘤接种于接种的动物中,其中使用单克隆抗体耗尽了$CD4^+$和$CD8^+$T细胞。如图26B中所示,在T细胞耗尽后,MCA105RFP和MCA105VISTA肿瘤两者以与非T耗尽宿主等同和比其快得多的速率生长。总之,这些数据表明肿瘤细胞上的VISTA表达可干扰宿主的保护性抗肿瘤免疫性。

[0807] 特异性单克隆抗体对VISTA的阻断会增强体外和体内T细胞反应。

[0808] 鉴别VISTA特异性单克隆抗体(13F3)以中和A20-DO11.10分析系统中的VISTA介导性抑制(图25A)。为了进一步证实13F3对T细胞反应的影响,从原生小鼠纯化$CD11b^{hi}$骨髓APC以在13F3存在或不存在下刺激OT-II转基因$CD4^+$T细胞(图25B)。与其中和效应一致,13F3增强了由$CD11b^{hi}$骨髓细胞刺激的T细胞增殖,其显示会表达高水平VISTA(图3)。在$CD11b^{hi}CD11c^+$骨髓DC和$CD11b^{hi}CD11c^-$单核细胞上都可看到13F3的类似作用(图25C-D)。

[0809] 接着,在EAE被动转移模型中考查单克隆抗体对VISTA的阻断的影响,所述模型是人多发性硬化症的小鼠自体免疫炎症疾病模型(Stromnes和Goverman,2006)。在供体小鼠中通过用蛋白脂质蛋白(PLP)肽主动免疫而将致脑炎性$CD4^+$T细胞初免,并且将其继承性转

移到原生小鼠中。为了谨慎地评价α-VISTA恶化疾病的能力，将滴定数目的活化的致脑炎性T细胞被动地转移到用α-VISTA或对照Ig处理的原生宿主中，并且监测EAE发展。发现13F3在次最优T细胞转移剂量下会明显加速疾病发作，以及恶化疾病严重度。13F3处理的组到第14天达到100％的发病率，而那些用对照抗体处理的小鼠在实验持续时间期间没有达到100％的发病率。在病程始终，13F3处理的组的平均疾病评分明显高于对照组。与较高的疾病评分一致，在病程结束时对中枢神经系统的分析证实13F3处理的组中有明显更多的IL-17A产生性$CD4^+$T细胞浸润。

[0810] 讨论

[0811] VISTA是Ig超家族网络的一个新成员，其对体外和体内T细胞都施加免疫抑制活性，并且是控制对癌症的自体免疫性和免疫反应的发展的重要介体。所呈现的数据表明，(a)VISTA是Ig超家族的新成员，其含有Ig-V域，所述域对PD-L1具有远的序列相似性，(b)当作为Ig融合蛋白而产生或在人造APC上过表达时，其会抑制CD4和$CD8^+$T细胞两者的增殖和细胞因子产生，(c)骨髓APC上的VISTA表达对于体外T细胞反应具有抑制性，(d)肿瘤细胞上的过表达会削弱接种小鼠的保护性抗肿瘤免疫性，以及(e)抗体介导性VISTA阻断会加剧T细胞介导性自体免疫疾病EAE的发展。

[0812] VISTA Ig-V域的生物信息学分析表明B7-嗜乳脂蛋白家族成员PD-L1、PD-L2和MOG，以及非B7家族CAR和VCBP3在进化上最接近VISTA的相关物(图23)。然而，一级序列特征的密切考察表明所有VISTA直系同源物都共有独特和保守的序列基序，并且VISTA可能呈现在结构上和功能上新型的Ig超家族成员。具体地，存在四个对VISTA胞外域独特的恒定半胱氨酸(在Ig-V域中三个以及在茎中一个)可以有助于影响其功能的新型结构特征。鉴于其严格的不变性，貌似有理的是所有四个VISTA特异性半胱氨酸都参与到二硫键中。这个观测结果表明几种可能性，包括四个半胱氨酸(a)形成两个分子内二硫键，(b)在二聚体界面形成四个分子间二硫键，以及(c)形成一个分子内和两个分子间二硫键。这些方案中的任一个都将呈现新型的二硫键合模式，并且将产生相对于典型的Ig超家族成员独特的三级和/或四级结构。另外，全局序列比较表明VISTA不是Ig超家族内的已知官能团的成员。

[0813] VISTA的表达模式进一步将VISTA与其它B7家族配体区分开。因为这两个配体与VISTA之间较高的序列同源性以及其对T细胞活化的类似抑制功能，所以这个数据主要与PD-L1和PD-L2对比。VISTA的稳态表达在造血细胞上选择性表达并且在APC(巨噬细胞和骨髓DC)与$CD4^+$T淋巴细胞两者上极高地表达。在本文中，PD-L1在造血与非造血细胞两者上具有广泛的表达，而PD-L2在DC和巨噬细胞上受限(Keir等,2006,2008)。虽然PD-L1和PD-L2两者在体外培养时和在活化时都在APC上上调(Yamazaki等,2002;Liang等,2003;Keir等,2008)，但是在短期体外培养之后会损失在骨髓细胞和T细胞上的VISTA表达，而不论是否存在任何刺激物(图6)。这种损失可以反映淋巴组织微环境对维持或调控体内VISTA表达的必需的作用。与这个假设一致，甚至在稳态下，在不同的组织位点，VISTA会区别地表达(即，在肠系膜LN的表达高于在周围淋巴组织，并且在血液中最低)。我们推测这些不同的表达水平可以反映VISTA在具体组织位置的差异性抑制功能。

[0814] 在活性免疫反应期间，体内VISTA表达得到高度调控。在TCR转基因小鼠中用佐剂加抗原(OVA/CFA)而非单独佐剂(CFA)进行免疫会在引流LN内诱导$VISTA^{hi}$骨髓APC群体(图7)。对抗原的需要表明APC上的VISTA上调可能是T细胞活化的结果。与VISTA相比，PD-L1和

PD-L2还响应于免疫而在骨髓APC上上调，但程度小得多。我们推测VISTA$^+$骨髓APC的诱导构成自调控机制以缩减进行中的免疫反应。与这个假设一致，当通过表达VISTA的骨髓APC刺激时，中和VISTA单克隆抗体会增强T细胞体外增殖反应(图25)。

[0815] 与骨髓细胞上的表达模式相反，在体内活化的CD4$^+$T细胞上的VISTA表达减少。这个结果表明体内CD4T细胞上的VISTA表达可以受活性免疫反应期间其活化状态和细胞因子微环境来调控。这个下调是独特的并且在其它抑制性B7家族配体如PD-L1、PD-L2和B7-H4中还没有看到。虽然目前未知CD4$^+$T细胞上VISTA表达的功能意义，但是会在将来的研究中研究在其同源相互作用期间从T细胞将信号反向传导到APC的可能性。

[0816] 通过使用VISTA-Ig融合蛋白、表达VISTA的APC和过表达VISTA的肿瘤，以及体外和体内中和性单克隆抗体来描绘VISTA的抑制配体功能。过表达VISTA的肿瘤可克服接种宿主中的强力保护性免疫。EAE模型中VISTA单克隆抗体的强增强作用进一步验证了VISTA是体内抑制配体的假设。已经使用类似的方法以表征其它B7家族配体的功能(Sica等,2003；Keir等,2008)。重要的是要注意，VISTA通过接合不同于PD-1的受体来发挥其抑制功能(图9)。阻断VISTA通路会恶化EAE的事实证实其功能在PD-L1或PD-L2下是不多余的。相反地，我们推测VISTA以由其独特的结构特征、表达模式和动力学反映的方式控制免疫反应。其未知受体的鉴别将进一步阐明VISTA介导性抑制的机制。

[0817] 总的来说，将VISTA鉴别为新型的免疫抑制性配体。在APC上的VISTA表达通过在T细胞和APC之间发生同源相互作用期间接合T细胞上的其尚待鉴别的对抗受体来抑制T细胞反应。VISTA阻断会在自体免疫疾病模型中增强T细胞介导性免疫，表明当与其它抑制性B7家族配体如PD-L1和PD-L2相比时，其在控制自体免疫中独特和非多余的作用。其在免疫活化早期高度受调控的表达模式也可以指示下调T细胞免疫性和减弱炎症反应的反馈控制通路。就这来说，VISTA抑制通路的治疗性介入提出一种调节T细胞介导性免疫性以治疗疾病如病毒感染和癌症的新型方法。

[0818] 实施例21

[0819] 作为自体免疫的免疫介入的目标的VISTA通路

[0820] 这些研究的目的在于确定可溶性VISTA-Ig蛋白是否可抑制体内免疫反应。使用体内鼠类VISTA-mIGg2a的研究显示，迟至第14天的治疗性治疗对EAE中的临床疾病评分具有有利作用。这些在进行中的实验看起来非常激动人心，因为我们可能已经鉴别了自体免疫疾病介入中的新轴心(图26)。在这种成功下，我们已经使用鼠类IgG1或IgG2a主链上的鼠类VISTA拓展了我们的研究以利用其嗜细胞能力。已经产生VISTA与IgG1 Fc(野生型IgG1和现有非FcR结合性IgG1两者)框内的Fc融合构建体。测试这些可溶性VISTA分子中的每一个以确定其是否可抑制EAE，并且显示VISTA-IgG1与VISTA-IgG2a两者都抑制EAE的发展和进展(图27)。虽然这些早期结果表明二聚嗜细胞性VISTA将具有体内活性，但是我们还准备使用位点特异性生物素化以及与抗生物素蛋白复合以便多聚化来进行四聚化。所提出的研究利用这个专业知识以进行系统产生以及对一组多价试剂进行分析以调节体外T细胞功能，以及具体地在EAE的情况下也是如此。最后，我们相信本建议中所述的努力很有希望能发展新的治疗策略并且通常将对关注于自体免疫和T细胞功能的整个团体有着可观的益处。

[0821] 实施例22

[0822] VISTA-Ig缀合物会减慢EAE进展

[0823] 实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)是多发性硬化症模型。通过用175μg MOG/CFA和300ng百日咳毒素(PT)对小鼠免疫(第0、2天)来诱导EAE。在第14、17和20天,施用150μg VISTA-IgG 2a(n=8)或150μg对照IgG2a(n=8)。将数据以平均值±SEM形式示于图26中。在另一实验中,在第6天,每周用3剂的150μg对照IgG1(n=3)、150μg对照IgG2a(n=6)、150μg mVISTA-IgG1(n=3),或150μg mVISTA IgG2a(n=6)处理小鼠(总共两星期)。将数据以平均值±SEM形式示于图27中。在另一实验中,在第14天,每周用3剂的PBS(n=6)、100μg对照IgG2a(n=6)、300μg对照IgG2a(n=6)、100μgVISTA-IgG2a(n=6),或300μg mVISTA IgG2a(n=6)处理小鼠(总共两星期)。将数据以平均值±SEM形式示于图28中。因此,VISTA-Ig融合蛋白对炎症病状例如多发性硬化症具有治疗效果。

[0824] 实施例23

[0825] 分析人细胞中的VISTA表达和通过VISTA-Ig的抑制

[0826] 在人细胞样本中考查VISTA的表达模式和通过施用VISTA-Ig融合蛋白对其的抑制。

[0827] 材料和方法

[0828] 产生VISTA-Ig融合蛋白—产生由人VISTA的细胞外IgV域的氨基酸16至194组成的融合蛋白,以及突变以弱结合Fc受体的人IgG1形式。将VISTA序列克隆到载体CDM7B的SpeI-BamHI位点。使用Freestyle转染试剂和无蛋白质的Freestyle表达培养基,根据制造商说明书(Invitrogen),通过Freestyle CHO细胞短暂转染来产生蛋白质。在生长5天之后收集上清液并且通过蛋白质G亲和柱纯化。使用10KMWCO旋转柱(Amicon)浓缩蛋白质。

[0829] 细胞制备—从未鉴别的健康的人供体获得人血小板样本。对于培养实验,血液层化于Lymphoprep(PAA)上并且通过密度梯度离心来分离。在PBS中洗涤界面细胞两次,然后在MACS缓冲液中洗涤一次,随后用Miltenyi CD4 Negative选择试剂盒II、CD8 Negative选择试剂盒或CD4记忆T细胞选择试剂盒根据制造商说明书来经历磁性珠粒选择。对于效应细胞分离,随后用Miltenyi CD27阳性选择珠粒使CD4T细胞耗尽$CD27^+$细胞类型。

[0830] 培养物—将T细胞以2×10^5个细胞/孔涂铺在涂有抗CD3(clone OKT3,BioXCell)和VISTA-Ig或对照Ig(ZZ,R&D biosystems)的96孔平底板中。除非另有规定,否则将抗CD3在2.5μg/ml下与10μg/ml(比率1:4)在PBS中的VISTA-Ig或对照Ig蛋白混合在一起,在4℃下过夜。用完全培养基洗涤各孔两次,随后添加细胞。当有指示时,涂布混合物中包括滴定量的抗CD28(Miltenyi Biotech),或将50ng/ml IL-2、IL-4、IL-7或IL-15(Peprotech)添加到培养基中。在第2天分析培养物的早期活化标记,并且在第5天分析后来的活化标记或CFSE概况。

[0831] 流式细胞术—对于培养之后的染色,收集细胞并且将其转移到V形底96孔板中。洗涤细胞并且在含有抗体(CD4、CD8、CD25、CD69、CD45RA;BD biosciences)和近红外可固定的活-死染料(Invitrogen)的HBSS/5%BCS染色缓冲液中染色。洗涤细胞并且用BD固定缓冲液固定,随后进行分析。

[0832] 对于用于VISTA表达的染色,洗涤全血并且用含有用于细胞外标记的抗体的PBA缓冲液(PBS/0.1%BSA/0.1%叠氮化钠)染色。针对CD4、CD8、CD3、CD45RA、CD56、CD11b、CD11c、CD123、HLA-DR、CD14和CD16的抗体购自BD biosciences,并且抗VISTA如本文所述来产生。为了对FoxP3细胞内染色,使用来自eBiosciences的Foxp3固定/透化浓缩物和稀释剂试剂

盒以及来自BD biosciences的抗FoxP3抗体。参见图33D。

[0833] 在LSRII Fortessa(Becton和Dickinson,San Jose,CA,USA)上,用FACSDiva软件v6.1.2(Becton和Dickinson)获得样本,并且用FlowJo软件(Tree Star,Inc.)进行分析。使用Prism 5(GraphPad Software,Inc.)产生图。

[0834] 结果

[0835] 人VISTA蛋白—小鼠VISTA序列相对于人基因组的BLAST鉴别出e值为8e-165并且同一性为77%的染色体10开放阅读框54(C10或f54或血小板受体Gi24前体,GENE ID:64115)。对于小鼠VISTA常见的是,预测这种蛋白质以编码具有单个细胞外IgV域的I型跨膜蛋白。人VISTA是311个氨基酸(aa)长,由32个aa的信号肽、130个aa的细胞外IgV域、33个aa的茎区、20个aa的跨膜域和长96个aa的细胞质尾部组成。参见SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0836] VISTA表达分析—描绘了通过对cDNA组织组(Origene)进行实时PCR分析来考查VISTA健康人组织的表达(图29A)。类似于小鼠组织,VISTA主要在造血组织中或在含有大量造血组织的组织中表达。这与VISTA在免疫相关功能中的重要性一致。有趣的是,人胎盘中的VISTA表达特别高,其可能表明VISTA在维持对妊娠的同种异体环境的耐受性中的功能作用。发现这种表达模式遵循与VISTA的最接近的同系物PD-L1类似的趋势(图29B)。

[0837] 接着,通过流式细胞术考查造血小室内的VISTA蛋白表达。从周边血液分离PBMC并且用抗VISTA单克隆抗体GA1染色。大部分单核细胞、树突细胞和约20%的CD4和CD8T细胞高度表达VISTA(图30)。在血液单核细胞的‘巡视’($CD14^{dim}CD16^{+}$)和‘炎症’($CD14^{+}CD16^{+/-}$)子集内并且在树突细胞的淋巴和骨髓子集内观测到VISTA表达。

[0838] VISTA对T细胞功能的功能作用。先前已经证明VISTA对小鼠T细胞免疫反应具有负影响(Wang等,(2011)J.Exp.Med.第1-16页)。考查VISTA在人细胞介导性免疫反应中是否具有相同作用。产生Ig融合蛋白,其由VISTA的细胞外域和含有突变以减小Fc受体结合的人IgG的Fc区组成。将10μg/ml VISTA-Ig或对照Ig与2.5μg/ml抗CD3(OKT3)一起固定在板上,然后通过CFSE稀释来测量增殖。发现VISTA会抑制粗纯化的CD4(图31A)和CD8(图31B)T细胞的CFSE稀释。VISTA所致的抑制与由PD-L1-Ig(R&D biosystems)诱导的抑制相当。另外,VISTA-Ig有效抑制记忆($CD45RO^{+}$,图31C)和效应物($CD27^{-}$,图31D)子集。人CD4 T细胞上的小鼠VISTA和人VISTA的比较证明VISTA在物种间可交叉反应。人VISTA-Ig以及相对于不同浓度的OKT3的人VISTA-Ig的滴定显示较高浓度的OKT3可被较高浓度的VISTA克服(图32A和32B)。

[0839] 为了获得一些对抑制机制的见解,在存在或不存在VISTA-Ig下活化之后考查细胞状态。在2天的培养期间,由抗CD3对早期活化标记CD25和CD69的上调被VISTA-Ig阻断(图33A和33B)。类似地,在培养5天之后,从CD45RA表达移到CD45RO表达,表明防止了抗原经历(图33C)。VISTA对细胞活力没有影响。与增殖阻断一致,用VISTA-Ig处理的细胞具有类似于未受刺激的细胞而非仅看到OKT3的胚细胞的前向和侧部消散谱。为了确定由VISTA诱导的抑制是否稳定,在抗CD3和VISTA-Ig上培养细胞2天,然后移到抗CD3上仅待3天。这种进一步的刺激不能救援抑制,如图34A和34B中所示。

[0840] 接着,考查VISTA-Ig对细胞因子产生的影响。在递增量的VISTA-Ig存在下用与板结合的OKT3刺激细胞5天,然后通过细胞计数性珠粒阵列在培养物上清液中测量多种细胞因子的浓度。仅检测到痕量水平的IL-2、IL-4或IL-6(<5pg/ml)并且没有观测到差异。然而,

VISTA-Ig会显著减少CD4(图35A)和CD8(图35B)T细胞的IL-10、TNFα和IFNγ的产生，并且IL-17产生倾向于适度减少。

[0841] 还考查了能够克服VISTA诱导型T细胞抑制的因素。示出了抗CD28激动性抗体向T细胞提供强力的共同刺激，并因此滴定至培养物中以激发VISTA抑制(图36A-C)。虽然较低量的抗CD28不能克服VISTA，但是当包括涂布浓度为1μg/ml的抗CD28时，VISTA不能阻断增殖。类似地，虽然低浓度的VISTA可通过添加细胞因子如IL-2、IL-7和IL-15来克服，但是较高浓度的VISTA仍具有抑制性，即使有在50ng/ml下的生理学上高浓度细胞因子。

[0842] 因此，VISTA-Ig融合蛋白可以用作炎症的负调控剂，因为其可明显减少CD4和CD8 T细胞的IL-10、TNFα和IFNγ的产生。这又可以使得免疫反应治疗性下调并且使自体免疫或炎症病症减轻。

[0843] 实施例24

[0844] 人结肠直肠癌中肿瘤浸润性白血球(TIL)上的VISTA表达以及与疾病阶段和预后的关系

[0845] 我们之前已证明鼠类TIL表达极高水平的VISTA，并且阻断VISTA的抗体会减小肿瘤生长(2)。我们还已经证明在人周边血液单核细胞(PBMC)与健康的结肠鼓膜中层单核细胞(LPMC)两者中的VISTA表达，并且假设VISTA在人结肠直肠癌(CRC)中的肿瘤浸润性白血球上表达。本实施例描述通过免疫荧光显微术和流式细胞术来表征CRC、相邻的“健康”粘膜和配对的周边血液中的VISTA表达。组织切片给出关于TME内VISTA表达的结构的有价值信息。流式细胞术允许对VISTA表达和非表达性细胞进行更广泛的表征，包括TIL如骨髓源性抑制细胞(MDSC)、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、树突细胞(DC)和调控性T细胞(Treg)的频率和活化状态。CRC中的VISTA表达还与临床和病态数据关联，以证明VISTA表达和预后标记如肿瘤阶段之间的关联性。

[0846] 抗体介导性VISTA阻断会抑制肿瘤生长：

[0847] 先前在实验室的研究已经确立VISTA是与PD-1无关地结合于T细胞上未知受体的强力免疫抑制配体(1)。当在APC上表达时，VISTA会抑制T细胞增殖和细胞因子产生。肿瘤细胞上的VISTA过表达会削弱接种的宿主中的保护性抗肿瘤免疫性。抗VISTA克隆13F3在功能上阻断VISTA体外抑制活性，并且会加剧实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)的疾病进展(75)。此外，施用13F3会明显减小多种可移植肿瘤系统，包括膀胱肿瘤MB49、甲基胆蒽(MCA)-105纤维肉瘤、胸腺瘤EG7、卵巢肿瘤ID8(图37)和B16F10黑素瘤中的肿瘤生长。另外，我们已经证实aVISTA介导性肿瘤排斥反应与增强的区域抗肿瘤T细胞反应相关，如通过来自MB49肿瘤引流淋巴结(LN)淋巴细胞的IFNg ELISPOT测量。

[0848] 为了进一步证明上述鼠类数据与人癌症发病机制的直接翻译关联性，我们小组已经发起多位点NIHR积存、CLRN记录观测性研究，以研究炎症性肠病和CRC(REC 10/H0804/65，NIHR CRN 9929)中粘膜免疫学中的缺陷。接着，我们完善了从肠切除样品的LPMC提取，以用于多色流式细胞术和功能性分析。使用抗VISTA克隆GA1和HC1(APS Biotech Ltd)，我们随后鉴别了人周边血液和鼓膜中层单核细胞和Lin-HLA-DR+DC和单核细胞中的VISTA表达，这之前并没有得到描述(图38)。因此，除在健康LPMC中表达以外，我们假设VISTA在相邻CRC中的TIL中表达。

[0849] 我们已经最优化了8至10色荧光辅助细胞分选(FACS)抗体组，以除细胞因子和转

录因子表达以外，还确定免疫细胞的频率和活化状态，并且将这些组应用于PBMC和LPMC。然后基于群体特定表面标记将FACS用于区分结肠肿瘤样本中的TIL群体。例如，发现人MDSC是CD11b+、CD33+、HLA-DR-并且进一步分为CD14+和CD14-子集。借助于2个我们实验室之前已经为所述分子产生的抗体克隆来进一步区分其VISTA阳性和阴性子群(图41;GA1和HC1)。在VISTA阳性和阴性亚群之间比较T细胞上的活化标记如CD69、肿瘤相关巨噬细胞上的CD64、CD62L等。则可对其进行进一步的研究，如在实施例29中在体外条件下那样。

[0850] 将肿瘤样本切片冷冻在OCT中，然后分析其VISTA表达。由免疫荧光或通过用苏木精对比染色的免疫组织化学对其进行染色。免疫荧光染色将使用抗VISTA抗体以及对TME(例如上皮细胞、MDSC、致耐受性DC、T细胞、B细胞和其它免疫细胞)中的其它细胞具有特异性的抗体。这证明表达VISTA的细胞的微解剖学局部化以及其与TME中其它细胞的空间相互作用。用苏木精对比染色的免疫组织化学阐明了肿瘤的病理和形态，以及VISTA如何与不同病理(例如炎症或坏死区域)相关。

[0851] 此外，将VISTA表达与临床和病态数据如Duke期、病理学TNM分期以及组织学特征如神经侵害和分化度相比，以确定VISTA表达如何与临床结果的代理值相关。使用CRC(Duke A66％的“高”COX-2表达相对于Duke D 100％)中的COX-2表达的范例，样本大小80(每一Duke分期组中，n＝20)具有84％幂(α＝0.05)以检测任何两个组之间的33％差异(76)。

[0852] 通过以全局和临床上接受的方式对样本分类，所述研究提供临床上相关数据。患者样本中TIL的表征将概述哪些细胞在人体内表达VISTA，以及每一子集内的表达如何随每一期癌症发展而变以及与结果相关。例如，已经发现在人卵巢癌中，Foxp3+Treg大量渗透与不良预后相关。这个目的还将推动进一步的体外研究，如在实施例29中。

[0853] 实施例25

[0854] 在肿瘤浸润性白血球(TIL)上的VISTA表达的功能作用

[0855] 我们的鼠类数据表明VISTA阳性Treg比VISTA阴性Treg更具抑制性。因此，我们假设表达VISTA的TIL将比VISTA阴性TIL对效应物免疫反应更具抑制性。使用两种互补方法检验这个假设。首先，针对VISTA阳性比对阴性子集分选来自结肠癌和健康对照样本的TAM、MDSC、DC和Treg。体外测定这些细胞对T细胞的抑制或刺激性质，接着进行进一步的机械学实验。其次，由反转录病毒RNAi降低VISTA表达以确定其如何影响不同体外TIL细胞类型的抑制性质。这种方法帮助我们进一步理解可能的治疗可如何影响TME。

[0856] 我们已经证明VISTA会深刻地抑制CD4+和CD8+T细胞反应(图39)。具体地，图39示出在aCD3增殖分析中使用与板结合的VISTA-Ig，在体外分析中的增殖抑制。本实施例进一步考查VISTA如何影响TME内不同细胞类型的功能。对结肠癌中VISTA的功能作用的理解进一步为通过使用抗VISTA抗体而变得可能的抗癌治疗提供基础。

[0857] 使用荧光辅助细胞分选以基于细胞特异性和活化标记从肿瘤样本获得骨髓或淋巴源性TIL(肿瘤相关巨噬细胞、骨髓源性抑制细胞、T细胞、B细胞和DC)的个别群体。然后将其用表达iRNA的慢病毒转染以降低VISTA或PD-L1表达，或表达高水平VISTA、PD-L1或“空”的逆转录病毒。将PD-L1用作阳性对照并且用于得到B7-CD28家族内的数据背景。可商购获得(Origene,Rockville,MD)在反转录病毒载体中的hVISTA的四种独特的29mer shRNA以及对照非功能性29mer杂交shRNA的构建体。其保证实现大于70％的敲除。在转染之后，测试TIL在含CFSE标记的反应T细胞的标准的混合淋巴细胞反应(MLR)培养物中的抑制/刺激能

力。还测量细胞因子产生以确定VISTA如何影响分化。

[0858] 实施例26

[0859] 筛选一组抗VISTA抗体并与现有抗PD-L1mAb比较活性以及鉴别VISTA阻断性抗体

[0860] 已经证明我们实验室之前产生的抗VISTA抗体会在小鼠中有效减小肿瘤生长，并且是VISTA的最接近的同系物，PD-L1在临床试验中已表现良好，用于治疗黑素瘤。本实施例描述测试一组抗VISTA抗体在增强T细胞体外增殖中的功效，并将其与单独抗PD-L1或者VISTA与PD-L1阻断的组合的功效相比。

[0861] 免疫检查点通路如PD-L1/PD-1和CTLA-4的作用已经充分记录于人患者中，以及CTLA-4阻断(伊匹单抗)，即对晚期黑素瘤具有任何功效的第一免疫学治疗(77)。抗VISTA治疗与另一免疫学检查点蛋白的阻断组合使用可以更进一步增强抗肿瘤反应。我们实验室使用C57BL/6小鼠中的细胞系B16F10检验了这个理论。由于B16F10的免疫原性差，因此其还呈现极具激发性的用于抗癌免疫介入的鼠类肿瘤系统。用aVISTA的预防性治疗(第-2天)明显阻止了B16F10肿瘤的进展，而另一免疫检查点蛋白PD-L1的阻断不能具有任何影响(图40)。当在治疗上施用aVISTA(第+4天)时，未检出如单一试剂的功效。然而，当VISTA阻断与PD-L1阻断组合时，看到对肿瘤生长的附加影响(图40)。当VISTA-Ig与PD-L1-Ig一起用于抑制T细胞活化时，体外观测到更大的协同效应。

[0862] 我们的结果使我们相信VISTA与PD-L1协同作用以最大限度地抑制T细胞反应。在本实施例中，我们测试了一组抗VISTA抗体在增强T细胞体外增殖中的功效，并将其与单独抗PD-L1或者VISTA与PD-L1阻断的组合相比。

[0863] 我们之前已经产生了抗VISTA的克隆GA1和HC1。图41中示用GA1 mAb进行染色。GA1因在ELISA中结合hVISTA-Ig而非Ig的能力而得到选择以及然后通过对GFP-VISTA转导细胞而非对照转导细胞的特异性染色而得到选择。如使用mAb上清液所示(图41)，GA1结合周边血液中超过50％的单核细胞以及小百分比的淋巴细胞，其所有都由VISTA-Ig阻断。产生一组更广泛的抗人VISTA抗体并且测试其阻断VISTA通路的功效。为了产生另外的抗体，我们用具有受到辐射的表达VISTA的EL4细胞系的小鼠，接着每月用VISTA-Ig加强。通过ELISA使用针对人IgG的VISTA-Ig以控制针对Fc区的反应来证实滴定度。然后使用脾脏以产生骨髓瘤。然后使用人PBMC以及表达VISTA的细胞系针对结合子来筛选上清液。将阳性克隆亚克隆并冻存。基于来自每一融合物的原始数据，我们预期有5至10个候选结合子，因此起初将使10只小鼠免疫。

[0864] 测试抗体阻断由表达VISTA的APC诱导的T细胞反应的功效。人血小板白血球富集的锥细胞(例如可获自国王学院医院(King’s College Hospital))。我们典型地可从每一样本获得约10^9个PBMC。通过Miltenyi珠粒选择分离出大量CD4 T细胞以及从不匹配的供体CD14+单核细胞，并且冻存。这得到相对一致的细胞群体以在混合淋巴细胞反应中筛选抗体。人血液单核细胞表达高水平的VISTA(图41)，因此是适用的刺激性群体。在抗vista抗体相对于对照Ig存在下通过CFSE稀释测量T细胞的增殖反应。另外，还使用抗PD-L1抗体，因为其为适用作阳性对照并适用于比较的充分表征的试剂。我们还测试了一起使用两种试剂的协同效应，并设想将两种试剂一起用作治疗。

[0865] 使用类似的方法，测试了抗VISTA抗体阻断由表达VISTA的APC细胞系如K-562诱导的T细胞反应的功效。

[0866] 另外,测试了抗VISTA抗体阻断抗CD3刺激的VISTA-Ig抑制的能力。如上述实施例3中所述,VISTA(PD-L3)-Ig抑制了粗纯化的CD4+和CD8+T细胞响应于与板结合的抗CD3刺激的增殖,如由停滞的细胞分裂测定(参见图9A-B)。

[0867] 针对在动物癌症模型中促进抗肿瘤反应,进一步体内测试了在这些分析中鉴别的VISTA抑制性抗体,例如在前述实施例中进一步描述。另外,可以将显示功效的抗体人源化并且进一步开发用于可能的治疗用途。

[0868] 本文所有公布、专利和专利申请都以全文引用的方式并入,其引用程度如同被明确地且个别地表明各个别公布、专利或专利申请以引用的方式整体并入一样。

[0869] 本领域技术人员将仅仅使用常规实验来认识到或能够确定本文所述的本发明的特定实施方案的等效物。这些等效物旨在由以下权利要求书涵盖。

[0870] 参考文献:

[0871] 1.Wang,L.,et al.,VISTA,a novel Ig-superfamily ligand that negatively regulates T cell responses.J.Exp.Med.,2011.208(3):p.577-92.

[0872] 2.Wang,L.,et al.,Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+regulatory T cells.Proc Natl Acad Sci U S A,2008.105(27):p.9331-6.

[0873] 3.Hodi,F.S.,Overcoming immunological tolerance to melanoma:Targeting CTLA-4.Asia Pac J Clin Oncol,2010.6Suppl 1:p.S16-23.

[0874] 4.Tarhini,A.,E.Lo,and D.R.Minor,Releasing the brake on the immune system:ipilimumab in melanoma and other tumors.Cancer Biother Radiopharm,2010.25(6):p.601-13.

[0875] 5.Kaehler,K.C.,et al.,Update on immunologic therapy with anti-CTLA-4 antibodies in melanoma:identification of clinical and biological response patterns,immune-related adverse events,and their management.Semin Oncol,2010.37(5):p.485-98.

[0876] 6.Wing,K.,et al.,CTLA-4 control over Foxp3+regulatory T cell function.Science,2008.322(5899):p.271-5.

[0877] 7.Chambers,C.A.,T.J.Sullivan,and J.P.Allison,Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+T cells.Immunity,1997.7(6):p.885-95.

[0878] 8.Waterhouse,P.,et al.,Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4.Science,1995.270(5238):p.985-8.

[0879] 9.Tivol,E.A.,et al.,Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction,revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4.Immunity,1995.3(5):p.541-7.

[0880] 10.Zheng,S.G.,et al.,TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+regulatory cells.J Immunol,2006.176(6):p.3321-9.

[0881] 11.van Elsas,A.,A.A.Hurwitz,and J.P.Allison,Combination immunotherapy

of B 16 melanoma using anticytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4(CTLA-4)and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation.J Exp Med,1999.190(3):p.355-66.

[0882] 12.Hoos,A.,et al.,Development of ipilimumab:contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy.Semin Oncol,2010.37(5):p.533-46.

[0883] 13.Calabro,L.,et al.,Clinical studies with anti-CTLA-4 antibodies in non-melanoma indications.Semin Oncol,2010.37(5):p.460-7.

[0884] 14.Attia,P.,et al.,Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4.J Clin Oncol,2005.23(25):p.6043-53.

[0885] 15.Freeman,G.J.,et al.,Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.J Exp Med,2000.192(7):p.1027-34.

[0886] 16.Butte,M.J.,et al.,Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the b7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses.Immunity,2007.27(1):p.111-22.

[0887] 17.Nishimura,H.,et al.,Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor.Immunity,1999.11(2):p.141-51.

[0888] 18.Nishimura,H.,et al.,Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice.Science,2001.291(5502):p.319-22.

[0889] 19.Keir,M.E.,et al.,PD-1 and its ligands in tolerance and immunity.Annu Rev Immunol,2008.26:p.677-704.

[0890] 20.Gao,Q.,et al.,Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma.Clin Cancer Res,2009.15(3):p.971-9.

[0891] 21.Dong,H.and L.Chen,B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity.J Mol Med,2003.81(5):p.281-7.

[0892] 22.Zou,W.and L.Chen,Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment.Nat Rev Immunol,2008.8(6):p.467-77.

[0893] 23.Dong,H.,et al.,Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis:a potential mechanism of immune evasion.Nat Med,2002.8(8):p.793-800.

[0894] 24.Blank,C.,et al.,PD-L 1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor(TCR)transgenic CD8+T cells.Cancer Res,2004.64(3):p.1140-5.

[0895] 25.Blank,C.,T.F.Gajewski,and A.Mackensen,Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumorspecific T cells as a mechanism of immune evasion:implications for tumor immunotherapy.Cancer Immunol Immunother,

2005.54(4):p.307-14.

[0896] 26.Iwai,Y.,et al.,Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade.Proc Natl Acad Sci U S A,2002.99(19):p.12293-7.

[0897] 27.Geng,H.,et al.,HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma.Int J Cancer,2006.118(11):p.2657-64.

[0898] 28.Hirano,F.,et al.,Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity.Cancer Res,2005.65(3):p.1089-96.

[0899] 29.Curiel,T.J.,et al.,Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity.Nat Med,2003.9(5):p.562-7.

[0900] 30.Brahmer,J.R.,et al.,Phase I study of single-agent anti-programmed death-1(MDX-1106)in refractory solid tumors:safety,clinical activity,pharmacodynamics,and immunologic correlates.J Clin Oncol,2010.28(19):p.3167-75.

[0901] 31.Sica,G.L.,et al.,B7-H4,a molecule of the B7 family,negatively regulates T cell immunity.Immunity,2003.18(6):p.849-61.

[0902] 32.Prasad,D.V.,et al.,B7S1,a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation.Immunity,2003.18(6):p.863-73.

[0903] 33.Yi,K.H.and L.Chen,Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4.Immunol Rev,2009.229(1):p.145-51.

[0904] 34.Kryczek,I.,et al.,B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma.J Exp Med,2006.203(4):p.871-81.

[0905] 35.Kryczek,I.,et al.,Cutting edge:induction of B7-H4 on APCs through IL-10:novel suppressive mode for regulatory T cells.J Immunol,2006.177(1):p.40-4.

[0906] 36.Shevach,E.M.,CD4+CD25+suppressor T cells:more questions than answers.Nat Rev Immunol,2002.2(6):p.389-400.

[0907] 37.Nishikawa,H.and S.Sakaguchi,Regulatory T cells in tumor immunity.Int J Cancer,2010.127(4):p.759-67.

[0908] 38.Yamaguchi,T.and S.Sakaguchi,Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer.Semin Cancer Biol,2006.16(2):p.115-23.

[0909] 39.Curiel,T.J.,et al.,Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.Nat Med,2004.10(9):p.942-9.

[0910] 40.Zou,W.,Regulatory T cells,tumour immunity and immunotherapy.Nat

Rev Immunol,2006.6(4):p.295-307.

[0911] 41.Sharma,M.D.,et al.,Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase.J Clin Invest,2007.117(9):p.2570-82.

[0912] 42.Tacke,F.and G.J.Randolph,Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets.Immunobiology,2006.211(6-8):p.609-18.

[0913] 43.Shortman,K.and S.H.Naik,Steady-state and inflammatory dendritic-cell development.Nat Rev Immunol,2007.7(1):p.19-30.

[0914] 44.Leon,B.and C.Ardavin,Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity.Immunol Cell Biol,2008.86(4):p.320-4.

[0915] 45.Auffray,C.,M.H.Sieweke,and F.Geissmann,Blood monocytes: development,heterogeneity,and relationship with dendritic cells.Annu Rev Immunol,2009.27:p.669-92.

[0916] 46.Geissmann,F.,ct al.,Development of monocytes,macrophages,and dendritic cells.Science,2010.327(5966):p.656-61.

[0917] 47.Qu,C.,et al.,Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes.J Exp Med, 2004.200(10):p.1231-41.

[0918] 48.Geissmann,F.,S.Jung,and D.R.Littman,Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.Immunity,2003.19(1): p.71-82.

[0919] 49.Sunderkotter,C.,et al.,Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response.J Immunol,2004.172(7): p.4410-7.

[0920] 50.Randolph,G.J.,et al.,Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo.Immunity,1999.11(6):p.753-61.

[0921] 51.Robben,P.M.,et al.,Recruitment of Gr-1+monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis.J Exp Med,2005.201(11):p.1761-9.

[0922] 52.Serbina,N.V.,et al.,TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection.Immunity,2003.19(1):p.59-70.

[0923] 53.Copin,R.,et al.,MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during Brucella melitensis infection.J Immunol,2007.178(8): p.5182-91.

[0924] 54.Geissmann,F.,et al.,Blood monocytes:distinct subsets,how they relate to dendritic cells,and their possible roles in the regulation of T-cell responses.Immunol Cell Biol,2008.86(5):p.398-408.

[0925] 55.Krutzik,S.R.,et al.,TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophagcs and dendritic cells.Nat Med,

2005.11(6):p.653-60.

[0926] 56.Leon,B.,M.Lopez-Bravo,and C.Ardavin,Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania.Immunity,2007.26(4):p.519-31.

[0927] 57.Le Borgne,M.,et al.,Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20are responsible for CD8+T cell crosspriming in vivo.Immunity,2006.24(2):p.191-201.

[0928] 58.Nakano,H.,et al.,Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses.Nat Immunol,2009.10(4):p.394-402.

[0929] 59.Rabinovich,G.A.,D.Gabrilovich,and E.M.Sotomayor,Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells.Annu Rev Immunol,2007.25:p.267-96.

[0930] 60.Gabrilovich,D.I.and S.Nagaraj,Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.Nat Rev hnmunol,2009.9(3):p.162-74.

[0931] 61.Wilcox,R.A.,Cancer-associated myeloproliferation:old association, new therapeutic target.Mayo Clin Proc,2010.85(7):p.656-63.

[0932] 62.Ostrand-Rosenberg,S.and P.Sinha,Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer.J Immunol,2009.182(8):p.4499-506.

[0933] 63.Marigo,I.,et al.,Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells.Immunol Rev,2008.222:p.162-79.

[0934] 64.Corzo,C.A.,et al.,HIF-1 alpha regulates function and differentiation of myeloid-derivedsuppressor cells in the tumor microenvironment.J Exp Med,2010.207(11):p.2439-53.

[0935] 65.Gabrilovich,D.,Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects.Nat Rev Immunol,2004.4(12):p.941-52.

[0936] 66.Melief,C.J.,Cancer immunotherapy by dendritic cells.Immunity, 2008.29(3):p.372-83.

[0937] 67.Steinman,R.M.,D.Hawiger,and M.C.Nussenzweig,Tolerogenic dendritic cells.Annu Rev Immunol,2003.21:p.685-711.

[0938] 68.Ghiringhelli,F.,et al.,Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+regulatory T cell proliferation.J Exp Med,2005.202(7):p.919-29.

[0939] 69.Conejo-Garcia,J.R.,et al.,Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A.Nat Med,2004.10(9):p.950-8.

[0940] 70.Huarte,E.,et al.,Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity.Cancer Res,2008.68(18): p.7684-91.

[0941] 71.Cubillos-Ruiz,J.R.,et al.,Polyethylenimine-based siRNA nanocomplexes reprogram tumor-associated dendritic cells via TLR5 to elicit therapeutic antitumor immunity.J Clin Invest,2009.119(8):p.2231-44.

[0942] 72.Bak,S.P.,et al.,Murine ovarian cancer vascular leukocytes require arginase-1 activity for T cell suppression.Mol Immunol,2008.46(2):p.258-68.

[0943] 73.Scarlett,U.K.,et al.,In situ stimulation of CD40 and Toll-like receptor 3 transforms ovarian cancerinfiltrating dendritic cells from immunosuppressive to immunostimulatory cells.Cancer Res,2009.69(18):p.7329-37.

[0944] 74.Nesbeth,Y.C.,et al.,CD4+T cells elicit host immune responses to MHC class II-negative ovarian cancer through CCL5 secretion and CD40-mediated licensing of dendritic cells.J Immunol,2010.184(10):p.5654-62.

[0945] 75.Wang,L.,et al.,VISTA,a novel mouse Ig-superfamily ligand that negatively regulates T cell responses.J Exp Med,2010.

[0946] 76.Sheehan,K.,K.Sheehan,and D.O′Donoghue,The relationship between cyclooxygenase-2expression and colorectal cancer.JAMA,1999.282:p.1254-7.

[0947] 77.Weber,J.,Immune checkpoint proteins:a new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background:CTLA-4 and PD-1 blockade.Semin Oncol,2010.37(5):p.430-9.

<110> Noelle, Randolph J.
Wang, Lili
Ceeraz, Sabrina

<120> 用于诊断自身免疫病症和炎性病症的VISTA-IG

<130> 76799.000600

<140> 未指定
<141> 2012-06-25

<160> 67

<170> PatentIn 版 3.3

<210> 1
<211> 4795
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 1

[0001]

gagcattcac tctagcgagc gagcggcgtg tacagccggc tccctgggct cctggagtcc 60

cgcttgctcc aagcgcactc cagcagtctc tttctgctct tgcccggctc gacggcgaca 120

tgggtgtccc cgcggtccca gaggccagca gcccgcgctg gggaaccctg ctccttgcta 180

ttttcctggc tgcatccaga ggtctggtag cagccttcaa ggtcaccact ccatattctc 240

tctatgtgtg tcccgaggga cagaatgcca ccctcacctg caggattctg ggccccgtgt 300

ccaaagggca cgatgtgacc atctacaaga cgtggtacct cagctcacga ggcgaggtcc 360

agatgtgcaa agaacaccgg cccatacgca acttcacatt gcagcacctt cagcaccacg 420

gaagccacct gaaagccaac gccagccatg accagcccca gaagcatggg ctagagctag 480

cttctgacca ccacggtaac ttctctatca ccctgcgcaa tgtgacccca agggacagcg 540

gcctctactg ctgtctagtg atagaattaa aaaaccacca cccagaacaa cggttctacg 600

ggtccatgga gctacaggta caggcaggca aaggctcggg gtccacatgc atggcgtcta 660

atgagcagga cagtgacagc atcacggctg cggccctggc caccggcgcc tgcatcgtgg 720

gaatcctctg cctccccctt atcctgctgc tggtctataa gcagagacag gtggcctctc 780

accgccgtgc ccaggagttg gtgaggatgg acagcagcaa cacccaagga atcgaaaacc 840

caggcttcga gaccactcca cccttccagg ggatgcctga ggccaagacc aggccgccac 900

tgtcctatgt ggcccagcgg caaccttcgg agtcaggacg gtacctgctc tctgacccca 960

gcacacctct gtcgcctcca ggccctgggg acgtcttttt cccatcccta gatccagtcc 1020

ctgactcccc taactctgaa gccatctaaa ccagctgggg aaccatgaac catggtacct 1080

gggtcaggga tatgtgcact tgatctatgg ctggcccttg gacagtcttt taggcactga 1140

ctccagcttc cttgctcctg ctctgagcct agactctgct tttacaagat gcacagaccc 1200

tcccctatct ctttcagacg ctacttgggg ggcagggaga agatgttgga ttgctcatgg 1260
ctgttctcaa gatcttggga tgctgagttc tccctagaga cttgacttcg acagccacag 1320
atgtcagatg acctgcatcc tatgaacgtc cggcttggca agagcctttc ttcatggaaa 1380
ccagtagccc ggaggggatg aggtaggcac cttgccaccc tcccgggaga gagacacaag 1440
atgtgagaga ctcctgctca ctgtgggggt gtggctggcc tgcttgtttg cctgaggatg 1500
ctcctctgtt ggactgactc tatccccctg gattctggag cttggctggc ctatgtccca 1560
ccagaggagc atctcagcag ccttccacca gcaacctgag ggcctgccag cttcgtggct 1620
ctgggctctc attacctgta tggccgtcca cagagctcag tggccagagg ctttgaaaca 1680
ggaagtacat gtcaggttca ggaaccactg tgagctcatt agtgtcttga gcaatgtgag 1740
gcctggacca gtggacacgg agggagggtg gcgagaggat gatggggatg atgaggggaa 1800
cacgctccct tcctgtcctt gtcatccacc actaccacta ttcagtgtgg agcagtggca 1860
aaggtgaccg acctccacaa tgtcctagtg atgctggacc atttctaagt gtgaaagaga 1920
tgctattaaa aacagtatgt ggcaatggct gccaacagct gagtggactg gaggcactgg 1980
ctttaaggcc ctggaggtgc agggcccggt atggggatag ggatgggagt ttcagtgagg 2040
gcctagggat cactccgctt ctgaccactc ttcttctgag cctcacctca gggtgacctt 2100
[0002] caggcacaca gaagagcttg cccctggtcc gatactactc ttggctctca tctccagggt 2160
ttggcatgac ctgggcacac agggggagtc ttcagaaagg attttaaagc atgaaaagaa 2220
agggtagttc ttgtgaggta gggatgggca gctgatgttt gagagtgagg agggatacgg 2280
ctgggcagat cactctccag tctctagagg gaaagtagct ctaagtctgg gagagcagca 2340
gcccagtggt accatatgtc ttcttgcagc ttccactggc tgggctgaac tgggcatggg 2400
taggaaagct cctgttctgg gcctgcagcc agggagaacc ccattcattc cctgaggaca 2460
gatgggtggg gagagaagag agagtttcag gccgggaagc agcaataagc tatctgctgg 2520
ggacccagac aagttgtctg atgaggtcca agatgtggga tgccagttat acctggggct 2580
tggggatcct tagaggcttt gtatcatcat cataggagtg tcggggtggc cagggcatca 2640
aagccatgac ccctgtttta tcctcagggt ccactcttct gcaccatcca ttgctctaga 2700
tctatgcagt tactatagac agaatgtgtt gttctgtttg gctttgggga taatggcctg 2760
gcgaactgcc agctgttcag tggcagggct gtgaggccag tcaaagacta gaacccacag 2820
accagctgaa cgatgagtat agcctgtccc ctgggggagc ctgacctgtc tccagcccta 2880
agcttcagac ctcaccactc agatgacttc taagaatttg cctgtgggga cccctgcatg 2940
gctgcagctc cgtggaaagg agaggaggcc cccagcagaa gaaccactcg cttcctgccc 3000
agcttcctcc tgtagggctc taagtctctt cttcttggga ccctgcaagc aaaggcatgt 3060

[0003]

cagcttggtg gtttcctgtt ttgggtgaag ttttgtgtgg tccgggttct gtctacatcc 3120
atgaacttgg ggtgctacca ccttgctgct gctgtagaga cagctgcagg atcttagggt 3180
ggaaaatgga ggtgccctga ggtgctagcc cttggggcaa aagatggggt ggcaatgaga 3240
cacagtgggg aactgagttc cccaagagga gggaggagcc ctgtagcctc aagggccata 3300
ttgggttcct ggtaccagca aaagcctaga gagcgaagtc tgtattttga ggaggtaatt 3360
gatccttacg gaatccatca gaaatttgga gcgggtgctt tatctatctc tggagggtct 3420
ctacctatct ccgatgaagc tctccctggg cctgggatgg gagaaaccag gaggaaaggt 3480
gtctgataaa gcaggggctt cttgacaagc caaagggcca ctggtagctg ttgtggaccg 3540
agctgaccct gctgaagtat tgtagtgtgc cttggaccaa cttctcaaaa gagcaacccc 3600
ggggctaccc tacttctgcc aggaagaggc ggagaagggg ctgagaggcc tggaaggggc 3660
tagctccttc tttgagaact gctccccgga ggacttggag gaggcggcta ggctacgggc 3720
tgctgagggc cctttgtctt tcctaacctg ggcactgtta ggatgctccc tcctggaaaa 3780
ggctttcctg ggtgtgagct agagcagtgt ccatgccagc gctgaacctg ccatggtggg 3840
agctgaacta aaaatttctc agggaactaa aataggcaaa agaggaactg ggggaggagg 3900
gtgccaggca ggatgggggg aagggagggc agtgcaaaag tctcttgaaa cacagacagc 3960
ccagctgagt gccagtccca gatcacagag aatacggctc atctggctca tgttctgcat 4020
gcttgctgct ttaccctggc actttccttc tccaccatga gtgcgagtcc tgggagtcct 4080
gggagggtga ggattaatgc cagcctgggg agcagatagc tgacagagtc cttgggtaac 4140
tggcttgaac caggacctca ggattccact ctggggatct agctttgtct gggccagtga 4200
agatctctat aatggcatta ttgccagggg ataaacattt cactgggttc tgatctgttg 4260
ggtgtggctt cctggaaaat atggtgagag gaattctgct aaggatacag ttgataagaa 4320
agttctgaga ttgattagta atgcctgcct tggactcagg aagggaagtg gcagtatgaa 4380
tgccatgtct taatcatttt ggttaaaata tgcttcccaa aagatttcca cgtgtgttct 4440
tgtttatttg acatctgtct ccatatcagt cttgaaagcc tttctgtgtg tatatatatg 4500
atgtttgcgt gtatatatgt ttttgtgtgt gcatatggaa gtcagaaatc actgggtgtc 4560
ttcctccatt cctttgcaat gtatgttttt ttttttttta cgatttattt actatatgaa 4620
tgttttgcct gaatacatgc ataggtgtca cgtacatgcc tgctggaacg cttggaactg 4680
gagttacagg tggctatgag ctacagtgtg agcactggga atcaaacctg ggtcttctgc 4740
aagagcaaca aattaaaagt cagctcttaa ctacttgagc tatttttcca actcc 4795

<210> 2
<211> 309
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

[0004]

```
Met Gly Val Pro Ala Val Pro Glu Ala Ser Ser Pro Arg Trp Gly Thr
1               5                  10                  15

Leu Leu Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Ser Arg Gly Leu Val Ala Ala
            20                  25                  30

Phe Lys Val Thr Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
        35                  40                  45

Asn Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Val Ser Lys Gly His
    50                  55                  60

Asp Val Thr Ile Tyr Lys Thr Trp Tyr Leu Ser Ser Arg Gly Glu Val
65                  70                  75                  80

Gln Met Cys Lys Glu His Arg Pro Ile Arg Asn Phe Thr Leu Gln His
                85                  90                  95

Leu Gln His His Gly Ser His Leu Lys Ala Asn Ala Ser His Asp Gln
            100                 105                 110

Pro Gln Lys His Gly Leu Glu Leu Ala Ser Asp His His Gly Asn Phe
        115                 120                 125

Ser Ile Thr Leu Arg Asn Val Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Cys
    130                 135                 140

Cys Leu Val Ile Glu Leu Lys Asn His His Pro Glu Gln Arg Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Gly Ser Met Glu Leu Gln Val Gln Ala Gly Lys Gly Ser Gly Ser Ths
                165                 170                 175

Cys Met Ala Ser Asn Glu Gln Asp Ser Asp Ser Ile Thr Ala Ala Ala
            180                 185                 190

Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu Pro Leu Ile
        195                 200                 205

Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Val Ala Ser His Arg Arg Ala
    210                 215                 220

Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Ser Asn Thr Gln Gly Ile Glu Asn
225                 230                 235                 240

Pro Gly Phe Glu Thr Thr Pro Pro Phe Gln Gly Met Pro Glu Ala Lys
                245                 250                 255

Thr Arg Pro Pro Leu Ser Tyr Val Ala Gln Arg Gln Pro Ser Glu Ser
            260                 265                 270

Gly Arg Tyr Leu Leu Ser Asp Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly
        275                 280                 285

Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp Ser Pro
    290                 295                 300

Asn Ser Glu Ala Ile
305
```

<210> 3
<211> 4774
<212> DNA
<213> 智人

<400> 3

[0005]

ggggggcggt gcctggagca cggcgctggg gccgcccgca gcgctcactc gctcgcactc 60
agtcgcggga ggcttccccg cgccggccgc gtcccgcccg ctccccggca ccagaagttc 120
ctctgcgcgt ccgacggcga catgggcgtc cccacggccc tggaggccgg cagctggcgc 180
tggggatccc tgctcttcgc tctcttcctg gctgcgtccc taggtccggt ggcagccttc 240
aaggtcgcca cgccgtattc cctgtatgtc tgtcccgagg ggcagaacgt caccctcacc 300
tgcaggctct tgggccctgt ggacaaaggg cacgatgtga ccttctacaa gacgtggtac 360
cgcagctcga ggggcgaggt gcagacctgc tcagagcgcc ggcccatccg caacctcacg 420
ttccaggacc ttcacctgca ccatggaggc caccaggctg ccaacaccag ccacgacctg 480
gctcagcgcc acgggctgga gtcggcctcc gaccaccatg gcaacttctc catcaccatg 540
cgcaacctga ccctgctgga tagcggcctc tactgctgcc tggtggtgga gatcaggcac 600
caccactcgg agcacagggt ccatggtgcc atgagctgtca ggtgcagac aggcaaagat 660
gcaccatcca actgtgtggt gtacccatcc tcctcccagg atagtgaaaa catcacggct 720
gcagccctgg ctacgggtgc ctgcatcgta ggaatcctct gcctcccccct catcctgctc 780
ctggtctaca agcaaaggca ggcagcctcc aaccgccgtg cccaggagct ggtgcggatg 840
gacagcaaca ttcaagggat tgaaaacccc ggctttgaag cctcaccacc tgcccagggg 900
atacccgagg ccaaagtcag gcacccccctg tcctatgtgg cccagcggca gccttctgag 960
tctgggcggc atctgctttc ggagcccagc acccccctgt ctcctccagg ccccggagac 1020
gtcttcttcc catccctgga ccctgtccct gactctccaa actttgaggt catctagccc 1080
agctgggggа cagtgggctg ttgtggctgg gtctggggca ggtgcatttg agccagggct 1140
ggctctgtga gtggcctcct tggcctcggc cctggttccc tccctcctgc tctgggctca 1200
gatactgtga catcccagaa gcccagcccc tcaacccctc tggatgctac atggggatgc 1260
tggacggctc agcccctgtt ccaaggattt tggggtgctg agattctccc ctagagacct 1320
gaaattcacc agctacagat gccaaatgac ttacatctta agaagtctca gaacgtccag 1380
cccttcagca gctctcgttc tgagacatga gccttgggat gtggcagcat cagtgggaca 1440
agatggacac tgggccaccc tcccaggcac cagacacagg gcacggtgga gagacttctc 1500
ccccgtggcc gccttggctc ccccgttttg cccgaggctg ctcttctgtc agacttcctc 1560
tttgtaccac agtggctctg gggccaggcc tgcctgccca ctggccatcg ccaccttccc 1620
cagctgcctc ctaccagcag tttctctgaa gatctgtcaa caggttaagt caatctgggg 1680

[0006]

cttccactgc ctgcattcca gtccccagag cttggtggtc ccgaaacggg aagtacatat 1740

tggggcatgg tggcctccgt gagcaaatgg tgtcttgggc aatctgaggc caggacagat 1800

gttgccccac ccactggaga tggtgctgag ggaggtgggt ggggccttct gggaaggtga 1860

gtggagaggg gcacctgccc cccgccctcc ccatccccta ctcccactgc tcagcgcggg 1920

ccattgcaag ggtgccacac aatgtcttgt ccaccctggg acacttctga gtatgaagcg 1980

ggatgctatt aaaaactaca tggggaaaca ggtgcaaacc ctggagatgg attgtaagag 2040

ccagtttaaa tctgcactct gctgctcctc ccccaccccc accttccact ccatacaatc 2100

tgggcctggt ggagtcttcg cttcagagcc attcggccag gtgcgggtga tgttcccatc 2160

tcctgcttgt gggcatgccc tggctttgtt tttatacaca taggcaaggt gagtcctctg 2220

tggaattgtg attgaaggat tttaaagcag gggaggagag taggggcat ctctgtacac 2280

tctgggggta aaacagggaa ggcagtgcct gagcatgggg acaggtgagg tggggctggg 2340

cagacccccc gtagcgttta gcaggatggg ggccccaggt actgtggaga gcatagtcca 2400

gcctgggcat ttgtctccta gcagcctaca ctggctctgc tgagctgggc ctgggtgctg 2460

aaagccagga tttggggcta ggcgggaaga tgttcgccca attgcttggg gggttggggg 2520

gatggaaaag gggagcacct ctaggctgcc tggcagcagt gagccctggg cctgtggcta 2580

cagccaggga accccacctg gacacatggc cctgcttcta agccccccag ttaggcccaa 2640

aggaatggtc cactgagggc ctcctgctct gcctgggctg ggccaggggc tttgaggaga 2700

gggtaaacat aggcccggag atggggctga cacctcgagt ggccagaata tgcccaaacc 2760

ccggcttctc ccttgtccct aggcagaggg gggtcccttc ttttgttccc tctggtcacc 2820

acaatgcttg atgccagctg ccataggaag agggtgctgg ctggccatgg tggcacacac 2880

ctgtcctccc agcactttgc agggctgagg tggaaggacc gcttaagccc aggtgttcaa 2940

ggctgctgtg agctgtgttc gagccactac actccagcct ggggacggag caaaactttg 3000

cctcaaaaca aattttaaaa agaaagaaag aaggaaagag ggtatgtttt tcacaattca 3060

tgggggcctg catggcagga gtggggacag gacacctgct gttcctggag tcgaaggaca 3120

agcccacagc ccagattccg gttctcccaa ctcaggaaga gcatgccctg ccctctgggg 3180

aggctggcct ggccccagcc ctcagctgct gaccttgagg cagagacaac ttctaagaat 3240

ttggctgcca gaccccaggc ctggctgctg ctgtgtggag agggaggcgg cccgcagcag 3300

aacagccacc gcacttcctc ctcagcttcc tctggtgcgg ccctgccctc tcttctctgg 3360

acccttttac aactgaacgc atctgggctt cgtggtttcc tgttttcagc gaaatttact 3420

ctgagctccc agttccatct tcatccatgg ccacaggccc tgcctacaac gcactaggga 3480

cgtccctccc tgctgctgct ggggaggggc aggctgctgg agccgccctc tgagttgccc 3540

tgggtgcgag aacatggcgc ctccaggggg cgggaggagc actaggggct ggggcaggag 3660

gctcctggag cgctggattc ctggcacagt ctgaggccct gagagggaaa tccatgcttt 3720

taagaactaa ttcattgtta ggagatcaat caggaattag gggccatctt acctatctcc 3780

tgacattcac agtttaatag agacttcctg cctttattcc ctcccaggga gaggctgaag 3840

gaatggaatt gaaagcacca tttggagggt tttgctgaca cagcggggac tgctcagcac 3900

tccctaaaaa cacaccatgg aggccactgg tgactgctgg tgggcaggct ggccctgcct 3960

gggggagtcc gtggcgatgg gcgctggggt ggaggtgcag gagccccagg acctgctttt 4020

caaaagactt ctgcctgacc agagctccca ctacatgcag tggcccaggg cagaggggct 4080

gatacatggc ctttttcagg gggtgctcct cgcggggtgg acttgggagt gtgcagtggg 4140

acaggggggct gcaggggtcc tgccaccacc gagcaccaac ttggcccctg gggtcctgcc 4200

tcatgaatga ggccttcccc agggctggcc tgactgtgct gggggctggg ttaacgtttt 4260

ctcagggaac cacaatgcac gaaagaggaa ctggggttgc taaccaggat gctgggaaca 4320

aaggcctctt gaagcccagc cacagcccag ctgagcatga ggcccagccc atagacggca 4380

caggccacct ggcccattcc ctgggcattc cctgctttgc attgctgctt ctcttcaccc 4440

catggaggct atgtcaccct aactatcctg gaatgtgttg agagggattc tgaatgatca 4500

atatagcttg gtgagacagt gccgagatag atagccatgt ctgccttggg cacgggagag 4560

[0007] ggaagtggca gcatgcatgc tgtttcttgg ccttttctgt tagaatactt ggtgctttcc 4620

aacacacttt cacatgtgtt gtaacttgtt tgatccaccc ccttccctga aaatcctggg 4680

aggttttatt gctgccattt aacacagagg gcaatagagg ttctgaaagg tctgtgtctt 4740

gtcaaaacaa gtaaacggtg gaactacgac taaa 4774

<210> 4
<211> 311
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Met Gly Val Pro Thr Ala Leu Glu Ala Gly Ser Trp Arg Trp Gly Ser
1 5 10 15

Leu Leu Phe Ala Leu Phe Leu Ala Ala Ser Leu Gly Pro Val Ala Ala
20 25 33

Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
35 40 45

Asn Val Thr Leu Thr Cys Arg Leu Leu Gly Pro Val Asp Lys Gly His
50 55 60

Asp Val Thr Phe Tyr Lys Thr Trp Tyr Arg Ser Ser Arg Gly Glu Val
65 70 75 80

Gln Thr Cys Ser Glu Arg Arg Pro Ile Arg Asn Leu Thr Phe Gln Asp

85 90 95

Leu His Leu His His Gly Gly His Gln Ala Ala Asn Thr Ser His Asp
100 105 110

Leu Ala Gln Arg His Gly Leu Glu Ser Ala Ser Asp His His Gly Asn
115 120 125

Phe Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu Thr Leu Leu Asp Ser Gly Leu Tyr
130 135 140

Cys Cys Leu Val Val Glu Ile Arg His His His Ser Glu His Arg Val
145 150 155 160

His Gly Ala Met Glu Leu Gln Val Gln Thr Gly Lys Asp Ala Pro Ser
165 170 175

Asn Cys Val Val Tyr Pro Ser Ser Ser Gln Asp Ser Glu Asn Ile Thr
180 185 190

Ala Ala Ala Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu
195 200 205

Pro Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Ala Ala Ser Asn
210 215 220

Arg Arg Ala Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Asn Ile Gln Gly Ile
225 230 235 240

Glu Asn Pro Gly Phe Glu Ala Ser Pro Pro Ala Gln Gly Ile Pro Glu
245 250 255

[0008]

Ala Lys Val Arg His Pro Leu Ser Tyr Val Ala Gln Arg Gln Pro Ser
260 265 270

Glu Ser Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro
275 280 285

Pro Gly Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp
290 295 300

Ser Pro Asn Phe Glu Val Ile
305 310

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L3的共同序列

<400> 5

Ile Thr Ala Ala Ala Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln
20 25 30

<210> 6

<211> 1316
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 6

[0009]

ggagtcctcc ccttggagcc tgggaggcct agggagaaag tagttctctt tcggtggcag 60

ggttgctgtc gagggcaccg agcaggagga taggtcgaca gagacgagga gttctggctc 120

ctcctgcaga catgcaccag cggctgctgg gctcgtccct gggrctcgcc cccgcgcggg 180

ggctctgaat gcctgccgcc gcccccatga gagcaccggc ctgggctccc gcccctaagc 240

ctctgctcgc ggagactgag ccatgtgggc ctggggctgg gccgctgcag cgctcctctg 300

gctacagact gcaggagccg gggcccggca ggagctcaag aagtctcggc agctgtttgc 360

gcgtgtggat tcccccaata ttaccacgtc caaccgtgag ggattcccag gctccgtcaa 420

gcccccggaa gcctctggac ctgagctctc agatgcccac atgacgtggt tgaactttgt 480

ccgacggcca gatgatgggt cctctagaaa acggtgtcgt ggccgggaca agaagtcgcg 540

aggcctctca ggtctcccag ggcccccagg acctcctggc cctcctggtc cccctggctc 600

ccctggtgtg ggcgttaccc cagaggcctt actgcaggaa tttcaggaga tactgaaaga 660

ggccacagaa cttcgattcc cagggctacc agacacattg ttaccccagg aacccagcca 720

acggctggtg gttgaggcct tctactgccg tttgaaaggc cctgtgctgg tggacaagaa 780

gactctggtg gaactgcaag gattccaagc tcctactact cagggcgcct tcctgcgggg 840

atctggcctg agcctgtcct tgggccgatt cacagcccca gtctctgcca tcttccagtt 900

ttctgccagc ctgcacgtgg accacagtga actgcagggc agaggccggt tgcgtacccg 960

ggatatggtc cgtgttctca tctgtattga gtccttgtgt catcgtcata cgtccctgga 1020

ggctgtatca ggtctggaga gcaacagcag ggtcttcaca gtgcaggttc aggggctgct 1080

gcatctacag tctggacagt atgtctctgt gttcgtggac aacagttctg gggcagtcct 1140

caccatccag aacacttcca gcttctcggg aatgcttttg ggtacctagc ggagctgaag 1200

aaacgattgt ggattgagga accaacacct tgcttcttag aggagctgaa aaggactact 1260

cactcccctt ttaatagttt tcatagcaat aaagaactcc aaacttcttc atcgct 1316

<210> 7
<211> 308
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 7

Met Trp Ala Trp Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Trp Leu Gln Thr
1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Ala Arg Gln Glu Leu Lys Lys Ser Arg Gln Leu Phe
20 25 30

Ala Arg Val Asp Ser Pro Asn Ile Thr Thr Ser Asn Arg Glu Gly Phe
35 40 45

Pro Gly Ser Val Lys Pro Pro Glu Ala Ser Gly Pro Glu Leu Ser Asp
50 55 60

Ala His Met Thr Trp Leu Asn Phe Val Arg Arg Pro Asp Asp Gly Ser
65 70 75 80

Ser Arg Lys Arg Cys Arg Gly Arg Asp Lys Lys Ser Arg Gly Leu Ser
85 90 95

Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
100 105 110

Ser Pro Gly Val Gly Val Thr Pro Glu Ala Leu Leu Gln Glu Phe Gln
115 120 125

Glu Ile Leu Lys Glu Ala Thr Glu Leu Arg Phe Ser Gly Leu Pro Asp
130 135 140

Thr Leu Leu Pro Gln Glu Pro Ser Gln Arg Leu Val Val Glu Ala Phe
145 150 155 160

Tyr Cys Arg Leu Lys Gly Pro Val Leu Val Asp Lys Lys Thr Leu Val
165 170 175

Glu Leu Gln Gly Phe Gln Ala Pro Thr Thr Gln Gly Ala Phe Leu Arg
180 185 190

[0010] Gly Ser Gly Leu Ser Leu Ser Leu Gly Arg Phe Thr Ala Pro Val Ser
195 200 205

Ala Ile Phe Gln Phe Ser Ala Ser Leu His Val Asp His Ser Glu Leu
210 215 220

Gln Gly Arg Gly Arg Leu Arg Thr Arg Asp Met Val Arg Val Leu Ile
225 230 235 240

Cys Ile Glu Ser Leu Cys His Arg His Thr Ser Leu Glu Ala Val Ser
245 250 255

Gly Leu Glu Ser Asn Ser Arg Val Phe Thr Val Gln Val Gln Gly Leu
260 265 270

Leu His Leu Gln Ser Gly Gln Tyr Val Ser Val Phe Val Asp Asn Ser
275 280 285

Ser Gly Ala Val Leu Thr Ile Gln Asn Thr Ser Ser Phe Ser Gly Met
290 295 300

Leu Leu Gly Thr
305

<210> 8
<211> 1055
<212> DNA
<213> 智人

<400> 8
ctcgccgcgc tgagccgcct cgggacggag ccatgcggcg ctgggcctgg gccgcggtcg 60

tggtcccccc cgggccgcag ctcgtgctcc tcgggggcgt cggggcccgg cgggaggcac 120

agaggacgca gcagcctggc cagcgcgcag atccccccaa cgccaccgcc agcgcgtcct 180

cccgcgaggg gctgcccgag gcccccaagc catcccaggc ctcaggacct gagttctccg 240

acgcccacat gacatggctg aactttgtcc ggcggccgga cgacggcgcc ttaaggaagc 300

ggtgcggaag cagggacaag aagccgcggg atctcttcgg tcccccagga cctccaggtg 360

cagaagtgac cgcggagact ctgcttcacg agtttcagga gctgctgaaa gaggccacgg 420

agcgccggtt ctcagggctt ctggacccgc tgctgcccca gggggcgggc ctgcggctgg 480

tgggcgaggc ctttcactgc cggctgcagg gtccccgccg ggtggacaag cggacgctgg 540

tggagctgca tggtttccag gctcctgctg cccaaggtgc cttcctgcga ggctccggtc 600

tgagcctggc ctcgggtcgg ttcacggccc ccgtgtccgg catcttccag ttctctgcca 660

gtctgcacgt ggaccacagt gagctgcagg gcaaggcccg gctgcgggcc cgggacgtgg 720

tgtgtgttct catctgtatt gagtccctgt gccagcgcca cacgtgcctg gaggccgtct 780

caggcctgga gagcaacagc agggtcttca cgctacaggt gcaggggctg ctgcagctgc 840

aggctggaca gtacgcttct gtgtttgtgg acaatggctc cggggccgtc ctcaccatcc 900

aggcgggctc cagcttctcc gggctgctcc tgggcacgtg agggcgccca ggggggctgg 960

[0011] cgaggagctg ccgccggatc ccggggaccc tcctactgat gcccgtggtc accacaataa 1020

agagccctcc accctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1055

<210> 9
<211> 302
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Met Arg Arg Trp Ala Trp Ala Ala Val Val Val Leu Leu Gly Pro Gln
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Gly Gly Val Gly Ala Arg Arg Glu Ala Gln Arg Thr
20 25 30

Gln Gln Pro Gly Gln Arg Ala Asp Pro Pro Asn Ala Thr Ala Ser Ala
35 40 45

Ser Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu Ala Pro Lys Pro Ser Gln Ala Ser
50 55 60

Gly Pro Glu Phe Ser Asp Ala His Met Thr Trp Leu Asn Phe Val Arg
65 70 75 80

Arg Pro Asp Asp Gly Ala Leu Arg Lys Arg Cys Gly Ser Arg Asp Lys
85 90 95

Lys Pro Arg Asp Leu Phe Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Glu Val
100 105 110

Thr Ala Glu Thr Leu Leu His Glu Phe Gln Glu Leu Leu Lys Glu Ala
115 120 125

Thr Glu Arg Arg Phe Ser Gly Leu Leu Asp Pro Leu Leu Pro Gln Gly
130 135 140

Ala Gly Leu Arg Leu Val Gly Glu Ala Phe His Cys Arg Leu Gln Gly
145 150 155 160

Pro Arg Arg Val Asp Lys Arg Thr Leu Val Glu Leu His Gly Phe Gln
165 170 175

Ala Pro Ala Ala Gln Gly Ala Phe Leu Arg Gly Ser Gly Leu Ser Leu
180 185 190

Ala Ser Gly Arg Phe Thr Ala Pro Val Ser Gly Ile Phe Gln Phe Ser
195 200 205

Ala Ser Leu His Val Asp His Ser Glu Leu Gln Gly Lys Ala Arg Leu
210 215 220

Arg Ala Arg Asp Val Val Cys Val Leu Ile Cys Ile Glu Ser Leu Cys
225 230 235 240

Gln Arg His Thr Cys Leu Glu Ala Val Ser Gly Leu Glu Ser Asn Ser
245 250 255

Arg Val Phe Thr Leu Gln Val Gln Gly Leu Leu Gln Leu Gln Ala Gly
260 265 270

[0012] Gln Tyr Ala Ser Val Phe Val Asp Asn Gly Ser Gly Ala Val Leu Thr
275 280 285

Ile Gln Ala Gly Ser Ser Phe Ser Gly Leu Leu Leu Gly Thr
290 295 300

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Treg-sTNF的共同序列

<400> 10

Ile Phe Gln Phe Ser Ala Ser Leu His Val Asp His Ser Glu Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> PD1L1 Ig-V域

<400> 11

Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
85 90 95

Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

[0013]

<210> 12
<211> 99
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(99)
<223> PD1L2 Ig-V域

<400> 12

Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu Leu
20 25 30

Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser Leu
35 40 45

Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys
50 55 60

Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu Thr
85 90 95

Val Lys Val

<210> 13
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> B7H4 Ig-V域

<400> 13

His Phe Ile Thr Val Thr Thr Phe Thr Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu
1 5 10 15

Asp Gly Thr Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Asn Gly
20 25 30

Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Ile Lys Gly Leu Val His Glu
35 40 45

[0014]

Phe Lys Glu Gly Lys Asp Asp Leu Ser Gln Gln His Glu Met Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Val Val Gly Asn Ala Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Thr Cys
85 90 95

Tyr Ile Arg Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys
100 105 110

Thr

<210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(110)

<223> B7H3 Ig-V域

<400> 14

Val Glu Val Gln Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
20 25 30

Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
35 40 45

His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg
50 55 60

Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
65 70 75 80

Leu Gln Arg Val Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val
85 90 95

Ser Ile Gln Asp Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val
100 105 110

[0015]

<210> 15
<211> 136
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(136)
<223> VISTA Ig-V域

<400> 15

Phe Lys Val Thr Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
1 5 10 15

Asn Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Val Ser Lys Gly His
20 25 30

Asp Val Thr Ile Tyr Lys Thr Trp Tyr Leu Ser Ser Arg Gly Glu Val
35 40 45

Gln Met Cys Lys Glu His Arg Pro Ile Arg Asn Phe Thr Leu Gln His
50 55 60

Leu Gln His His Gly Ser His Leu Lys Ala Asn Ala Ser His Asp Gln
65 70 75 80

Pro Gln Lys His Gly Leu Glu Leu Ala Ser Asp His His Gly Asn Phe
85 90 95

Ser Leu Thr Leu Arg Asn Val Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Cys
100 105 110

Cys Leu Val Ile Glu Leu Lys Asn His His Pro Glu Gln Arg Phe Tyr
115 120 125

Gly Ser Met Glu Leu Gln Val Gln
130 135

<210> 16
<211> 311
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Met Gly Val Pro Thr Ala Leu Glu Ala Gly Ser Trp Arg Trp Gly Ser
1 5 10 15

Leu Leu Phe Ala Leu Phe Leu Ala Ala Ser Leu Gly Pro Val Ala Ala
20 25 30

[0016]

Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
35 40 45

Asn Val Thr Leu Thr Cys Arg Leu Leu Gly Pro Val Asp Lys Gly His
50 55 60

Asp Val Thr Phe Tyr Lys Thr Trp Tyr Arg Ser Ser Arg Gly Glu Val
65 70 75 80

Gln Thr Cys Ser Glu Arg Arg Pro Ile Arg Asn Leu Thr Phe Gln Asp
85 90 95

Leu His Leu His His Gly Gly His Gln Ala Ala Asn Thr Ser His Asp
100 105 110

Leu Ala Gln Arg His Gly Leu Glu Ser Ala Ser Asp His His Gly Asn
115 120 125

Phe Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu Thr Leu Leu Asp Ser Gly Leu Tyr
130 135 140

Cys Cys Leu Val Val Glu Ile Arg His His His Ser Glu His Arg Val
145 150 155 160

His Gly Ala Met Glu Leu Gln Val Gln Thr Gly Lys Asp Ala Pro Ser
165 170 175

Asn Cys Val Val Tyr Pro Ser Ser Ser Gln Asp Ser Glu Asn Ile Thr
180 185 190

Ala Ala Ala Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu
195 200 205

Pro Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Ala Ala Ser Asn
210 215 220

Arg Arg Ala Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Asn Ile Gln Gly Ile
225 230 235 240

Glu Asn Pro Gly Phe Glu Ala Ser Pro Pro Ala Gln Gly Ile Pro Glu
245 250 255

Ala Lys Val Arg His Pro Leu Ser Tyr Val Ala Gln Arg Gln Pro Ser
260 265 270

[0017] Glu Ser Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro
275 280 285

Pro Gly Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp
290 295 300

Ser Pro Asn Phe Glu Val Ile
305 310

<210> 17
<211> 309
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc-feature
<222> (1)..(309)
<223> VISTA直系同源物

<400> 17

Met Gly Val Pro Ala Val Pro Glu Ala Ser Ser Pro Arg Trp Gly Thr
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Ser Arg Gly Leu Val Ala Ala
20 25 30

Phe Lys Val Thr Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
35 40 45

Asn Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Val Ser Lys Gly His
50 55 60

Asp Val Thr Ile Tyr Lys Thr Trp Tyr Leu Ser Ser Arg Gly Glu Val
65 70 75 80

Gln Met Cys Lys Glu His Arg Pro Ile Arg Asn Phe Thr Leu Gln His
85 90 95

Leu Gln His His Gly Ser His Leu Lys Ala Asn Ala Ser His Asp Gln
100 105 110

Pro Gln Lys His Gly Leu Glu Leu Ala Ser Asp His His Gly Asn Phe
115 120 125

Ser Ile Thr Leu Arg Asn Val Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Cys
130 135 140

Cys Leu Val Ile Glu Leu Lys Asn His His Pro Glu Gln Arg Phe Tyr
145 150 155 160

[0018]

Gly Ser Met Glu Leu Gln Val Gln Ala Gly Lys Gly Ser Gly Ser Thr
165 170 175

Cys Met Ala Ser Asn Glu Gln Asp Ser Asp Ser Ile Thr Ala Ala Ala
180 185 190

Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu Pro Leu Ile
195 200 205

Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Val Ala Ser His Arg Arg Ala
210 215 220

Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Ser Asn Thr Gln Gly Ile Glu Asn
225 230 235 240

Pro Gly Phe Glu Thr Thr Pro Pro Phe Gln Gly Met Pro Glu Ala Lys
245 250 255

Thr Arg Pro Pro Leu Ser Tyr Val Ala Gln Arg Gln Pro Ser Glu Ser
260 265 270

Gly Arg Tyr Leu Leu Ser Asp Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly
275 280 285

Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp Ser Pro
290 295 300

Asn Ser Glu Ala Ile
305

<210> 18
<211> 312
<212> PRT
<213> 袋鼠

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(312)
<223> VISTA直系同源物

<400> 18

Met Asn Val Pro Thr Ser Val Leu Glu Ser Gly Gly Arg Arg Trp Gly
1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Ala Phe Phe Leu Ala Ala Ser Arg Gly Leu Val Ala
20 25 30

Ala Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly
[0019] 35 40 45

Glu Asn Ile Thr Leu Ala Cys Gln Leu Leu Gly Pro Val Pro Lys Gly
50 55 60

His Asp Val Ser Phe Tyr Lys Thr Trp Phe Arg Ser Ser Arg Gly Glu
65 70 75 80

Val Gln Val Cys Ser Glu His Arg Pro Ile Arg Asn Val Thr Leu Gln
85 90 95

Asn Leu His Pro Tyr His Gly Gly His Gln Ala Ser Asn Thr Ser His
100 105 110

Asn Leu Leu Gln Ser His Gly Leu Glu Thr Ala Ser Asp His His Gly
115 120 125

Asn Phe Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu Thr Val Gln Asp Gly Gly Leu
130 135 140

Tyr Cys Cys Leu Val Val Glu Met Arg His Arg His Ser Glu His Arg
145 150 155 160

Val His Ala Ala Met Glu Leu Gln Val Gln Lys Gly Lys Asp Ala Pro

165 170 175

Ser Lys Cys Ile Thr Tyr Pro Ser Ser Pro Glu Glu Ser Asp Asn Ile
180 185 190

Thr Ala Ala Ala Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys
195 200 205

Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Val Ala Ser
210 215 220

His Arg Arg Ala Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Ser Pro Gln Gly
225 230 235 240

Ile Glu Asn Pro Gly Phe Glu Ala Pro Pro Ser Ser Gln Gly Leu Pro
245 250 255

Glu Ala Lys Val Arg Pro Pro Leu Ser Tyr Met Ala Gln Arg Gln Pro
260 265 270

Ser Glu Ser Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Asn Thr Pro Leu Ser
275 280 285

[0020]

Pro Pro Gly Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro
290 295 300

Asp Ser Pro Asn Ser Glu Phe Asn
305 310

<210> 19
<211> 310
<212> PRT
<213> 海豚

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(310)
<223> VISTA直系同源物

<400> 19

Met Gly Val Pro Pro Val Pro Glu Ala Gly Ser Trp Arg Arg Gly Pro
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Phe Phe Leu Ala Ala Ser Arg Gly Leu Val Ala Ala
20 25 30

Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
35 40 45

Asn Val Thr Leu Thr Cys Arg Leu Leu Gly Pro Leu Ala Lys Gly His
50 55 60

Asp Val Thr Phe Tyr Lys Thr Trp Tyr Arg Ser Ser Arg Gly Glu Val
65 70 75 80

Gln Ala Cys Ser Glu Arg Arg Pro Ile Arg Asn Leu Thr Phe Gln Asp
85 90 95

Leu His Leu His His Gly Gly His Gln Ala Asn Ser Ser Gln Asp Leu
100 105 110

Ala Gln Arg His Gly Leu Glu Ser Ala Ser Asp His His Gly Asn Phe
115 120 125

Thr Ile Thr Met Arg Asn Leu Thr Leu Leu Asp Gly Gly Leu Tyr Cys
130 135 140

Cys Leu Val Val Glu Ile Arg His Arg His Ser Glu Gln Arg Leu Tyr
145 150 155 160

Gly Ala Met Glu Leu Gln Val Gln Arg Gly Glu Glu Ala Pro Ser Lys
165 170 175

[0021]

Cys Thr Val Tyr Pro Pro Ser Ser Lys Glu Ser Glu Ser Ile Thr Ala
180 185 190

Ala Ala Leu Ala Thr Ser Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu Pro
195 200 205

Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Val Ala Ser Asn Arg
210 215 220

Arg Ala Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Asn Thr Gln Gly Ile Glu
225 230 235 240

Asn Pro Gly Phe Glu Thr Ser Pro Pro Ser His Gly Met Pro Glu Thr
245 250 255

Lys Pro Arg Gln Pro Leu Thr Tyr Met Ala Arg Arg Gln Pro Ser Glu
260 265 270

Ser Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Asn Thr Pro Leu Ser Pro Pro
275 280 285

Gly Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp Ser
290 295 300

Pro Asn Ser Glu Ala Ile
305 310

<210> 20
<211> 288
<212> PRT
<213> 原鸡

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(288)
<223> VISTA 直系同源物

<400> 20

Gly Gly Thr Ala Ala Phe Leu Val Thr Val Pro Tyr Thr Leu Cys Ile
1 5 10 15

Cys Pro Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Arg Val Ser Gly Pro
20 25 30

Pro Ala Asp His His Asp Leu Ile Phe Lys Thr Trp Tyr Phe Ser Asn
35 40 45

[0022] Asn Gly Asp Gln Ser Cys Ser Glu Lys Arg His Val Arg Asn Leu Thr
50 55 60

Glu Lys Glu Leu Arg His Asp Pro Gly Arg His His Ser Thr Ala Ala
65 70 75 80

Asn Ser Thr Ala Arg Ser Pro His Gly Ser Leu Ala Ser His His Gly
85 90 95

Val Glu Phe Val Pro Asp His His Gly Ala Phe His Ile Val Val Met
100 105 110

Asn Leu Thr Leu Gln Asp Ser Gly Asn Tyr Cys Cys Tyr Ala Met Glu
115 120 125

Thr Arg Arg Asp His Gly Lys Ala His Thr Leu His Ile Ala His Gly
130 135 140

Phe Val Glu Leu Gln Ile Gln Arg Gly Arg Gly Ser Leu Gln Asn Cys
145 150 155 160

Thr Phe His Thr Ala Thr Ser Lys Asp Ile Thr Ala Ala Ala Leu Ala
165 170 175

Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu Pro Leu Ile Leu Leu
180 185 190

Leu Ile Tyr Lys Gln Arg Gln Ala Val Ser His Arg Arg Ala His Glu
195 200 205

Leu Val Arg Met Glu Ser Ser Ala Gln Gly Ile Glu Asn Pro Val Phe
210 215 220

Glu Ala Leu Pro Ala Gly Ser Thr Glu Gln Arg Pro Arg Pro Gln Leu
225 230 235 240

Ser Tyr Leu Gly Gly Arg Gln Leu Ser Glu Ser Gly Arg His Leu Leu
245 250 255

Ser Glu Pro Asn Thr Pro Leu Ser Pro Pro Ala Pro Gly Glu Cys Phe
260 265 270

Phe Pro Thr Leu Asp Pro Val Pro Asp Ser Pro Asn Ser Leu Lys Ala
275 280 285

<210> 21
<211> 260
<212> PRT
[0023] <213> 爪蟾

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(260)
<223> VISTA直系同源物

<400> 21

Asp Ala Ile Thr Ala Phe Ser Val Ser Ala Leu Tyr Ser His Ile Thr
1 5 10 15

Cys Pro Glu Gly Gln Asn Val Asn Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly His
20 25 30

Val Ala Asp Lys His Asp Val Leu Phe Ser Leu Trp His Phe Ser Lys
35 40 45

Asp Lys Asn Ser Asn Cys Leu Glu Arg Arg His Ile Gln Asn Thr Thr
50 55 60

Glu Arg Asp His Leu His Lys Glu His Leu Ser His Ser Met His Asn
65 70 75 80

Gly Ala Phe Gln Ile Thr Leu Thr Asn Val Ser Gln Gln Asp Ser Gly
85 90 95

Gly Tyr Cys Cys Tyr Val Ile Glu Ala Ser Lys Lys His His Thr Arg
100 105 110

His Tyr Ser Tyr Ile Glu Phe Gln Val Lys Thr Asp Asp Leu Asn Leu
115 120 125

Tyr Thr Cys Met Phe His Ser Pro Thr Glu Gly Asp Asn Ser Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Ala Leu Ala Ile Val Ser Cys Val Ile Gly Ile Leu Cys Met
145 150 155 160

Pro Leu Leu Leu Phe Leu Val Tyr Lys Gln Arg Arg Ala Leu Ser His
165 170 175

Arg Arg Ser Tyr His Phe Val Phe Ile Asp Phe Ser Glu Ala Gln Gly
180 185 190

Ile Glu Asn Pro Val Phe Asp Asp Pro Pro Pro Ala Asn Val Val Glu
195 200 205

[0024] Gln Arg Pro Arg Leu Ala Phe Met Ala Ser Arg Gln Gln Ser Glu Ser
210 215 220

Asp Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Asn Thr Pro Leu Ser Pro Ser Cys
225 230 235 240

Pro Asn Glu Cys Phe Phe Pro Ser Leu Pro Val Pro Asp Ser Pro Asp
245 250 255

Pro Gly Asn Val
260

<210> 22
<211> 315
<212> PRT
<213> 斑胸草雀

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(315)
<223> VISTA 直系同源物

<400> 22

Gly His Pro Ala Thr Met Gly Thr Ala Ser Pro Arg Pro Gly Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Cys Leu Leu Ala Ser His Gly Gly Ala Asp Ala Phe
20 25 30

Leu Ile Ser Thr Pro Tyr Ser Leu Cys Val Cys Pro Glu Gly Gln Asn
35 40 45

Val Thr Leu Ser Cys Arg Ile Ser Gly Ala Leu Ala Glu Arg His Asp
50 55 60

Leu Leu Tyr Lys Thr Trp Tyr Phe Ser Ser Thr Gly Asp Gln Ser Cys
65 70 75 80

Ser Asp Lys Arg His Ile Arg Asn Val Thr Asp Lys Glu Leu Arg His
85 90 95

Asp Leu Gly Arg His His Glu Leu Pro Gly Asn Ala Ser Gln Lys Pro
100 105 110

Pro Phe Gly Trp Gln Ser Gly His His Gly Val Glu Leu Val Leu Asp
115 120 125

His His Gly Ala Phe His Leu Val Val Met Asn Leu Thr Leu Gln Asp
130 135 140

[0025]

Ser Gly Asn Tyr Cys Cys Tyr Ala Val Glu Val Arg Arg Glu Gly His
145 150 155 160

Ser Lys Pro His Thr Val Gln Ala Ala His Gly Phe Val Glu Leu Gln
165 170 175

Ile Gln Arg Gly Glu Pro Cys Ser His Ala Arg Ala Gln Ser Gln Arg
180 185 190

Ala Ala Asp Asp Ile Thr Ala Ala Val Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile
195 200 205

Val Gly Ile Leu Cys Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ile Tyr Lys Gln
210 215 220

Arg Gln Ala Ala Ser Ser Arg Arg Ala His Glu Leu Val Arg Met Asp
225 230 235 240

Ser Gly Ala Gln Gly Ile Glu Asn Pro Val Phe Glu Ala Val Pro Ser
245 250 255

Ala Gly Ala Glu Pro Arg Pro Arg Ala Gln Leu Ser Tyr Val Ala Ser
260 265 270

Arg Leu Pro Ser Glu Ser Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Ser Thr
275 280 285

Pro Leu Ser Pro Pro Gly Pro Gly Asp Cys Phe Phe Pro Thr Leu Asp
290 295 300

Pro Val Pro Asp Ser Pro Asn Ser Leu Lys Ala
305 310 315

<210> 23
<211> 274
<212> PRT
<213> 斑马鱼

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(274)
<223> VISTA直系同源物

<400> 23

Met Asp Val Phe Arg Ala Val Leu Leu Cys Phe His Val Phe Thr Ala
1 5 10 15

Ile Gln Ala Ser Gly Asp His His Ser Leu Arg Val Ser Val Pro His
20 25 30

[0026]

Arg Thr Tyr Glu Cys Pro Glu Gly Ala Asp Val Ile Leu Lys Cys Val
35 40 45

Pro Ser Gly Thr Lys Ala Tyr Pro Gln Asp Thr Phe Trp Thr Thr Trp
50 55 60

Leu Tyr Thr Pro Arg Ser Gln Asp His Cys Gln Lys Gly Ala His Pro
65 70 75 80

Arg Lys Ala Asn His Thr Asn Arg Ser Leu Gly Val Val Tyr Ser Ser
85 90 95

Gly Asp Lys Val Phe Ser Val Ser Leu Lys Asn Val Lys His Thr Asp
100 105 110

Gln Gly Lys Tyr Cys Cys Trp Leu Leu Asp Leu His Gly Arg His Lys
115 120 125

Glu Gln Glu Ala His Asp Phe Met Tyr Leu Ser Val Met Pro Thr Pro
130 135 140

Lys Asp Ala His Asn Gly Ser Leu Lys Cys Leu Glu Tyr Ser His Thr

145 150 155 160

Ala Ser Asp Asp Val Ala Glu Gly Leu Ala Ile Ala Ala Cys Val Ala
165 170 175

Phe Val Leu Cys Leu Pro Leu Ile Leu Met Leu Val Tyr Arg Gln Arg
180 185 190

Gln Thr Val Glu Arg His Arg Arg Ala His Glu Leu Val Arg Met Asp
195 200 205

Ser Glu Ala Gln Gly His Glu Asn Pro Val Phe Leu Gly Asp Ser Pro
210 215 220

Glu Pro Lys Met Arg Thr Val Ser Gln Ile Met Met Arg Gln Pro Ser
225 230 235 240

Glu Thr Gly His His Leu Leu Ser Glu Pro Gly Thr Pro Phe Ser Pro
245 250 255

Asn Ile Gln Gly Glu Leu Phe Phe Ser Ala Gln Gly Leu Pro Glu Ser
260 265 270

[0027]

Asn Ile

<210> 24
<211> 293
<212> PRT
<213> 河豚

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(293)
<223> VISTA直系同源物

<400> 24

Leu Glu Lys Phe Thr Ser Ala His His Thr Lys Gln Thr Leu Glu Lys
1 5 10 15

Gly Leu Asn Leu Leu Cys Leu Thr Lys Ser Asn Ala His His Gly His
20 25 30

Pro Ala Met Ser Val Ser Ala Ser His Leu Tyr Tyr Thr Cys Pro Glu
35 40 45

Gly Ala Asn Ala Thr Leu Val Cys Asn Gln Arg Gly Gly Ala Leu His
50 55 60

```
Pro Asn Asp Ser Leu Trp Arg Leu Trp Phe Phe Thr Pro His Lys Asp
65                  70                  75                  80

Gln His Cys Thr Lys His Gly Pro Arg Asn Val Thr Phe Lys His Ser
                85                  90                  95

Lys Leu Ser Ser Gly Leu His Phe Gly Ala Thr Gln Glu Asn Phe Trp
            100                 105                 110

Val Gln Leu Gln Asn Val Thr His Ala Asp Gln Gly Arg Tyr Cys Cys
        115                 120                 125

Ala Ala Leu Glu Ile Glu Ser Ile His His Glu Ala Val Gln Arg Thr
    130                 135                 140

His Ser His Met Phe Leu Asn Ile Ile Pro Arg Gly Thr Gly Ser Pro
145                 150                 155                 160

Asn Cys Thr Val Ser Ala Pro Ser Ala Pro Glu Gly Asn Ala Thr Leu
                165                 170                 175

Cys Thr Val Pro Val Ala Leu Ala Met Gly Ala Cys Ile Leu Ala Leu
            180                 185                 190
```

[0028]

```
Leu Ser Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Arg Gln Arg Gln Ser
        195                 200                 205

Ala Gln Ser Arg Arg Arg Ala Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Glu
    210                 215                 220

Ala His Gly His Glu Asn Pro Val Phe Leu Gly Gly Ser Pro Gln Ile
225                 230                 235                 240

Lys Asn Arg Thr Val Ser Gln Ile Met Ala Arg Gln Ser Ser Glu Thr
                245                 250                 255

Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Gly Thr Pro Leu Ser Pro Pro Ala
            260                 265                 270

His Gly Asp Val Phe Phe Pro Ala Glu Asp Thr Ile Phe Glu Thr Pro
        275                 280                 285

Glu Leu Arg Gln Val
    290
```

<210> 25

<211> 159
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 域
<222> (1)..(159)
<223> 细胞外域

<400> 25

Phe Lys Val Thr Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
1 5 10 15

Asn Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Val Ser Lys Gly His
20 25 30

Asp Val Thr Ile Tyr Lys Thr Trp Tyr Leu Ser Ser Arg Gly Glu Val
35 40 45

Gln Met Cys Lys Glu His Arg Pro Ile Arg Asn Phe Thr Leu Gln His
50 55 60

Leu Gln His His Gly Ser His Leu Lys Ala Asn Ala Ser His Asp Gln
65 70 75 80

[0029]

Pro Gln Lys His Gly Leu Glu Leu Ala Ser Asp His His Gly Asn Phe
85 90 95

Ser Ile Thr Leu Arg Asn Val Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Cys
100 105 110

Cys Leu Val Ile Glu Leu Lys Asn His His Pro Glu Gln Arg Phe Tyr
115 120 125

Gly Ser Met Glu Leu Gln Val Gln Ala Gly Lys Gly Ser Gly Ser Thr
130 135 140

Cys Met Ala Ser Asn Glu Gln Asp Ser Asp Ser Ile Thr Ala Ala
145 150 155

<210> 26
<211> 221
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 域
<222> (1)..(221)
<223> 细胞外域

<400> 26

Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
85 90 95

Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

[0030] Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg
145 150 155 160

Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser
165 170 175

Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe
180 185 190

Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His
210 215 220

<210> 27
<211> 202
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 域
<222> (1)..(202)
<223> 细胞外域

<400> 27

Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu
20 25 30

Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

[0031]

Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu
100 105 110

Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp
165 170 175

Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser
180 185 190

Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp
195 200

<210> 28
<211> 220
<212> PRT

<213> 智人

<220>
<221> 域
<222> (1)..(220)
<223> 细胞外域

<400> 28

Val Glu Val Gln Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Asp Ala Thr Leu Phe Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
20 25 30

Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
35 40 45

His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg
50 55 60

Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
65 70 75 80

[0032] Leu Gln Arg Val Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Thr Val
85 90 95

Ser Ile Gln Asp Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala
100 105 110

Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg
115 120 125

Pro Gly Asn Met Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro
130 135 140

Glu Ala Glu Val Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly
145 150 155 160

Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val
165 170 175

His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys
180 185 190

Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr
195 200 205

Ile Thr Gly Gln Pro Leu Thr Phe Pro Pro Glu Ala

210 215 220

<210> 29
<211> 233
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 域
<222> (1)..(233)
<223> 细胞外域

<400> 29

Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Lys His Phe Ile Thr Val Thr
1 5 10 15

Thr Phe Thr Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Thr Leu Ser Cys
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Asn Gly Ile Val Ile Gln Trp Leu
35 40 45

Lys Glu Gly Ile Lys Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp
50 55 60

[0033]

Asp Leu Ser Gln Gln Met Glu Met Phe Ala Gly Arg Thr Ala Val Phe
65 70 75 80

Ala Asp Gln Val Val Val Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val
85 90 95

Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Thr Cys Tyr Ile Arg Thr Ser Lys
100 105 110

Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met
115 120 125

Pro Glu Ile Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Ser Leu Arg Cys
130 135 140

Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Ala Trp Ala Ser Gln
145 150 155 160

Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu
165 170 175

Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn
180 185 190

Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala
195 200 205

Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Asp Ser Glu Val Lys Arg Arg
210 215 220

Ser Gln Leu Gln Leu Leu Asn Ser Gly
225 230

<210> 30
<211> 159
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 域
<222> (1)..(159)
<223> 细胞外域

<400> 30

Phe Lys Val Thr Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
1 5 10 15

Asn Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Val Ser Lys Gly His
[0034] 20 25 30

Asp Val Thr Ile Tyr Lys Thr Trp Tyr Leu Ser Ser Arg Gly Glu Val
35 40 45

Gln Met Cys Lys Glu His Arg Pro Ile Arg Asn Phe Thr Leu Gln His
50 55 60

Leu Gln His His Gly Ser His Leu Lys Ala Asn Ala Ser His Asp Gln
65 70 75 80

Pro Gln Lys His Gly Leu Glu Leu Ala Ser Asp His His Gly Asn Phe
85 90 95

Ser Ile Thr Leu Arg Asn Val Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Cys
100 105 110

Cys Leu Val Ile Glu Leu Lys Asn His His Pro Glu Gln Arg Phe Tyr
115 120 125

Gly Ser Met Glu Leu Gln Val Gln Ala Gly Lys Cys Ser Gly Ser Thr
130 135 140

Cys Met Ala Ser Asn Glu Gln Asp Ser Asp Ser Ile Thr Ala Ala

145 150 155

<210> 31
<211> 149
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 域
<222> (1)..(149)
<223> 细胞外域

<400> 31

Ser Gly Trp Leu Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg Ser Leu Thr
1 5 10 15

Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu Asn Trp Asn
35 40 45

Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys Asn
50 55 60

[0035]

Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile Ile Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Met Pro Lys Ala
100 105 110

Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg Ile
115 120 125

Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro Lys Pro Glu Glu
130 135 140

Arg Phe Gln Gly Met
145

<210> 32
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<220>

<221> 域
<222> (1)..(126)
<223> 细胞外域

<400> 32

Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala Ser Ser His
1 5 10 15

Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ser Pro Ser His Asn Thr Asp
20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln Met Thr Glu
35 40 45

Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly Phe Leu Asp
50 55 60

Tyr Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Lys Val
85 90 95

[0036] Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly Asn Gly Thr
100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120 125

<210> 33
<211> 71
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 域
<222> (1)..(71)
<223> 细胞外域

<400> 33

Arg Ser Asn Ala Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn Glu Thr
1 5 10 15

Val Thr Phe Arg Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp Ile Tyr
20 25 30

Phe Cys Lys Ile Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
35 40 45

Arg Ser Asn Gly Thr Ile Thr His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His
50 55 60

Thr Gln Ser Ser Pro Lys Leu
65 70

<210> 34
<211> 154
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 域
<222> (1)..(154)
<223> 细胞外域

<400> 34

Glu Lys Ala Thr Lys Arg Asn Asp Glu Glu Cys Pro Val Gln Leu Thr
1 5 10 15

Ile Thr Arg Asn Ser Lys Gln Ser Ala Arg Thr Gly Glu Leu Phe Lys
20 25 30

Ile Gln Cys Pro Val Lys Tyr Cys Val His Arg Pro Asn Val Thr Trp
35 40 45

[0037]

Cys Lys His Asn Gly Thr Ile Cys Val Pro Leu Glu Val Ser Pro Gln
50 55 60

Leu Tyr Thr Ser Trp Glu Glu Asn Gln Ser Val Pro Val Phe Val Leu
65 70 75 80

His Phe Lys Pro Ile His Leu Ser Asp Asn Gly Ser Tyr Ser Cys Ser
85 90 95

Thr Asn Phe Asn Ser Gln Val Ile Asn Ser His Ser Val Thr Ile His
100 105 110

Val Arg Glu Arg Thr Gln Asn Ser Ser Glu His Pro Leu Ile Thr Val
115 120 125

Ser Asp Ile Pro Asp Ala Thr Asn Ala Ser Gly Pro Ser Thr Met Glu
130 135 140

Glu Arg Pro Gly Arg Thr Trp Leu Leu Tyr
145 150

<210> 35
<211> 124

<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 域
<222> (1)..(124)
<223> 细胞外域

<400> 35

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser Phe His Asn Gly
1 5 10 15

Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln Leu Lys
20 25 30

Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu Leu Thr Lys Thr
35 40 45

Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro Met Leu Cys Leu
50 55 60

Tyr Met Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Asn Asn Pro Asp
65 70 75 80

[0038] Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser Ile Phe Asp Pro
85 90 95

Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr
100 105 110

Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu
115 120

<210> 36
<211> 306
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 36

Met Gly Val Pro Asn Val Pro Glu Ala Ser Ser Pro Arg Trp Gly Thr
1 5 10 15

Leu Ile Leu Ala Asp Phe Leu Ala Ala Ser Arg Gly Leu Val Ala Ala
20 25 30

Phe Lys Val Thr Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
35 40 45

Asn Ala Thr Leu Thr Cys Arg Ile Leu Gly Pro Val Ser Lys Gly His

50 55 60

Asp Val Thr Ile Tyr Lys Thr Trp Tyr Leu Ser Ser Arg Gly Glu Val
65 70 75 80

Gln Met Cys Lys Glu Glu Arg Pro Ile Arg Asn Phe Ile Leu Gln His
85 90 95

Leu Gln His His Gly Ser His Leu Lys Ala Asn Ala Ser His Asp Gln
100 105 110

Pro Gln Lys His Gly Leu Glu Thr Ala Ser Asp His His Gly Asn Phe
115 120 125

Ser Ile Thr Leu Arg Asn Val Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Cys
130 135 140

Cys Leu Val Ile Glu Leu Lys Asn His His Pro Lys Gln Arg Phe Tyr
145 150 155 160

Gly Ser Met Glu Leu Gln Val Gln Ala Gly Lys Gly Ser Gly Thr Asn
165 170 175

[0039]

Ala Ser Asn Glu Gln Asp Ser Asp Ser Ile Thr Ala Ala Ala Leu Ala
180 185 190

Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu Pro Leu Ile Leu Leu
195 200 205

Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Val Ala Ser His Arg Arg Ala Gln Glu
210 215 220

Leu Val Arg Met Asp Ser Ser Asn Thr Gln Gly Ile Lys Asn Pro Gly
225 230 235 240

Phe Glu Thr Thr Pro Pro Phe Gln Gly Met Pro Glu Ala Lys Thr Arg
245 250 255

Pro Pro Leu Ser Tyr Val Ala Gln Arg Gln Pro Ser Glu Ser Gly Arg
260 265 270

Tyr Leu Leu Ser Asp Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly Pro Gly
275 280 285

Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp Ser Asn Ser Glu
290 295 300

Ala Ile
305

<210> 37
<211> 308
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Met Gly Val Pro Thr Ala Ile Glu Ala Ser Ser Trp Arg Trp Gly Ser
1 5 10 15

Leu Ile Phe Ala Leu Phe Leu Ala Ala Ser Leu Gly Pro Val Ala Ala
20 25 30

Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Val Val Cys Pro Glu Gly Gln
35 40 45

Asn Val Thr Leu Thr Cys Arg Leu Leu Gly Pro Val Asp Lys Gly His
50 55 60

Asp Val Thr Phe Tyr Lys Thr Trp Tyr Arg Ser Ser Arg Gly Glu Val
65 70 75 80

[0040]

Gln Thr Cys Ser Glu Arg Arg Pro Ile Arg Asn Leu Thr Phe Gln Asp
85 90 95

Leu Lys Leu His His Gly Gly His Gln Ala Ala Asn Thr Ser His Asp
100 105 110

Leu Ala Gln Arg His Gly Leu Glu Ser Ala Ser Asp His His Gly Asn
115 120 125

Phe Ser Ile Thr Asn Arg Asn Leu Thr Leu Leu Asp Ser Gly Leu Tyr
130 135 140

Cys Cys Leu Val Val Glu Ile Arg His His His Ser Lys His Arg Val
145 150 155 160

His Gly Ala Met Glu Leu Gln Val Gln Thr Gly Lys Asp Ala Pro Asn
165 170 175

Val Val Tyr Pro Ser Ser Ser Gln Asp Ser Glu Asn Ile Thr Ala Ala
180 185 190

Ala Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu Pro Leu
195 200 205

Ile Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Ala Ala Ser Asn Arg Arg
210 215 220

Ala Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Asn Ile Gln Gly Ile Lys Asn
225 230 235 240

Pro Gly Phe Glu Ala Ser Pro Pro Ala Gln Gly Ile Pro Glu Ala Lys
245 250 255

Val Arg His Pro Leu Ser Tyr Val Ala Gln Arg Gln Pro Ser Glu Ser
260 265 270

Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly
275 280 285

Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp Ser Asn
290 295 300

Phe Glu Val Ile
305

<210> 38
<211> 25
<212> DNA
[0041] <213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 38
gggcacgatg tgaccttcta caaga 25

<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 39
cagatgccaa atgacttaca tctta 25

<210> 40
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 40
gagatggatt gtaagagcca gttta 25

<210> 41
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 41
gggctttgag gagagggtaa acata 25

<210> 42
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 42
cctatctcct gacattcaca gttta 25

<210> 43
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

[0042]

<400> 43
cagtttaata gagacttcct gcctt 25

<210> 44
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 44
cagggagagg ctgaaggaat ggaat 25

<210> 45
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 45
ggaatgtgtt gagagggatt ctgaa 25

<210> 46
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 46
gagagggatt ctgaatgatc aatat 25

<210> 47
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 47
cacagagggc aatagaggtt ctgaa 25

<210> 48
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 48
cagatgccaa atgacttaca tctta 25

[0043]

<210> 49
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 49
gagatggatt gtaagagcca gttta 25

<210> 50
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 50
ggtgagtcct ctgtggaatt gtgat 25

<210> 51
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> siRNA

<400> 51
gggctttgag gagagggtaa acata 25

<210> 52
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 52
cctatctcct gacattcaca gttta 25

<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 53
cagtttaata gagacttcct gcctt 25

[0044]

<210> 54
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 54
cagggagagg ctgaaggaat ggaat 25

<210> 55
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 55
ggaatgtgtt gagagggatt ctgaa 25

<210> 56
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 56

gagagggatt ctgaatgatc aatat 25

<210> 57
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 57
cacagagggc aatagaggtt ctgaa 25

<210> 58
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 58
acaaagggca cgatgtgacc ttcta 25

[0045]

<210> 59
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 59
gggcacgatg tgaccttcta caaga 25

<210> 60
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 60
gaccaccatg gcaacttctc catca 25

<210> 61
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 61
cagacaggca aagatgcacc atcca 25

<210> 62
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 62
ggcaaagatg caccatccaa ctgtg 25

<210> 63
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 63
ccatccaact gtgtggtgta cccat 25

<210> 64
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

[0046]

<400> 64
ggatggacag caacattcaa gggat 25

<210> 65
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 65
gacagcaaca ttcaagggat tgaaa 25

<210> 66
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> siRNA

<400> 66
ccctgtccct gactctccaa acttt 25

<210> 67
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0047]

<223> siRNA

<400> 67
cctgactctc caaactttga ggtca 25

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

图1A



图1B

```
                ************************************************************
VISTA     ---FKVTTPY----------SLYVCPEGQNATLTCRILGPVSKGHDVTIYKTWYLSSRGE
PD-1      -SGWLLEVPNGPWRSLTFYPAWLTVSEGANATFTCSLS--------------NWSEDLM
CTLA-4    -EAIQVTQPS----------VVLASSHG-VASFPCEYS---------------PSHNTDE
CD28      ---------------------------RSNAEFNGD-----------------------
BTLA      EKATKRNDEECPVQLTITRNSKQSARTGELFKLQKPVK---------------YCVHRPN
ICOS      --EINGSADH----------RMFSFHNG-GVQISCKYP---------------ETVQQLK
                ************************************************************
VISTA     VQMCKEHRPIR---NFTLQHLQHHGSHLKANASHDQPQKHGLELASDHHGNFSITLRNVT
PD-1      LNWNRLSPSNQ------TEKQAAFCNGLSQPVQDARFQIIQLPN----RHDFHMNILDTR
CTLA-4    VRVTVLRQTND---QMTEVCATTFTEKNTVGFLDYPFCSGTFNE-----SRVNLTIQGLR
CD28      ------------------------------------GDFDN-----ETVTFRLWNLH
BTLA      VTWCKHNGTICVPLEVSPQLYTSWEENQSVPVFVLHFKPIHLSDNGSYSCSTNFNSQVIN
ICOS      MRLFREREVLC---ELT----KTKGSGNAVSIKNPMLCLYMLSN-----NSVSFFLNNPD
                **************************
VISTA     PRDSGLYCCLVIELKNHHPEQRFYGSMELQVQAGKCSGSTCMASNEQDSDSITAA-----
PD-1      RNDSGIYLC---GAISLMPKAKIEES----------PGAELVVTERILETSTRYPSPSPK
CTLA-4    AVDTGLYLC---KVELMYPPPYFVGM---------GNGTQIYVIDPEPCPDSD-------
CD28      VNHTDIYFC---KIEFMYPPPYLDNE--------RSNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKL---
BTLA      SHSVTIHVRERTQNSSEHPLITVSDI---------PDATNASGPSTMEERPGRTWLLY--
ICOS      SSQGSYYFC---SLSIFDPPPFQERN---------LSGGYLHIYESQLCCQLKLWL----
VISTA     --------
PD-1      PEERFQGM
CTLA-4    --------
CD28      --------
BTLA      --------
ICOS      --------
```

图1C

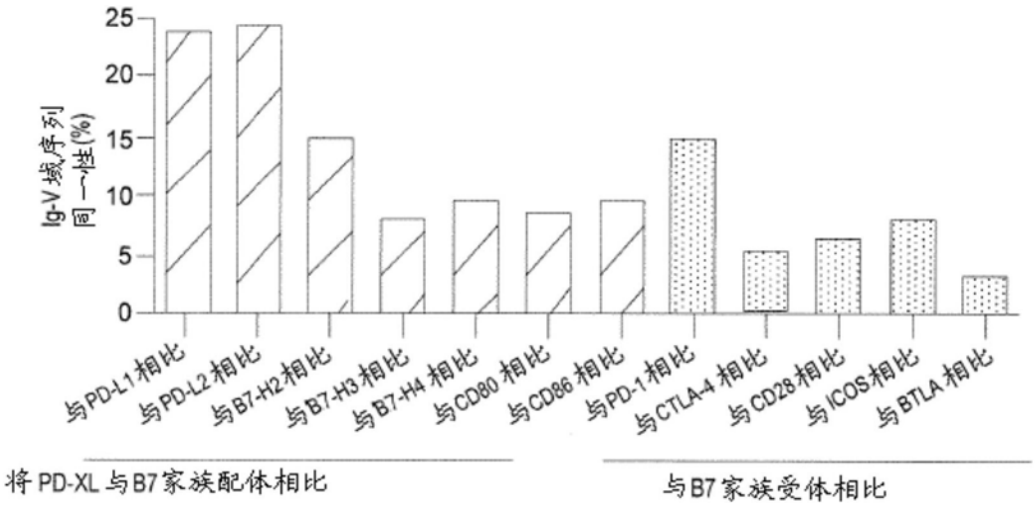

图1D


VISTA_小鼠
VISTA_人
60
119
179
237
297
309
311

图1E

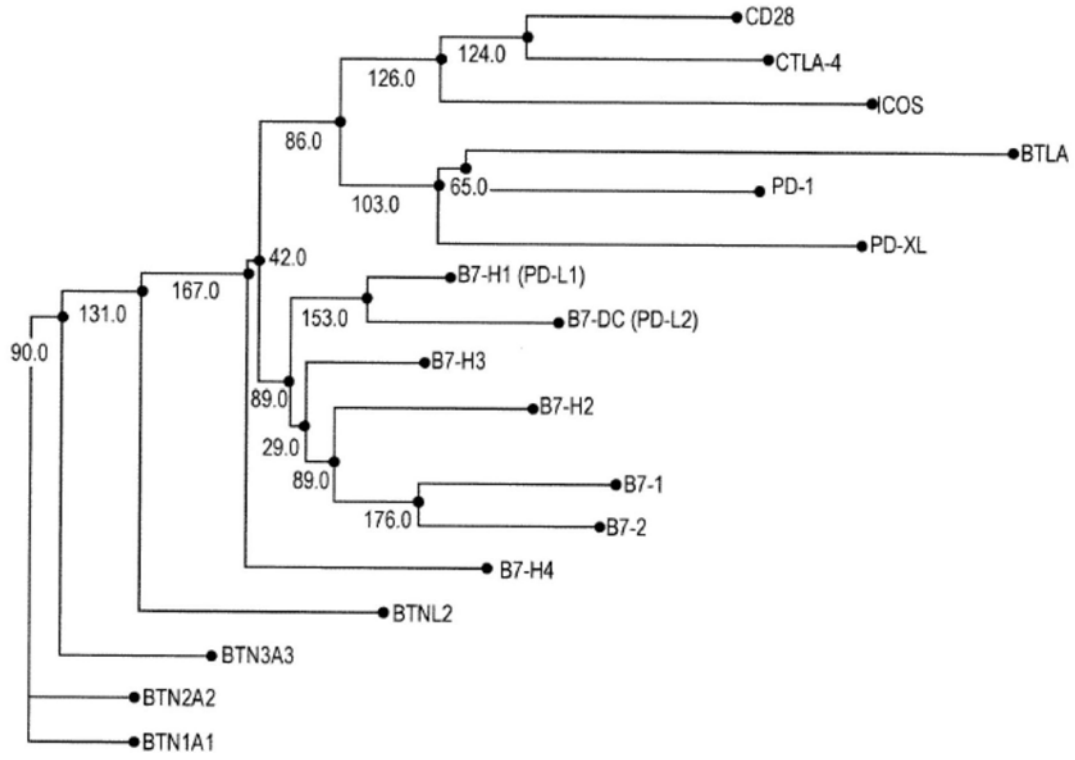
CD28
CTLA-4
ICOS
BTLA
PD-1
PD-XL
B7-H1 (PD-L1)
B7-DC (PD-L2)
B7-H3
B7-H2
B7-1
B7-2
B7-H4
BTNL2
BTN3A3
BTN2A2
BTN1A1
124.0
126.0
86.0
65.0
103.0
42.0
167.0
131.0
153.0
90.0
89.0
29.0
89.0
176.0

图2

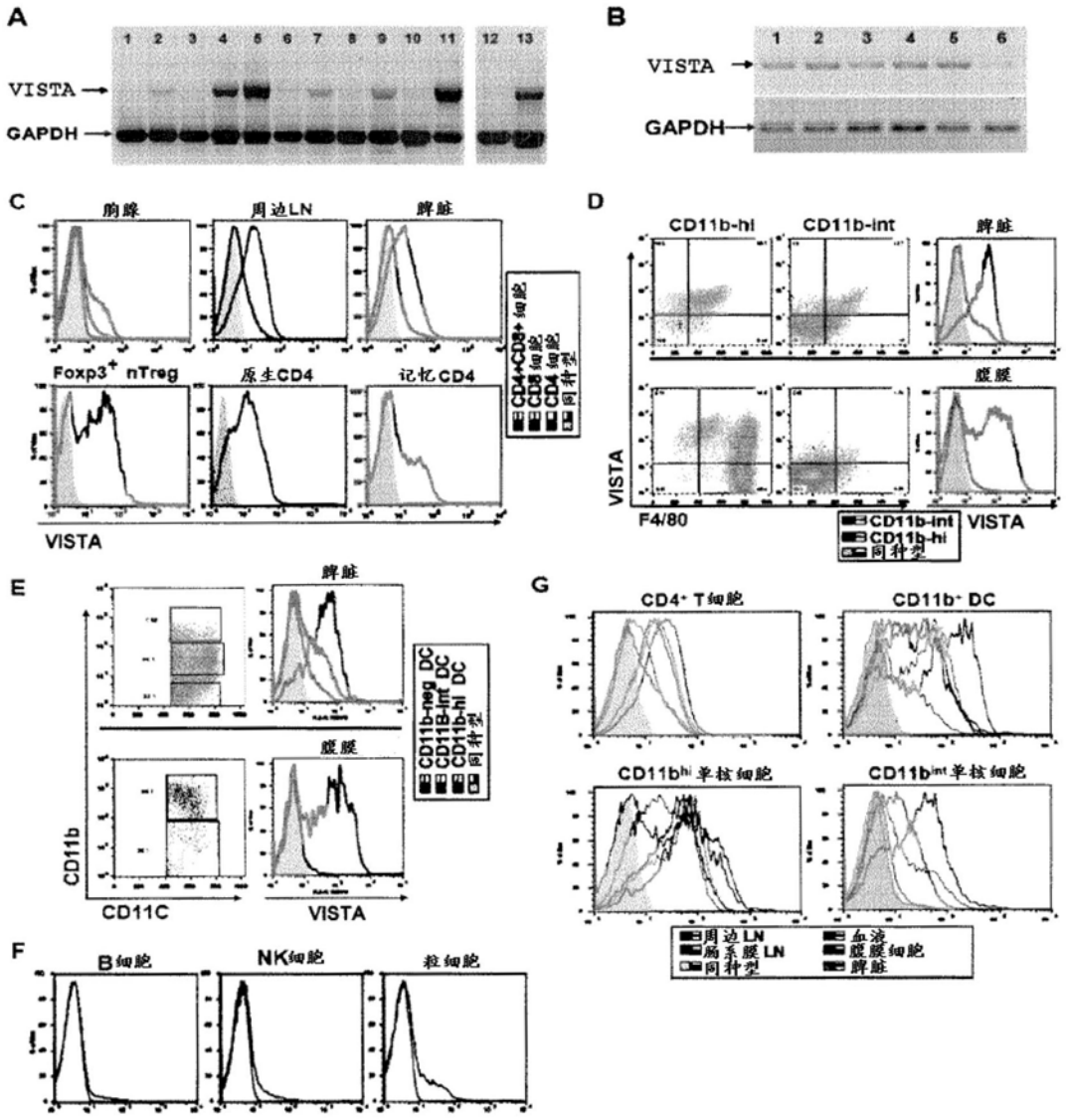
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
VISTA
GAPDH
B
1 2 3 4 5 6
VISTA
GAPDH
C
胸腺
周边LN
脾脏
Foxp3+ nTreg
原生CD4
记忆CD4
VISTA
D
CD11b-hi
CD11b-int
脾脏
腹膜
VISTA
F4/80
CD11b-int
CD11b-hi
VISTA
E
脾脏
腹膜
CD11b
CD11C
VISTA
CD11b-neg DC
CD11B-int DC
CD11b-hi DC
G
CD4+ T细胞
CD11b+ DC
CD11bhi单核细胞
CD11bint单核细胞
周边LN
肠系膜LN
血液
腹膜细胞
脾脏
F
B细胞
NK细胞
粒细胞

图3

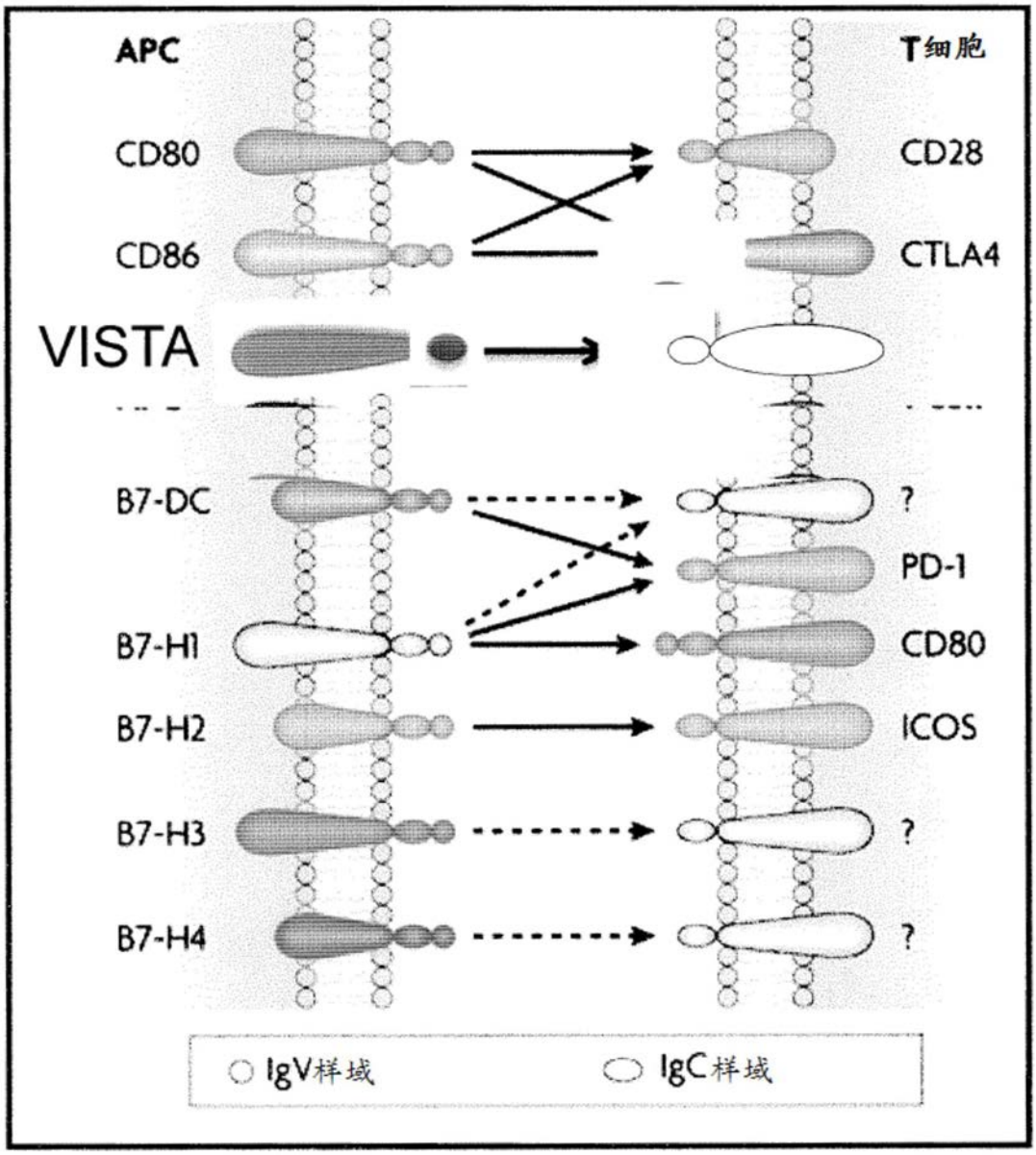
APC
T细胞
CD80
CD28
CD86
CTLA4
VISTA
B7-DC
?
PD-1
B7-H1
CD80
B7-H2
ICOS
B7-H3
?
B7-H4
?
IgV样域
IgC样域

图4

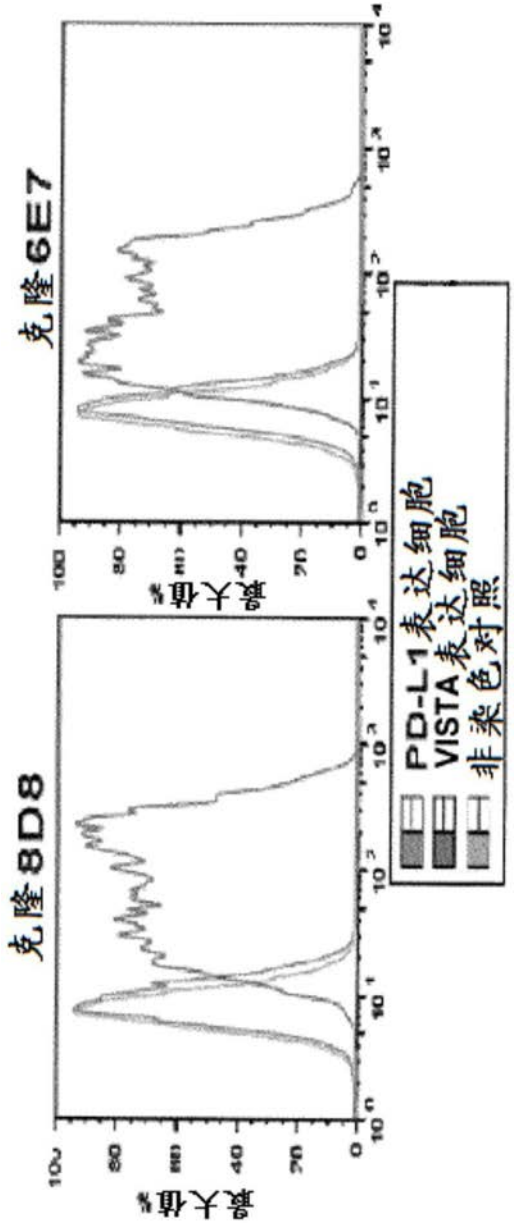

图5

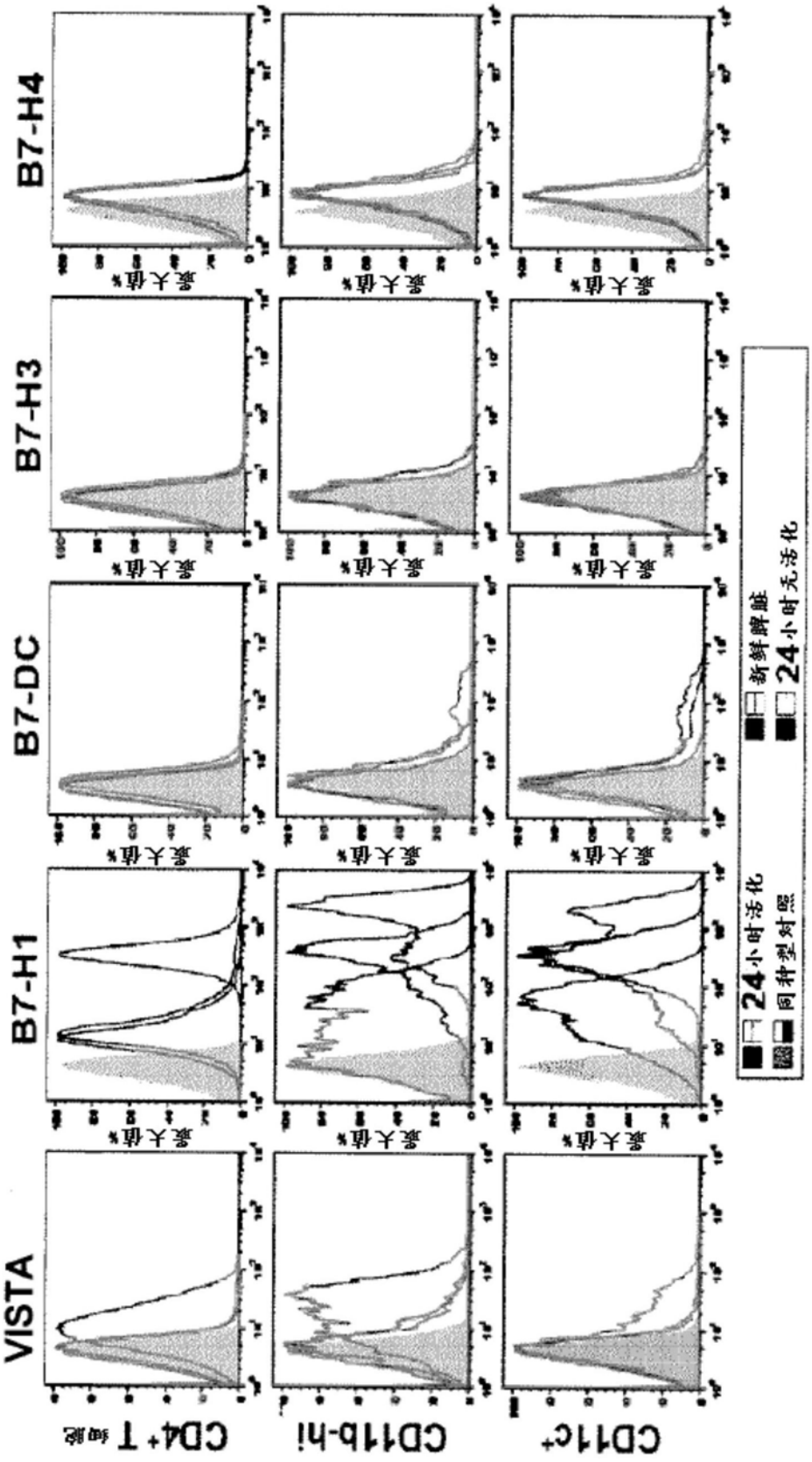
VISTA
B7-H1
B7-DC
B7-H3
B7-H4
CD4+ T 细胞
CD11b-hi
CD11c+
数人值%
新鲜脾脏
24小时无活化
24小时活化
同种型对照

图6

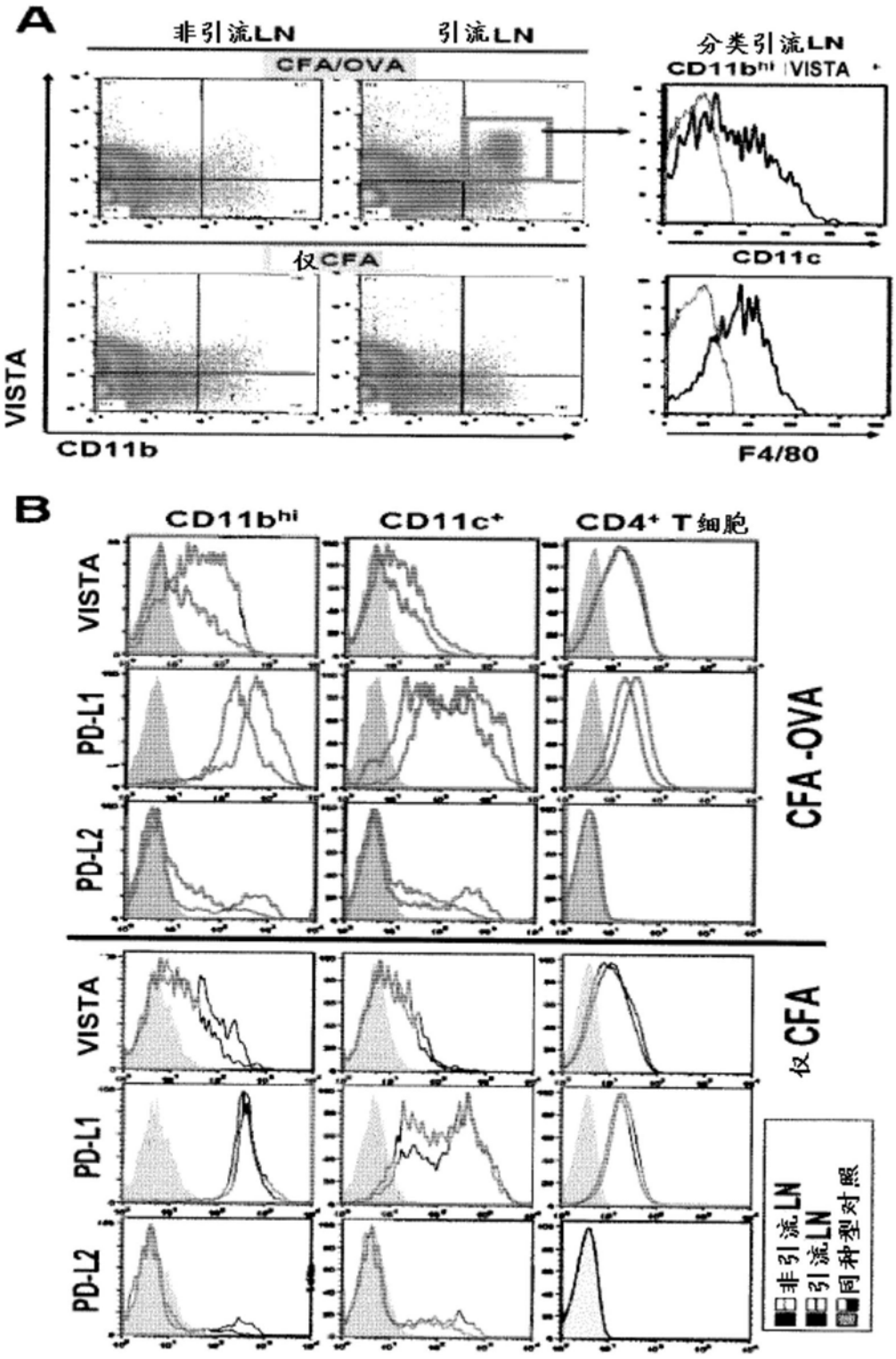
A
非引流LN
引流LN
CFA/OVA
仅CFA
VISTA
CD11b
分类引流LN
CD11b^hi VISTA+
CD11c
F4/80
B
CD11b^hi
CD11c+
CD4+ T细胞
VISTA
PD-L1
PD-L2
CFA-OVA
仅CFA
非引流LN
引流LN
同种型对照

图7

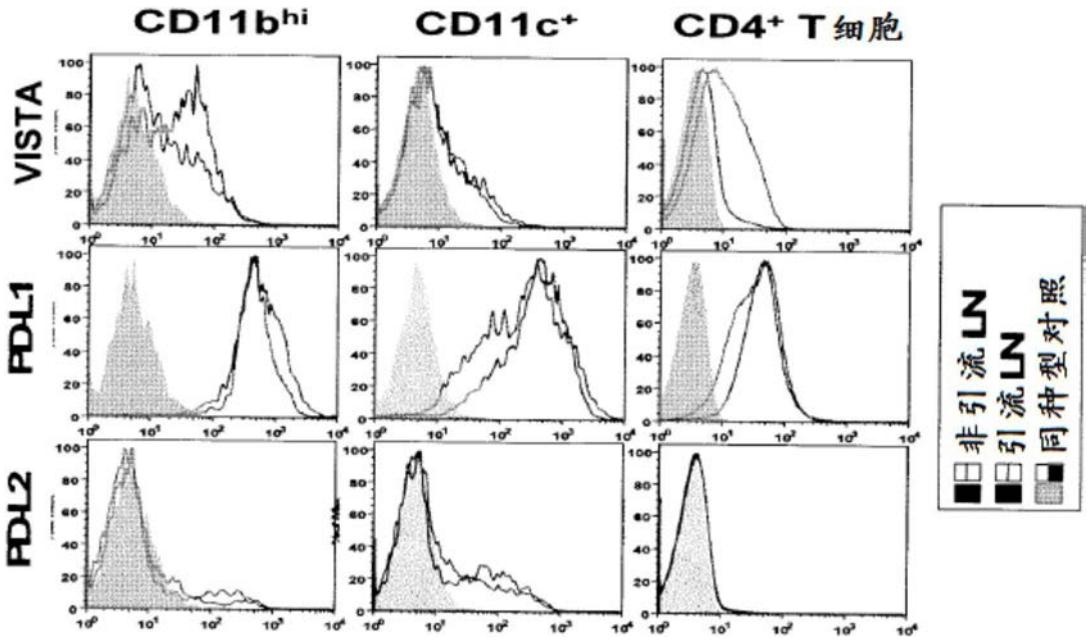

图8

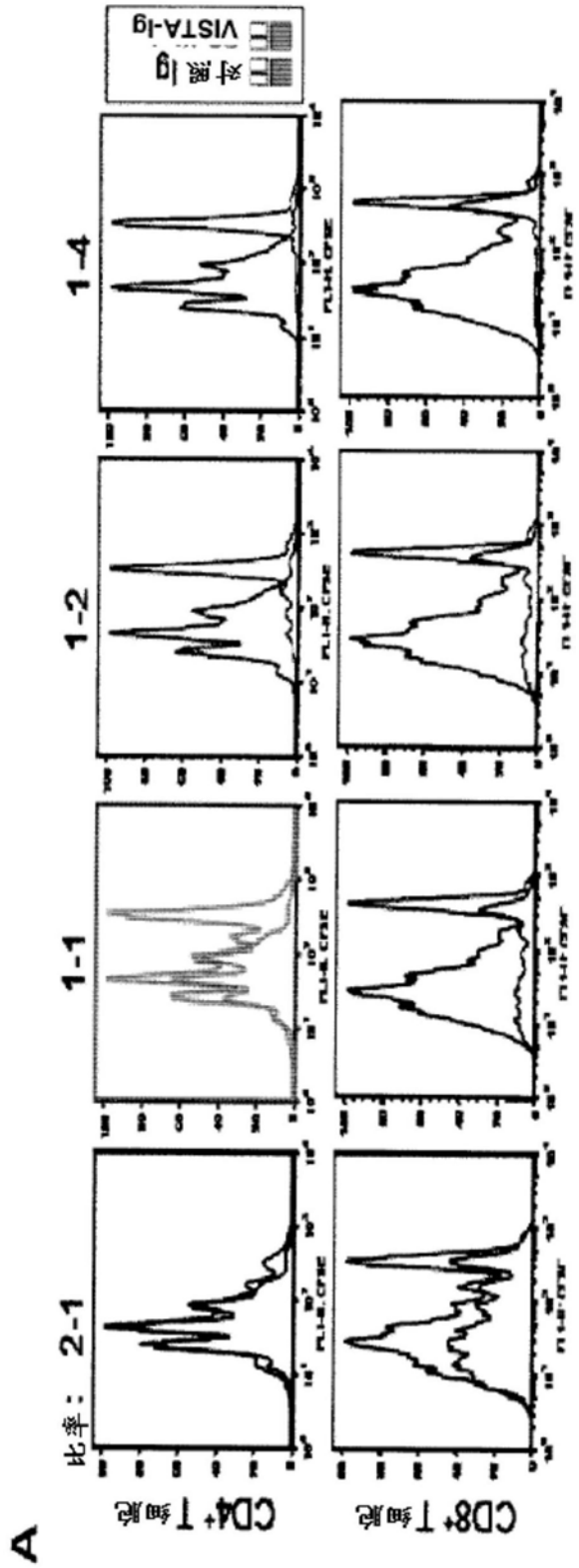

图9A

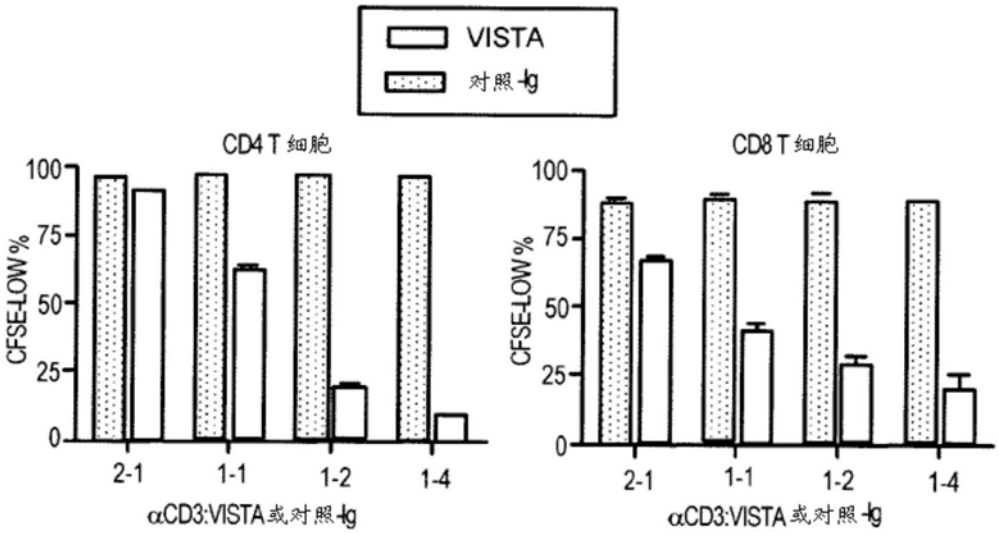
VISTA
对照-Ig
CD4 T 细胞
CD8 T 细胞
CFSE-LOW %
100
75
50
25
0
2-1
1-1
1-2
1-4
αCD3:VISTA或对照-Ig

图9B

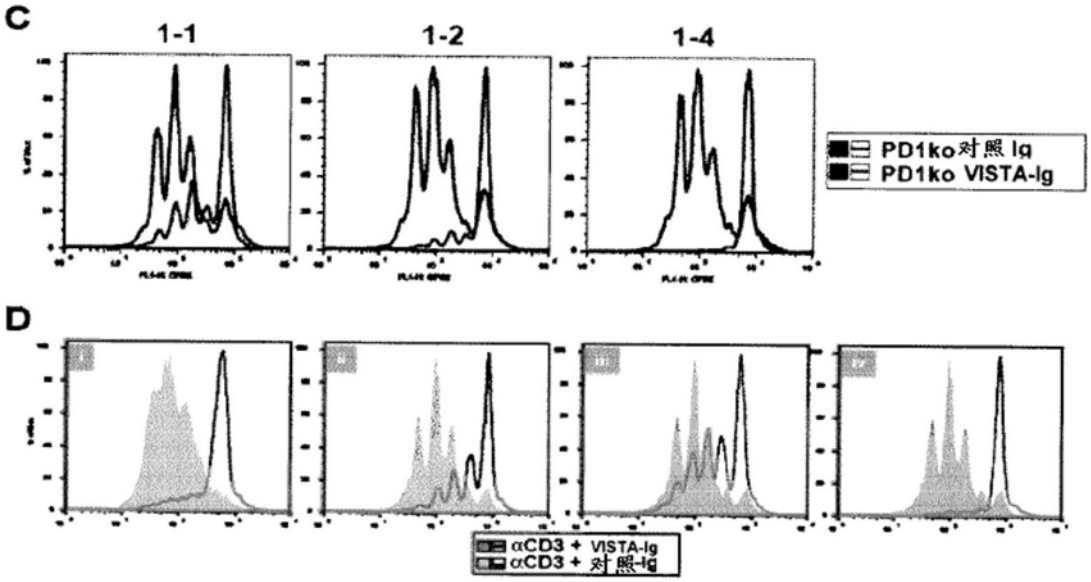
C
1-1
1-2
1-4
PD1ko对照 Ig
PD1ko VISTA-Ig
D
αCD3 + VISTA-Ig
αCD3 + 对照-Ig

图9

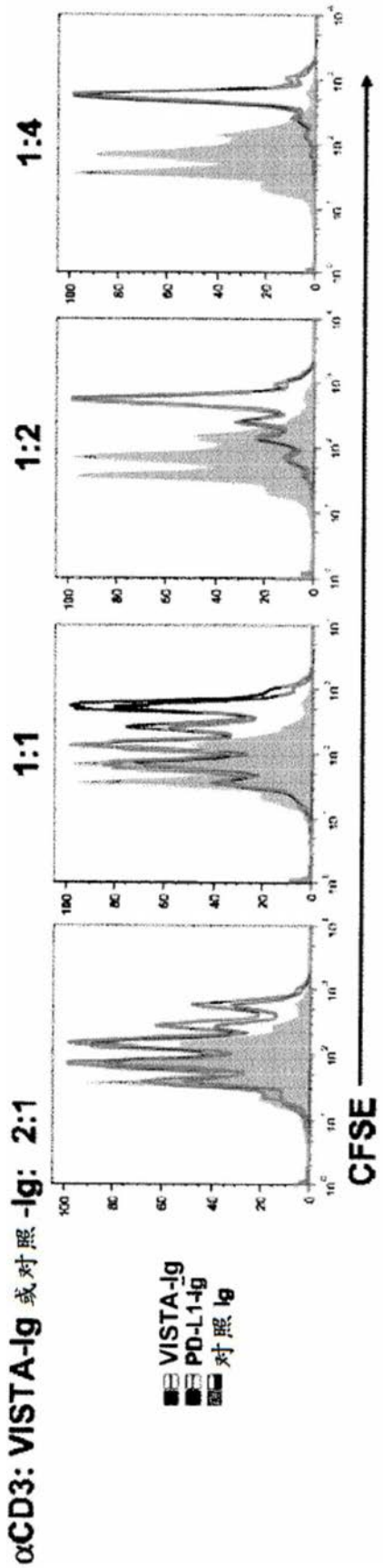

图10

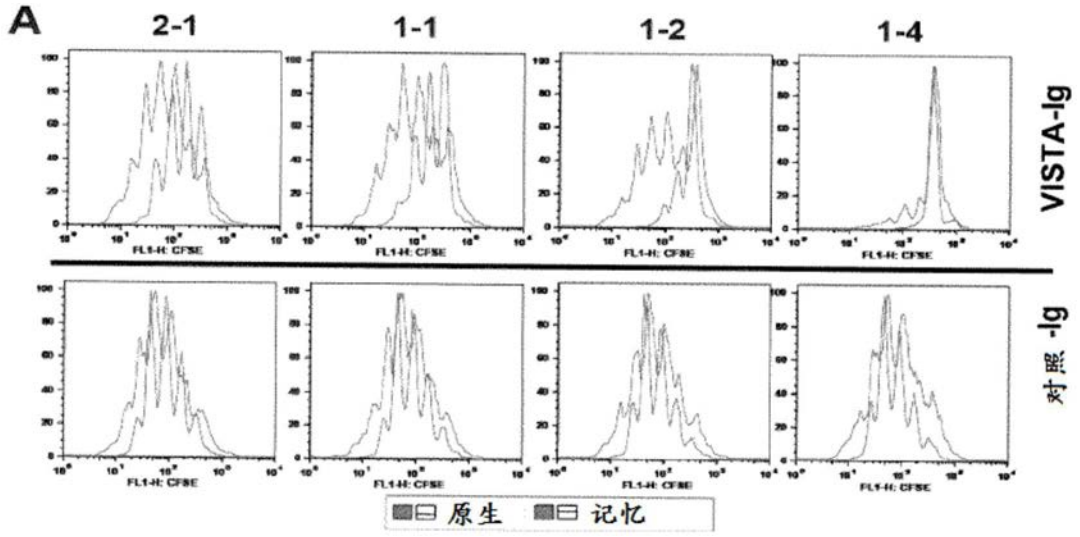
A
2-1
1-1
1-2
1-4
VISTA-Ig
对照 -Ig
FL1-H: CFSE
原生
记忆

图11A

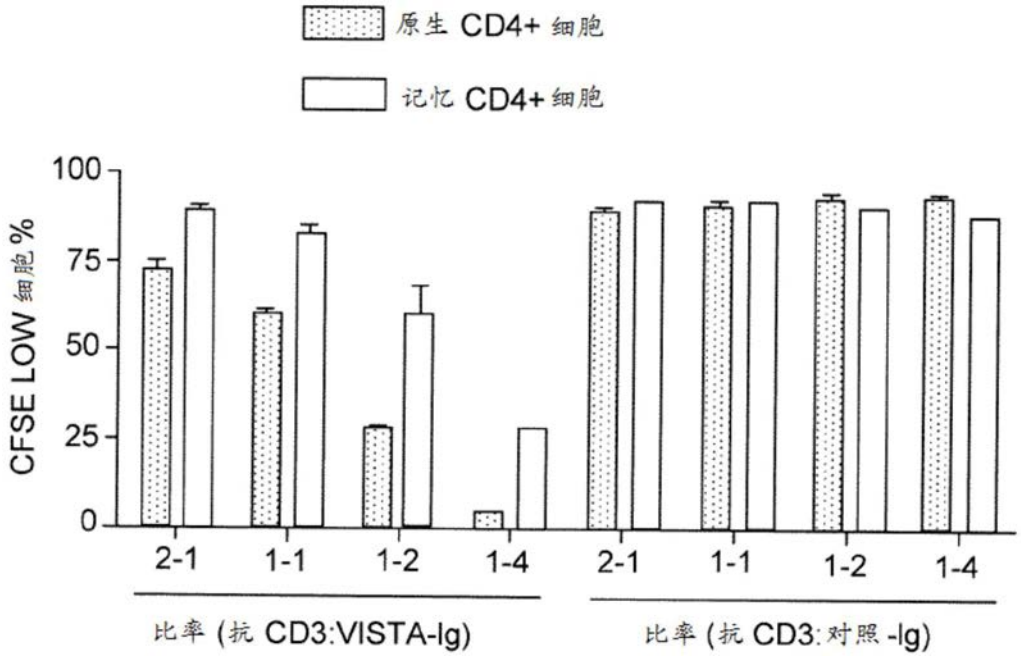
原生 CD4+ 细胞
记忆 CD4+ 细胞
CFSE LOW 细胞 %
100
75
50
25
0
2-1
1-1
1-2
1-4
2-1
1-1
1-2
1-4
比率 (抗 CD3:VISTA-Ig)
比率 (抗 CD3:对照 -Ig)

图11B

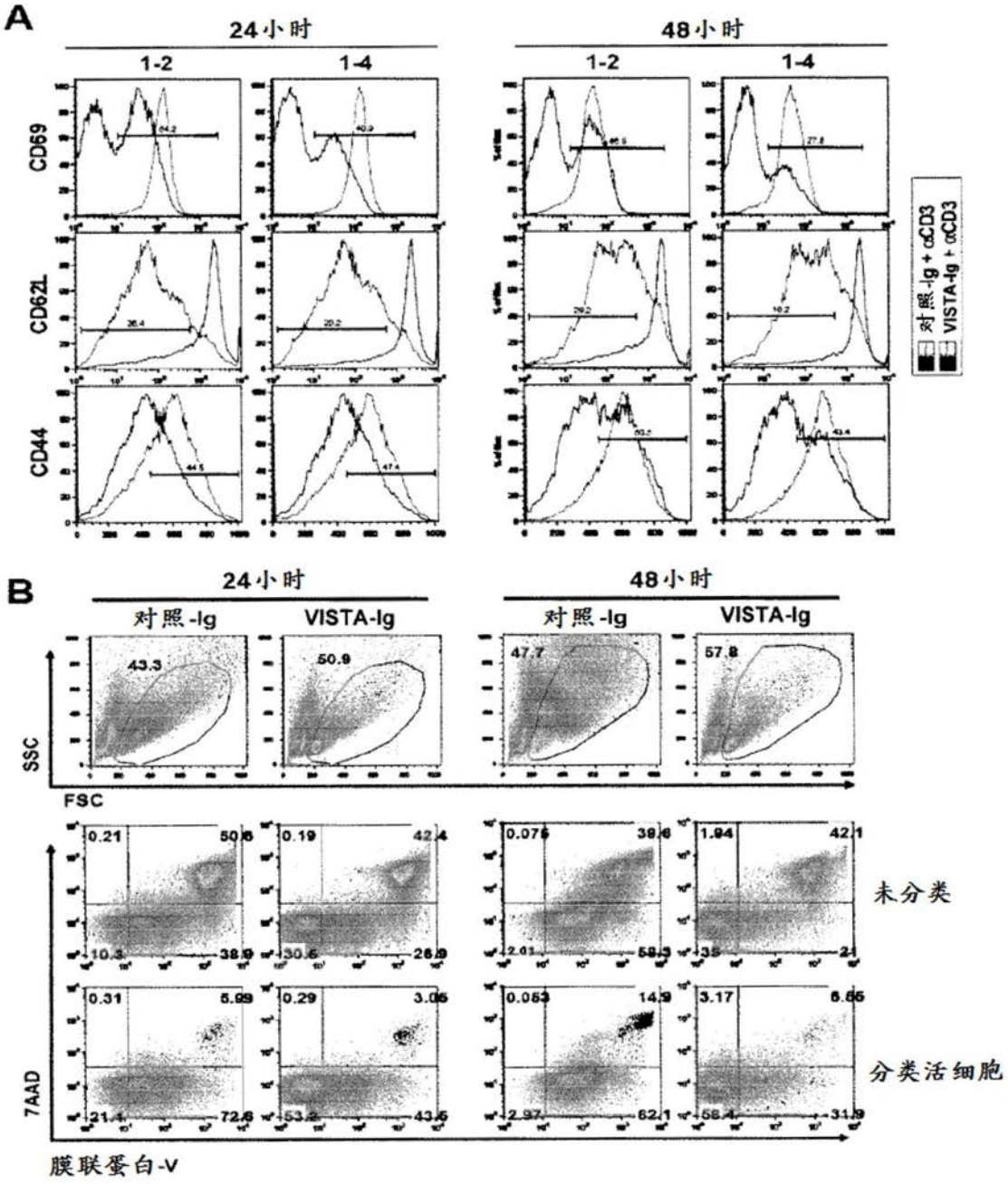
A
24小时
48小时
1-2
1-4
CD69
CD62L
CD44
对照-Ig + αCD3
VISTA-Ig + αCD3
B
24小时
48小时
对照-Ig
VISTA-Ig
SSC
FSC
7AAD
膜联蛋白-V
未分类
分类活细胞

图12

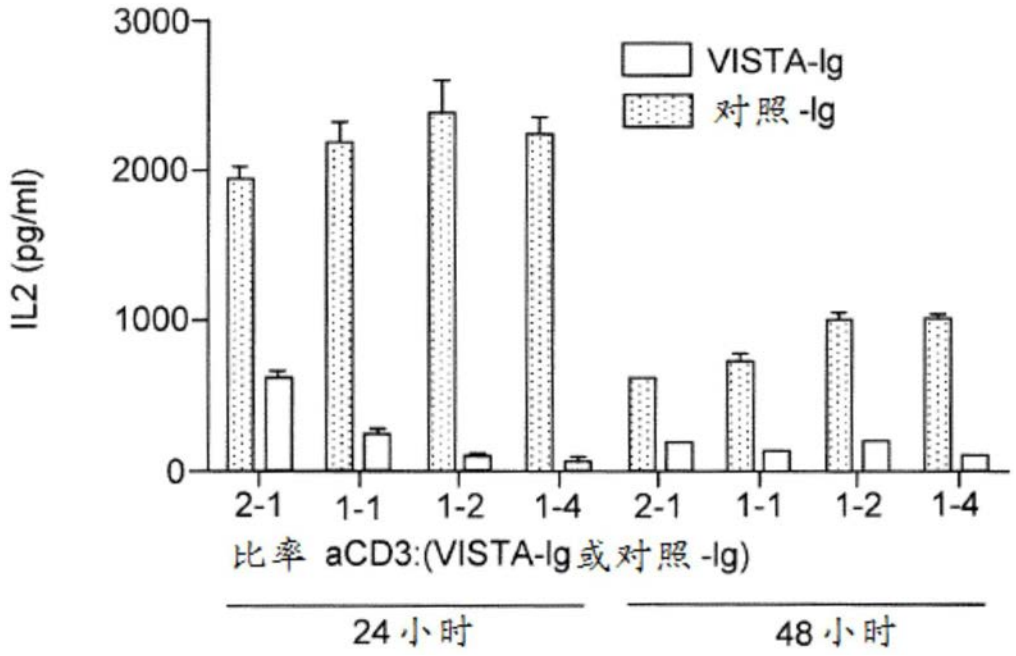
3000
2000
1000
0
IL2 (pg/ml)
VISTA-Ig
对照 -Ig
2-1
1-1
1-2
1-4
2-1
1-1
1-2
1-4
比率 aCD3:(VISTA-Ig或对照 -Ig)
24 小时
48 小时

图13A

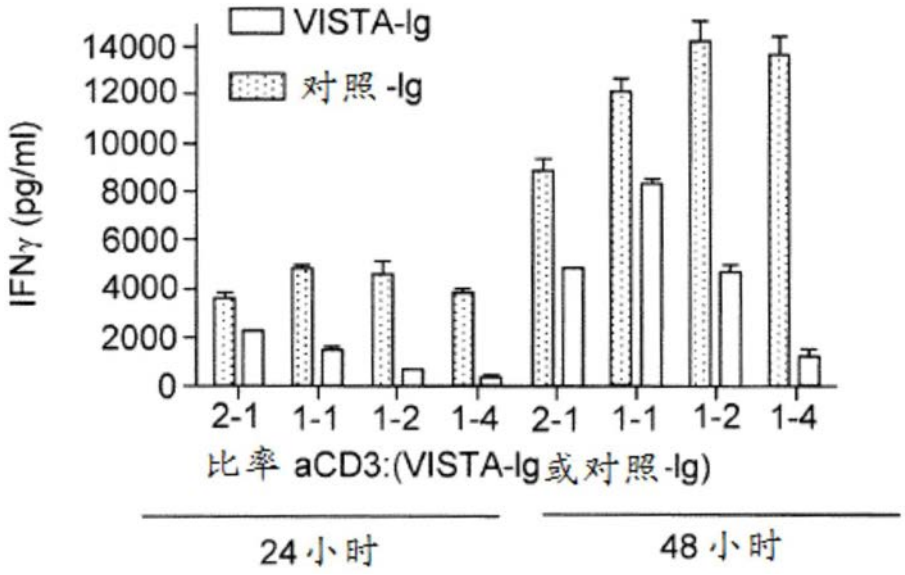
VISTA-Ig
对照 -Ig
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
IFNγ (pg/ml)
2-1
1-1
1-2
1-4
2-1
1-1
1-2
1-4
比率 aCD3:(VISTA-Ig或对照 -Ig)
24 小时
48 小时

图13B

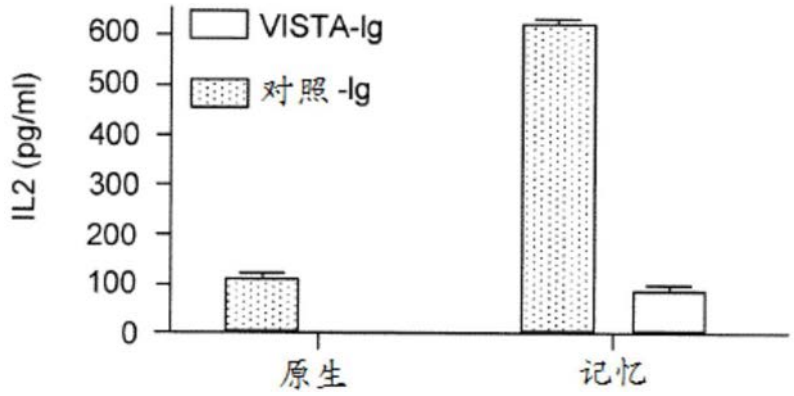

图13C

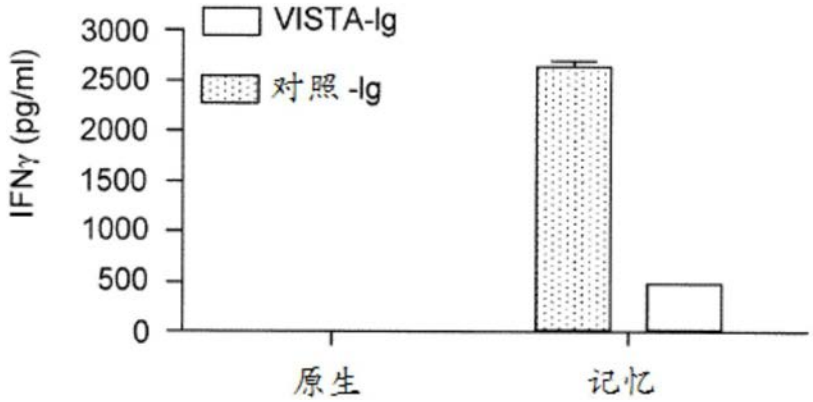

图13D

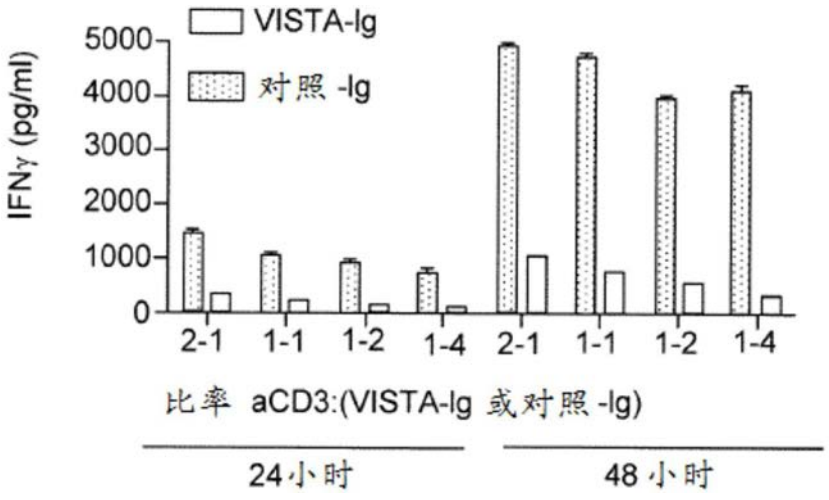

图13E

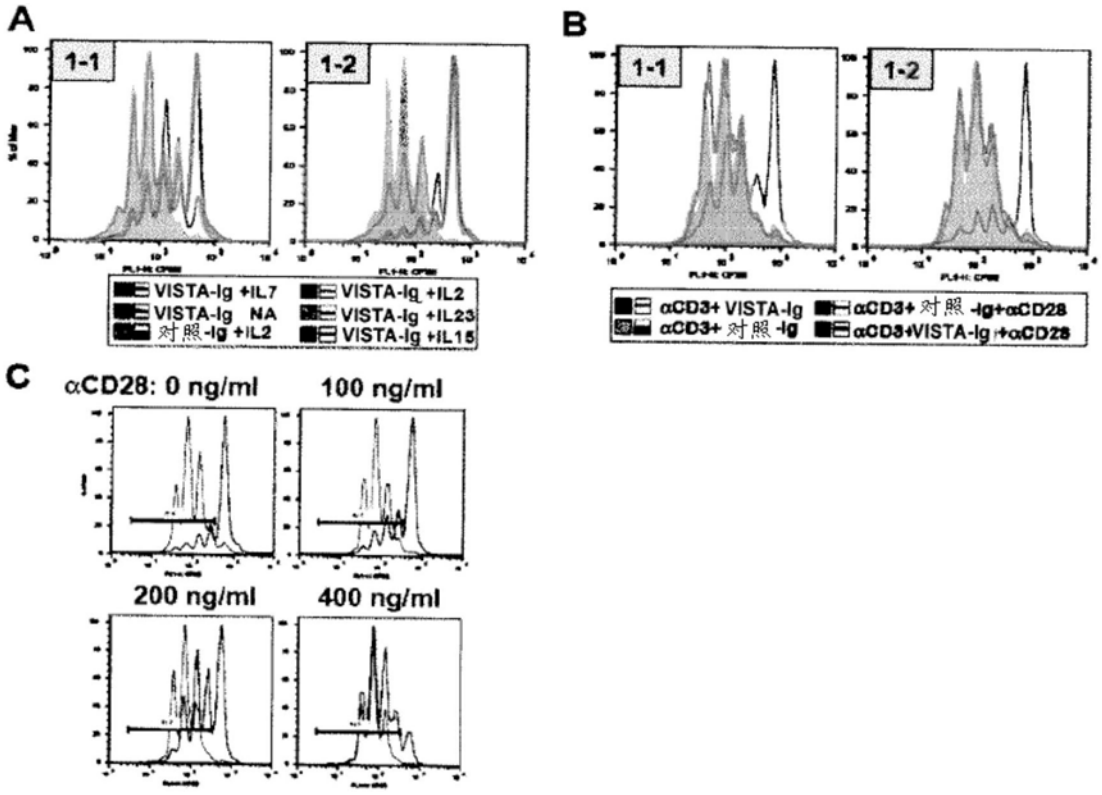
A
1-1
1-2
VISTA-Ig +IL7
VISTA-Ig NA
对照-Ig +IL2
VISTA-Ig +IL2
VISTA-Ig +IL23
VISTA-Ig +IL15
B
1-1
1-2
αCD3+ VISTA-Ig
αCD3+ 对照 -Ig
αCD3+ 对照 -Ig+αCD28
αCD3+VISTA-Ig +αCD28
C
αCD28: 0 ng/ml
100 ng/ml
200 ng/ml
400 ng/ml

图14

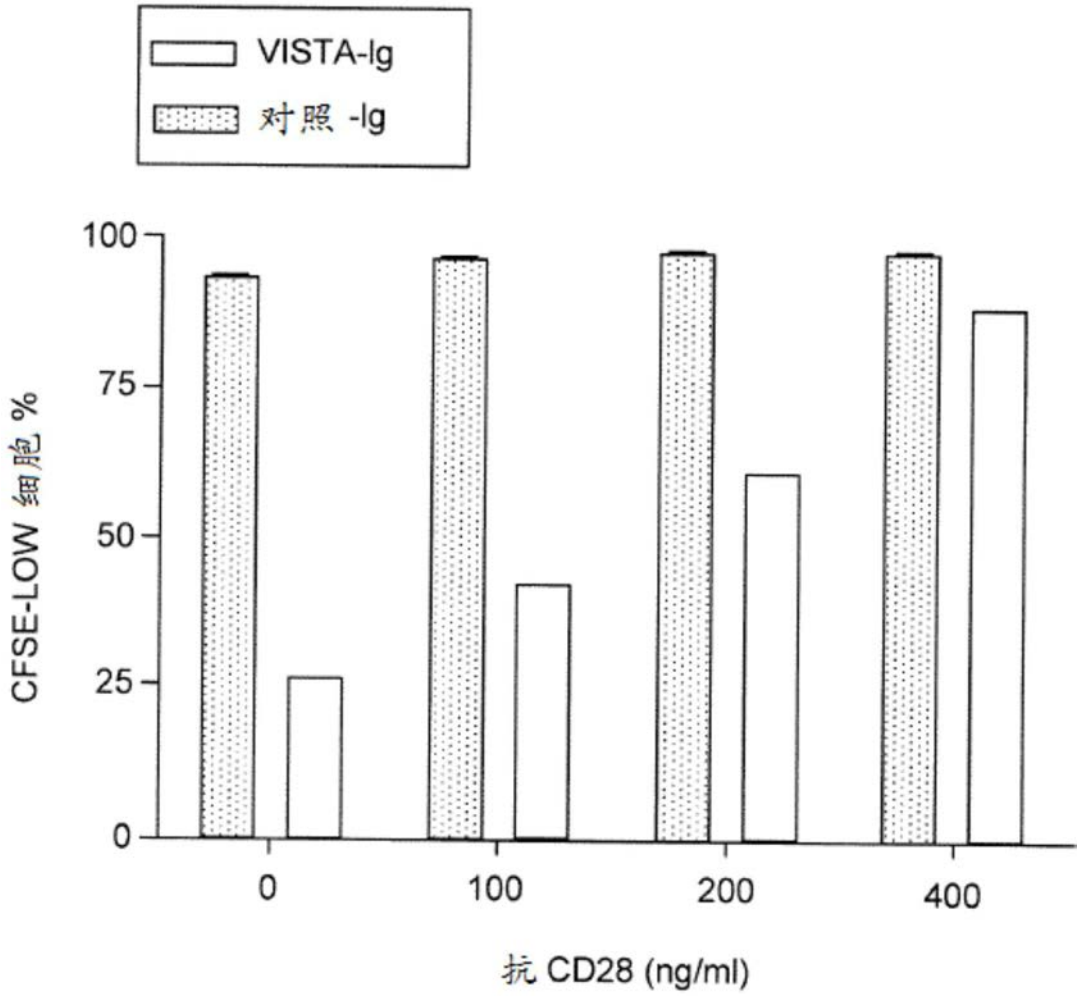
VISTA-Ig
对照 -Ig
CFSE-LOW 细胞 %
100
75
50
25
0
0
100
200
400
抗 CD28 (ng/ml)

图14D

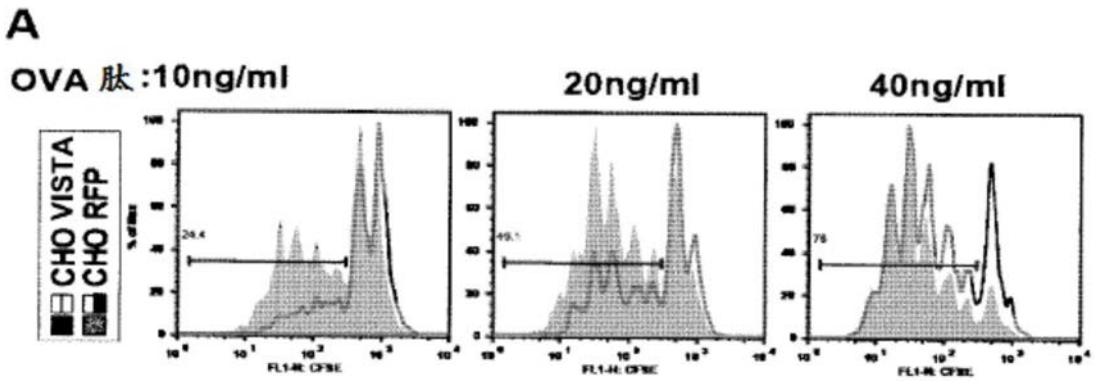
A
OVA 肽:10ng/ml
20ng/ml
40ng/ml
CHO VISTA
CHO RFP

图15A

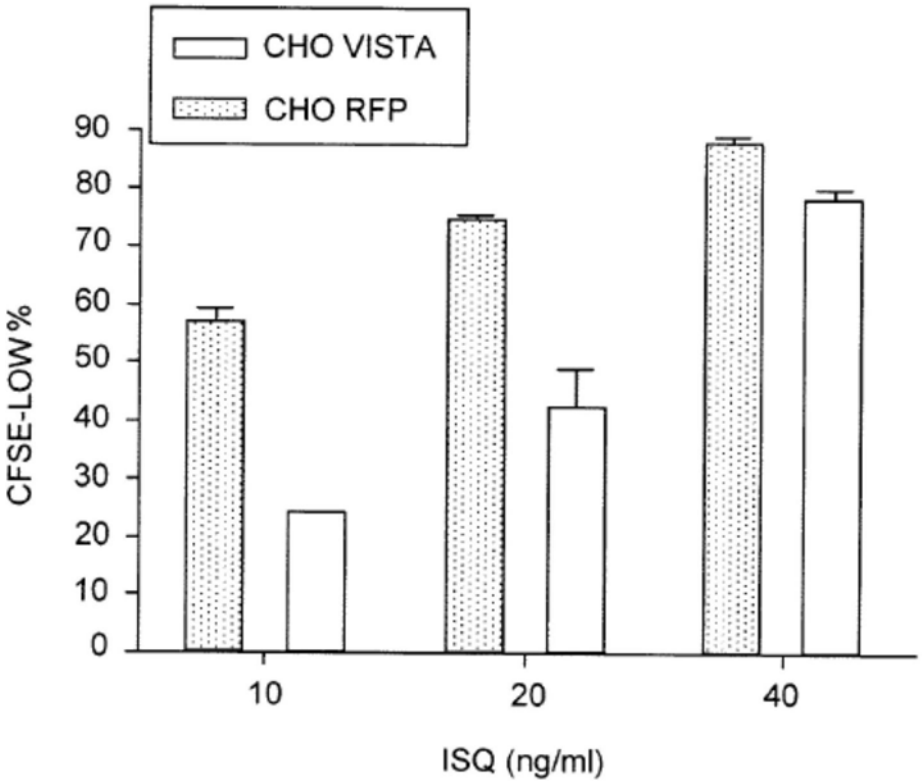
CHO VISTA
CHO RFP
CFSE-LOW %
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
20
40
ISQ (ng/ml)

图15B

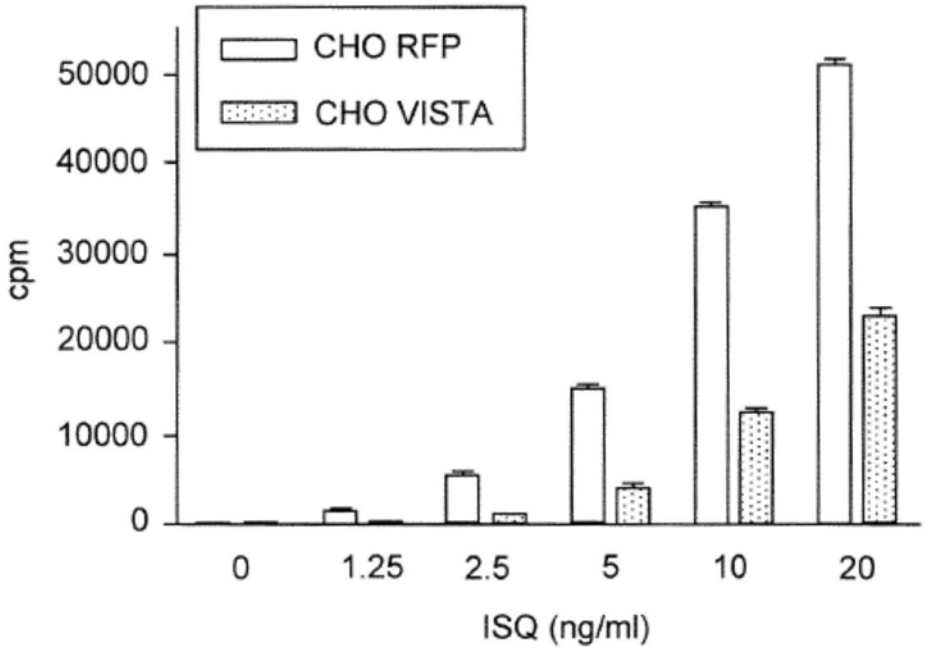
CHO RFP
CHO VISTA
cpm
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
1.25
2.5
5
10
20
ISQ (ng/ml)

图15C

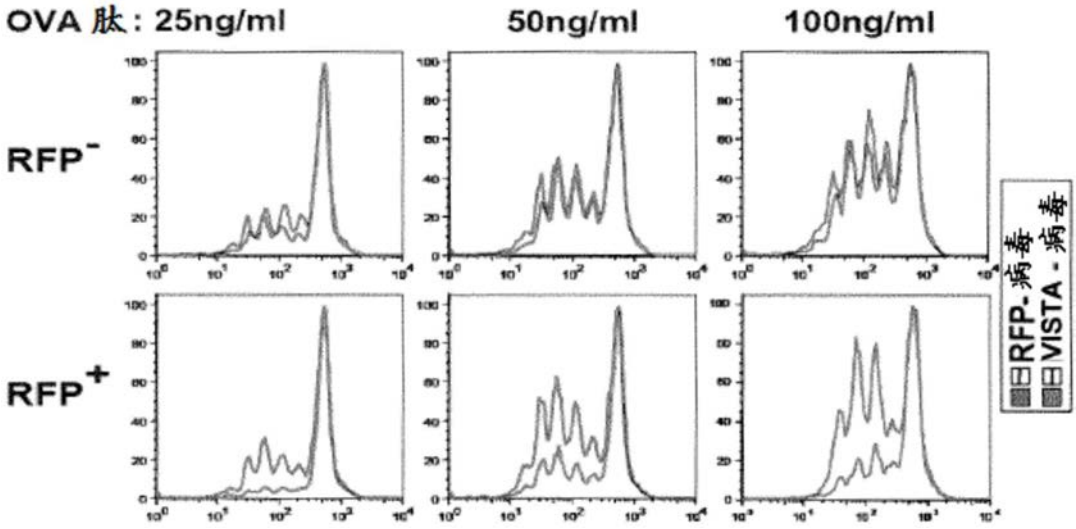
OVA 肽：25ng/ml
50ng/ml
100ng/ml
RFP-
RFP+
RFP-病毒
VISTA - 病毒

图15D

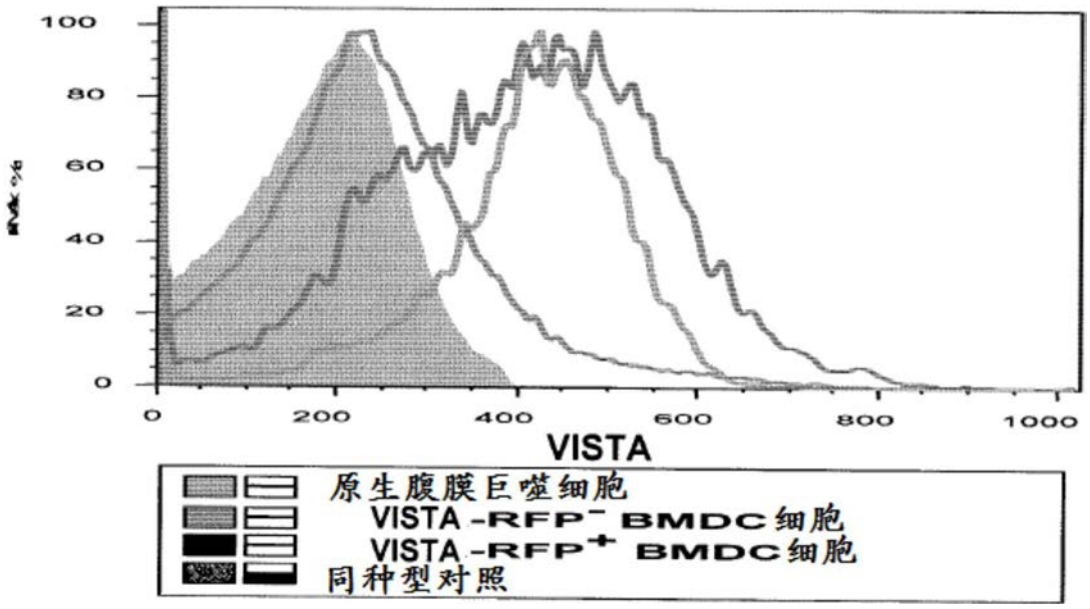
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
800
1000
VISTA
原生腹膜巨噬细胞
VISTA -RFP⁻ BMDC细胞
VISTA -RFP⁺ BMDC细胞
同种型对照

图16

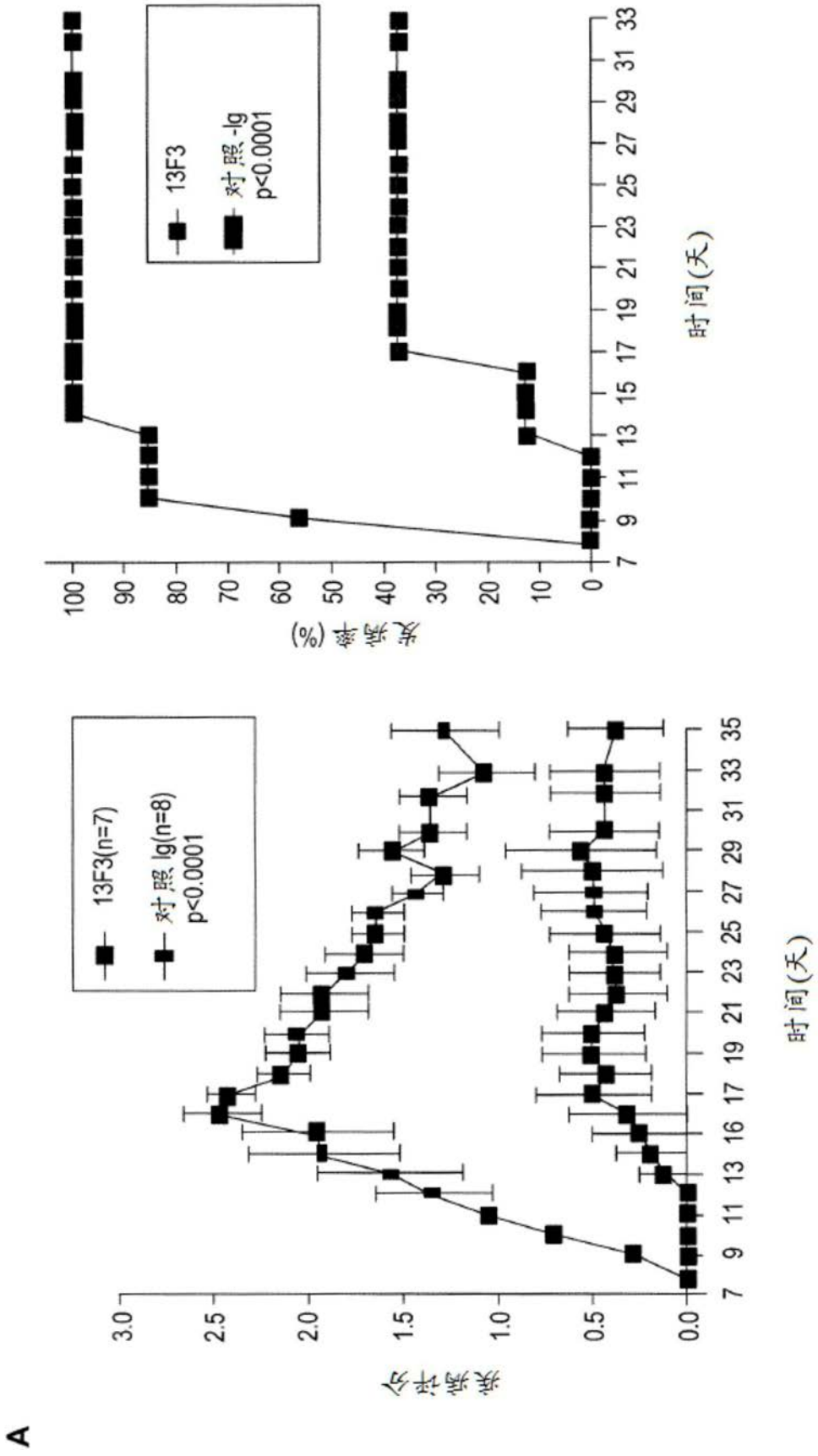

图17

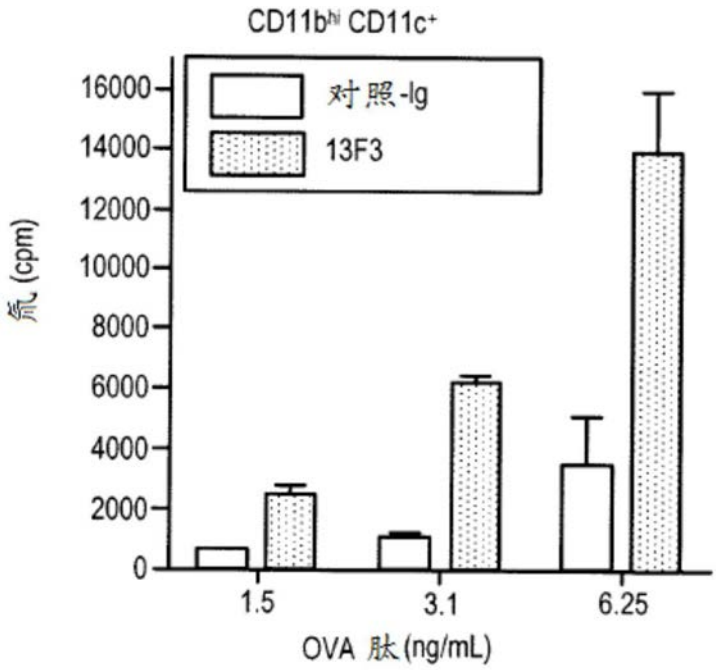
CD11b^hi CD11c+
对照-Ig
13F3
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
氚 (cpm)
1.5
3.1
6.25
OVA 肽(ng/mL)

图18

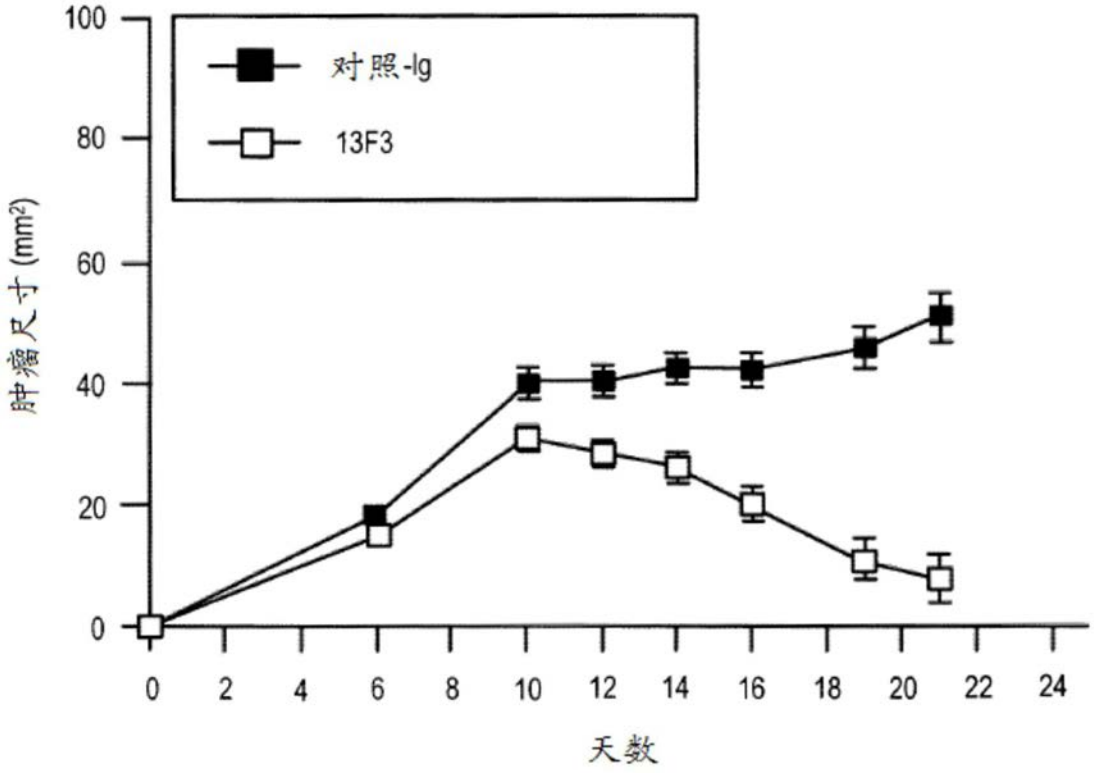
对照-Ig
13F3
100
80
60
40
20
0
肿瘤尺寸 (mm²)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
天数

图19

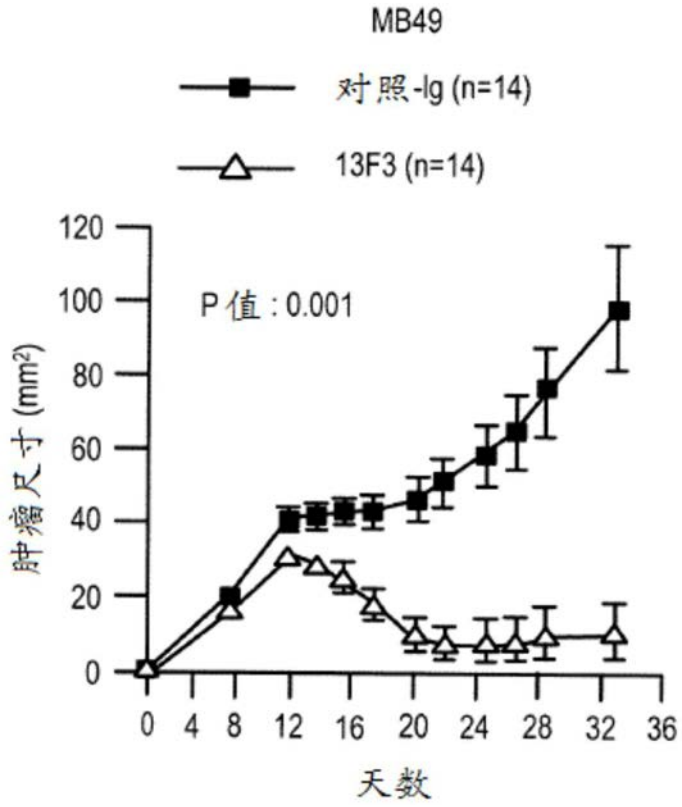
MB49
对照-Ig (n=14)
13F3 (n=14)
P 值 : 0.001
肿瘤尺寸 (mm²)
120
100
80
60
40
20
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36
天数

图20A

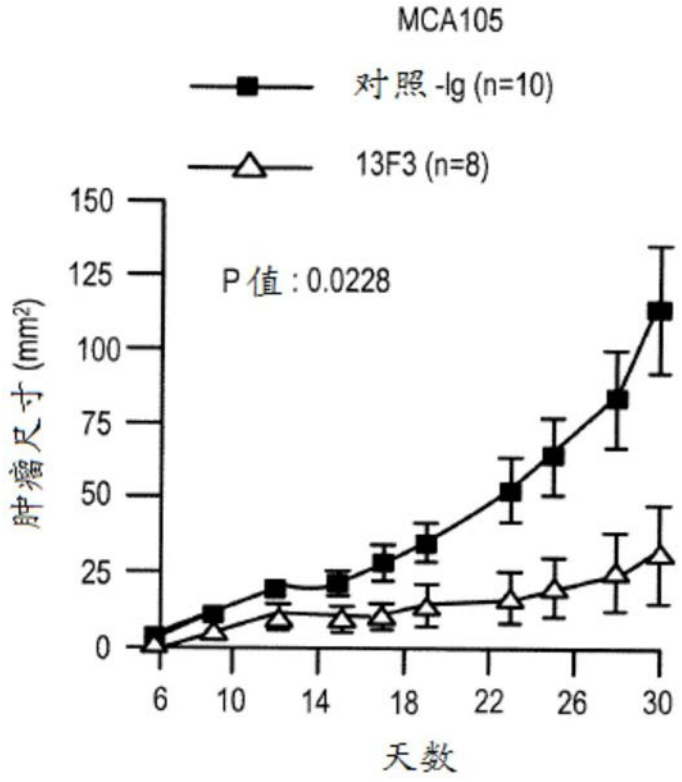
MCA105
对照 -Ig (n=10)
13F3 (n=8)
P 值 : 0.0228
肿瘤尺寸 (mm²)
150
125
100
75
50
25
0
6 10 14 18 22 26 30
天数

图20B

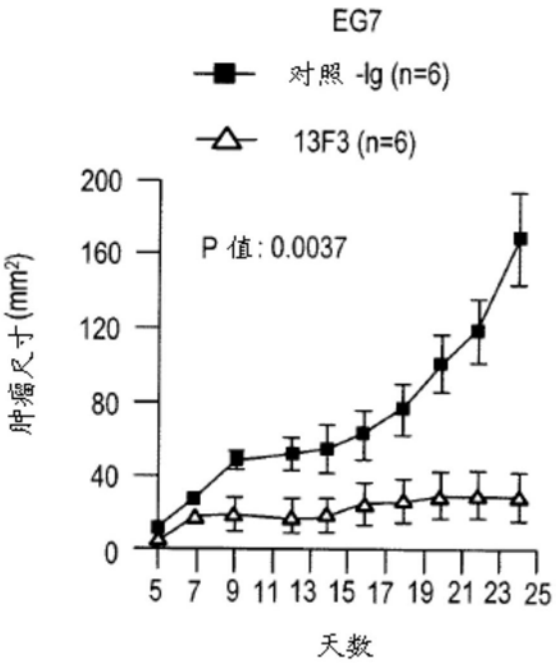
EG7
对照 -Ig (n=6)
13F3 (n=6)
P 值: 0.0037
肿瘤尺寸 (mm²)
200
160
120
80
40
0
5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25
天数

图20C

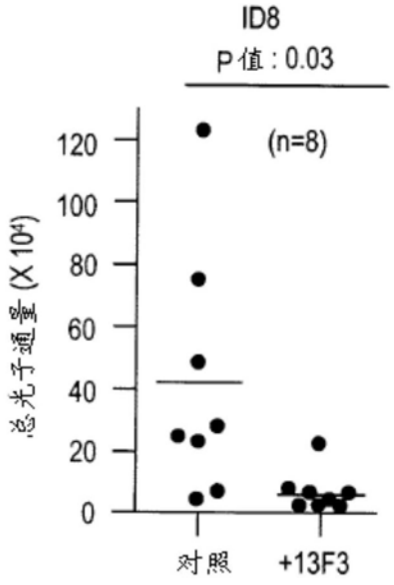
ID8
P 值 : 0.03
(n=8)
总光子通量 (X 10⁴)
120
100
80
60
40
20
0
对照
+13F3

图20D

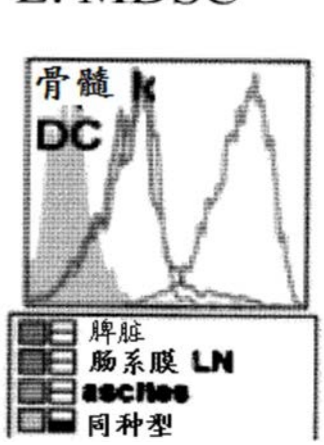

图20E

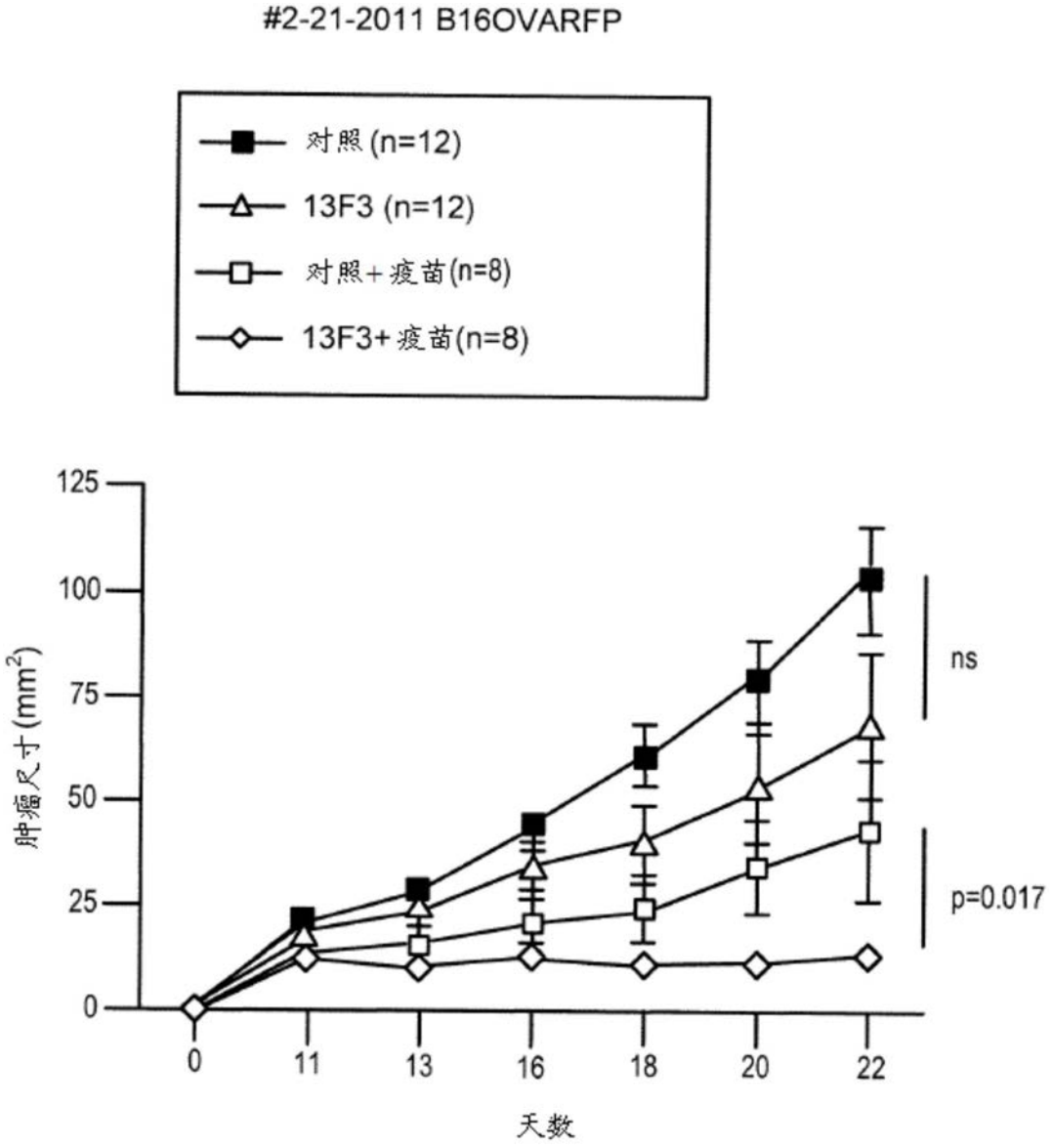
#2-21-2011 B16OVARFP
对照(n=12)
13F3 (n=12)
对照+疫苗(n=8)
13F3+疫苗(n=8)
肿瘤尺寸(mm²)
125
100
75
50
25
0
0
11
13
16
18
20
22
天数
ns
p=0.017

图21

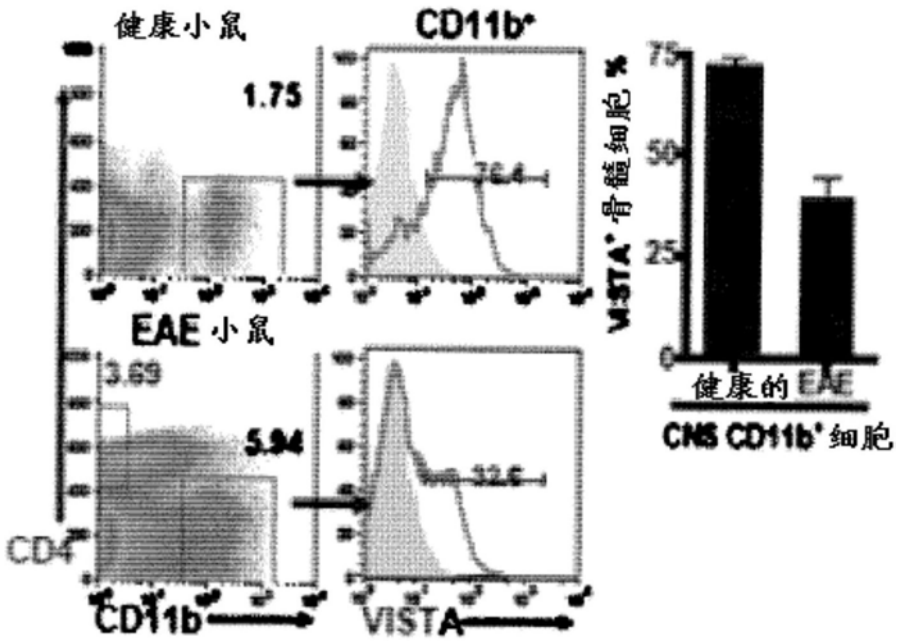

图22

MGVPAVPEASSPRWGTLLLAIFLAASRGLVAA**FKVTTPYSLYVCPEGQNATLTC**
RILGPVSKGHDVTIYKTWYLSSRGEVQMCKEHRPIRNFTLQHLQHHGSHLKAN
ASHDQPQKHGLELASDHHGNFSITLRNVTPRDSGLYCCLVIELKNHHPEQRFYG
SMELQVQ*AGKGSGSTCMASNEQDSDSITAA*ALATGACIVGILCLPLILLLVYKQRQ
VASHRRAQELVRMDSSNTQGIENPGFETTPPFQGMPEAKTRPPLSYVAQRQPS
ESGRYLLSDPSTPLSPPGPGDVFFPSLDPVPDSPNSEAI
(SEQ ID NO: 17)

图23A

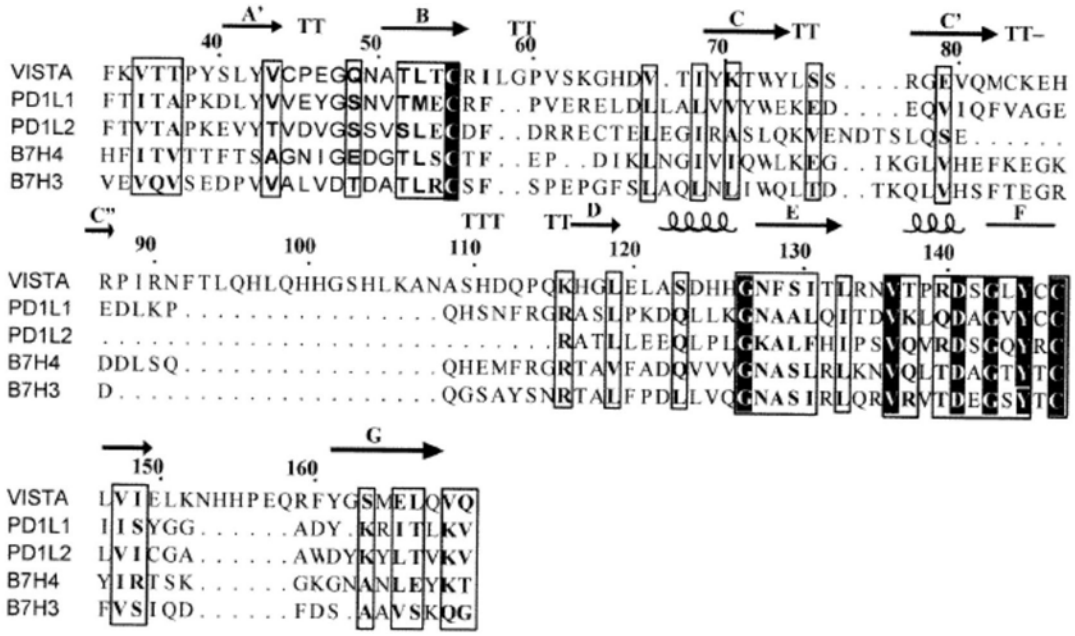
A'
B
C
C'
C"
D
E
F
G
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
VISTA FKVTTPYSLYVCPEGQNATLTCRILGPVSKGHDV.TIYKTWYLSS....RGEVQMCKEH
PD1L1 FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRF..PVERELDLLALVVYWEKED....EQVIQFVAGE
PD1L2 FTVTAPKEVYTVDVGSSVSLECDF..DRRECTELEGIRASLQKVENDTSLQSE.....
B7H4 HFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCTF..EP..DIKLNGIVIQWLKEG..IKGLVHEFKEGK
B7H3 VEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSF..SPEPGFSLAQLNLIWQLTD..TKQLVHSFTEGR
VISTA RPIRNFTLQHLQHHGSHLKANASHDQPQKHGLELASDHHGNFSITLRNVTPRDSGLYCG
PD1L1 EDLKP.....QHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCG
PD1L2 .....RATLLEEQLPLGKALFHIPSVQVRDSGQYRC
B7H4 DDLSQ.....QHEMFRGRTAVFADQVVVGNASLRLKNVQLTDAGTYTC
B7H3 D.....QGSAYSNRTALFPDLLVQGNASIRLQRVRVTDEGSYTC
VISTA LVIELKNHHPEQRFYGSMELQVQ
PD1L1 IISYGG.....ADY.KRITLKV
PD1L2 LVICGA.....AWDYKYLTVKV
B7H4 YIRTSK.....GKGNANLEYKT
B7H3 FVSIQD.....FDS.AAVSKQG

图23B

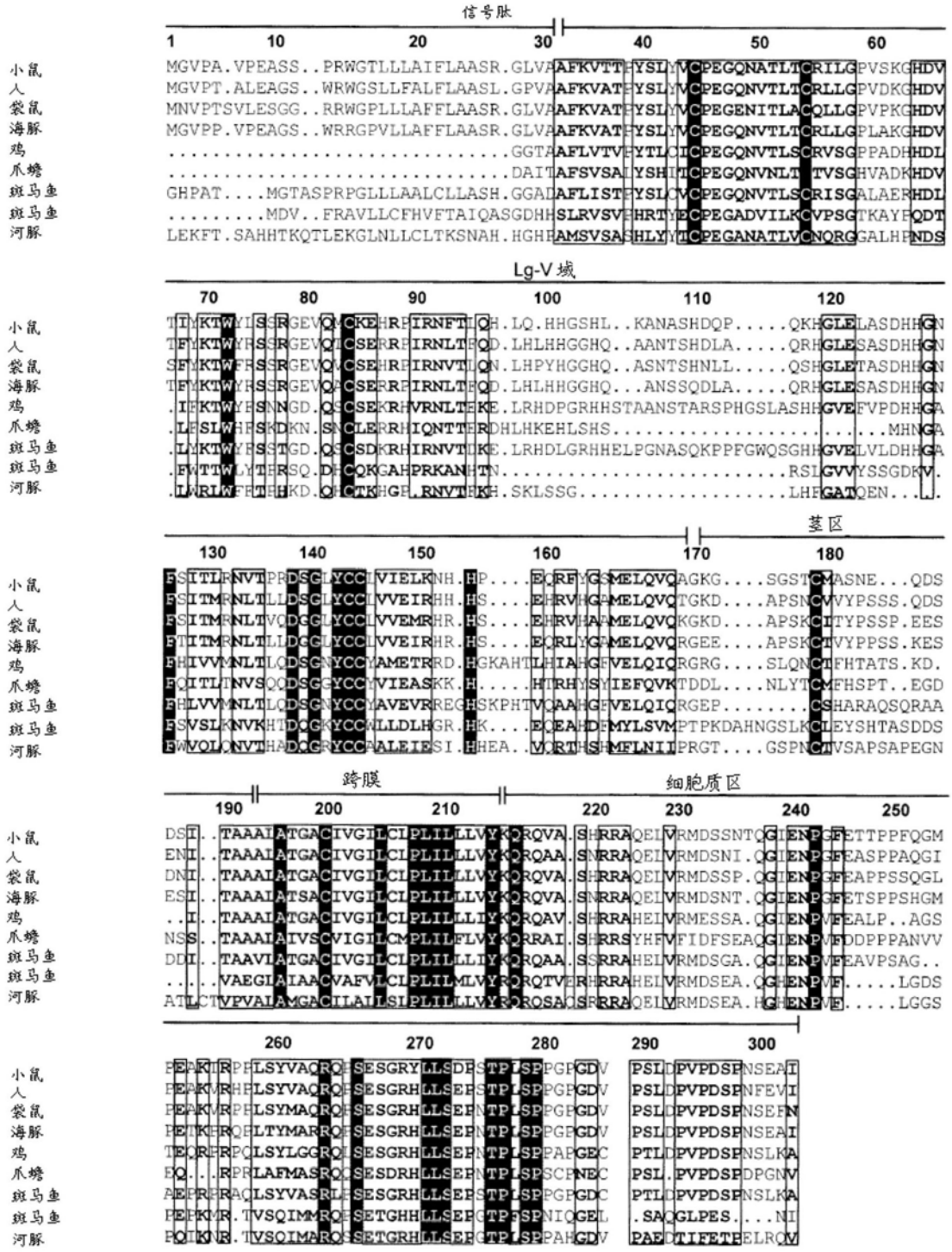

图23C

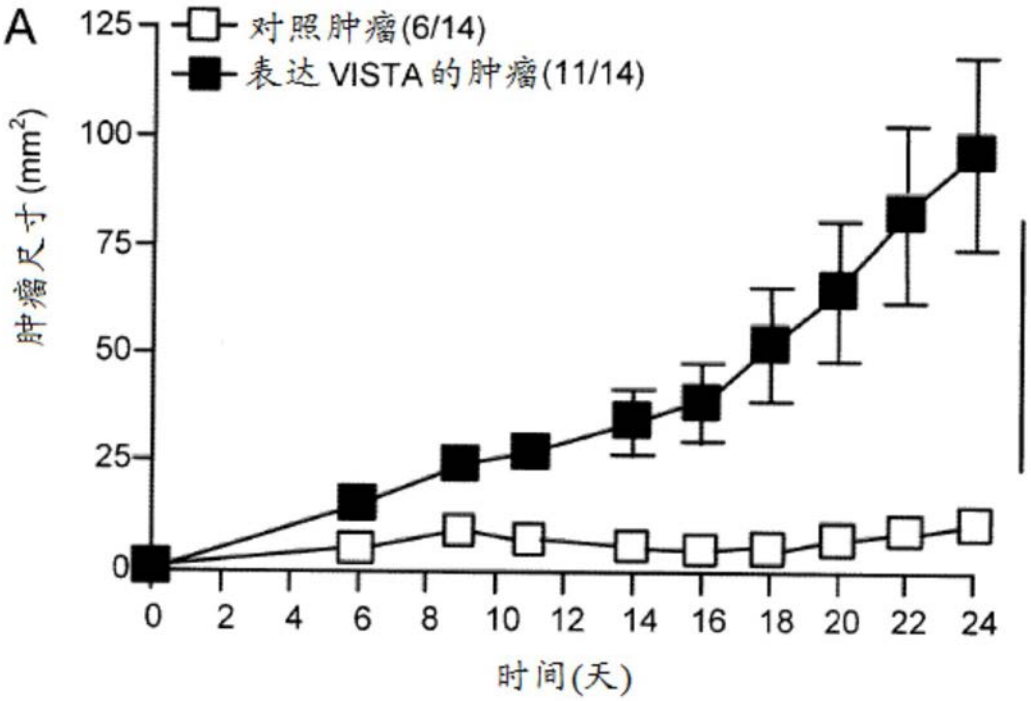
A
对照肿瘤(6/14)
表达 VISTA 的肿瘤(11/14)
肿瘤尺寸 (mm²)
125
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
时间(天)

图24A

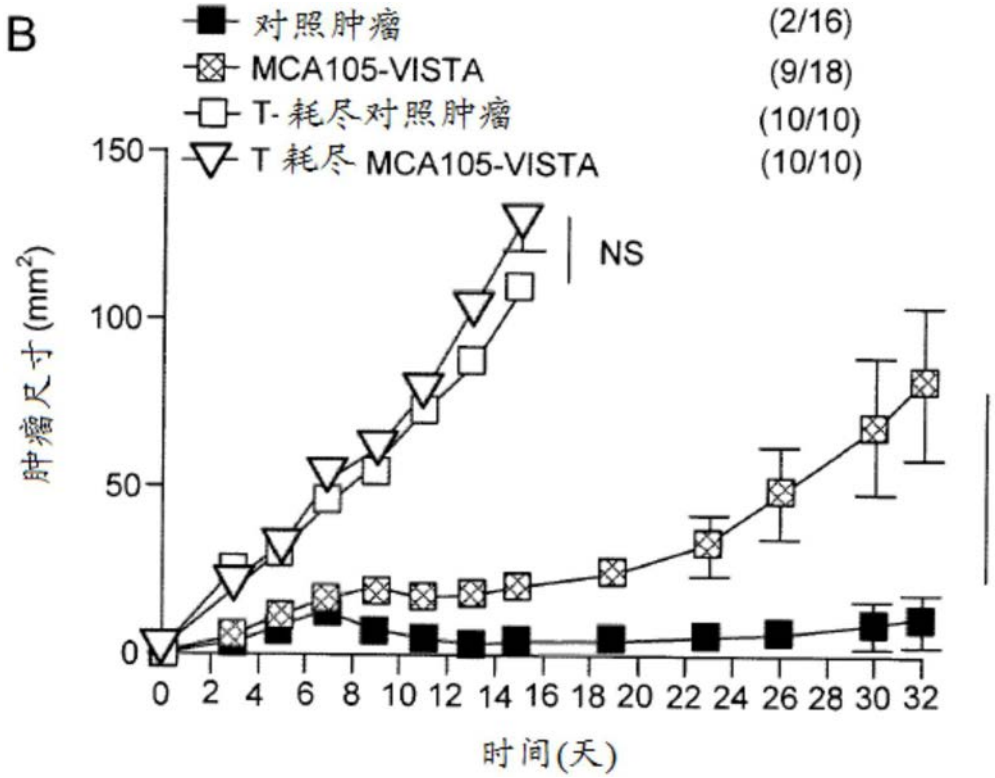
B
对照肿瘤 (2/16)
MCA105-VISTA (9/18)
T-耗尽对照肿瘤 (10/10)
T 耗尽 MCA105-VISTA (10/10)
NS
肿瘤尺寸 (mm²)
150
100
50
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32
时间(天)

图24B

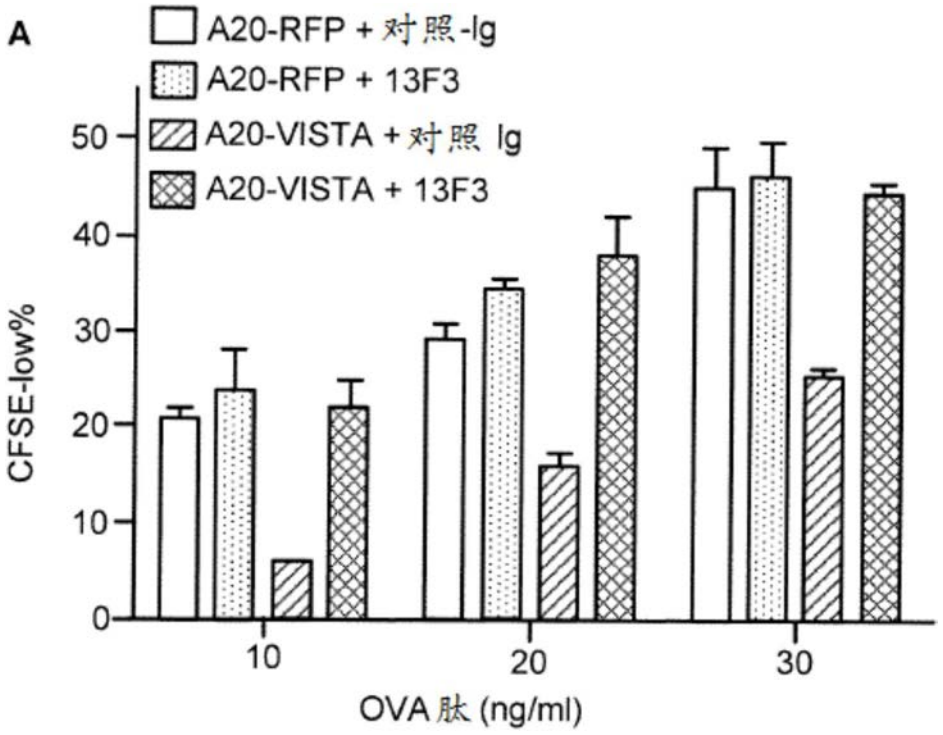
A
A20-RFP + 对照-Ig
A20-RFP + 13F3
A20-VISTA + 对照 Ig
A20-VISTA + 13F3
CFSE-low%
0
10
20
30
40
50
10
20
30
OVA 肽 (ng/ml)

图25A

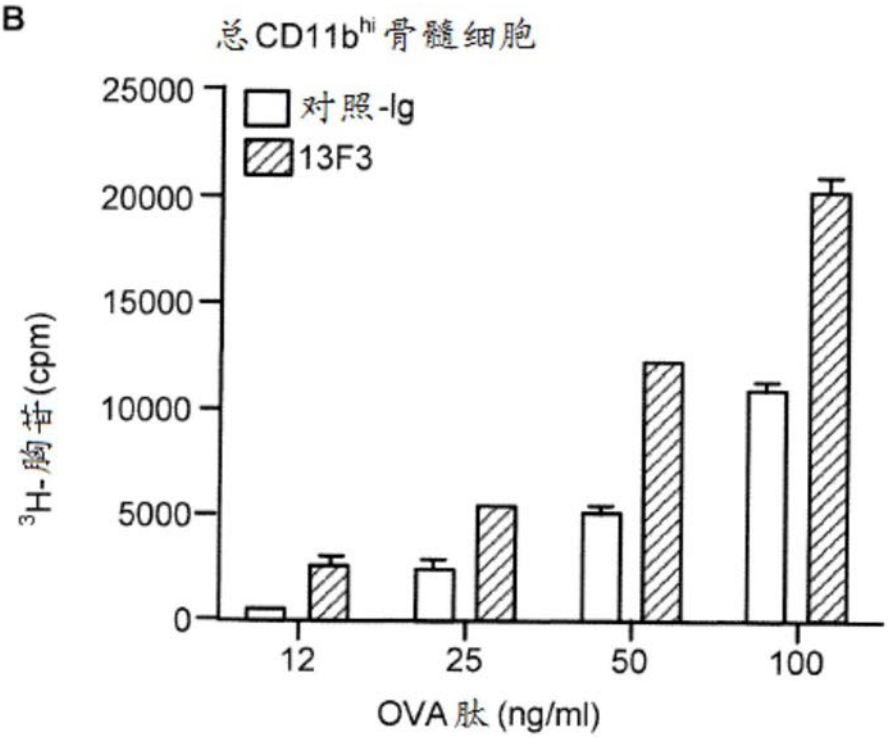
B
总 CD11b^hi 骨髓细胞
对照-Ig
13F3
3H-胸苷(cpm)
0
5000
10000
15000
20000
25000
12
25
50
100
OVA 肽 (ng/ml)

图25B

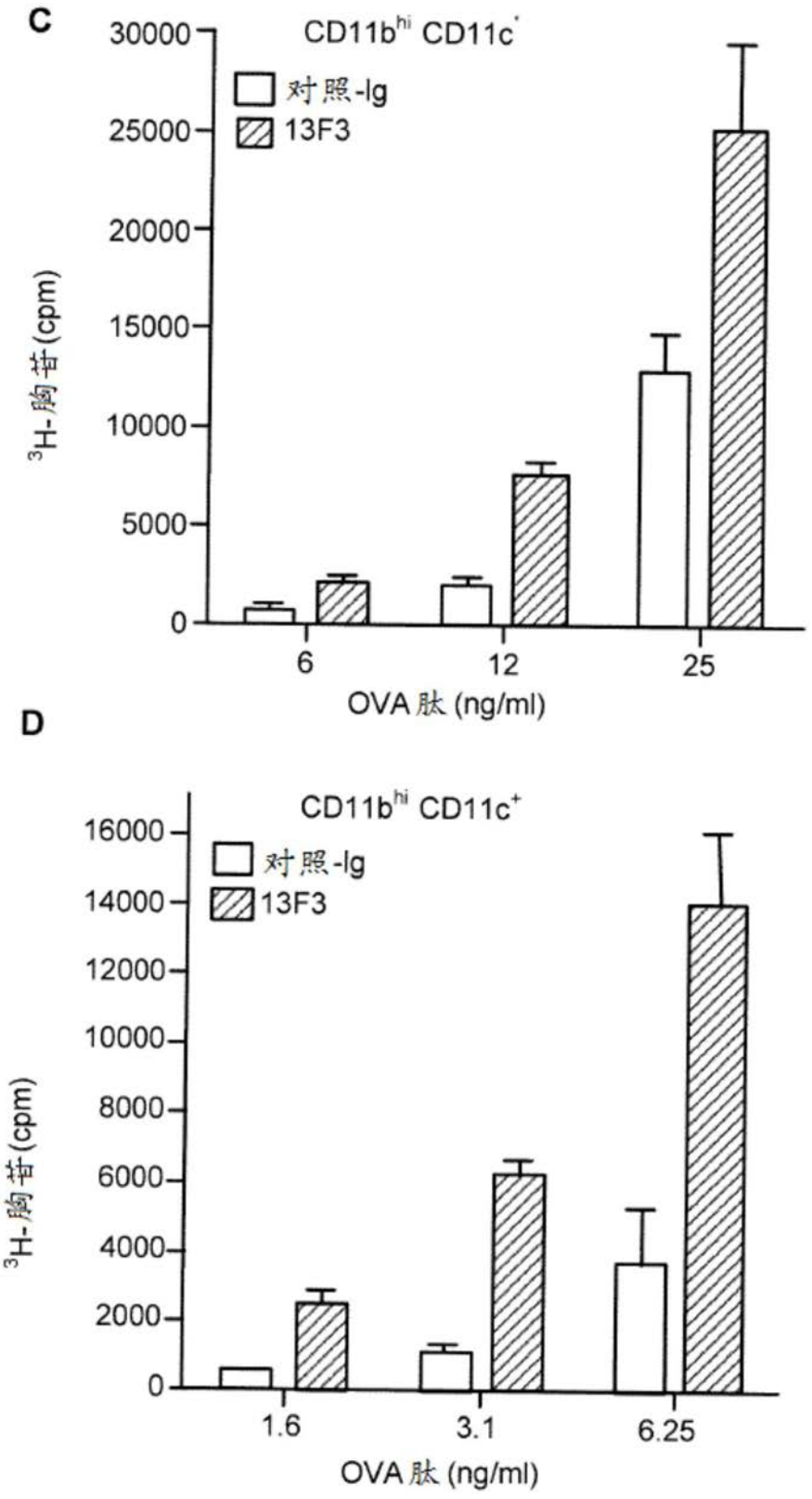
C
CD11b^hi CD11c^+
对照-Ig
13F3
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
3H-胸苷(cpm)
6
12
25
OVA 肽 (ng/ml)
D
CD11b^hi CD11c^+
对照-Ig
13F3
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
3H-胸苷(cpm)
1.6
3.1
6.25
OVA 肽 (ng/ml)

图25

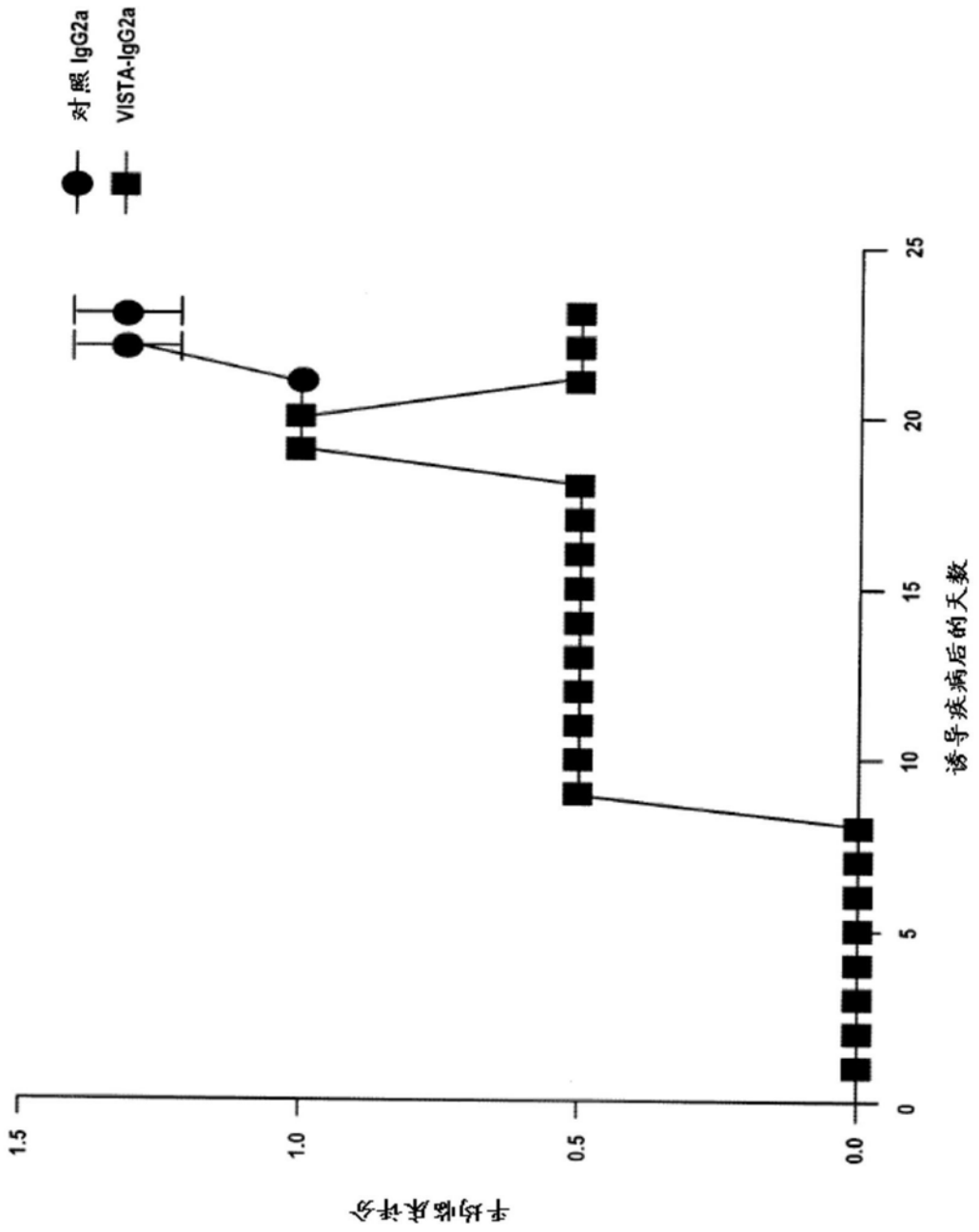

图26

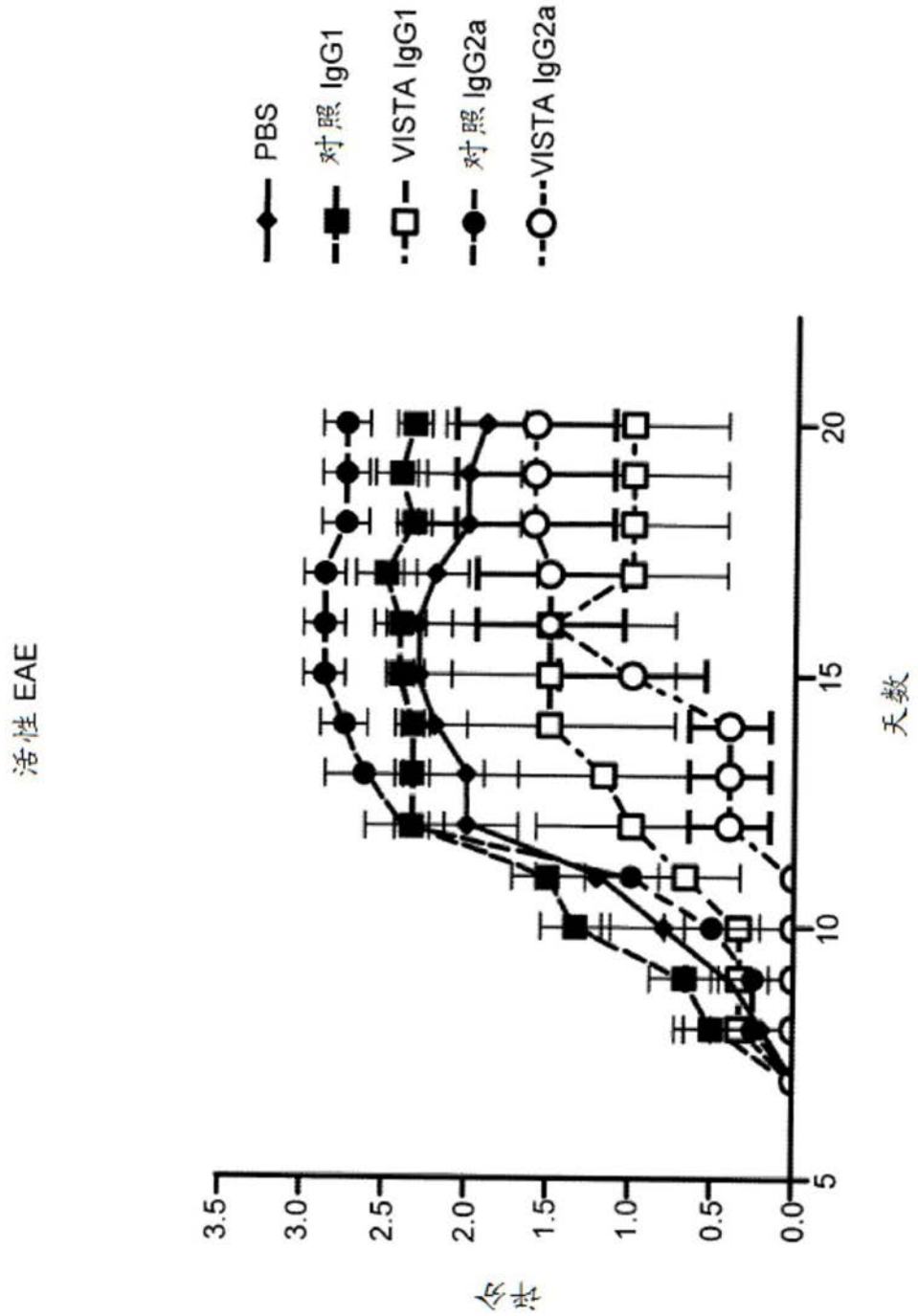
PBS
对照 IgG1
VISTA IgG1
对照 IgG2a
VISTA IgG2a
活性 EAE
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
5
10
15
20
天数

图27

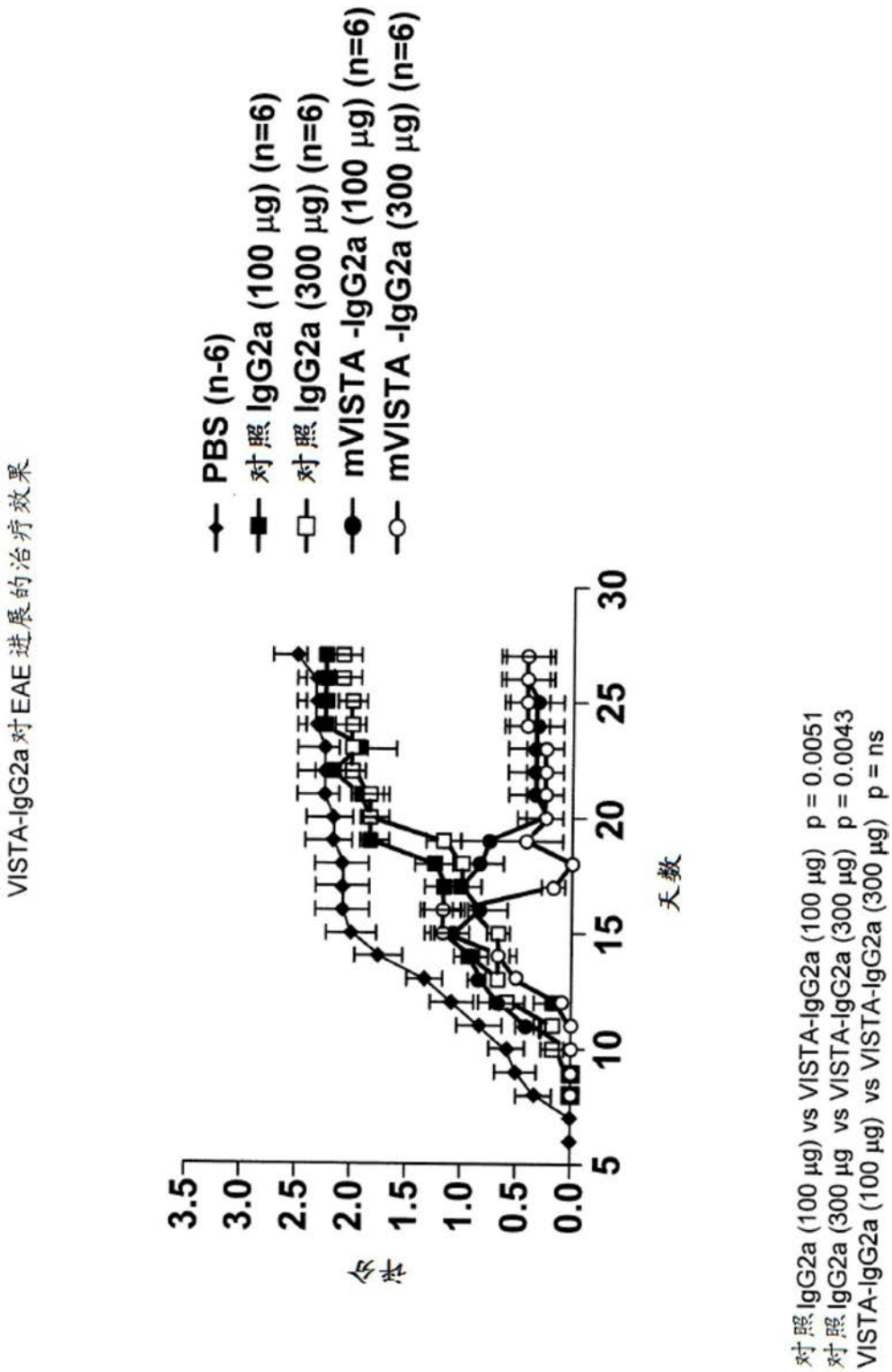
VISTA-IgG2a对EAE进展的治疗效果
PBS (n-6)
对照 IgG2a (100 μg) (n=6)
对照 IgG2a (300 μg) (n=6)
mVISTA -IgG2a (100 μg) (n=6)
mVISTA -IgG2a (300 μg) (n=6)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
5
10
15
20
25
30
天数
对照 IgG2a (100 μg) vs VISTA-IgG2a (100 μg) p = 0.0051
对照 IgG2a (300 μg vs VISTA-IgG2a (300 μg) p = 0.0043
VISTA-IgG2a (100 μg) vs VISTA-IgG2a (300 μg) p = ns

图28

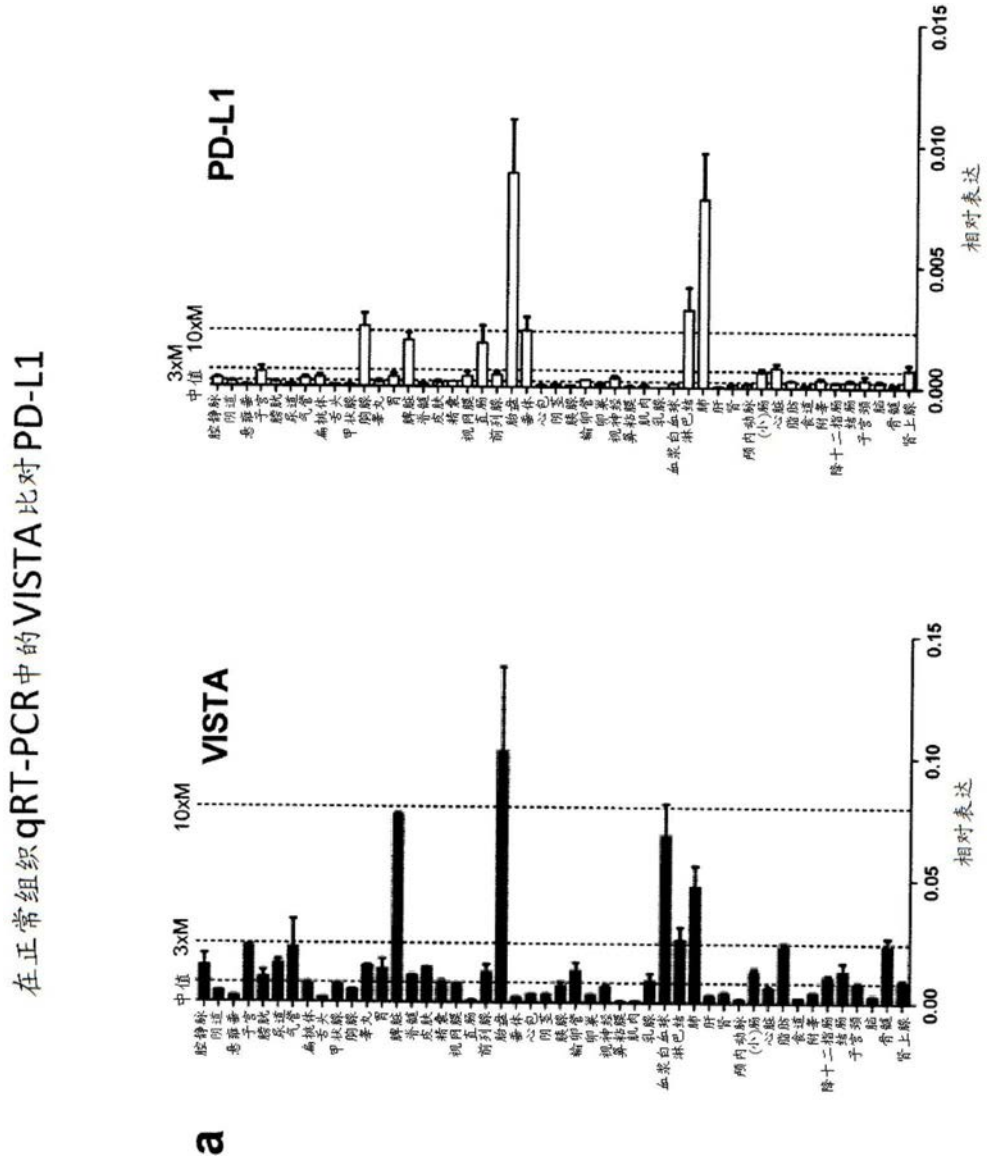
在正常组织qRT-PCR中的VISTA比对PD-L1
a
VISTA
PD-L1
中值
3xM
10xM
相对表达
0.00
0.05
0.10
0.15
0.000
0.005
0.010
0.015

图29

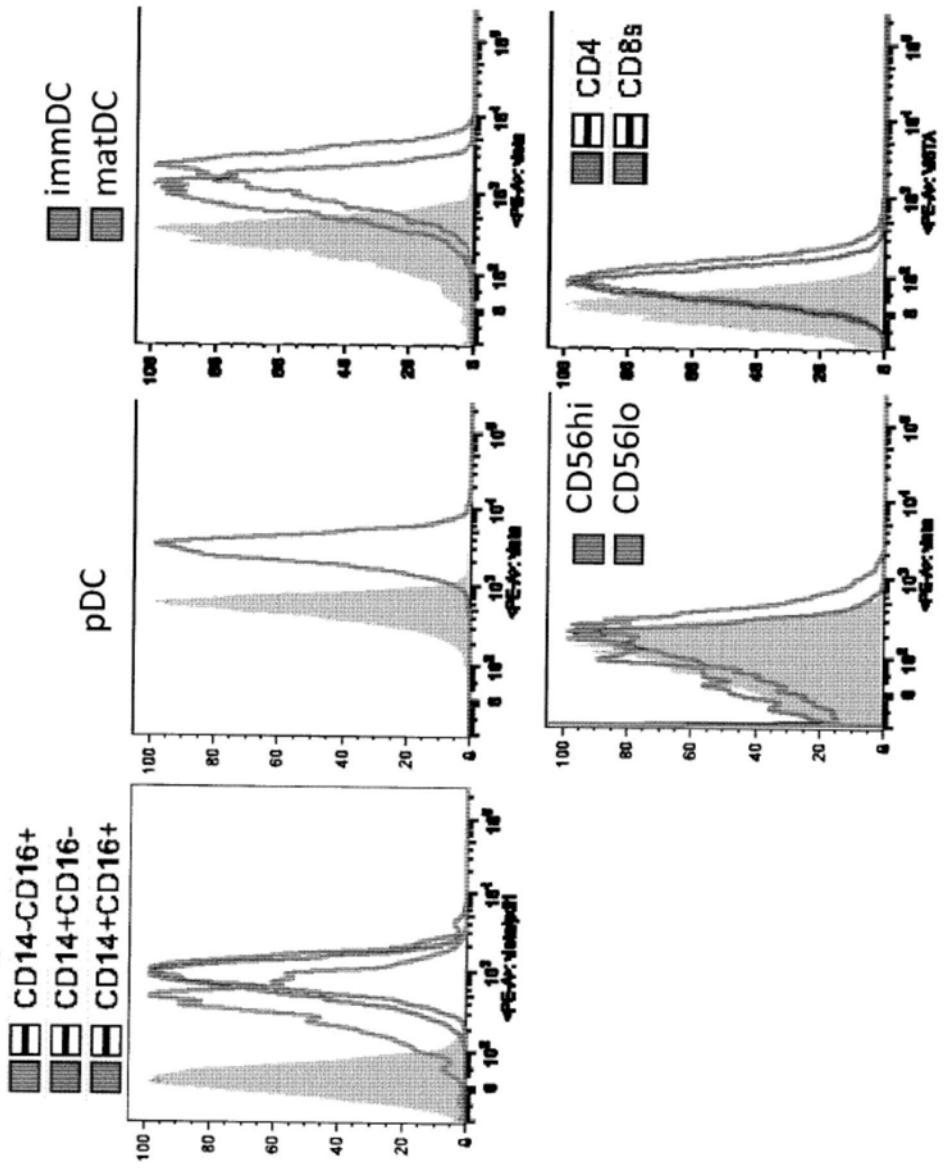
CD14-CD16+
CD14+CD16-
CD14+CD16+
pDC
immDC
matDC
CD56hi
CD56lo
CD4
CD8s

图30

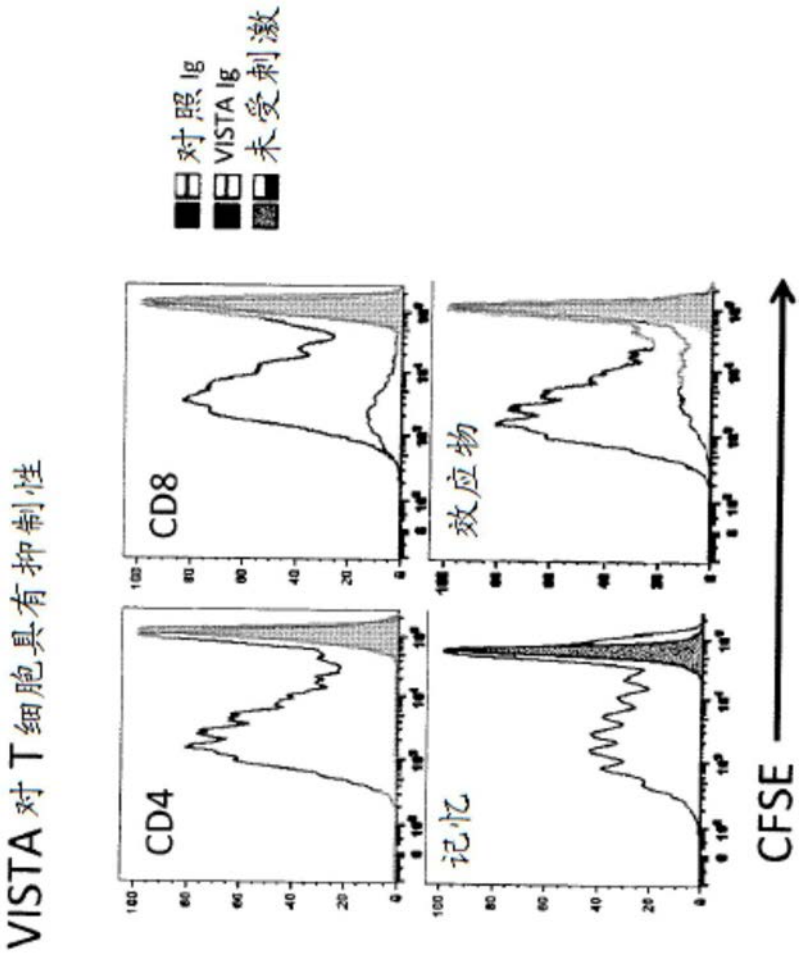

图31

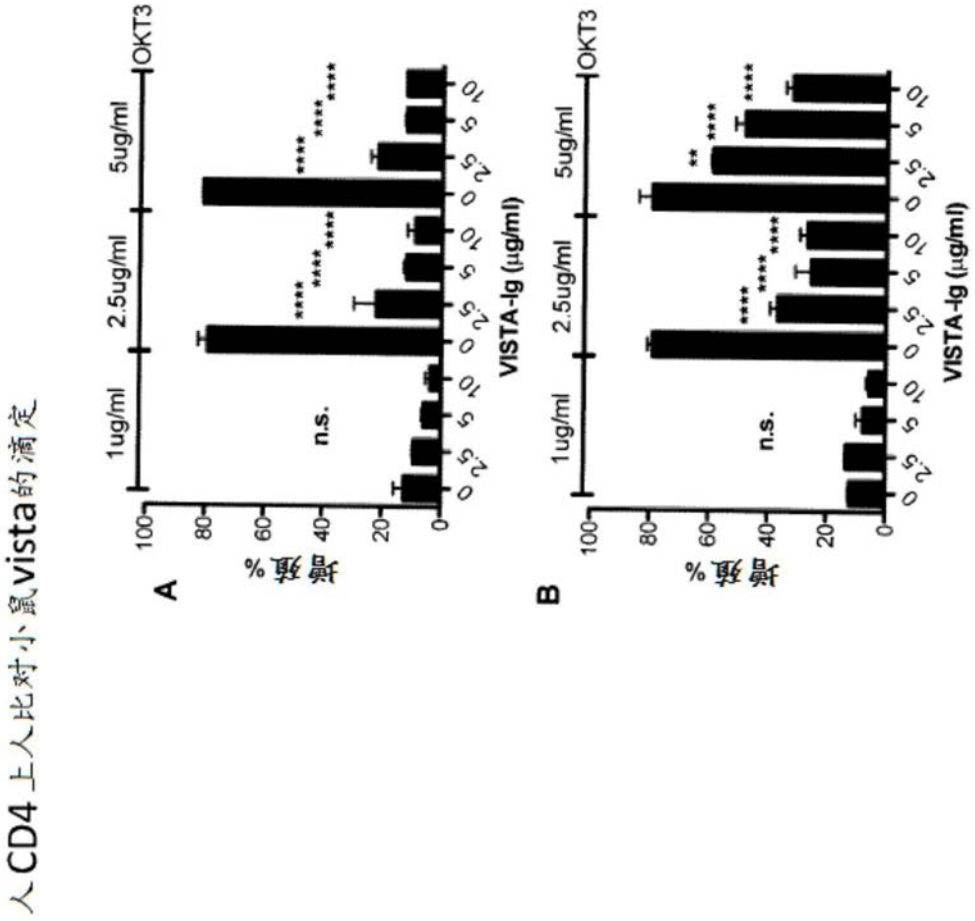
人CD4 上人比对小鼠vista的滴定
A
B
增殖 %
VISTA-Ig (μg/ml)
1ug/ml
2.5ug/ml
5ug/ml
OKT3
n.s.
****
**

图32

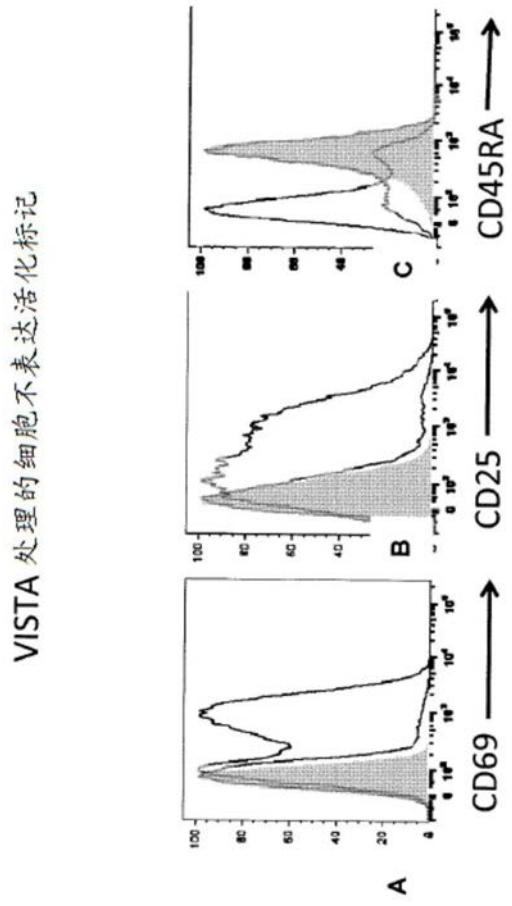

图33A-C

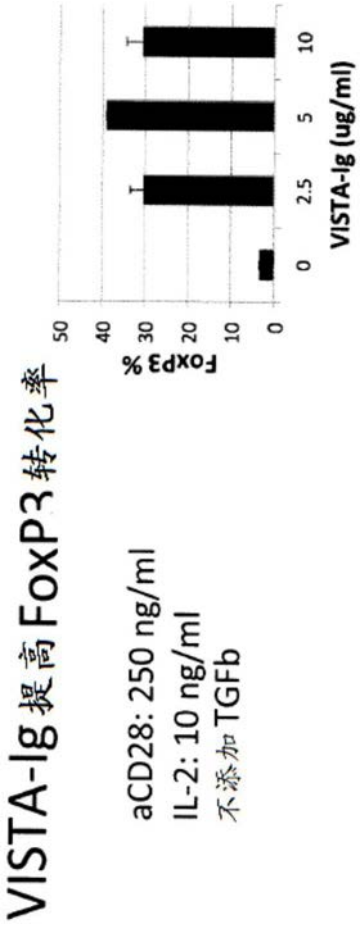
VISTA-Ig 提高 FoxP3 转化率
aCD28: 250 ng/ml
IL-2: 10 ng/ml
不添加 TGFb
FoxP3 %
0
10
20
30
40
50
0
2.5
5
10
VISTA-Ig (ug/ml)

图33D

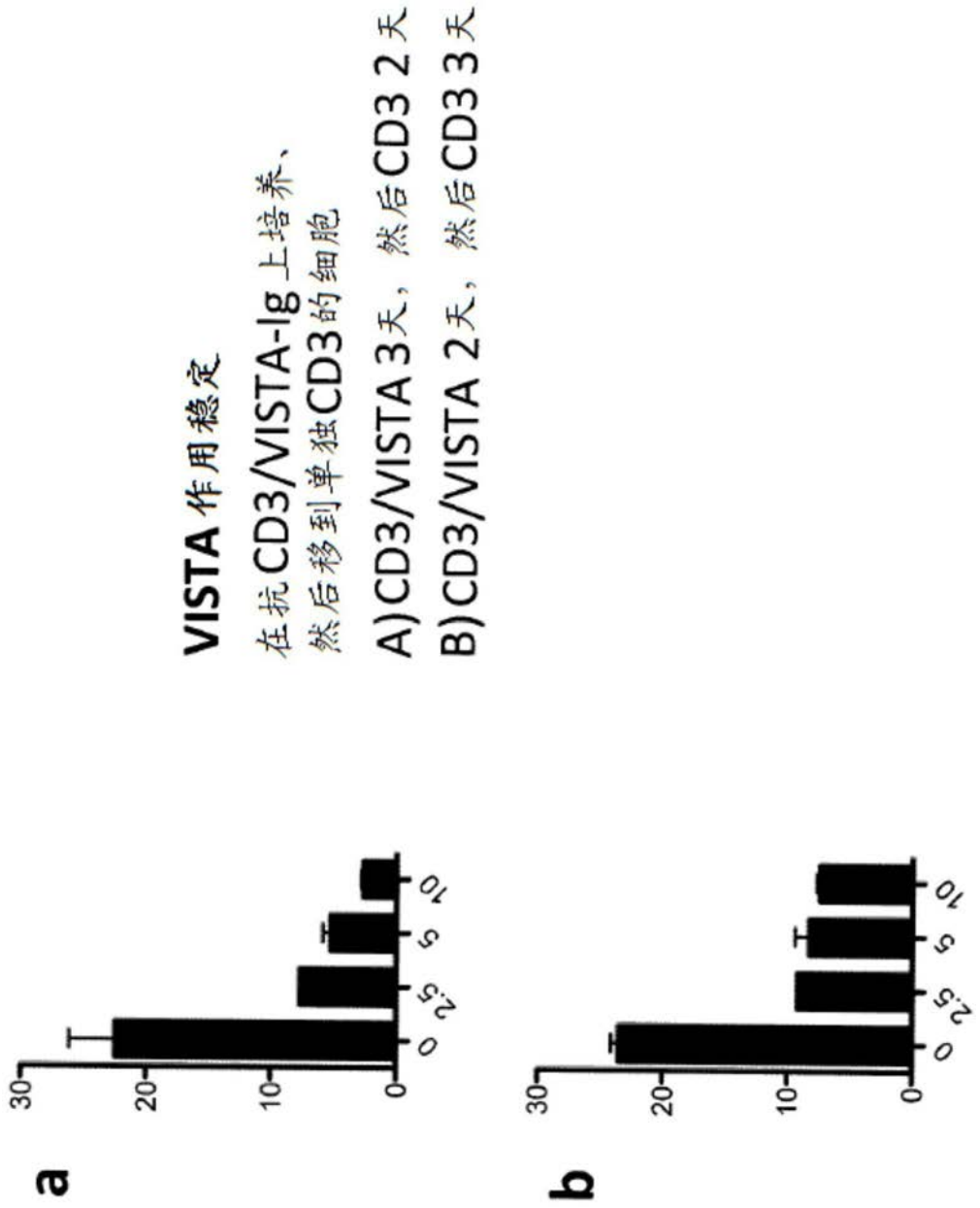
VISTA 作用稳定
在抗 CD3/VISTA-Ig 上培养、
然后移到单独 CD3 的细胞
A) CD3/VISTA 3 天，然后 CD3 2 天
B) CD3/VISTA 2 天，然后 CD3 3 天
a
b
30
20
10
0
0
2.5
5
10

图34

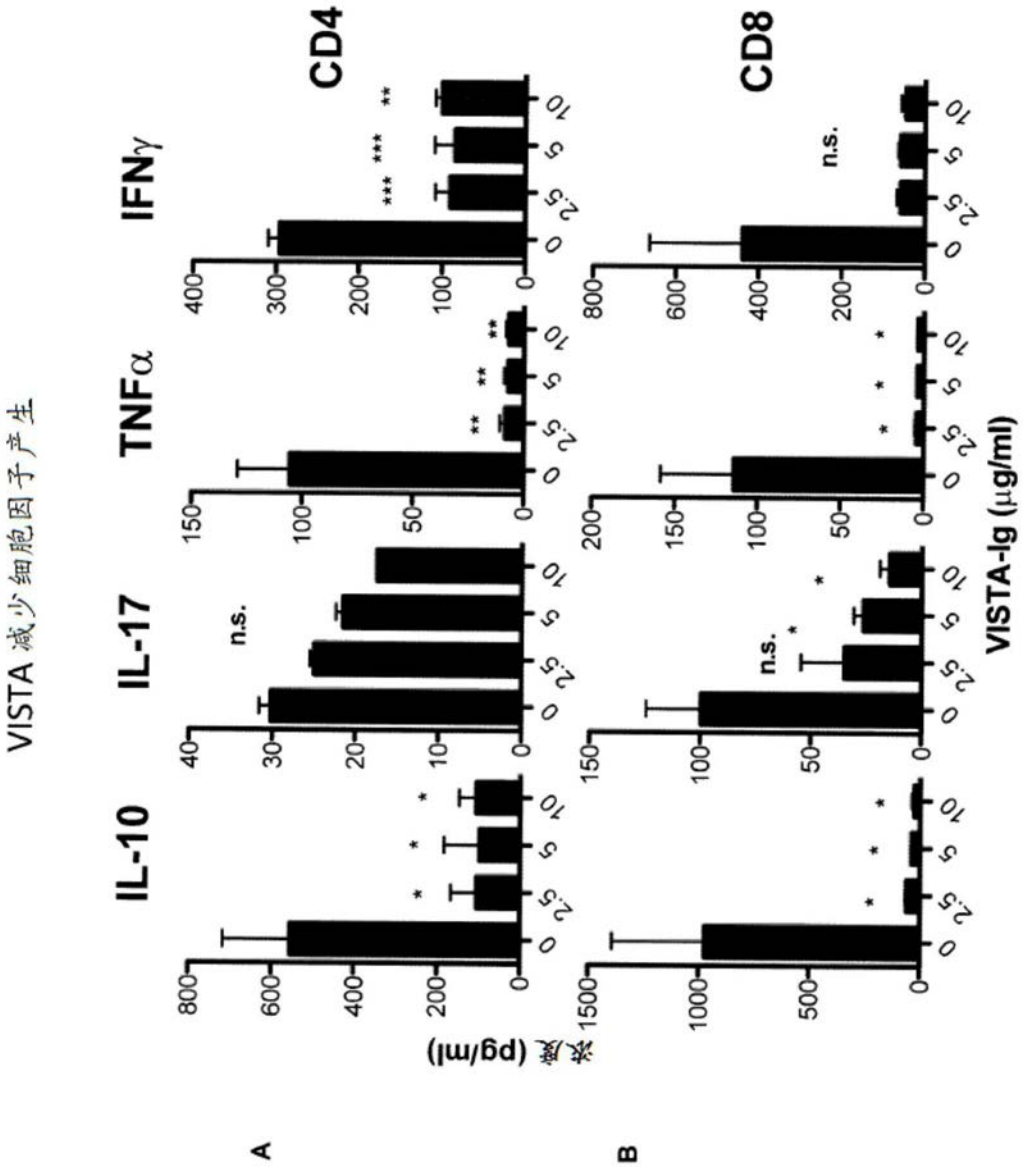
VISTA 减少细胞因子产生
IL-10
IL-17
TNFα
IFNγ
CD4
CD8
n.s.
细胞因子 (pg/ml)
VISTA-Ig (μg/ml)
A
B

图35

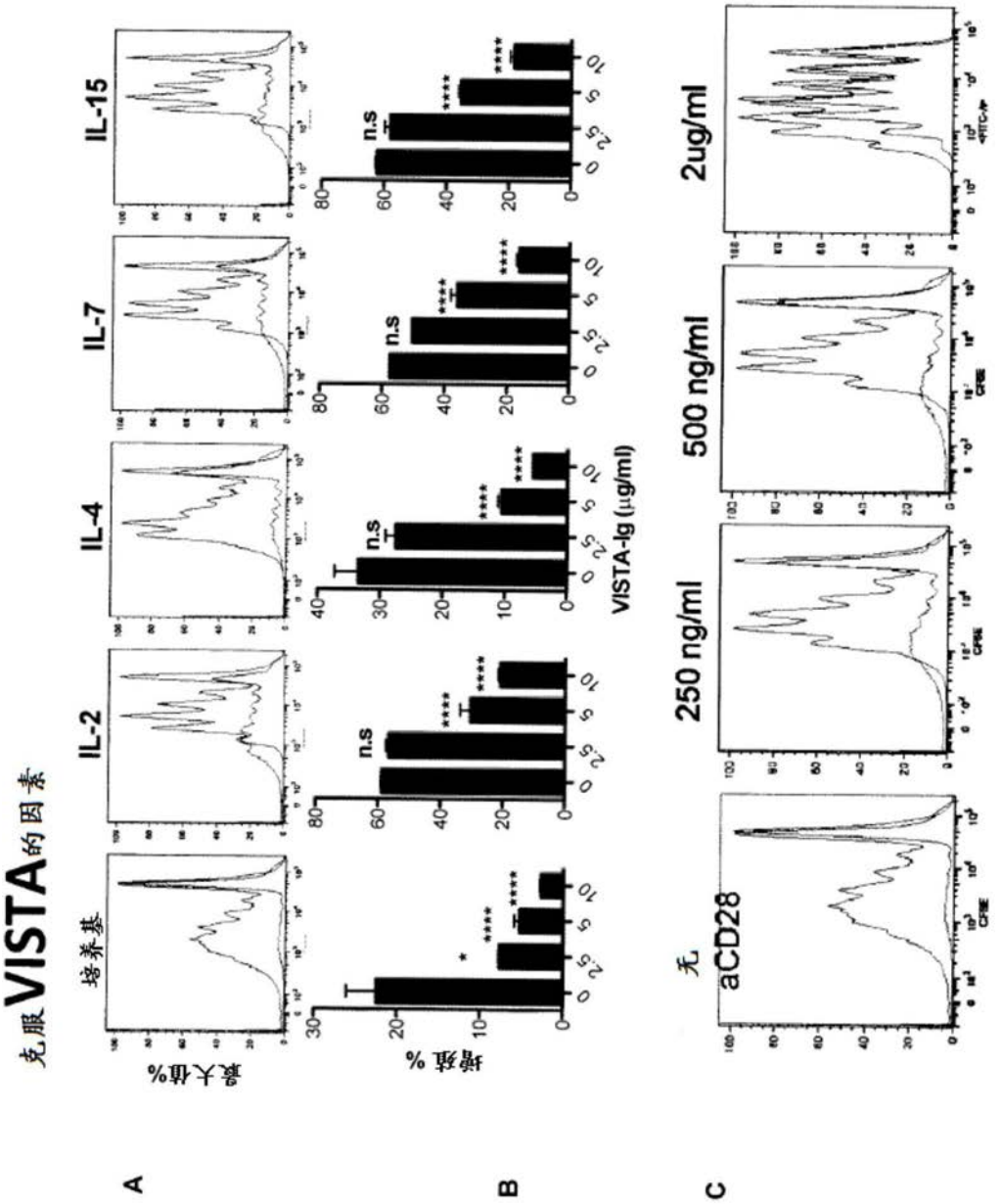
克服VISTA的因素
培养基
IL-2
IL-4
IL-7
IL-15
无
aCD28
250 ng/ml
500 ng/ml
2ug/ml
A
B
C
VISTA-Ig (μg/ml)
n.s
****

图36

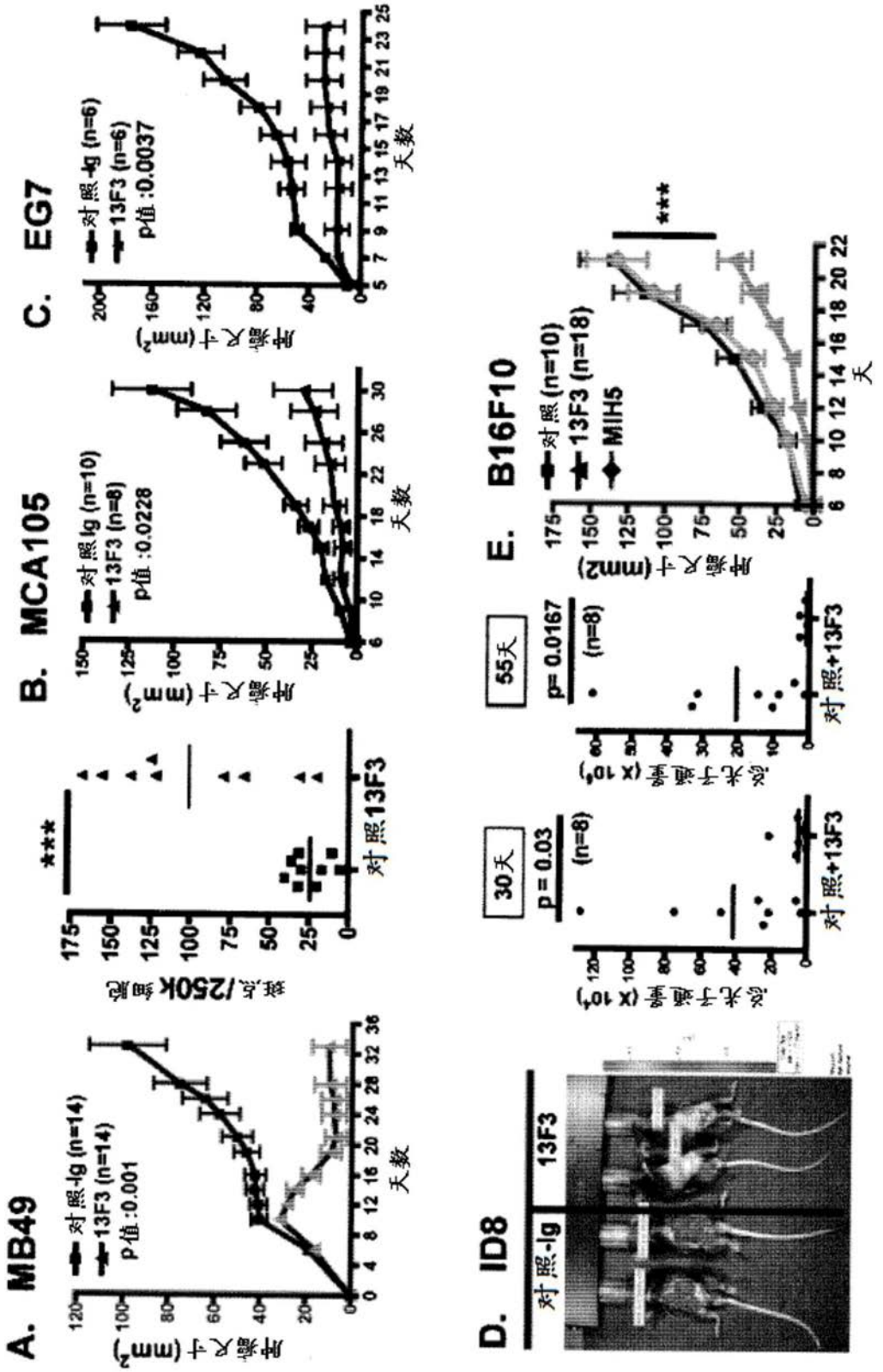
A. MB49
对照-Ig (n=14)
13F3 (n=14)
p值:0.001
肿瘤大小 (mm²)
天数
B. MCA105
对照 Ig (n=10)
13F3 (n=8)
p值:0.0228
肿瘤大小 (mm²)
天数
C. EG7
对照-Ig (n=6)
13F3 (n=6)
p值:0.0037
肿瘤大小 (mm²)
天数
***
斑点/250K 细胞
对照
13F3
对照13F3
D. ID8
对照-Ig
13F3
30天
p= 0.03
(n=8)
55天
p= 0.0167
(n=8)
对照+13F3
对照+13F3
E. B16F10
对照 (n=10)
13F3 (n=18)
MIH5
肿瘤大小 (mm²)
天
***

图37

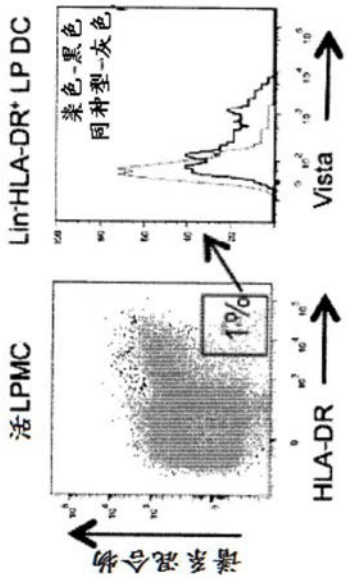

图38

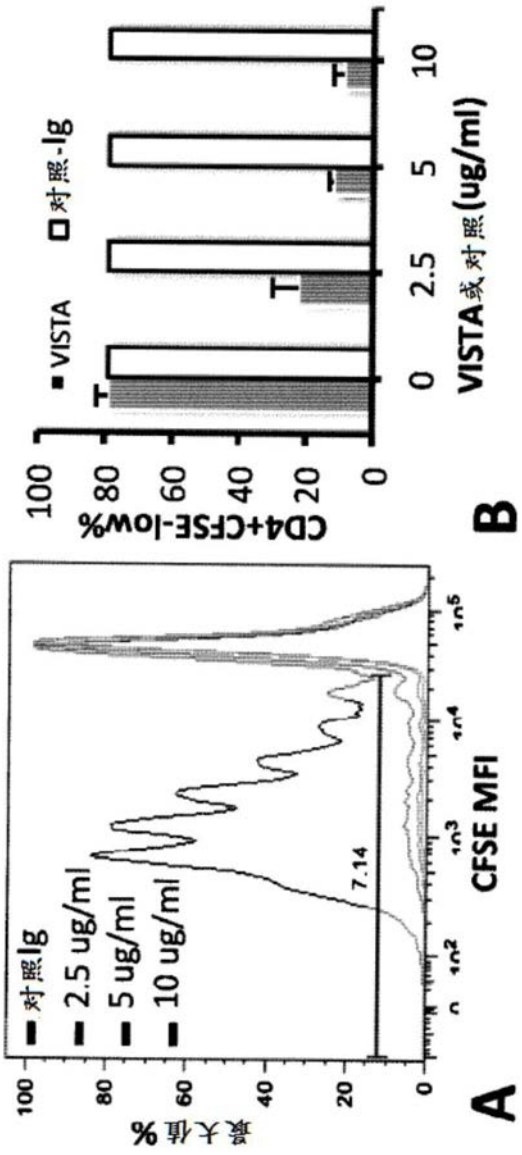
A
B
CFSE MFI
最大值%
对照Ig
2.5 ug/ml
5 ug/ml
10 ug/ml
7.14
CD4+CFSE-low%
VISTA
对照-Ig
VISTA或对照(ug/ml)

图39

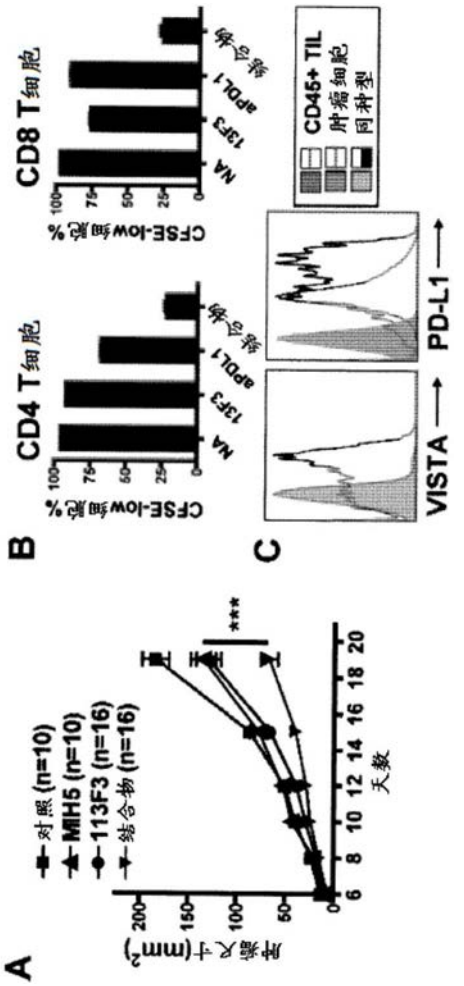
A
肿瘤尺寸(mm²)
对照 (n=10)
MIH5 (n=10)
113F3 (n=16)
结合物 (n=16)
天数
***
B
CD4 T细胞
CD8 T细胞
CFSE-low细胞%
NA
113F3
aPDL1
结合物
C
CD45+ TIL
肿瘤细胞
同种型
VISTA
PD-L1

图40

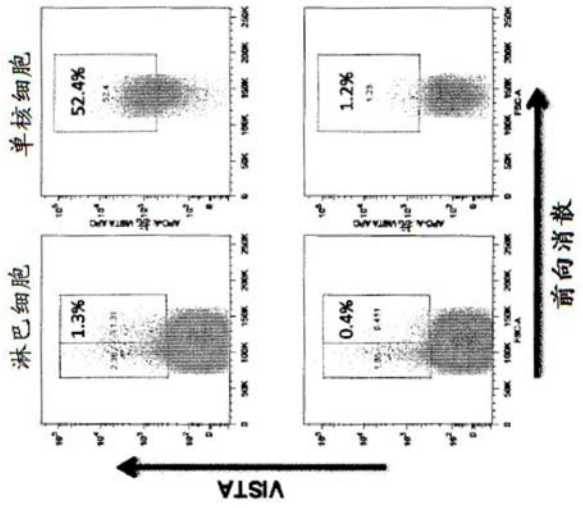
单核细胞
淋巴细胞
52.4%
1.2%
1.3%
0.4%
VISTA
前向消散

图41